



Title	Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion
Author(s)	本田, 知之
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45286
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	ほん だ とも ゆき 本田 知之
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 18453 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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion (E-カドヘリンによる接着に対するネクチン細胞外フラグメントのアンタゴニストとアゴニスト様作用)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 米田 悅啓 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とアドヘレンスジャンクション(AJ)がある。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、アファデインを結合している。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接着分子であり、アクチンフィラメント結合タンパク質アファデインを介してアクチン細胞骨格と連結している。ネクチングファミリーにはネクチン-1、-2、-3、-4があり、ホモフィリックまたはファミリー間(ネクチン-1と-3、-2と-3、-1と-4)でヘテロフィリックな結合をする。アファデインノックアウトマウスの解析から、ネクチン-アファデイン系はAJ形成に必須であることが明らかとなっている。しかし、これまでネクチン-アファデイン系によるAJ形成の制御機構の詳細は不明であった。本研究では、ネクチンのアンタゴニストとアゴニストを開発し、AJ形成におけるネクチン-アファデイン系の役割を解析した。

〔方法ならびに成績〕

ネクチンを介した組胞間接着に対するネクチン細胞外フラグメントのアンタゴニスト様作用

ネクチンの接着機能の阻害剤として、ネクチン-1、-3の細胞外ドメインとヒトFcとの融合タンパク質(Nef-1、-3)を作製した。ネクチン-1あるいはネクチン-3を発現させたマウスのL線維芽細胞を混ぜてインキュベーションすると、ネクチン-1とネクチン-3のヘテロ結合による大きな細胞塊を形成した。ここにNef-1あるいはNef-3を加えると、細胞塊の形成が阻害された。この阻害作用に必要な濃度は、Nef-1で100nM、Nef-3で10nMであった。以上の結果から、Nef-3をネクチンによる接着の阻害剤として使用できることが明らかになった。

Nef-3のアンタゴニスト様作用による細胞間接着形成の解析

細胞間接着形成におけるネクチンの役割について、Nef-3を用いて検討した。ネクチン-1とE-カドヘリンと共に発現させたL細胞(ネクチン-1-EL細胞)を正常カルシウム濃度で培養すると、ネクチン-1、E-カドヘリンは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、接着部に濃縮していたE-カドヘリンは消失した。一方、ネクチン-1の濃縮は接着部に残存した。続けて正常カルシウム濃度で培養すると、ネクチン-1の濃縮した接着部にE-カドヘリンが再び濃縮した。Nef-3存在下で低カルシウム濃度で培養すると、ネクチンの接着は阻害され、接着部に

濃縮していたネクチン-1はE-カドヘリンと共に消失した。続いてNef-3存在下で正常カルシウム濃度で培養すると、E-カドヘリンとネクチン-1の接着部への濃縮は遅延した。上皮細胞であるMDCK細胞でも同様の結果が得られた。以上のことから、カドヘリンはネクチンを介した接着部に、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。

Nef-3のアゴニス様作用によるネクチンを介した細胞間接着形成の解析

カドヘリンがネクチンの形成する接着部に濃縮するには、ネクチン同士の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。ネクチン-1-EL細胞をNef-3ビーズと培養すると、ビーズと細胞との接触面にネクチン-1が濃縮した。この結果、Nef-3はアゴニストとして作用することが明らかになった。さらに、ビーズと細胞との接着面にアファデインが濃縮し、次にE-カドヘリンと β -カテニンが濃縮した。MDCK細胞を用いた実験でも同様の結果が得られた。以上のことから、ネクチン同士の結合はカドヘリン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。

[総括]

私は、カドヘリンの細胞間接着部への濃縮がネクチンに依存しており、さらにネクチン同士の結合はカドヘリンを接着部へリクルートするのに十分であることを見出した。これらの結果から、上皮細胞のAJ形成の過程として次のようなモデルが考えられる。2つの上皮細胞が接触するとまず、ネクチン同士が結合し接着面を形成する。次にその接着面にカドヘリンがリクルートされ、両者が協調的にAJを形成する。このように、ネクチン-アファデイン系は、AJ形成時の接着部へのカドヘリン-カテニン系の集積を促進することで、AJ形成を制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞のアドヘレンスジャンクション(AJ)には細胞間接着機構として、カドヘリン-カテニン系以外にネクチン-アファデイン系が存在する。これまでネクチン-アファデイン系によるAJ形成の制御機構は不明であった。

本申請者は、本研究において、ネクチン細胞外領域とヒトIgGFCとの融合タンパク質(Nef)を作製し、接着形成時にNefをネクチンのアンタゴニストとして作用させることで、接着部位へのカドヘリンの集積が抑制されることを見出した。一方、Nefを結合させたビーズと細胞を培養することで、Nefをネクチンのアゴニストとして作用させ、ビーズと細胞の接着部位にネクチンだけでなくカドヘリンも集積することを見出した。以上の結果から、ネクチン-アファデイン系が、接着部位へのカドヘリン-カテニン系の集積を促進し、AJ形成に関与す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、学位に値すると考える。