

Title	Recruitment of E-cadherin associated with α - and β -catenins and p120 ^{ctn} to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells
Author(s)	岡本, 涼子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47467
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

氏 名	おか もと りょう こ 岡 本 涼 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20908 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 3 月 23 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	Recruitment of E-cadherin associated with α - and β -catenins and p120 ^{ctn} to the nectin-based cell-cell adhesion sites by the action of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in MDCK cells. (MDCK 細胞における 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate による E カドヘリン-カテニン複合体のネクチン接着部位への集積)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高 井 義 美 (副査) 教 授 宮 坂 昌 之 教 授 中 村 敏 一

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

上皮細胞の主な細胞間接着装置としてアドヘレンスジャンクション (AJ) とタイトジャンクション (TJ) が存在する。TJ の形成は E-カドヘリンが形成する AJ に依存しており、AJ が破壊されると TJ も破壊されることが知られている。AJ には主要な接着分子として E-カドヘリンとネクチンが、TJ には主要な接着分子としてクローディンが局在している。低カルシウム濃度で培養した上皮細胞を通常カルシウム濃度で培養すると、E-カドヘリンがネクチン細胞間接着部位に濃縮した後に TJ が形成される。一方、低カルシウム濃度でホルボールエステル (TPA) 存在下で培養すると、E-カドヘリンの細胞間接着部位への濃縮は認められず、TJ が形成される。そこで本研究では、イヌ腎上皮由来 MDCK 細胞を用いて、低カルシウム濃度 TPA 培養下におけるネクチン接着部位での E-カドヘリン非依存的な TJ 形成機構を検討した。

[方法ならびに成績]

I. E-カドヘリンの局在の解析

これまでの報告のとおり、ネクチン-1 を発現させた MDCK 細胞 (ネクチン-1-MDCK 細胞) を $2\mu\text{M}$ の低カルシウム濃度で培養した後、 2mM の通常カルシウム濃度で培養すると、AJ・TJ 構成分子は細胞間接着部位に濃縮する。一方、低カルシウム濃度 TPA 存在下で培養すると、E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮が認められず、TJ が形成される。しかしこの時、E-カドヘリンの裏打ちタンパク質であるカテニンは細胞間接着部位へ濃縮していた。そこで、E-カドヘリンの局在を調べるため GFP を融合した GFP-E-カドヘリンを発現させると、GFP のシグナルは細胞間接着部位に濃縮した。また、細胞膜表面上の E-カドヘリン量を測定したところ、低カルシウム濃度 TPA 培養下では、通常カルシウム濃度培養下と同程度存在していた。以上の結果より低カルシウム濃度 TPA 培養下において、E-カドヘリンは細胞膜上に存在するが、免疫蛍光染色では抗体で認識されない E-カドヘリンが細胞間接着部位へ集積していることが明らかになった。

II. E-カドヘリンの接着力の解析

前述のように、E-カドヘリンの細胞内領域に結合するカテニンは、低カルシウム濃度 TPA 培養下で細胞間接着部位に集積する。そこで免疫沈降を行った結果、低カルシウム濃度 TPA 培養下でも、通常カルシウム濃度培養下と同様に E-カドヘリンとカテニンの結合量に差はなかった。E-カドヘリンの接着力を調べたところ、低カルシウム濃度 TPA 培養下では、通常カルシウム濃度培養下に比べて接着力が低下していた。以上の結果から、接着部位に集積している E-カドヘリンは、その細胞内領域にカテニンを連結しているが、細胞外領域では E-カドヘリン同士が互いにトランスに結合していないことが示唆された。

III. ネクチン接着部位へのノントランス結合型 E-カドヘリンの集積

ネクチン-1 はネクチン-3 と細胞外ドメインでトランス結合する。まずネクチン-3 の細胞外ドメインをヒト IgG Fc 領域に融合させたキメラタンパク質 (Nef-3) を作製し、抗ヒト Fc 抗体を用いて Nef-3 を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-MDCK 細胞を Nef-3 ビーズとともに低カルシウム濃度 TPA で培養すると、細胞とビーズの接着部位にネクチンが集積した。さらにその接着部位に GFP-E-カドヘリンとカテニンが集積した。以上の結果から、低カルシウム TPA 培養下において、ネクチン接着部位にトランス結合していない E-カドヘリンが集積することが示唆された。

IV. 細胞間接着形成初期におけるネクチン接着部位の重要性

低カルシウム濃度 TPA 培養下において、ネクチン接着部位にトランス結合していない E-カドヘリンやカテニン、および TJ 構成分子が集積する。そこで、細胞間接着形成初期にネクチン接着部位が必要かどうかを検討した。ネクチン阻害剤によってネクチンのトランス結合を阻害すると、細胞間接着部位に AJ・TJ 構成分子は濃縮しなかった。このことから、低カルシウム TPA 培養下において、ネクチンのトランス結合が AJ・TJ 構成分子の集積に関与することが明らかになった。

[総括]

今回、低カルシウム濃度 TPA 培養下における E-カドヘリン非依存的な TJ 形成機構について、以下のことがわかった。E-カドヘリンは細胞膜表面に存在しているが、トランスに結合していないことを見出した。E-カドヘリンのトランスな結合は必ずしも TJ 形成に必要ではないと考えられた。次に、この E-カドヘリンは細胞内領域にカテニンを連結し、ネクチン接着部位に集積することを明らかにした。また、ネクチンのトランス結合は細胞間接着形成に必要であることを明らかにした。TPA により Protein Kinase C (PKC) が活性化されることから、ネクチン接着部位での E-カドヘリン非依存的な TJ 形成機構は PKC の活性化の関与が示唆される。

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 にはクローディング、AJ にはカドヘリンとネクチンが主に局在している。TJ の形成は、E-カドヘリンが形成する AJ に依存しており、AJ が破壊されると TJ も破壊されることが知られている。しかし、MDCK 上皮細胞を低カルシウム濃度で培養すると AJ とともに TJ が消失するが、ホルボールエステル (TPA) を加えると、カドヘリン非依存的な TJ が形成されることが知られている。

本申請者は、ネクチン接着部位での E-カドヘリン非依存的な TJ 形成におけるネクチンの役割を検討した。その結果、低カルシウム濃度で TPA を作用させると、GFP-E-カドヘリンはネクチン細胞間接着部位に集積するが、トランスに結合していないことを見出した。このトランス結合していない GFP-E-カドヘリンは細胞内領域ではカテニンと結合していた。さらに、ネクチン結合阻害剤を作用させると、GFP-E-カドヘリン-カテニン複合体の集積および TJ 形成が阻害されることを明らかにした。以上の結果から、低カルシウム濃度 TPA 作用条件下における TJ 形成には、ネクチンのトランス結合が必要であるが、カドヘリンのトランス結合は必ずしも必要ではないことが明らかとなった。

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、本研究はこの申請者の博士 (医学) の学位授与に値する。