The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Implications of Nectin-like Molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in Cell-Cell Adhesion and Transmembrane Protein Localization in Epithelial Cells
Author(s)	真貝, 竜史
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45546
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　真貝竜史（しんがいたつし）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）

学位記番号　第　19320　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

医学系研究科臓器制御医学専攻

学位論文名　Implications of Nectin-like Molecule-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 in Cell-Cell Adhesion and Transmembrane Protein Localization in Epithelial Cells
（ネクチン様分子 Necl-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1：細胞間接着装置以外の側－基底細胞膜部位への局在と Pals2 の結合）

論文審査委員　（主査）
教　授　門田　守人

（副査）
教　授　宮坂　昌之　　教　授　米田　悦啓

論文内容の要旨

〔　目的　〕

細胞間接着の分子機構を明らかにすることは、個体発生における器官形成などの生命現象だけでなく、がんの浸潤・転移などの病態を理解する上で重要である。接着分子ネクチンは上皮細胞においてタイトジャンクション（TJ）やアドヘレンスジャンクション（AJ）の形成に重要な働きを果たしている。ネクチンは3つの免疫グロブリン様ループのある細胞外領域、一つの細胞膜貫通領域、そして一つの細胞内領域から構成されている。一方、ネクチンに構造上類似したネクチン様分子 Nectin-like molecule（Necl）がいくつか報告されている。ネクチンは細胞内領域の C 末端にアファディンを結合するが、Necl は結合しない。今回私は、Necl ファミリーの一つである Necl-2/IGSF4/RA175/SgIGSF/TSLC1/SynCAM1 に着目し、その機能について解析した。

〔方法ならびに成績〕

Necl-2 のホモフィリック/ヘテロフィリックな接着活性

細胞間接着活性を持たないマウス L 線維芽細胞に Necl-2 を恒常的に発現させた細胞株 Necl-2-L 細胞を樹立し、その細胞間接着活性を検討した。野生型 L 細胞は細胞塊を形成しなかったが、Necl-2-L 細胞は細胞塊を形成した。Necl-2-L 細胞を免疫蛍光染色法で解析した結果、その細胞間接着部位に Necl-2 が局在していた。また、ネクチンファミリーや他の Necl ファミリーとのヘテロフィリックな接着活性を検討した結果、Necl-2 は Necl-1 と Nectin-3 に対して接着活性を示した。

上皮組織における Necl-2 の局在

マウス組織における Necl-2 の局在を免疫蛍光染色法で検討した。その結果、Necl-2 は胆嚢、肝臓、肺などの上皮組織の側－基底膜部位に局在していた。また、Necl-2 の局在を AJ のアファディンや TJ の ZO-1 と比較したところ、どちらとも共局在しなかった。免疫電顕法で胆嚢上皮を解析した結果、Necl-2 は側－基底膜上に分布し、TJ、AJ、デスモゾームなどの細胞間接着装置以外の部位に局在していた。

上皮系細胞での Necl-2 の発現

様々な細胞株における Necl-2 発現を Western blotting で検討した。その結果、マウス上皮細胞株 MTD-1A 細胞では発現していたが、線維芽細胞株の L、NIH3T3、Swiss3T3 細胞では発現していなかった。MTD-1A 細胞における Necl-2 の局在を免疫蛍光染色法で解析した結果、Necl-2 は細胞間接着部の側－基底膜部位に分布していた。

細胞間接着形成における Necl-2 の挙動

細胞間接着の形成における Necl-2 の挙動を、MTD-1A 細胞を用いた創傷治癒アッセイで検討した。創傷 6 時間後、細胞間接着形成の初期段階であるスポット様細胞接着部位に Necl-2 の集積が認められた。8 時間後、細胞接着部位はライン様になり、そこにも Necl-2 は集積していた。アファディンや ZO-1 もライン状に集積するが、Necl-2 は幅のある分布を示し、アファディンや ZO-1 のシグナルとは一致しなかった。

Pals2 と Necl-2 の直接結合

ネクチンはアクチン結合タンパク質であるアファディンを結合する。そこで、Necl-2 とアファディンの結合を検討したが、結合しなかった。そのため、Necl-2 の細胞内領域に結合する分子を酵母 two-hybrid 法によってマウス精巣のライブラリをスクリーニングした。その結果、membrane-associated guanylate kinase（MAGUK）ファミリーの一つである Pals2 を単離した。Necl-2 と Pals2 の結合を、1）HEK293 細胞を用いた共免疫沈降法、2）Necl-2-L 細胞を用いた細胞間接着部位へのリクルート実験、3）リコンビナントタンパク質によるアフィニティー実験によって検討した。その結果、Necl-2 と Pals2 は直接結合し、その結合は Necl-2 の細胞内領域の C 末端の PDZ ドメイン結合モチーフと Pals2 の PDZ ドメインを介していることが明らかとなった。

〔　総括　〕

Necl-2 はネクチンと同様に接着分子として機能する。その発現分布は上皮組織（細胞）に特異的である。また、その局在は細胞間接着部位ではあるが、TJ、AJ、デスモゾームなどの細胞間接着装置以外の側－基底膜部位というユニークな局在を示した。ネクチンはアクチン結合タンパク質であるアファディンを結合するが、Necl-2 はアファディンを結合しなかった。一方、Necl-2 は MAGUK ファミリーに属する Lin-7 結合蛋白質 Pals2 を結合した。Lin-7 は線虫において増殖因子受容体の局在に関与していることが知られている。以上の結果から、Necl-2 は上皮細胞における接着分子としての機能だけでなく、Pals2 を介した増殖因子受容体などの細胞膜貫通蛋白質の局在に関与しいていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

接着分子ネクチンは 4 種類からなるファミリーを構成しており、上皮細胞においてタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションの形成に重要な役割を果たしている。一方、ネクチンに構造上類似した分子 Necl が 5 種類あることがわかっている。本研究では Necl-2 について解析したところ、ネクチンと同様にホモまたはヘテロフィリックな接着分子として機能していることが判明した。また、その局在は上皮細胞の細胞間接着装置以外のバソラテラル領域というユニークな分布をしていた。さらに Necl-2 は接着形成の非常に初期から機能していることが示唆された。

一方、Necl-2 はネクチンと異なり裏打ちタンパク質としてアファディンを結合せず、Lin-7 結合蛋白質 pals2 を結合した。Lin-7 は線虫において EGF 受容体の局在に関与することから、Necl-2 は接着形成だけでなく、細胞膜貫通蛋白質の局在にも関与していることが示唆された。

Necl-2 は細胞接着分子のみならず、がん抑制遺伝子としても同定されていることから、本研究はがんの発生や浸潤・転移のメカニズムの理解に貢献することが期待され、学位の授与に値すると考える。