

氏 名 石 原 悟

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第281号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Activation of Integrin-based Cell Adhesion in
Mouse L Fibroblasts Expressing Stabilized β
Catenin in the Nucleus

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 岡田 泰伸
教 授 池中 一裕
助 教 授 丸山 敬
教 授 月田 承一郎（京都大学）

論文内容の要旨

β catenin is involved not only in the cadherin-based cell adhesion system but also in the *Wnt* signaling pathway. In this pathway, it is supposed that β catenin is phosphorylated by glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) to become susceptible to degradation, that the *Wnt* signaling suppresses GSK-3 β to increase the amount of non-phosphorylated, stable β catenin, and that the stable β catenin affects the transcription of various genes in the nucleus. To separate the role of β catenin in intracellular signaling from its role in the cadherin-based cell adhesion, they constructed a mutant β catenin (*mbH*) with amino acid substitutions at its putative GSK-3 β phosphorylation site (GSKP sequence), and introduced it into L fibroblasts that lack the cadherin expression. In stable transfectants (LmbH), not only mbH but also endogenous wild type β catenin was stabilized. Green fluorescence protein (GFP) carrying the mutated GSKP sequence also stabilized the endogenous β catenin in L cells, indicating that the mutated GSKP sequence suppresses the degradation machinery for β catenin. Furthermore, by adding the nuclear localization signal to mbH, they obtained L transfectants (LmbHN) expressing the stabilized β catenin predominantly in the nucleus. Under the long-term aggregation conditions, LmbHN formed compact cell aggregates consisting mainly of 2-5 cells. LmbH also showed a similar aggregation activity but to a lesser extent, and parent L cells mostly remained to be dissociated. Close analyses by immunofluorescence microscopy and the cell adhesion inhibition assay with RGD peptides revealed that aggregation activity is attributed to the integrin-based cell adhesion. Considering that the amount of stabilized β catenin in the nucleus is significantly larger in LmbHN than in LmbH, they speculate that the accumulation of β catenin in the nucleus resulted in the activation of integrin-based cell adhesion. The transfectants established in this study, thus, will provide an advantageous system to selectively analyze the role of β catenin in the nucleus and in the regulation of integrin activity.

審査結果の要旨

β -カテニン、細胞接着分子であるカドヘリンと結合してその接着性を制御している。一方、 β -カテニンは、分泌蛋白質であるWntの刺激を受けて細胞内でその情報を核まで伝達する働きもすると考えられている。本研究では、 β -カテニンのWnt情報伝達系での機能を細胞レベルで解析するためのモデル系の開発を目指した。ショウジョウバエのWingless (Wntのホモログ) の情報伝達系の解析から脊椎動物でもWntの刺激のない時は、 β -カテニンがGSK-3と呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼによりリン酸化されることにより不安定化していると考えられている。したがって安定な β -カテニンはWntシグナリングのドミナントアクティブな因子として期待できる。そこで、 β -カテニンのアミノ酸33番から45番にあるGSK-3のリン酸化のコンセンサス配列のSまたはTをAに変え、この変異型 β -カテニンをカドヘリンを発現していないマウスL細胞に導入したところ、変異型 β -カテニンはL細胞内で安定に発現した。

L細胞には内在性の β -カテニンのmRNAは大量にあるが蛋白質は不安定であることが知られていたが、意外なことに、変異型 β -カテニンはこの内在性の β -カテニンまでも安定化した。そこでさらに、変異型 β -カテニンのC末端に核移行シグナルを組み込み、L細胞に導入した。その結果、安定な β -カテニンが核に濃縮するクローンが複数得られた。その細胞には、親株に比べて明らかに細胞基質間接着の亢進が見られ、低速での旋回培養を行うと2つから5つの細胞からなる凝集塊を形成した。この凝集塊を構成する細胞間にはファイブロネクチンとインテグリン $\alpha 5$ が濃縮していた。以上の結果から、少なくともL細胞で β -カテニンを核で安定に発現させるとインテグリン・ファイブロネクチンによる接着が亢進することが分かった。この細胞系は、 β -カテニンのシグナル伝達への関与をはじめ細胞レベルで解析することを可能にするものであり、この分野の今後の発展に寄与するシステムが確立されたと考えられる。よって本研究は博士論文として十分に価値のあるものと考えられる。

また、博士論文の内容のみならず、今後の研究方向や関連分野の研究動向についての口答試問を行ったが、すべてに対して適切で満足すべき答えを得ることができた。博士論文の内容はすでに英文学術専門誌に投稿されており、論旨も整然としており、英語力にも問題がないものと判定された。 β カテニンはカドヘリンを介しての細胞接着メカニズムに関与することはとてもよく知られているが、 β カテニンのもう1つの機能であるWntシグナル系の解明に新たな光を当てたにとどまらず、インテグリンを介しての細胞接着メカニズムへの関与という全く新しい興味深い発見をしたものであり、発表及び質疑応答に対しては自信に満ちた態度でのぞんでいた。今後、 β カテニンのリン酸化の具体的証拠の提出やin vivoにおける形態形成への実際の関与の証明など、多くの重要な課題がこれによって新たに生じたことに対しても、正しい認識と覚悟を示していた。