



Title	Afadin : A Key Molecule Essential for Structural Organization of Cell-Cell Junctions of Polarized Epithelia during Embryogenesis
Author(s)	池田, わたる
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42575
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

氏名	池田 わたる
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16031 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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Afadin: A Key Molecule Essential for Structural Organization of Cell-Cell Junctions of Polarized Epithelia during Embryogenesis (アファディン: 初期発生における極性上皮の細胞間接着形成に重要な分子)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美
	(副査) 教授 岡野 栄之 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

【目的】

上皮細胞の細胞間接着には、バリアやフェンスとして機能するタイトジャンクション (TJ)、機械的に強固な細胞間接着を担うアドヘレンスジャンクション (AJ) が頂上部から順に配列している。TJ には接着分子としてクローディンとオクルーディンが存在し、これらは細胞内の裏打ちタンパク質 ZO-1、-2、-3 と結合し、アクチン細胞骨格と連結している。一方、AJ には接着分子としてカドヘリンが存在し、 β -カテニンや α -カテニンと結合し、アクチン細胞骨格と連結している。私共は最近、少なくとも接着分子ネクチンと、アクチン結合タンパク質アファディンから構成される新しい細胞間接着系を見出している。ネクチンは少なくともネクチン-1、-2、-3 からなるファミリーを形成しており、アファディンはネクチンをアクチン細胞骨格に連結している。ネクチン-アファディン系はカドヘリン-カテニン系と同様に AJ に局在して細胞間接着機構を構成しているが、ネクチン-アファディン系の生理的機能は明らかではなかった。

本研究では、細胞間接着形成におけるネクチン-アファディン系の機能を理解するために、アファディンノックアウト (KO) マウスおよびアファディンダブルノックアウト (DKO) ES 細胞を作成し、その解析を行った。

【方法ならびに成績】

1) 野生型マウス胎生初期におけるアファディンの発現パターン

抗アファディン抗体を用いて凍結切片および whole-mount による免疫染色を行った。アファディンは胚性組織である外胚葉や中胚葉に由来する再構築の活発な上皮構造（神経ヒダ、神経管、体腔、体節など）における AJ に強く検出され、胚外性組織（卵黄嚢や臓側内胚葉など）ではほとんど認められなかった。

2) アファディン KO マウスの作成

アファディン遺伝子のエクソン 2 をネオマイシン耐性遺伝子に置換し、アファディン遺伝子を破壊した。ヘテロ KO (Afa^{+/−}) マウスには異常は認められなかったが、Afa^{−/−} マウスは胎生10.5日には死亡した。

3) アファディン KO マウスの解析

胎生7.5～9.5日にかけての胎生初期における形態解析では、Afa^{−/−} マウスは神経ヒダや体節などの構造物が形成されず、外胚葉上皮は異常な湾曲を示した。さらに、神経ヒダに相当する部分には細胞塊が認められた。しかし、野生型マウスにおいてアファディンの発現が認められなかった胚外性組織では Afa^{−/−} マウスにおいて特に異常が

認められなかった。つぎに、Afa^{-/-}マウスの中胚葉発生について解析するために、原始線条マーカーである Brachyury の *in situ* hybridization、そして中胚葉マーカーである PDGFR α や Flk-1 の免疫染色を行った。Afa^{-/-}マウスには野生型マウスと同様に原始線条から中胚葉が発生していることが明らかとなった。しかし、Afa^{-/-}マウスでは外胚葉上皮が異常な湾曲を示し、その結果、中胚葉細胞の異常な遊走がみられた。

4) アファディン KO マウスの胚性外胚葉上皮の解析

Afa^{-/-}マウスの表現型はアファディンの発現が強く見られた胚性外胚葉の異常が原因であると考えられた。そこで、外胚葉の細胞間接着の形成を AJ のマーカーである E-カドヘリンと、TJ のマーカーである ZO-1 の免疫染色で解析した。野生型マウスにおける神経ヒダなどの胚性外胚葉は丈の高い一層の上皮構造をとり、E-カドヘリンは AJ に濃縮し、ZO-1 は TJ に局在していた。一方、Afa^{-/-}マウスの神経ヒダに相当する部分では、細胞が極性を失い、ランダムな接着をして細胞塊を形成していた。その細胞塊において、E-カドヘリンは細胞全周性に分布し、ZO-1 はランダムなドット状に分布していた。

5) アファディン DKO ES 細胞の作成および解析

Afa^{-/-}マウスの表現型を *in vitro* で解析するために、アファディン DKO ES 細胞を樹立した。野生型の ES 細胞を *in vitro* で分化させると、内胚葉と外胚葉の 2 層の上皮構造からなる球体の構造物 embryoid body (EB) が形成される。アファディン DKO EB では、外胚葉の上皮構造が形成されなかった。また、アファディンの発現が認められなかった内胚葉には異常が検出されなかった。E-カドヘリンや ZO-1 を免疫染色したところ、外胚葉に相当する部分において E-カドヘリンは細胞の全周性に、ZO-1 はランダムなドット状に分布し、Afa^{-/-}マウスと同様に異常な分布を示した。

【総括】

私はアファディン KO マウスおよびアファディン DKO ES 細胞を作成し、細胞間接着形成におけるアファディンの機能解析を行った。その結果、胎生初期におけるアファディンの発現パターンと Afa^{-/-}マウスの表現型から、アファディンは活発に再構築される上皮構造の形成過程において、特に重要な働きをする分子であることを明らかにした。また、アファディンの欠失によって胚性外胚葉上皮の E-カドヘリンや ZO-1 の局在が異常になることから、アファディンが AJ や TJ の編成をする分子であることを明らかにした。アファディンが AJ や TJ の編成をする詳細な分子機構は明らかではないが、アファディンの欠失によりネクチンの細胞間接着活性や局在が異常となり、結果として上皮構造の形成が障害されている可能性が考えられる。最近、私共はネクチンが細胞内アファディンを介して α -カテニン、 β -カテニン、そしてカドヘリンを細胞間接着部位にリクルートしていくことを明らかにしている。さらに、ネクチンはアファディンを介して ZO-1 をリクルートしていくことも明らかにしている。したがって、ネクチン-アファディン系はこれらの機能を介して 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、本研究において新しい細胞間接着機構ネクチン-アファディン系の構成分子アファディンのノックアウトマウスを作成し、ネクチン-アファディン系の生理的機能の解析を試みた。その結果、胎生初期におけるアファディンの発現パターンとアファディンノックアウトマウスの表現型から、アファディンは活発に再構築される上皮構造の形成過程において、特に重要な働きをする分子であることを明らかにした。また、アファディンの欠失によって胚性外胚葉上皮の E-カドヘリンや ZO-1 の局在が異常になることから、アファディンがアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションの形成に重要な働きをする分子であることを明らかにした。

本研究の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いえる。したがって、学位授与に十分値するものと考えられる。