The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Afadin : A Novel Actin Filament-binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junction
Author(s)	萬代, 研二
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41257
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【 107 】

氏　　名	萬　代　研　二（まん だい けん じ）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　14265　号
学位授与年月日	平成11年2月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Afadin: A Novel Actin Filament-binding Protein with One PDZ Domain Localized at Cadherin-based Cell-to-Cell Adherens Junction (細胞間接着結合に存在するPDZドメインを有する新規アクチンフィラメント結合蛋白質：アファディン
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 堀　正二 (副査) 教 授 高井　義美　教 授 宮坂　昌之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

多細胞生物においては，細胞-細胞間あるいは細胞-細胞外基質間の接着機構は重要な機能を果たしている。これらの細胞接着部位においては膜貫通蛋白質や膜結合蛋白質による特別な膜の領域が形成され，さらにアクチンフィラメント（F-アクチン）などの細胞骨格が連結している。上皮細胞の細胞-細胞間接着は，密着結合，接着結合，接着斑といった構造よりなるが，これらのうち，密着結合，接着結合にはF-アクチンが連結している。本研究ではF-アクチンに結合する新規分子の単離を試みた。その結果，新規蛋白質，l-afadinを同定し，その性状解析を行い，本分子が細胞間接着結合を裏打ちするF-アクチン結合蛋白質の一つであることを明らかにした。

【方法ならびに成績】

1．l-afadin，s-afadinの単離，同定

ラット胎児脳の低塩抽出液を，種々のカラムクロマトグラフィーに供し，放射性ヨードでラベルしたF-アクチンによるオーバーレイ法によって検出される，SDS-PAGE上205 kDaの蛋白質（p205）を分離精製した。また，SDS-PAGE上190 kDaの蛋白質（p190）が，p205とパラレリズムを持って同時に精製された。最終精製産物よりそれぞれの蛋白質の部分アミノ酸配列を得た。これらのアミノ酸配列にもとづきプローブを作製しラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングし，p205，p190の遺伝子を得た。p205は1829アミノ酸よりなり，ほぼ中央部にPDZドメインを一ケ所，C末端部にプロリンに富む領域を三ケ所もつ蛋白質であった。p190は1663アミノ酸よりなり，p205のC末端部が欠損したスプライシングバリアントであった。p190は，ホモロジー検索により，一部の急性白血病において*ALL-1*遺伝子が結合し融合遺伝子を形成する相手として発見されたヒトの遺伝子*AF-6*と90%の相同性を示し，その長さもほぼ等しい為，*AF-6*のラットカウンターパートであることが示唆された。種々のリコンビナント蛋白質の検討により，p205のC末端部はF-アクチン結合ドメインであることが明らかにされた。p190はこのドメインを欠損していた。p205をl-afadin，p190をs-afadinと命名した。

2．l-afadinの生化学的性状解析

l-afadinとF-アクチンとの相互作用について検討した。F-アクチンの側方に結合するmyosin S1との競合実験を行った。検出はF-アクチンによるオーバーレイ法によった。過剰量のmyosin S1共存下ではl-afadinのF-アクチンへの結合は阻害されたが，myosin S1とF-アクチンとの結合を阻害するMgATP存在下では，l-afadinのF-アクチンへの結合が認められた。従って，l-afadinはF-アクチンの側方に結合することが示唆された。粘稠度を測定することによりF-アクチンに対する架橋形成能を検討したが，l-afadinには架橋形成能が殆ど認められなかった。アクチン結合ドメインのリコンビナント蛋白質を用い，F-アクチンとの共同沈降実験を行ったところアクチンモノマー500分子にl-afadin 1分子の割合で結合することが示された。また，その解離定数（Kd）は10^{-7} Mオーダーであった。

3．l-afadinの細胞内発現

l-afadin，s-afadinの臓器発現をウエスタンブロットにより検討した。l-afadinは検討した全ての臓器(心，脳，脾，肺，肝，骨格筋，腎，精巣)に発現を認め，s-afadinは脳に豊富な発現を認めた。l-afadinの細胞内分布を免疫組織化学により検討した。肝臓の凍結切片において，l-afadinは毛細胆管の接着装置に存在することが示唆された。心臓の凍結切片では介在板が濃染された。小腸吸収上皮細胞では，その水平断において細胞接着部位が全周性に線状に染色された。その縦断像では，E-cadherinに比べ接着装置部位により濃縮していることが観察された。また，密着結合に存在するZO-1に比べやや基底膜側に染色された。さらに，接着斑の蛋白であるdesmoplakinとの二重染色では両者の染色部位は一致しなかった。以上より，l-afadinは細胞間接着結合に存在することが示唆された。最後に，小腸吸収上皮のl-afadinの免疫電子顕微鏡的検討によりl-afadinが細胞間接着結合の裏打ち構造に存在することが明らかにされた。

【総括】

l-afadin，s-afadinの単離，同定と，l-afadinの性状解析を行った。l-afadinはPDZドメインを有する蛋白質であり，各種臓器に普遍的に発現し，生化学的にF-アクチンの側方に結合する蛋白質であることが明らかとなった。組織学的検討では細胞間接着結合に存在することが示された。以上より，l-afadinは，細胞間接着結合とアクチン細胞骨格を連結する蛋白質の一つであることが示された。さらに，l-afadinはPDZドメインやポリプロリン領域を介して何らかの蛋白質と結合することが予想され，同部位において種々の分子を束ねる機能を有することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ヒトを含む多細胞生物の基礎病態究明に欠かせない細胞接着の制御機構を明らかにする目的で，新規蛋白質l-afadinの単離とその遺伝子の同定，生化学的性状解析，組織学的解析を行ったものである。その結果，同蛋白質が各種臓器に普遍的に発現し，アクチン細胞骨格系と細胞間接着結合を直接連結させる機能を有することを示した。さらに，同蛋白質はそのPDZドメインやポリプロリン領域を介して他の蛋白質と結合することが予想され，同部位において種々の分子を束ねる機能を有する可能性があることを示した。

以上，本研究は細胞間接着結合に存在する新規F-アクチン結合蛋白質を単離，同定し，その性状を詳細に解析した独創的かつ重要な研究で，学位の授与に値するものと考えられた。