The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions
Author(s)	大塩, 貴子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48959
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

【13】

氏　　名	大（おお）　塩（しお）　貴（たか）　子（こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１８０３　号
学位授与年月日	平成 20 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	Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions （アドヘレンスジャンクションとタイトジャンクション形成における Par-3 とアファディンの協調的役割）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　高井　義美 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　米田　悦啓

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

上皮細胞には、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。AJ においてはカドヘリンとネクチンが接着分子として機能している。ネクチンの細胞内は、アクチン結合タンパク質アファディンと結合することにより、アクチン細胞骨格に連結している。TJ においてはクローディンが主な接着分子として機能している。細胞間接着の形成において、まずネクチンが細胞間接着部位に集積する。次に、ネクチンはアファディンを介してカドヘリンをその接着部位にリクルートし、協調的に AJ を形成する。さらに、ネクチンとアファディンは、AJ の頭頂側にクローディンをリクルートして、TJ を形成する。一方、TJ の形成には細胞極性因子も関与しており、細胞極性因子の一つである Par-3 は、アファディンと同様にネクチンと結合する。そこで、本研究では、イヌ腎上皮細胞株 MDCK 細胞を用いてネクチン－アファディン系による AJ･TJ 形成における Par-3 の役割を検討した。

〔　方法ならびに成績　〕

Ⅰ. Par-3 ノックダウン細胞における AJ・TJ 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・TJ を形成するが、2μM 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 Par-3 の役割について検討した。RNA 干渉法によって Par-3 をノックダウンし、細胞間接着の形成を観察したところ、ネクチンは細胞間接着部位へ濃縮していたが、アファディンはその濃縮が弱まっていた。さらに、カドヘリン、クローディンの細胞間接着部位への濃縮も弱まっていた。カドヘリンの接着力を調べたところ、Par-3 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて接着力が低下していた。また、デキストラン透過性実験により、Par-3 ノックダウン細胞では、TJ のバリア機能が低下していることもわかった。以上の結果から、Par-3 は、TJ だけでなく AJ の形成にも関与していることが明らかになった。

Ⅱ. Par-6β、aPKC ノックダウン細胞における AJ・TJ 形成の解析

Par-3 は、Par-6β、aPKC と 3 者複合体を形成していることが知られている。そこで、RNA 干渉法により Par-6β または aPKC をノックダウンし、細胞間接着の形成における Par-6β と aPKC の役割についても検討した。すると、Par-6β ノックダウン細胞および aPKC ノックダウン細胞において、ネクチンは細胞間接着部位へ濃縮していたが、アファディン、カドヘリン、クローディンの細胞間接着部位への濃縮は弱まり、Par-3 ノックダウン細胞と同じ表現型を示した。以上の結果から、AJ・TJ の形成には、Par-3 だけでなく Par-6β や aPKC も関与していることが明らかになった。

Ⅲ. ネクチン-アファディン系による AJ・TJ 形成における Par-3 の役割の解析

Par-3 ノックダウン細胞にアファディンを過剰発現させることによって、AJ・TJ の形成が回復するかを検討した。その結果、アファディンの細胞間接着部位への濃縮は回復したが、カドヘリンやクローディンの細胞間接着部位への濃縮は弱まったままであり、AJ・TJ の形成は回復しなかった。以上の結果から、Par-3 はネクチンとアファディンによる AJ・TJ の形成にも関与していることが明らかになった。

Ⅳ. Par-3 ノックダウン細胞における Rac の活性化の解析

Par-3 は、Rac の GEF である Tiaml とも結合することが知られている。そこで、Par-3 ノックダウン細胞における Rac の活性化を Rac のプルダウンアッセイ法によって調べた。コントロールの細胞では、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すると、時間の経過に伴って Rac が活性化された。しかし、Par-3 ノックダウン細胞では、コントロールの細胞に比べ、Rac の活性化は顕著に減少していた。Rac は、ネクチンやカドヘリンのトランス結合によって活性化される。そこで、どちらのトランス結合による Rac の活性化に Par-3 が関与するのか調べた。ネクチンまたはカドヘリンの細胞外領域をディッシュに固層化し、その上に細胞をまくと、それぞれのトランス結合によって Rac が活性化され、細胞は大きく伸展する。ネクチンについて解析した結果、コントロール細胞でも Par-3 をノックダウンした細胞でも、同じように細胞は大きく伸展した。一方、カドヘリンについて解析した結果、コントロール細胞と比較して Par-3 をノックダウンした細胞では、伸展しなかった。この結果は、活性化型の Rac を発現させることによって回復した。以上の結果から、Par-3 は、ネクチンのトランス結合による Rac の活性化には関与していないが、カドヘリンのトランス結合による Rac の活性化に関与していることが明らかになった。

Ⅴ. 活性化型 Rac を発現させた Par-3 ノックダウン細胞における AJ・TJ 形成の解析

細胞間接着形成には Rac の活性化が必要であることが知られているが、Ⅳ. の結果から Par-3 ノックダウン細胞では Rac の活性化が減少していることが明らかとなった。そこで、Par-3 ノックダウン細胞に活性化型の Rac を発現させて、細胞間接着の形成を観察した。その結果、アファディンの細胞間接着部位への濃縮は弱まったままで、カドヘリンとクローディンの細胞間接着部位への濃縮も回復しなかった。以上の結果から、Par-3 ノックダウン細胞における AJ・TJ の形成異常は、Rac の活性化だけが原因でないことが明らかになった。

〔 総　　括 〕

今回の結果から、細胞間接着形成における Par-3 の役割は⑴ネクチンとアファディンの結合を促進する、⑵カドヘリンのトランス結合による Rac の活性化を制御する、⑶ネクチンやアファディンと協調的に AJ・TJ を形成する、ことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞には、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。AJ ではネクチンが接着分子として機能している。ネクチンは、その細胞内でアクチン結合タンパク質ア

ファディンと結合することでアクチン細胞骨格に連結し、アファディンと協調して AJ と TJ を形成する。一方、TJ の形成には細胞極性因子も関与しており、ネクチンは細胞極性因子の一つである Par-3 とも結合する。そこで、本申請者は、ネクチン-アファディン系による AJ と TJ 形成における Par-3 の役割を検討した。

その結果、Par-3 はネクチンとアファディンの結合を制御していること、そしてアファディンと協調的に AJ と TJ を形成することを明らかにした。さらに、Par-3 はネクチンのトランス結合による Rac の活性化に必要なかったが、カドヘリンのトランス結合による Rac の活性化に必要である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、博士（医学）の学位授与に値する。