



Title	Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies
Author(s)	小村, 仁美
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54144">https://hdl.handle.net/11094/54144</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">大阪大学の博士論文について</a>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

【33】	
氏 名	こむら ひとみ 小 村 仁 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 6 0 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体生理医学専攻
学 位 論 文 名	Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies (初期胚発生期の細胞極性形成におけるアフアディンの役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米田 悦啓 (副査) 教 授 宮坂 昌之 教 授 山下 俊英

## 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ア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や JAM 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、隣り合う細胞間でまずネクチンが細胞間接着部位に集積する。次に、ネクチンは細胞内シグナル伝達機構を活性化してアクチン細胞骨格を再編成し、カドヘリンをその接着部位にリクルートする。リクルートされたカドヘリンはネクチンと協調的に AJ を形成する。また、TJ 形成においてもネクチン-アフアディン複合体や Par 複合体を含む多くの分子の作用が必要である。アフアディン欠損マウスは、胎生期において細胞間接着や細胞遊走の異常により胎生致死となる。しかしながら、胚発生期においてアフアディンが果たす作用の分子メカニズムは十分には明らかになっていない。本研究では、胚発生期のモデルシステムとして胚様体を用い、この分子メカニズムの解明を目的とした。

### 〔 方法ならびに成績 〕

#### I. 胚様体形成時の AJ と TJ 構成分子の局在の解析

ES 細胞は分化抑制因子 LIF の非存在下で浮遊培養すると胚様体を形成する。胚様体最外層の細胞は原始内胚葉に分化し、その内側に基底膜を形成する。基底膜に接する内側の細胞は一層の原始外胚葉に分化する。

アフアディン欠損胚様体では AJ の構成分子であるネクチン-2 や $\beta$ -カテニン、TJ の構成分子である ZO-1 の原始内胚葉および原始外胚葉のアピカル部位への濃縮は認められなかった。ネクチン-2、 $\beta$ -カテニンおよび ZO-1 の発現レベルは野生型とアフアディン欠損胚様体で差がなかったことから、アフアディンは AJ および TJ 構成分子の局在に重要な働きをすることが明らかとなった。また、電子顕微鏡による観察では、アフアディン欠損胚様体の原始内胚葉および原始外胚葉の細胞間接着は高度に減弱しており、上述の結果と合わせて、これらの部位の細胞における AJ と TJ は形成されていないと考えられる。

#### II. 胚様体形成における Par 複合体の局在の解析

Par-3 は Par-6 および atypical PKC (aPKC) と共に複合体を形成し、細胞極性に重要な役割を果たす。アフアディン欠損胚様体では、Par-3 と Par-6 のアピカル部位への濃縮は減少した。Par-3 および Par-6 の発現レベルは野生型と比較して差はなかった。このことは、アフアディンが Par 子複合体の局在を制御して、細胞極性の形成に重要であることを示している。

#### III. Cdc42 と atypical PKC の活性化におけるアフアディンの必要性

ネクチンにより活性化される低分子量 G タンパク質 Cdc42 は Par-6 と結合して、Par 複合体の機能を制

御する。そこで、アフアディン欠損胚様体における Cdc42 の活性化状態をブルダウン法により調べた。その結果、アフアディン欠損胚様体では Cdc42 の活性化が低下していた。Cdc42 の活性化により Par-6 を介して aPKC はリン酸化されるが、アフアディン欠損胚様体では aPKC のリン酸化も低下していた。これらの結果から、胚様体での Cdc42 と aPKC の活性化にアフアディンは必要であり、この Cdc42 と aPKC の活性化抑制が、Par 複合体の原始内胚葉および原始外胚葉のアピカル部位への濃縮減弱の分子機構の一つであると考えられる。

#### IV. インテグリン $\alpha 6$ とインテグリン $\beta 1$ の発現におけるアフアディンの関与

アフアディン欠損胚様体では基底膜ラミニンの局在が大きく乱れている。そこで、ラミニンの受容体であるインテグリンの局在と発現を調べた。インテグリン $\alpha 6$ とインテグリン $\beta 1$ は基底膜および原始外胚葉の細胞間接着部位に濃縮したが、アフアディン欠損胚様体ではこれらの部位に濃縮しなかった。アフアディンを欠損させるとインテグリン $\alpha 6$ の発現レベルは著しく減少した。一方、インテグリン $\beta 1$ は成熟型が減少し、未成熟型が増加した。これらの結果は、アフアディンがインテグリンの発現と成熟度を制御して、ラミニンの局在を制御すると共に、胚様体での細胞極性や細胞間接着の形成に重要な役割を果たしていることを示すものである。

### 〔 総 括 〕

発生初期において、アフアディンは、AJ や TJ 構成分子および Par 複合体の局在、Par 複合体の活性化に必要な低分子量 G タンパク質 Cdc42 や Par 複合体構成分子の一つである aPKC の活性化、さらに、細胞外基質ラミニンの受容体であるインテグリン $\alpha 6$ やインテグリン $\beta 1$ の発現と局在を調節することにより、細胞の極性形成を制御している。

## 論文審査の結果の要旨

アフアディンは、アドヘレンスジャンクション (AJ) で細胞間接着分子ネクチンをアクチン細胞骨格に連結させる。上皮細胞において、ネクチン-アフアディン複合体はAJの形成だけではなく、タイトジャンクション(TJ)の形成にも重要である。今までの研究から、胚発生においてアフアディンが正常な形態形成に不可欠であることが明らかになっている。しかし、その分子メカニズムについてはほとんど解明されていない。本申請者はモデルシステムとして胚様体を使用し、その分子機構について検討した。

その結果、本申請者はアフアディンが発生初期においてAJやTJ構成分子およびPar複合体の局在、Par複合体の活性化に必要な低分子量Gタンパク質Cdc42やPar複合体構成分子の一つであるaPKCの活性化、さらに、細胞外基質ラミニンの受容体であるインテグリン $\alpha 6$ やインテグリン $\beta 1$ の発現と局在を調節することにより、細胞の極性形成を制御していることを見出した。

本研究は初期胚発生におけるアフアディン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) の学位に値する。