



Title	Involvement of the Annexin II-S100A10 Complex in the Formation of E-Cadher in-based Adherens Junctions in MDCK Cells
Author(s)	山田, 章夫
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45459
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	やま だ あき お 山 田 章 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 6 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 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	Involvement of the Annexin II-S100A10 Complex in the Formation of E-Cadherin-based Adherens Junctions in MDCK Cells (上皮細胞のアドヘレンスジャンクション形成におけるアネキシン II-S100A10 複合体の役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高井 義美 (副査) 教 授 松田 道行 教 授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目的 〕

アドヘレンスジャンクション (AJ) は、上皮細胞の細胞間接着の形成に重要である。AJ には接着分子として、ネクチンと E-カドヘリンが局在し、それぞれアファディンと α -, β -カテニンを介してアクチン細胞骨格に連結している。細胞間接着が形成されるとき、まずネクチンが細胞間接着を形成し、その部位に E-カドヘリンをリクルートし、AJ が形成される。このネクチンと E-カドヘリンによる AJ の形成には、これらの接着分子を連結するいくつかの分子とアクチン細胞骨格が必要であることが明らかになっているが、これらだけでは AJ 形成の分子機構を十分説明できない。そこで、本研究では、イヌ腎上皮由来 MDCK 細胞を用いて AJ 形成に関与する新たな分子の同定を試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

E-カドヘリンによる AJ 形成における蛋白質分解と合成の必要性

ネクチン-1 を発現させた MDCK 細胞 (ネクチン-1-MDCK 細胞) を 2 mM の通常カルシウム濃度で培養すると、ネクチン-1 と E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮した。この細胞を 2 μ M の低カルシウム濃度で培養すると、E-カドヘリンは細胞間接着部位から消失したが、ネクチン-1 は残っていた。この細胞を再び通常カルシウム濃度で培養すると E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮した。しかしながら、蛋白質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) 存在下で通常カルシウム濃度で培養すると、E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮しなかった。また、プロテアソームインヒビター (ALLN) 存在下で低カルシウム濃度で培養した後、再び通常カルシウム濃度に戻したときも、E-カドヘリンの細胞間接着部位への濃縮は減少していた。以上の結果から、E-カドヘリンによる AJ の形成には、AJ が破壊されるときにある蛋白質が分解され、AJ が形成されるときに同じかまたは別の蛋白質が再合成される必要があることが示唆された。

CHX と ALLN 処理による蛋白質量の変化

CHX または ALLN 処理したときの細胞膜上の E-カドヘリン量を検討したところ、CHX 処理により細胞膜上の E-カドヘリンはコントロールに比べ 50%程度減少していた。ALLN 処理では変化なかった。しかしながら、GFP-E-カ

ドヘリンを過剰発現させた MDCK 細胞においても CHX 処理により GFP-E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮しなかったことから、CHX 処理による細胞間接着部位への E-カドヘリンの濃縮の阻害効果は、E-カドヘリンの量の減少によるのではないと考えられた。次に、CHX または ALLN 処理したときの E-カドヘリンと相互作用する分子の量を検討したが、 α -カテニン、 β -カテニン、p120^{cas}、アファディン、 α -アクチニン、ビンキュリン、ADIP、LMO7 に大きな変化はなかった。以上の結果から、既知の因子以外の分子の分解と合成が E-カドヘリンによる AJ 形成に必要であることが示唆された。

E-カドヘリンによる AJ 形成に関与する新規因子の同定

そこで CHX または ALLN 処理したネクチン-1-MDCK 細胞の細胞膜画分を二次元電気泳動し、E-カドヘリンによる AJ 形成に関与する新規因子の同定を試みた。その結果、CHX 処理で減少し、ALLN 処理で増加する蛋白質として アネキシン II-S100A10 複合体を同定した。アネキシン II と S100A10 はヘテロ四量体を形成し、カルシウム依存的にリン脂質やアクチン線維に結合することが報告されている。

アネキシン II-S100A10 複合体の E-カドヘリンによる AJ 形成への関与

メチル- β -シクロデキストリン処理によりコレステロールを細胞膜から除去しアネキシン II-S100A10 複合体の細胞膜への局在を阻害すると、ネクチンは細胞間接着部位に濃縮していたが、E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮しなかった。また、RNA 干渉法によりアネキシン II をノックダウンしても、ネクチンは細胞間接着部位に濃縮していたが、E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮しなかった。以上の結果から、アネキシン II-S100A10 複合体がネクチンと E-カドヘリンによる AJ の形成に関与することが明らかになった。

[総括]

今回、ネクチンと E-カドヘリンによる AJ の形成には、AJ が破壊されるときにある蛋白質が分解され、AJ が形成されるときに同じかまたは別の蛋白質が再合成される必要があることを見出した。次に、そのような蛋白質の候補としてアネキシン II-S100A10 複合体を同定し、アネキシン II-S100A10 複合体がネクチンと E-カドヘリンによる AJ の形成に関与することを明らかにした。アネキシン II-S100A10 複合体はアクチン細胞骨格の再構成に関与していることが報告されており、アクチン細胞骨格を介したネクチンと E-カドヘリンの連結に関与する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

アドヘレンスジャンクション (AJ) は、上皮細胞の細胞間接着の形成に重要である。AJ には接着分子として、ネクチンと E-カドヘリンが局在し、それぞれアファディンと α -、 β -カテニンを介してアクチン細胞骨格に連結している。細胞間接着が形成されるとき、まずネクチンが細胞間接着を形成し、その部位に E-カドヘリンをリクルートし、AJ が形成される。しかしながら、ネクチンと E-カドヘリンの連結機構については不明な点が多い。

本申請者は、本研究において、E-カドヘリンによる AJ の形成には、AJ が破壊されるときにある蛋白質が分解され、AJ が形成されるときに同じかまたは別の蛋白質が再合成される必要があることを見出した。次に、そのような蛋白質の候補としてアネキシン II-S100A10 複合体を同定し、この複合体がネクチンと E-カドヘリンによる AJ の形成に関与することを明らかにした。

本研究は、上皮細胞の細胞間接着形成の分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験結果自体の意義だけでなく、今後の研究への発展も期待できる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値する。