

Title	Role of Nectin in Formation of E-Cadherin-based Adherens Junctions in Keratinocytes : Analysis with the N-Cadherin Dominant Negative Mutant
Author(s)	田中, 美成
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45230
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	田中 美成
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18527 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Role of Nectin in Formatin of E-Cadherin-based Adherens Junctions in Keratinocytes : Analysis with the N-Cadherin Dominant Negative Mutant (E-カドヘリンによる表皮細胞のアドヘレンスジャンクション形成に対するネクチンの役割 : N-カドヘリン・ドミナントネガティブ変異体を用いた検討)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 吉川 秀樹 教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞間接着の制御機構の解明は、がんの浸潤・転移を理解する上で重要である。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接着分子で、アクチンフィラメント結合タンパク質アファディンを介してアクチン細胞骨格に連結している。これまでに、ネクチン-アファディン系はカドヘリン-カテニン系と協調的に上皮細胞のアドヘレンスジャンクション (AJ) 形成を制御することが示されている。本研究では、カドヘリンのドミナントネガティブ変異体 (DN) を用いて、ネクチンと E-カドヘリンの機能的関連について解析した。

〔方法ならびに結果〕

DN による細胞間接着の破綻に対するネクチンの効果の検討

N-カドヘリンの細胞外領域の大部分 (272-662 アミノ酸) を欠失した変異体を DN として用いた。DN を表皮細胞に発現すると細胞間接着が破綻し、細胞間における E-カドヘリンの濃縮が消失した。この条件下でネクチンを強制発現させると、DN による細胞間接着の破綻は抑制され、細胞間への E-カドヘリンの濃縮が認められた。

ネクチンと DN の相互作用についての検討

ネクチンの細胞外領域をビーズにコートしたネクチンビーズを用いて、ビーズと表皮細胞の接触面へ DN がリクルートされるかを検討した。ネクチンビーズと細胞の接触面にはネクチンの濃縮が見られた。この条件下で、DN は接触面にリクルートされた。以上の結果から、DN はネクチンを介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。

E-カドヘリンの接着活性に対するネクチンの効果の検討

E-カドヘリンの接着活性を cell dissociation assay で検討した。細胞間接着を十分に作らせた表皮細胞に、TE 処理 (0.01% Trypsin, 1 mM EDTA) あるいは TC 処理 (0.01% Trypsin, 1 mM CaCl₂) を施した後にピペッティング

を行った。E-カドヘリンの接着はカルシウム依存性であることから、TC および TE 処理における凝集塊数 (N_{TC} および N_{TE}) の比 (N_{TC}/N_{TE}) によって E-カドヘリンの接着活性を評価した。表皮細胞 ($N_{TC}/N_{TE}=0.15$) に DN を発現させると、E-カドヘリンの接着活性は低下した ($N_{TC}/N_{TE}=0.35$)。DN とネクチンを強制発現すると、E-カドヘリンの接着活性は改善した ($N_{TC}/N_{TE}=0.16$)。以上の結果から、ネクチンは E-カドヘリンの接着活性を制御することが明らかになった。

DN による E-カドヘリンの発現に対する影響についての検討

E-カドヘリンに対するドミナントネガティブ効果は E-カドヘリンの発現量低下による可能性が報告されている。そこで、E-カドヘリンの発現レベルについて検討した。表皮細胞に DN を発現させても、E-カドヘリンの発現量は変化しなかった。また、シヨ糖密度勾配遠心法を用いた実験でも、細胞膜上の E-カドヘリン量は DN の発現によって変化しなかった。以上の結果から、DN の発現によって E-カドヘリンの発現レベルは変化しないことが示唆された。

[総括]

私は、ネクチンが E-カドヘリンと機能的に関連して E-カドヘリンの接着活性を制御していることを明らかにした。DN はネクチンによってリクルートされた。また、DN の発現によって E-カドヘリンの発現レベルは変化しなかった。以上のことから、DN はネクチンと E-カドヘリンの分子連関を阻害することによってドミナントネガティブ効果を示すと考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞間接着の制御機構を解明することは、がんの浸潤・転移のメカニズムを理解する上で重要である。細胞間接着装置アドヘレンスジャンクションにはカドヘリン-カテニン系と共にネクチン-アファディン系が局在し、細胞間接着の形成に関与する。しかし、カドヘリン-カテニン系とネクチン-アファディン系がどのように機能的に関連するのかは不明であった。

申請者は、本研究において、E-カドヘリンに対するドミナントネガティブ変異体 (DN) を用いてカドヘリン-カテニン系とネクチン-アファディン系の機能的連関について解析を行った。ネクチンを発現させると、DN による細胞間接着の破綻が改善し、E-カドヘリンの細胞間接着部位への濃縮が回復することを見出した。さらに、ネクチンを発現させると、DN によって低下した E-カドヘリンの接着活性を改善することを見出した。以上の結果から、ネクチン-アファディン系がカドヘリン-カテニン系と機能的に関連し、アドヘレンスジャンクションの形成に寄与することが明らかになった。

がん細胞は細胞間接着の破綻という特徴を持っていることから、本研究は、実験結果自体の意義だけでなく、今後のがん研究への発展性も期待できるものと言える。したがって、学位授与に値すると考えられる。