

Title	Nectin/PRR : An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein
Author(s)	高橋, 健一
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43120
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	高橋 健一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 16442 号
学位授与年月日	平成13年6月5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	Nectin/PRR : An Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecule Recruited to Cadherin-based Adherens Junctions through Interaction with Afadin, a PDZ Domain-containing Protein (ネクチン/PRR : PDZ ドメイン含有蛋白質アフアディンとの結合を介してカドヘリンをベースとしたアドヘレンスジャンクションにリクルートされるイムノグロブリン様接着分子)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 中村 敏一

論文内容の要旨

【目的】

細胞間接着の機能ユニットは接着分子とそれを裏打ちする細胞内蛋白質より構成されており、接着分子はその裏打ち蛋白質を介して細胞骨格と連結し、特殊な細胞膜ドメインを形成している。上皮細胞のアドヘレンスジャンクション (AJ) では、カドヘリンが必須の接着分子として機能しており、細胞内で β および α -カテニンなどの膜裏打ち蛋白質と結合し、アクチン細胞骨格と連結している。最近私共の研究室は、新しいアクチンフィラメント結合蛋白質であるアフアディンを見出し、アフアディンが、カドヘリン-カテニン系と共に種々の細胞の AJ に局在し、上皮細胞ではカドヘリン-カテニン系より高度に AJ に濃縮していることを明らかにしている。また、アフアディン遺伝子欠損マウスの解析から、アフアディンが AJ やタイトジャンクション (TJ) の形成に必須の役割を果たしていることも明らかにしている。アフアディンには、その中央部に PDZ ドメイン、その C 末端側に 3 つのポリプロリン領域、C 末端にアクチンフィラメント結合ドメインが存在する。PDZ ドメインは細胞膜貫通蛋白質に見られる特徴的な C 末端モチーフに結合することが知られており、アフアディンは AJ に局在する何らかの細胞膜貫通蛋白質に結合していることが考えられた。

そこで本研究では、アフアディンに結合する膜貫通蛋白質の同定を試み、その蛋白質の性状解析を行った。

【方法ならびに成績】

1) アフアディンに結合する細胞膜貫通蛋白質の同定

Yeast two-hybrid 法を用いて、アフアディンに結合する分子を検索した。その結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜貫通蛋白質を得て、ネクチンと命名した。ネクチンは、機能が不明である poliovirus receptor-related protein (PRR) と同一であった。ネクチンは、ネクチン-1 と-2 の少なくとも 2 種のメンバーから構成されるファミリーを形成し、ネクチン-2 はさらに α および δ のスプライシングバリエーションが存在した。また、それぞれのメンバーはその C 末端に 4 アミノ酸 (E/A-X-Y-V) の特徴的なモチーフを有していた。

2) ネクチンとアフアディンの結合

Yeast two-hybrid 法にて、アフアディンの PDZ ドメインがネクチン-1、-2 α 、-2 δ の細胞内領域に結合した。また、アフアディン-アフィニティークロマトグラフィー法にて、アフアディンの PDZ ドメインは、ネクチン-1 の細胞内領域と 1 : 1 の割合で結合した。さらに、³⁵S-メチオニン標識のアフアディンによるオーバーレイ法によって、ネクチン-1、-2 α 、

-2δのC末端の4アミノ酸のモチーフが、アファディンとの結合に必須であることが明らかとなった。次に、in vivoでのネクチンとアファディンの結合を確認するため、マウス肝細胞とマウス乳腺上皮由来細胞株 MTD-1A 細胞からネクチン-2を免疫沈降した。その結果、ネクチン-2とアファディンが共沈した。また、ネクチン-1、-2αまたは-2δとアファディンを強性発現させた COS7 細胞からの免疫沈降実験で、各ネクチンとアファディンは共沈した。

3) ネクチンの上皮および非上皮細胞における局在

マウスの小腸吸収上皮において、ネクチン-2はアファディンと共に、E-カドヘリンに比べて高度に AJ に濃縮していた。さらに、免疫電顕によって、ネクチン-2が AJ に局在していることを確認した。また、心筋細胞や、カドヘリンが発現していない L 線維芽細胞にカドヘリンを強制発現させた EL 細胞などの非上皮細胞においても、ネクチン-2はアファディンと共に、カドヘリンをベースとした AJ に局在していた。

4) カドヘリンをベースとした AJ へのネクチンのリクルート

ネクチン-1 またはその C 末端の 4 アミノ酸を欠失させた変異体 (ネクチン-1ΔC) を EL 細胞に発現させると、ネクチン-1はカドヘリンをベースとした AJ にリクルートされたが、ネクチン-1ΔC は AJ にリクルートされなかった。したがって、ネクチンはアファディンを介してカドヘリン-カテニン系と連結していることが明らかとなった。

5) ネクチンの細胞接着活性

ネクチン-1 またはネクチン-2αを強制発現させた L 細胞を用いて、ネクチンの細胞接着活性を検討した。その結果、ネクチン-1 と-2αは共にホモフィリックな Ca²⁺非依存性の細胞接着活性を示した。

【総括】

私は、アファディンと結合する細胞膜貫通蛋白質としてネクチンを同定し、その性状解析を行った。ネクチンは、Ca²⁺非依存性のホモフィリックな細胞接着活性を示し、上皮および非上皮細胞の AJ に局在していることを明らかにした。さらに、ネクチンはアファディンを介してカドヘリン-カテニン系と連結していることも見出した。最近私共は、ネクチンファミリーの新しいメンバーであるネクチン-3を単離し、ネクチン-3もネクチン-1および-2と同様な性状を示すことを見出すと共に、ネクチン-3はネクチン-1または-2とヘテロフィリックな細胞接着活性も示すことを明らかにしている。また、私共の研究室では、ネクチンがアファディンを介してαおよび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くる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 TJ の構成分子である ZO-1 をリクルートしてくることも見出している。したがって、アファディン遺伝子欠損マウスの解析結果と考え合わせると、ネクチンは AJ や TJ の形成を制御していると考えられる。一方、ネクチンはαヘルペスウィルスの受容体 (Hve と命名) であることが明らかとなっており、私共は、ネクチンとアファディンの結合がαヘルペスウィルスの細胞間伝搬に重要な役割を果たすことを見出している。また、ネクチン-1は口唇裂・口蓋裂を特徴とする ectodermal dysplasia の原因遺伝子であることが報告されている。このように、ネクチンは種々の病態にも関与しており、ネクチンのさらなる解析は、個体発生における形態形成や神経回路網の形成と共に、炎症、損傷治癒、がんなどの病態の解明に役立つものと期待される。

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局在しているアクチンフィラメント結合蛋白質アファディンと相互作用する細胞膜貫通蛋白質の単離を試み、ネクチンの同定に成功している。さらに、ネクチンの性状解析を行い、ネクチンが免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Ca²⁺非依存性の細胞接着分子であることを明らかにした。また、ネクチンはアファディンを介してアクチン細胞骨格に連結するとともに、アドヘレンスジャンクションにおいてカドヘリン-カテニン系と連結していることを明らかにした。

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考えられる。