



Title	Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain-associated Proteins
Author(s)	橘, 公一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42570
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名	橘 公一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16032 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究生体制御医学専攻
学位論文名	Two Cell Adhesion Molecules, Nectin and Cadherin, Interact through Their Cytoplasmic Domain-associated Proteins (2つの細胞間接着分子ネクチンとカドヘリンはそれぞれの細胞内ドメイン結合蛋白質を介して相互作用する)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

【目的】

上皮細胞のアドヘレンスジャンクション(AJ)の主要な細胞間接着機構として、カドヘリン-カテニン系が知られている。接着分子カドヘリンは、その細胞内領域で β -、 α -カテニンなどの膜裏打ち蛋白質と結合してアクチン細胞骨格に連結している。最近、私共はカドヘリン-カテニン系とは異なる細胞間接着機構を見出し、ネクチン-アフアディン系と命名している。ネクチンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Ca^{2+} 非依存的な接着分子であり、アフアディンはアクチン結合蛋白質で、ネクチンをアクチン細胞骨格に連結している。ネクチンとアフアディンは共に上皮細胞のAJにカドヘリン-カテニン系より高度に濃縮している。また、アフアディンノックアウトマウスおよびアフアディンダブルノックアウトES細胞の解析から、アフアディンはAJやタイトジャンクション(TJ)の編成に重要な働きをしていることが明らかになっている。

本研究では、 α -カテニンを欠失させたF9細胞と、E-カドヘリンが欠失しているL細胞にこれらの接着機構の構成分子を発現させた種々の細胞株を用い、これら2つの細胞間接着機構ネクチン-アフアディン系とカドヘリン-カテニン系の相互作用を解析し、ネクチン-アフアディン系の機能を解明することを試みた。

【方法ならびに成績】

1) ネクチンとカドヘリンの連結における α -カテニンの関与についての検討

両接着系の連結に α -カテニンが関与していることを明らかにするために、 α -カテニンを欠失させたF9の細胞株F9D α (-/-)と、この細胞に再び α -カテニンを再現させた α F9D α (-/-)を用い、ネクチン、アフアディン、E-カドヘリンの局在を解析した。 α F9D α (-/-)ではE-カドヘリン、ネクチン、アフアディンは細胞間接着部位で同一の局在を示した。これに対してF9D α (-/-)ではE-カドヘリンは α F9D α (-/-)と同様の局在を示したが、ネクチンとアフアディンはE-カドヘリンとは局在が異なっていた。以上の結果からネクチン-アフアディン系は α -カテニンを介してE-カドヘリンと連結することが明らかとなった。

2) ネクチンとカドヘリンの連結に必要な α -カテニンの領域についての検討

細胞内領域を欠失させたE-カドヘリンと α -カテニンのN末端側半分(nE α N)あるいはC末端側半分(nE α C)のキメラタンパク質を発現させたnE α N-L細胞とnE α C-L細胞を用いて、ネクチンとアフアディンの局在を解析した。nE α N-L細胞では、ネクチンとアフアディンは共にカドヘリン依存性細胞間接着部位に局在

していなかった。これに対して、nE α C-L細胞ではネクチンとアフアディンは共に同接着部位に局在していた。以上の結果から、ネクチン-アフアディン系のカドヘリン依存性細胞間接着部位への局在には、 β -カテニンを必要とせず、 α -カテニンのC末端側半分が必要であることが明らかとなった。

3) アフアディンと α -カテニンの直接結合についての検討

アフアディンと α -カテニンの直接結合を検討するためにYeast Two-Hybrid法で解析を行った。 α -カテニンの全長ではアフアディンとの結合は認められなかったが、 α -カテニンのC末端側半分ではアフアディンとの結合が認められた。次に、Yeast Two-Hybrid法の結果をin vitroの系で確認するためにaffinity chromatographyを行ったが、アフアディンと α -カテニンC末端側はstoichiometricalには結合しなかった。また、COS7細胞にFLAGタグの付いたアフアディンの全長と、HAタグの付いた α -カテニンのC末端側半분을共発現させ、抗FLAG抗体あるいは抗HA抗体で免疫沈降実験を行ったところ、いずれも共沈しなかった。以上の結果から、アフアディンと α -カテニンの連結機構は単純なものではなく、他の因子による制御やそれぞれのタンパク質の翻訳後修飾などが必要であると考えられた。

4) ネクチン依存性細胞間接着部位への α -カテニンのリクルートに関する検討

全長のネクチン-2 α を恒常的に発現するL細胞(Nectin-2 α -L細胞)、あるいはネクチン-2 α のC末端のアフアディン結合モチーフを欠いたネクチン-2 α - Δ Cを恒常的に発現するL細胞(Nectin-2 α - Δ C-L細胞)に α -カテニンを一過性に発現させ、その局在を解析した。Nectin-2 α -L細胞において α -カテニンはネクチン依存性細胞間接着部位に局在していたが、Nectin-2 α - Δ C-L細胞では同接着部位に濃縮していなかった。以上の結果から、 α -カテニンはE-カドヘリン非存在下でもネクチン依存性細胞間接着部位にアフアディンを介してリクルートされることが明らかとなった。

5) ネクチン依存性細胞間接着部位へのE-カドヘリンのリクルートに関する検討

全長のネクチン-1 α を恒常的に発現するL細胞(Nectin-1 α -L細胞)、あるいはL細胞にE-カドヘリンを安定に発現させた細胞株であるEL細胞(Nectin-1 α -EL細胞)と、ネクチン-1 α のC末端のアフアディン結合モチーフを欠いたネクチン-1 α - Δ Cを恒常的に発現するEL細胞(Nectin-1 α - Δ C-EL細胞)を混合培養し、E-カドヘリンの局在を解析した。カドヘリンがトランス結合しないL細胞、EL細胞間の接着に着目して観察を行ったところ、Nectin-1 α -L細胞/Nectin-1 α -EL細胞による細胞間接着部位にE-カドヘリンは濃縮したが、Nectin-1 α -L細胞/Nectin-1 α - Δ C-EL細胞による細胞間接着部位にはE-カドヘリンは濃縮しなかった。以上の結果から、E-カドヘリンはトランス結合を形成しなくても、ネクチン依存性細胞間接着部位にアフアディンを介してリクルートされることが明らかとなった。

【総括】

私は、ネクチンとカドヘリンがアフアディンと α -カテニンのC末端側半분을介して連結していることを明らかにした。また、カドヘリンの細胞間のトランス結合の形成とは関係なく、ネクチン-アフアディン複合体はE-カドヘリン- β -カテニン複合体を α -カテニンを介して、ネクチン依存性細胞間接着部位にリクルートする機能を有していることも明らかにした。以上の結果から、ネクチン-アフアディン系とカドヘリン-カテニン系の相互作用によるAJの形成には次のような2つのモデルが考えられる。1つは、ネクチンとカドヘリンがそれぞれ独立してトランス結合した後、ネクチン-アフアディン系とカドヘリン-カテニン系がお互いをリクルート、クラスタリングすることによってコンパクトなAJを形成するというモデルである。他の1つは、ネクチンがまずトランス結合することによってアフアディンを介して α -カテニン、 β -カテニンと共にトランス結合していないカドヘリンをリクルートした後、カドヘリンがトランス結合することによってネクチンをクラスタリングするとともにコンパクトなAJが形成されるモデルである。いずれのモデルにおいても、これらの2つの細胞間接着機構は同じ細胞間接着部位に局在し、協調的に作用してAJやTJの形成を制御していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、アドヘレンスジャンクションにおける細胞間接着機構であるネクチン-アファディン系とカドヘリン-カテニン系の相互作用を解析した。その結果、接着分子ネクチンとカドヘリンは、それぞれの細胞内ドメイン結合蛋白質であるアファディンと α -カテニン（C末端側半分）を介して連結していることを明らかにした。さらに、カドヘリンの細胞間のトランス結合の形成とは関係なく、ネクチン-アファディン複合体はE-カドヘリン- β -カテニン複合体を α -カテニンを介して、ネクチン依存性細胞間接着部位にリクルートする機能を有していることも明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に十分値すると思われる。