



Title	Role of nectin in organization of tight junctions
Author(s)	福原, 淳範
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43862
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

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	福原 淳範
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17610 号
学位授与年月日	平成 15 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	Role of nectin in organization of tight junctions (タイトジャンクション形成におけるネクチンの役割)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 松澤 佑次 教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

[目的]

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) がある。TJ には接着分子クローディン、オクルーディン、JAM が局在し、細胞内で ZO-1 と結合している。AJ には接着分子カドヘリン、ネクチンが局在し、細胞内でそれぞれカテニン、アファディンと結合している。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カルシウム非依存的な接着分子であり、アファディンはアクチン結合タンパク質で、ネクチンをアクチン細胞骨格に連結している。これまでにネクチンーアファディン系がカドヘリンーカテニン系と協調的に作用することにより AJ の形成を制御していることが明らかになっている。さらに、アファディンノックアウトマウスおよびアファディンダブルノックアウト ES 細胞の解析から、アファディンは、AJ のみでなく、TJ の形成にも重要な働きをしていることが示唆されている。本研究では、TJ 形成におけるネクチンーアファディン系の役割を解析した。

[方法ならびに結果]

カルシウムスイッチによる細胞間接着の再形成におけるクローディン、オクルーディン JAM の局在についての検討

TJ 再形成におけるネクチンの役割をネクチン阻害剤を用いて検討した。上皮系細胞である MDCK 細胞を正常カルシウム濃度で培養すると、ネクチン、カドヘリン、クローディン、オクルーディン、JAM、アファディン、ZO-1 はすべて細胞間接着部に濃縮した。次に、低カルシウム濃度で培養すると、カドヘリン、クローディン、オクルーディン、JAM が接着部より消失した。このとき、ネクチン、アファディン、ZO-1 は接着部に残存した。続いて正常カルシウム濃度で培養すると、ネクチンの濃縮した接着部にカドヘリン、クローディン、オクルーディン、JAM が再び濃縮した。この時、ネクチンの阻害剤である gD (glycoproteinD) と Nef-3 (ネクチン 3 とヒト IgG の Fc 領域の融合タンパク質) を溶液中に加えると、ネクチンの接着は阻害され、クローディン、オクルーディン、JAM、カドヘリンの濃縮も阻害された。以上のことから JAM、クローディン、オクルーディンはネクチンの形成する接着部に、ネクチンに依存してリクルートされることが明らかになった。

カルシウムスイッチによる TJ 再形成におけるバリアー機能の回復についての検討

TJ 再形成におけるバリアー機能の回復に対するネクチン阻害剤の影響を検討した。MDCK 細胞をトランスウェル上で高密度に培養し、上部のチャンバーから下部のチャンバーへの FITC デキストラノの単位面積当たりの拡散速度を計測し、TJ のバリアー機能の指標とした。正常カルシウム濃度では、拡散速度は $0.05 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ であったが、低カルシウム濃度で培養すると $2.38 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ に増加し、続いで正常カルシウム濃度で培養すると 1 時間後に $0.71 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ 、6 時間後に $0.21 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ へと低下し、バリアー機能の回復がみられた。このとき、正常カルシウム濃度の培養液中に、ネクチンの阻害剤を加えると、1 時間後に $1.01 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ 、6 時間後に $0.54 \text{ pmol/cm}^2/\text{hr}$ と拡散速度の回復は有意に遅延した。以上の結果から TJ のバリアー機能の回復は、ネクチンに依存することが明らかになった。

Nef-3 ビーズと細胞の接触面へのクローディン、オクルーディン、JAM の局在についての検討

TJ 構成因子がネクチンの接着部に濃縮するには、ネクチンのトランス結合だけで十分であるかを検討した。Nef-3 を、抗ヒト Fc 抗体を用いてラテックスビーズに固相化した Nef-3 ビーズを作成した。MDCK 細胞を Nef-3 ビーズと培養すると、Nef-3 ビーズと MDCK 細胞の接触面にはネクチンが濃縮した。さらに、この接触面にはアファディン、JAM、ZO-1 も濃縮した。しかし、クローディン、オクルーディンは濃縮しなかった。以上のことから、ネクチンによるトランス結合はカドヘリンおよび JAM を接着部にリクルートするのに十分であることが明らかになった。クローディン、オクルーディンは、Nef-3 ビーズへの濃縮がみられないことから、これらの濃縮にはクローディン、オクルーディン同士の結合、または他の因子の関与が必要であると考えられた。

[総括]

私は、JAM、クローディン、オクルーディンの細胞間接着部への濃縮がネクチンに依存しており、さらにネクチンによるトランス結合は JAM を接着部ヘリクルートするのに十分であることを見出した。上皮細胞の細胞間接着の形成過程では、カドヘリン、ネクチン、JAM がまず接着部に濃縮し、遅れてクローディン、オクルーディンが濃縮することが報告されている。したがって、TJ 形成の過程では、まずネクチンが接着を形成し、その接着部に JAM がリクルートされ、続いでクローディン、オクルーディンがリクルートされることで TJ が形成されると考えられる。さらに、JAM は PAR-3 と直接結合し、PAR-3/PAR-6/aPKC 複合体は上皮細胞の極性形成の過程に必須であることが報告されている。したがって、ネクチンは JAM のリクルートを介して、PAR-3/PAR-6/aPKC 複合体の局在化を誘導し、細胞極性の形成にも関与していると考えられる。

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、運動等の重要な細胞機能を担う多数の分子が集積している。接着分子ネクチンと、ネクチンをアクチン細胞骨格に連結させるアクチンフィラメント結合タンパク質アファディンからなる細胞間接着機構ネクチンーアファディン系は AJ に局在し、カドヘリンーカテニン系と協調的に作用することにより AJ の形成を制御している。

本申請者は、本研究において、TJ 形成におけるネクチンーアファディン系の役割について解析し、TJ における接着分子である JAM、クローディン、オクルーディンの細胞間接着部への濃縮はネクチンに依存していること、およびネクチンによるトランス結合は JAM を接着部ヘリクルートするのに十分であることを見出した。また、ネクチンと JAM は、それぞれの細胞内結合タンパク質であるアファディンと ZO-1 を介して連結している可能性を示した。以上の結果から、ネクチンーアファディン系が AJ だけでなく TJ の形成にも重要な役割を果た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。