

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、〈ahref="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏
名
本
E
E
In the permitted part of the permitted

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 悦啓 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、アファディンを結合している。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ィンを介してアクチン細胞骨格と連結している。ネクチン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。アファディンノックアウトマウスの解析から、ネクチン・アファディン系は 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・アファディン系による 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・アファディ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 100 nM、Nef-3で 10 nM 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-カドヘリンを共に発現させた 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。続い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ィンが濃縮し、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ヘ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・アファディン系は、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・アファディン系が存在する。これまでネクチン・アファディン系による 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、接着部位へのカドへ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へリンも集積することを見出した。以上の結果から、ネクチンアファディン系が、接着部位へのカドへリン・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。