

Title	Nectin-3, a New Member of Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules That Shows Homophilic and Heterophilic Cell-Cell Adhesion Activities
Author(s)	佐藤, 啓子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47543">https://hdl.handle.net/11094/47543</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	佐 藤 啓 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 20587 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 4 月 24 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	<b>Nectin-3, a New Member of Immunoglobulin-like Cell Adhesion Molecules That Shows Homophilic and Heterophilic Cell-Cell Adhesion Activities</b> (ホモフィリックおよびヘテロフィリックな細胞接着活性を示す新規イムノグロブリン様細胞接着分子ネクチン-3)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高井 義美  (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 内山 安男

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### [ 目 的 ]

近年、高井らによって、接着分子ネクチンと F-アクチン結合蛋白質アフアディンの複合体が、カドヘリン-カテニン系との密接な関係のもと、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の形成を制御していることが明らかにされている。ネクチンは、イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、3つのイムノグロブリン様ドメインを有する細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域から構成されている。ネクチンは、細胞表面上でシスダイマーを形成した後に、相手側の細胞表面にあるネクチンとトランスに結合して細胞接着活性を示すと考えられている。ネクチンは、ネクチン-1 と-2 からなるファミリーを形成していることが知られている。今回私は、ネクチンファミリーに属する新しい分子ネクチン-3 を単離して、その性状を解析した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

##### I. ネクチン-3 cDNA のクローニングと構造決定

ネクチンファミリーの新規メンバーを同定するために、EST データベースを検索した結果、ネクチン-1 および-2 と相同性のある配列が得られた。その配列をもとにマウス脳 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、ネクチンファミリーの新しい分子ネクチン-3 を単離することに成功した。ネクチン-3 には、3つのスプライシングバリエントが存在し、それぞれをネクチン-3 $\alpha$ 、-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$  と命名した。ネクチン-3 $\alpha$ 、-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$  は、他のネクチンファミリーと同様の構造を有していた。ネクチン-3 $\alpha$  および-3 $\beta$  には、ネクチンファミリーで保存されている C 末端の 4 アミノ酸からなる PDZ ドメイン結合モチーフ (E/A) XYV が存在したが、ネクチン-3 $\gamma$  では欠失していた。本研究では、後述の Northern blotting で明らかとなった主なスプライシングバリエントであるネクチン-3 $\alpha$  を中心に解析を行った。

##### II. ネクチン-3 $\alpha$ のホモフィリックなトランス結合とシスダイマーの形成

ネクチン-3 $\alpha$  を発現させた L 細胞 (ネクチン-3 $\alpha$ -L 細胞) では、抗ネクチン-3 $\alpha$  抗体を用いた Western blotting

より約 100 kDa のバンドが検出された。ネクチン-3 $\alpha$ -L 細胞を用いた細胞凝集実験により、ネクチン-3 $\alpha$  はホモフィリックな細胞接着活性を示した。この細胞接着は、EDTA 添加による影響を受けなかったことから、ネクチン-3 $\alpha$  は、ネクチン-1 および-2 と同様に  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性のホモフィリックな細胞接着分子であることが明らかとなった。一方、ネクチン-1 および-2 はシスダイマーを形成することが知られている。そこで、ネクチン-3 $\alpha$ -L 細胞をクロスリンカー (BS3) で処理し、Western blotting を行った結果、分子量約 200-220 kDa のバンドが検出された。したがって、ネクチン-3 $\alpha$  もシスホモダイマーを形成することが明らかとなった。

### III. ネクチン-3 $\alpha$ とネクチン-1 $\alpha$ および-2 $\alpha$ とのヘテロフィリックなトランス結合

ネクチンファミリーメンバー間のヘテロフィリックな細胞接着活性を検討した。ネクチン-1 $\alpha$ 、-2 $\alpha$ 、-3 $\alpha$  をそれぞれ発現させた L 細胞 (ネクチン-1 $\alpha$ -L 細胞、ネクチン-2 $\alpha$ -L 細胞、ネクチン-3 $\alpha$ -L 細胞) の一方を蛍光色素 (DiI) で標識して混合細胞凝集実験を行った。その結果、ネクチン-3 $\alpha$ -L 細胞とネクチン-1 $\alpha$ -L 細胞あるいはネクチン-2 $\alpha$ -L 細胞は、2 種類の細胞による均一な凝集塊を形成した。また、ネクチン-3 $\alpha$  のネクチン-1 $\alpha$  あるいはネクチン-2 $\alpha$  に対するヘテロフィリックな親和性は、各々のホモフィリックな親和性より高かった。一方、ネクチン-1 $\alpha$ -L 細胞とネクチン-2 $\alpha$ -L 細胞では、2 種類の細胞間の凝集はほとんど認められなかった。これらの結果は、蛍光免疫染色法によっても確認された。一方、ネクチン-3 $\alpha$  は、ネクチン-1 $\alpha$  やネクチン-2 $\alpha$  とシスヘテロダイマーは形成しなかった。以上の結果から、ネクチン-3 $\alpha$  がネクチン-1 $\alpha$  あるいはネクチン-2 $\alpha$  とヘテロフィリックにトランス結合することが明らかとなった。

### IV. ネクチン-3 の組織分布および細胞内局在

ネクチン-3 $\alpha$ 、-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$  の組織分布を各々に対する特異的なプローブを用いた Northern blotting により検討した。その結果、ネクチン-3 $\alpha$  は多くの組織で発現していたが、ネクチン-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$  は主に精巣で発現していた。したがって、ネクチン-3 $\alpha$  が主なスプライシングバリエントであることが明らかとなった。つぎに、マウス小腸吸収上皮細胞におけるネクチン-3 $\alpha$  の局在を免疫染色により検討した。その結果、ネクチン-3 $\alpha$  は、ネクチン-2 と同様に AJ に局在することが明らかとなった。

### V. ネクチン-3 $\alpha$ とアフアディンとの結合

ネクチン-3 $\alpha$  とアフアディンとの直接結合をネクチン-3 $\alpha$  の細胞内領域の GST 融合蛋白質とアフアディンの PDZ ドメインの MBP 融合蛋白質を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより検討した。その結果、ネクチン-3 $\alpha$  の細胞内領域とアフアディンの PDZ ドメインは直接結合した。一方、PDZ ドメイン結合モチーフを欠失させたネクチン-3 $\alpha$  の細胞内領域は、アフアディンと結合しなかった。以上の結果から、ネクチン-3 $\alpha$  は、PDZ ドメイン結合モチーフを介してアフアディンと直接結合することが明らかとなった。

### [ 総 括 ]

私は、ネクチンファミリーに属する新しい接着分子ネクチン-3 を同定し、3 つのスプライシングバリエントをネクチン-3 $\alpha$ 、-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$  と命名した。ネクチン-3 は、シスホモダイマーを形成し、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存性のホモフィリックな細胞接着活性を示した。また、ネクチン-3 はネクチン-1 および-2 に対してヘテロフィリックな細胞接着活性を示し、ネクチン-3 のネクチン-1 あるいは-2 に対するヘテロフィリックな親和性は各々のホモフィリックな親和性より高かった。一方、ネクチン-1 および-2 は接着活性を示さなかった。さらに、ネクチン-3 は、ネクチン-2 と共に小腸上皮細胞の AJ に局在し、アフアディンと結合した。以上の結果から、ネクチンは、少なくとも 3 つの構成因子からなるファミリーを形成しており、ホモフィリックな接着活性しかないカドヘリンとは異なり、ホモフィリックあるいはヘテロフィリックによる多様な接着様式を持つ AJ の細胞間接着分子であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究において、ネクチンファミリーに属する新しい接着分子ネクチン-3を同定し、3つのスプライシングバリエントをネクチン-3 $\alpha$ 、-3 $\beta$ 、-3 $\gamma$ と命名した。ネクチン-3は、シスホモダイマーを形成し、Ca<sup>2+</sup>非依存性のホモフィリックな細胞接着活性を示した。また、ネクチン-3はネクチン-1および-2に対してヘテロフィリックな細胞接着活性を示し、このヘテロフィリックな親和性は各々のホモフィリックな親和性より高かった。さらに、ネクチン-3は、ネクチン-2と共に小腸上皮細胞のアドヘレンスジャンクションに局在し、F-アクチン結合蛋白質であるアフアディンと結合した。したがって、ネクチンは、少なくとも3つの構成因子からなるファミリーを形成しており、ホモフィリックな接着活性しかないカドヘリンとは異なり、多様な接着様式を持つアドヘレンスジャンクションの細胞間接着分子であることが示唆された。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後のこの分野の研究に極めて重要な意義を持つものと考えられる。したがって、今後の発展性や生命科学への貢献度から鑑み、学位授与に十分値するものと認める。