OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	α-Catenin-independent Recruitment of ZO-1 to Nectin-based Cell-Cell Adhesion Sites through Afadin
Author(s)	横山, 茂和
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43689
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	横山茂和（よこやま しげかず）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第16823号
学位授与年月日	平成14年3月25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	α-Catenin-independent Recruitment of ZO-1 to Nectin-based Cell-Cell Adhesion Sites through Afadin （α-カテニンに依存しない、アファディンを介した、ZO-1のネクチンをベースとした細胞間接着部位へのリクルート）
論文審査委員	（主査） 教授 高井 義美 （副査） 教授 門田 守人　教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

ZO-1は、上皮細胞のタイトジャンクション（TJ）に局在するF-アクチン結合蛋白質であり、接着分子クローディンやJAMと結合して、それらをアクチン細胞骨格に連結している。TJを有しない非上皮細胞では、ZO-1はアドヘレンスジャンクション（AJ）に局在している。AJでは、カドヘリンがβ-カテニン、α-カテニンと結合してアクチン細胞骨格と連結している。これまで、ZO-1はα-カテニンと直接結合してAJに局在することが報告されている。一方、私共の研究室では、接着分子ネクチンと、それをアクチン細胞骨格に連結させるF-アクチン結合蛋白質アファディンから構成されるAJの新しい細胞間接着機構を見出している。ネクチン-アファディン系とカドヘリン-カテニン系はアファディンとα-カテニンを介して連結しており、AJの形成を制御している。また、ネクチン-アファディン系はTJの形成にも関与している。

本研究では、ZO-1のAJへの局在化機構におけるネクチン-アファディン系の役割を解析した。

【方法ならびに成績】

1）E-カドヘリンをベースとしたAJでのZO-1とネクチン-アファディン系の共局在

カドヘリンが欠損しているL細胞にE-カドヘリンとネクチン-2を共に強制発現させ、ZO-1の局在を免疫染色法にて検討した。ZO-1は、ネクチン-2、アファディンと共にE-カドヘリンをベースとしたAJに局在した。また、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（nEαN）あるいはC末端側半分（nEαC）のキメラタンパク質をL細胞に強制発現させ、ZO-1の局在を検討した。ZO-1と内在性ネクチン-2は、nEαCをベースとした細胞間接着部位に局在したが、nEαNをベースとした細胞間接着部位に濃縮しなかった。以上の結果から、ZO-1はネクチン-アファディン系と共にE-カドヘリンをベースとしたAJに局在し、これらの蛋白質の共局在は、α-カテニンのC末端に依存していることが明らかになった。

2）ネクチンをベースとした組胞接着部位へのZO-1のリクルート

全長のネクチン-2を強制発現させたL細胞（ネクチン-2-L細胞）とアファディンと結合できないネクチン-2のミュータント（ネクチン-2-ΔC）を強制発現させたL細胞（ネクチン-2-ΔC-L細胞）を用いて、ZO-1の局在を検討した。ZO-1はアファディンと共に、ネクチン-2をベースとした細胞間接着部位に局在したが、ネクチン-2-ΔCをベースとし

た細胞間接着部位には濃縮しなかった。以上の結果から、ZO-1はアファディンを介してネクチンをベースとした細胞間接着部位にリクルートされることが明らかになった。

3）ZO-1とネクチン-アファディン系との間接的結合

ネクチン-2-L 細胞からネクチン-2を免疫沈降させると、ZO-1とアファディンが共沈した。一方、ネクチン-2-ΔC-L 細胞からネクチン-2-ΔC を免疫沈降させると、ZO-1とアファディンは共沈しなかった。アフィニティークロマトグラフィーでは、ZO-1はネクチン-2とアファディンに直接結合しなかった。以上の結果から、ZO-1はアファディンを介してネクチンに結合するが、ZO-1とアファディンの結合も直接的ではなく、何らかの因子が必要であることが示唆された。

4）ネクチンをベースとした細胞間接着部位への ZO-1とα-カテニンの同時リクルート

ネクチン-2-L 細胞とネクチン-2-ΔC-L 細胞にα-カテニンを強制発現させた結果、アファディンに依存して ZO-1とα-カテニンが同時にネクチンをベースとした細胞間接着にリクルートされることが明らかになった。

5）α-カテニンに依存しない、ZO-1とネクチン-アファディン系の共局在

α-カテニンの欠失させた F9Dα(-/-) 細胞と、この細胞に再びα-カテニンを発現させたαF9Dα(-/-) 細胞を用いて、ZO-1の局在を検討した。αF9Dα(-/-) 細胞では、ZO-1は E-カドヘリン、ネクチン-2、アファディンと共に AJ に局在した。一方、F9Dα(-/-) 細胞では、ネクチン-2と E-カドヘリンの局在は異なり、ZO-1の局在は、ネクチン-2、アファディンの局在と一致したが、E-カドヘリンの局在とは一致しなかった。以上の結果から、E-カドヘリンをベースとした AJ への ZO-1のリクルートはα-カテニンに依存するが、ネクチンをベースとした細胞間接着部位への ZO-1のリクルートはα-カテニンに依存しないことが明らかになった。

【総括】

私は、ZO-1がネクチンをベースとした細胞間接着部位にリクルートされ、このリクルートはα-カテニンとの結合を介してではなく、アファディンとの間接的結合を介して行われることを見出した。このことから、非上皮細胞の AJ への ZO-1の局在化は、カドヘリン-カテニン系のみならずネクチン-アファディン系を介して行われていると考えられる。一方、極性がよく発達した上皮細胞では、ZO-1は TJ においてクローディンや JAM と結合しており、カドヘリン-カテニン系とネクチン-アファディン系に結合していない。しかし、上皮細胞の細胞間接着の形成過程では、カドヘリン-カテニン系、ネクチン-アファディン系、JAM、ZO-1がまず細胞間接着部位に濃縮し、遅れてクローディンが濃縮する。一旦、TJ が形成されると、ZO-1は TJ にリクルートされる。最近、私共の研究室では、ネクチン-アファディン系が JAM を細胞間接着部位にリクルートすることを明らかにしつつある。したがって、ネクチン-アファディン系による TJ 形成の制御メカニズムとして、まずネクチン-アファディン系が ZO-1との結合を介して JAM を細胞間接着部位にリクルートし、続いて JAM がクローディンをリクルートして TJ が形成される可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞の細胞間接着には、タイトジャンクション（TJ）とアドヘレンスジャンクション（AJ）が存在し、細胞の接着・極性・増殖・運動等の様々な重要な細胞機能を司る分子が集積している。これら機能分子の集積機構として、ZO-1は重要な役割を担っている。ZO-1は上皮細胞においては TJ に局在し、TJ を有しない非上皮細胞では AJ に局在する。一方、接着分子ネクチンと、それをアクチン細胞骨格に連結させる F-アクチン結合蛋白質アファディンから構成される新しい細胞間接着機構が AJ に局在し、AJ と TJ のオーガナイザーとして機能している。本申請者は、本研究において、ZO-1の局在化機構を解析し、ネクチン-アファディン系が ZO-1と間接的に結合し、ZO-1の局在化に重要な役割を果たしていることを明らかにした。したがって、ネクチン-アファディン系は、ZO-1の細胞間接着への局在化を決定し、ZO-1による機能分子の集積作用を介して AJ や TJ をオーガナイズしていると考えられる。

このように、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。