



Title	Localization of mLin-7 at nectin-based cell-cell junctions
Author(s)	山本, 泰憲
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43943
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	山本泰憲
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第17601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	Localization of mLin-7 at nectin-based cell-cell junctions (ネクチンをベースとした細胞間接着部位への mLin-7 の局在)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 中村 敏一 教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

[目的]

私共はカドヘリン-カテニン系とは異なる新しい細胞間接着機構、ネクチニアファディン系を見出している。ネクチニアファディン系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ネクチンと、アクチンフィラメント結合蛋白質アファディンより構成され、上皮細胞ではアドヘレンスジャンクション (AJ) に限局して局在している。ネクチンはアファディンと結合することでアクチン細胞骨格に連結している。ネクチニアファディン系はカドヘリン-カテニン系と協調的に機能することで AJ の形成を制御している。ネクチニアファディン系による AJ 形成の制御機構を分子レベルで理解するためには、ネクチニアファディン系により局在が制御されている分子を単離することが重要である。そこで本研究では、ネクチンを強制発現させた細胞株と二次元電気泳動法を用いて、ネクチニアファディン系により局在が制御されている分子の同定を試みた。

[方法ならびに成績]

1) ネクチニアファディン系により局在が制御されている分子の同定

マウス繊維芽細胞である L 細胞に、ネクチン-2 α と E-カドヘリンを同時に安定に発現させた nectin-2 α -full-EL 細胞と、アファディンと結合できない C 末 4 アミノ酸を欠失したネクチンの変異体、ネクチン-2 α - Δ C と E-カドヘリンを同時に安定に発現させた nectin-2 α - Δ C-EL 細胞から、ショ糖密度勾配遠心分離法により細胞膜画分をそれぞれ単離した。単離した細胞膜画分を尿素変性条件下、CHAPS で可溶化し、可溶性画分を二次元電気泳動で展開し蛋白質を染色した。その結果、10 個の蛋白質が nectin-2 α - Δ C-EL 細胞よりも nectin-2 α -full-EL 細胞で濃縮していた。このうち、分子量約 25 kDa の蛋白質を質量分析法により同定したところ、線虫 LIN-7 の哺乳動物ホモログである mLin-7C であった。nectin-2 α -full-EL 細胞と nectin-2 α - Δ C-EL 細胞を免疫染色したところ、mLin-7C は nectin-2 α -full-EL 細胞で細胞間接着部位にネクチン-2 α と共に濃縮し、nectin-2 α - Δ C-EL 細胞では細胞間接着部位に濃縮していなかった。以上の結果から、mLin-7C の局在は、ネクチニアファディン系により制御されていることが確認できた。

2) ネクチニアファディン系依存的な mLin-7C の局在

ヒト胃がん細胞である HSC-39 細胞にネクチン-2 α を安定に発現させた nectin-2 α -full-HSC-39 細胞では、ネクチンは細胞膜上でクラスターを形成し、クラスターと細胞間接着部位に局在する。一方、E・カドヘリンは細胞間接着部位にのみ局在する。mLin-7C を免疫染色したところ、mLin-7C はクラスターと細胞間接着部位でネクチンと共に局在していた。また、培地の Ca^{2+} 濃度を $2 \mu\text{M}$ まで下げるときカドヘリンはエンドサイトーシスされ、細胞間接着部位から消失する。この条件下でも、mLin-7C はクラスターと細胞間接着部位でネクチンと共に局在していた。以上の結果から、mLin-7C の局在はネクチニアファディン系に依存しており、カドヘリンーカテニン系は必須でないことが明らかになった。

3) ネクチニアファディン系と mLin-7C との間接的結合

nectin-2 α -full-HSC-39 細胞からネクチン-2 α を免疫沈降させると、mLin-7C とアファディンが共沈した。一方、nectin-2 α - Δ C-HSC-39 細胞からネクチン-2 α - Δ C を免疫沈降させると、mLin-7C とアファディンは共沈しなかった。アフィニティーコロマトグラフィーでは mLin-7C はネクチンとアファディンに直接結合しなかった。Nectin-2 α -full-HSC-39 細胞をアクチン重合阻害剤で処理してアクチンフィラメントを破壊したところ、mLin-7C はクラスターと細胞間接着部位でネクチンと共に局在していた。以上の結果から、mLin-7C とネクチニアファディン系は、アクチンフィラメントではない何らかの因子を介して間接的に結合していることが明らかになった。

〔総括〕

ネクチニアファディン系により局在が制御されている分子として mLin-7 を同定した。そして、mLin-7 の細胞間接着部位への局在がネクチニアファディン系に依存しており、カドヘリンーカテニン系は必須でないことを明らかにした。以上の結果から、ネクチニアファディン系はカドヘリンーカテニン系を制御する分子機構とは異なる分子機構で、mLin-7 の局在を制御していることが考えられた。AJ における mLin-7 の機能は不明であるが、線虫では LIN-7 は上皮増殖因子受容体と結合しその局在を制御していることが知られている。よって、AJ においても mLin-7 はなんらかの増殖因子受容体に結合し、ネクチニアファディン系が mLin-7 を介して増殖因子受容体の局在を制御している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞間接着機構ネクチニアファディン系は、上皮細胞のアドヘレンスジャンクション (AJ) に局在し、AJ の形成に必須の役割を担っている。本研究において、本申請者は、AJ 構成分子 mLin-7 の局在が、ネクチニアファディン系により制御されていることを明らかにした。線虫では、LIN-7 は上皮増殖因子受容体の局在を制御していることから、ネクチニアファディン系が mLin-7 を介してなんらかの受容体の局在を制御している可能性が考えられた。

このように本研究は、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。