Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Regulation of the Assembly and Adhesion Activitiy of E-Cadherin by Nectin and Afadin for the Formation of Adherens Junctions in MDCK Cells |
| Author(s) | 佐藤, 龍洋 |
| Citation | 大阪大学, 2006, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/46325 |
| 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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

【24】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 佐　藤　龍　洋 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　２００８１　号 |
| 学位授与年月日 | 平成 18 年３月 24 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第４条第１項該当<br>医学系研究科生体制御医学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | Regulation of the Assembly and Adhesion Activity of E-Cadherin by Nectin and Afadin for the Formation of Adherens Junctions in MDCK Cells<br>（MDCK 細胞のアドヘレンスジャンクション形成におけるネクチンとアファディンによる E-カドヘリンの集積と接着活性の制御） |
| 論　文　審　査　委　員 | （主査）<br>教　授　高井　義美<br>（副査）<br>教　授　金倉　　譲　　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（TJ）やアドヘレンスジャンクション（AJ）が存在する。接着分子としてTJにはクローディンが、AJにはカドヘリンとネクチンが主に局在している。細胞間接着の形成において、ネクチンはまず最初に細胞間接着部位に集積し、次にカドヘリンをネクチン接着部位にリクルートして AJ を形成する。ネクチンを介した AJ の形成には、ネクチンのトランス結合による低分子量 G タンパク質 Cdc42 と Rac の活性化と、それによる IQGAP1 を介したアクチン細胞骨格の再編成が関与している。しかし、ネクチンの細胞内領域に結合するアファディンの機能については十分に理解されていない。そこで本研究では、イヌ腎上皮細胞である MDCK 細胞を用いてアファディンのノックダウンを行い、細胞間接着形成の制御機構におけるネクチン－アファディン系の役割について検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

アファディンノックダウン細胞における AJ と TJ の形成の解析

MDCK 細胞は 2 mM の通常カルシウム濃度で培養すると AJ と TJ を形成するが、2 μM の低カルシウム濃度で 3 時間培養することで、それらを破壊することができる。今回の実験では、低カルシウム濃度で培養した細胞を再び通常カルシウム濃度で培養して細胞間接着を再形成させ、細胞間接着の形成におけるアファディンの役割について検討した。RNA 干渉法（RNAi）によりアファディンをノックダウンして細胞間接着の形成を観察したところ、カドヘリンやクローディンは細胞間接着部位に集積しなかった。また、カドヘリンの接着力を調べたところ、アファディンをノックダウンした細胞では、ノックダウンしていない細胞に比べて接着力が低下していた。以上の結果から、アファディンは AJ と TJ の形成に関与していることが明らかになった。

アファディンノックダウン細胞におけるカドヘリンの局在と接着力の解析

前述のように、アファディンをノックダウンした細胞では細胞間接着部位にカドヘリンを観察できなかったが、カ

ドヘリンの細胞内領域に結合する p120$^{ctn}$、β-、α-カテニンは、アファディンをノックダウンした細胞でも、ノックダウンしていない細胞と同様に細胞間接着部位に集積した。免疫沈降を行った結果、アファディンをノックダウンした細胞としていない細胞を比較すると、カドヘリンとカテニンの結合量に差はなかった。また、細胞膜上に存在するカドヘリン量にも差はなかった。そこで、アファディンをノックダウンした細胞に GFP タグを付けたカドヘリンを発現させ、GFP による発光でカドヘリンの局在を観察したところ、GFP タグを付けたカドヘリンは細胞間接着部位に集積した。以上の結果から、アファディンをノックダウンした MDCK 細胞において、抗体で認識されないカドヘリンが細胞間接着部位に集積していることが明らかになった。

カドヘリンとカテニンの細胞間接着部位へのリクルート機構の解析

アファディンをノックダウンした細胞では、ネクチンは細胞間接着部位に集積した。そこで、ネクチンによるカドヘリンとカテニンのリクルートの関与について、ネクチン結合阻害剤を用いて検討した。ネクチン結合阻害剤はネクチンのトランス結合を阻害するとともに、細胞間接着部位へのカドヘリンとカテニンの集積を阻害した。さらに、ネクチンからのシグナル伝達により活性化される c-Src や低分子量 G タンパク質の Rap1、Cdc42、Rac を阻害しても同様の結果が得られた。また、ネクチンからのシグナル伝達によって引きおこされる IQGAP1 依存的なアクチン再編成を阻害しても同様の結果が得られた。以上の結果から、カドヘリンとカテニンの接着部位への集積には、ネクチンのトランス結合およびネクチンからのシグナル伝達を介した IQGAP1 依存的なアクチンの再編成が関与することが明らかになった。

アファディンと p120$^{ctn}$ の相互作用によるカドヘリンの接着力の促進

アファディンノックダウン細胞では細胞の接着力が低下していたことから、アファディンはカドヘリンの接着力を促進すると考えられた。また、アファディンは Rap1 依存的に p120$^{ctn}$ と結合することから、アファディンが p120$^{ctn}$ を介してカドヘリンの接着力を促進しているかどうか検討した。アファディンをノックダウンした細胞に、p120$^{ctn}$ の調節領域と考えられている N 末端領域を欠失した活性型変異体（p120$^{ctn}$ΔN）を過剰発現すると、カドヘリンによる接着力が促進した。以上の結果から、アファディンは Rap1 依存的に p120$^{ctn}$ を活性化してカドヘリンのトランス結合を促進することが明らかになった。

〔　総括　〕

今回の結果から、ネクチンとアファディンによるカドヘリンとカテニンの制御機構について以下のように考察した。まず、ネクチンがトランス結合して細胞間に弱い接着を形成する。次に、ネクチンは c-Src や Rap1、Cdc42、Rac などのシグナル因子を活性化する。そして IQGAP1 依存的なアクチン細胞骨格の再編成を引きおこし、カドヘリンとカテニンをネクチン接着部位に集積させる。さらにアファディンは、Rap1 依存的に p120$^{ctn}$ と相互作用して p120$^{ctn}$ を活性化する。最後に、活性化された p120$^{ctn}$ がカドヘリンのトランス結合を促進して AJ 形成を促進する。このようにネクチンとアファディンは、カドヘリンの集積と接着活性を制御して AJ 形成を促進すると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

上皮細胞の細胞間接着には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）が存在する。接着分子として TJ にはクローディンが、AJ にはカドヘリンとネクチンが主に局在している。細胞間接着の形成において、ネクチンはまず最初に細胞間接着部位に集積し、次にカドヘリンをネクチン接着部位にリクルートして AJ を形成する。しかし、ネクチンの細胞内領域に結合するアファディンの機能については不明な点が多い。

本申請者は本研究において、ネクチンとアファディンによるカドヘリンとカテニンの制御機構について解析した。その結果、ネクチンのトランス結合とそれによるシグナル伝達を介した IQGAP1 依存的なアクチン細胞骨格の再編成が、アファディン非依存的にカドヘリンとカテニンを細胞間接着部位にリクルートすることを見いだした。また、アファディンは p120$^{ctn}$ と相互作用してカドヘリンの接着力を促進し、AJ の形成を促進することを見いだした。

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。