



Title	Involvement of the Annexin II-S100A10 Complex in the Formation of E-Cadherin-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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45459">https://hdl.handle.net/11094/45459</a>
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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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	山田 章夫
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19267 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 $\alpha$ -、 $\beta$ -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  $\mu$ 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、 $\alpha$ -カテニン、 $\beta$ -カテニン、p120<sup>ctn</sup>、アファディン、 $\alpha$ -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- $\beta$ -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 $\alpha$ -、 $\beta$ -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。