Osaka University Knowledge Archive

Title	Involvement of integrin-induced activation of protein kinase C in the formation of adherens junctions
Author(s)	尾﨑, 美沙
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57739
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【1】

氏名	尾﨑美沙（おざきみさ）
博士の専攻分野の名称	博士（生命機能学）
学位記番号	第 23934 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 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Involvement of integrin-induced activation of protein kinase C in the formation of adherens junctions. （インテグリンによるプロテインキナーゼC活性化のアドヘレンスジャンクション形成における作用機構）
論文審査委員	（主査） 教授 米田 悦啓 （副査） 教授 岩井 一宏　教授 八木 健

論文内容の要旨

細胞間接着の形成は正常な組織の構築に不可欠である。上皮細胞の細胞間接着における主な接着装置としてタイトジャンクション(TJ)とアドヘレンスジャンクション(AJ)がある。TJは細胞間接着部位の最も頭頂側に位置し、その機能は大きく二つある。一つは水や水溶性物質が細胞間隙を自由に通過しないようにするバリア機能、もう一つは細胞膜上にあるタンパク質や脂質を頭頂側と側基底側の間で分離するフェンス機能である。一方、AJは強い収縮力に対して組織構造を維持するために、隣接した細胞を物理的に結合する役目を果たしている。AJ形成は、その後のTJ形成に必要であると考えられてきたが、ある条件下では、AJの形成が必ずしもTJ形成に必要でないことが明らかになっており、TJ形成におけるAJ形成の必要性には議論の余地がある。

カドヘリンとネクチンはAJに存在する主要な細胞間接着分子である。カドヘリンがカルシウム依存的な接着活性を持つのに対し、ネクチンはカルシウム非依存的な接着活性を示す。私共の研究室では、ネクチンがAJ形成の初期段階およびその後のTJの形成に重要であること、また、細胞間接着と細胞-基質間接着の間のクロストークについて解析し、ネクチンによるシグナル伝達およびAJ形成には、ネクチンと物理的に結合するインテグリン$\alpha_v\beta_3$の活性化が必要であることを明らかにしている。さらに、低カルシウム濃度で前培養したMDCK細胞において、12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)により薬理学的にプロテインキナーゼC (PKC)を活性化すると、不完全ながらもAJが形成され、TJ様の構造も形成されることを以前に報告した。しかし、細胞間接着形成の過程においてPKCがどのように活性化されて、細胞間接着の形成を制御するのかについてはほとんど解明されておらず、本研究ではAJ形成におけるPKCの活性化の役割と作用について検討した。

まず初めに、MDCK細胞を低カルシウム濃度で前培養し、カルシウム濃度を通常の濃度に戻してAJを形成させる時に、インテグリン$\alpha_v\beta_3$が活性化することを確認した。これに対し、低カルシウム濃度で前培養したMDCK細胞にTPAを投与した場合、インテグリン$\alpha_v\beta_3$の活性化はなくAJ様の構造が形成された。これは、TPAによって直接PKCを活性化することにより誘導されるAJ様構造の形成には、インテグリン$\alpha_v\beta_3$の活性化は必要でないことを示している。また、AJが形成される際に、MDCK細胞に豊富に発現しているPKCαが細胞質から細胞膜上へと移行することにより、PKCαがAJ形成過程で活性化をしていることが示された。逆に、PKCα阻害薬の存在下では、AJ形成は抑制された。次に、インテグリン$\alpha_v\beta_3$阻害薬の投与により、PKCαの活性化が抑制されたことから、PKCαの活性化はインテグリン$\alpha_v\beta_3$に依存していると考えられる。これまでに、インテグリン$\alpha_v\beta_3$の細胞内シグナル伝達に関与する分子FAKは、その下流でc-Srcを活性化することよりAJ形成に必要な分子であることが明らかになっている。そこで、TPA投与によってAJ様構造が形成される際のFAKの活性化について検討した。その結果、TPAによってAJ様構造が形成される際に、FAKのリン酸化が亢進していた。また、このAJ様構造の形成は、FAKのドミナントネガティブ変異体であるFRNKを導入したMDCK細胞において抑制された。このことは、TPAによって活性化されるPKCαがインテグリン$\alpha_v\beta_3$の下流かつFAKの上流で機能していることを示している。FAK下流で活性化されるc-Srcに関しても、c-Src阻害薬の存在下ではTPAによるAJ様構造の形成が抑制されること、またc-Srcの恒常活性型変異体をMDCK細胞に導入すると、PKCαの活性化がない状態でもAJ様の構造が形成されたことから、c-SrcはPKCαの下流で機能していることが確認された。

これらの結果は、活性化したPKCがインテグリン$\alpha_v\beta_3$の下流、FAKの上流で作用し、ネクチンによるAJ形成に重要であることを示している。すなわち、細胞間接着形成の過程では、まず初めにトランス結合したネクチンが活性化型インテグリン$\alpha_v\beta_3$と協調してFAK、c-Srcを活性化するが、この過程で PKCがインテグリン$\alpha_v\beta_3$の下流、FAKの上流で活性化されることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞では、主にタイトジャンクション（TJ）とアドヘレンスジャンクション（AJ）が細胞間の接着を担っている。AJには、接着分子ネクチンが局在し、ネクチンとインテグリン$\alpha_v\beta_3$、FAKが協調したRac、Cdc42の活性化によりAJが形成される。さらにTJが形成され、細胞間接着が完成する。一方、細胞間接着の形成におけるプロテインキナーゼC（PKC）の関与が明らかになっていたが、その分子メカニズムは不明であった。

本研究で、申請者はMDCK細胞を用いて、細胞間接着の形成に主に関与しているPKCがPKCαであること、また、AJ形成におけるPKCα の作用機序を明らかにした。すなわち、PKCαはインテグリン$\alpha_v\beta_3$の下流、FAK上流で作用することによってAJの形成に寄与することを示した。

以上から、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、本研究は学位の授与に値すると考える。