



Title	液中原子間力顕微鏡を用いた無脊椎動物クラシカルカドヘリンの構造進化の解析
Author(s)	西口, 茂孝
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72664
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （西 口 茂 孝）	
論文題名	液中原子間力顕微鏡を用いた無脊椎動物クラシカルカドヘリンの構造進化の解析
論文内容の要旨 クラシカルカドヘリン（以後カドヘリンと省略する）は後生動物で広く保存された、形態形成に必須の細胞間接着タンパク質である。カドヘリンは細胞間接着装置の一つであるアドヘレンスジャンクションを構成する一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外領域は細胞間接着を担い、細胞質領域はカテニタンパク質を介して細胞骨格と連動して形態形成に関わる。カドヘリンは同じ種類のカドヘリンと特異的に結合する結合特異性を持ち、形態形成での細胞選別に関わる。カドヘリンは様々な動物で同定されているが、カドヘリンの細胞外領域のドメイン構成が系統関係を反映して多様化していることが明らかとなっている。脊椎動物に存在する上皮カドヘリン（E-カドヘリン）の細胞外領域は、5つの細胞外カドヘリンドメイン（ECドメイン）が連なった棒状構造をしており、細胞膜から最も遠位（N末端側）のEC1で同種のカドヘリンと特異的に結合する。一方、昆虫に存在する上皮カドヘリン（昆虫E-カドヘリン）はE-カドヘリンの機能的な相同分子であることが示唆されているが、細胞外領域が7つのECドメインとその他のドメインで構成されており、N末端側の6つのECドメイン（EC1-EC6）が接着に必須である点でE-カドヘリンと異なる。E-カドヘリンと昆虫E-カドヘリンは17個のECドメインとその他のドメインを持つ共通の祖先型カドヘリンから、異なるドメインを失って短縮化して進化したことがゲノム解析によって示唆されている。これまで、E-カドヘリンの構造および結合メカニズムが精力的に研究されてきた一方で、昆虫E-カドヘリンや祖先型カドヘリンの構造および結合メカニズムはほとんど明らかになっていない。X線結晶構造解析および電子顕微鏡法によって、E-カドヘリンの構造を複数のグループが報告しているが、その他のカドヘリンに関しては祖先型カドヘリンの一部である4つのECドメインのX線結晶構造解析以外に前例がない。上述の構造解析手法は分子の全長が長い昆虫E-カドヘリンや祖先型カドヘリンに対して、分子の大量精製や結晶化等の前処理および画像平均化による構造決定が困難であること等の課題がある。一方、液中原子間力顕微鏡（AFM）はカンチレバーと呼ばれる探針により、観察対象の表面構造を画像化する顕微鏡であるが、分子の大量精製や結晶化等の前処理を必要とせず、分子が機能する液中環境で分子の構造および動態を高いSN比で動画撮影によって解析出来ることが利点である。AFMは上述の構造解析手法と比べて分解能が劣ることが欠点であるが、上述の課題を補完する技術である。 私は無脊椎動物のカドヘリンの構造および結合メカニズムを明らかにすることを目的として、昆虫E-カドヘリンに分類されるショウジョウバエ上皮カドヘリン（DE-カドヘリン）と、祖先型カドヘリンに分類されるショウジョウバエ神経カドヘリン（DN-カドヘリン）の精製分子を用いた構造解析と、組織切片を用いたin situでの細胞間接着装置の構造解析に取り組んだ。本研究で私はAFMの利点を駆使して、カドヘリンが機能する溶液組成で精製した分子を液中環境で観察してカドヘリンの構造を解析した。AFMは分解能が低いことが欠点であるが、本研究で私はDE-およびDN-カドヘリンの全長だけでなく、分子の欠損シリーズやC末端側にGFPを付加した分子を作製し、これらの観察画像を比較して構造を解析した。 昆虫E-カドヘリンに分類されるDE-カドヘリンのAFM観察の結果、DE-カドヘリンは接着に必須なEC1-EC6の内、N末端側のEC1-EC4で安定した球状構造を形成し、EC5-EC6がこの球状構造の安定化に必要であることを特定した。AFMで観察したDE-カドヘリンの球状構造の機能的意義を探るために、私はDE-カドヘリンと同じく昆虫E-カドヘリンに分類されるコオロギの上皮カドヘリン（Gb1-カドヘリン）が、DE-カドヘリンと同じドメイン構成を持つ一方で、同種のカドヘリンのみと結合することに着目し、特異的な結合に関与するドメインを探索した。私はDE-カドヘリン由来のECドメインとGb1-カドヘリン由来のECドメインから構成されるハイブリッドカドヘリンを、様々なドメイン領域で切り替えて作製し、これらのハイブリッドカドヘリンがDE-カドヘリンとGb1-カドヘリンのどちらに特異的に結合するか、昆虫細胞系を用いて解析した。実験の結果、昆虫E-カドヘリンの球状構造を形成するEC1-EC4に同種のカドヘリンに対する結合特異性を決める主要因子が存在することを特定し、昆虫E-カドヘリンの球状構造が特異的な結合に重要であることを明らかにした。	

祖先型カドヘリンに分類されるDN-カドヘリンのAFM観察の結果、DN-カドヘリンはEC1-EC16の領域内に少なくとも3箇所の屈曲部を持ち、1箇所はフレキシブルに屈曲し、その他の2箇所は球状構造の形成に関与することを特定した。さらに、DN-カドヘリンはECドメイン以外のドメインから成るC末端側の領域においても球状構造を形成することを特定した。その後の観察により、同じくDE-カドヘリンでもC末端側のECドメイン以外のドメイン領域で球状構造が観察されたことから、C末端側の球状構造は昆虫E-カドヘリンと祖先型カドヘリンの共通した特徴であることがわかった。抗体ビーズを用いた分子の結合機能評価の結果、DE-およびDN-カドヘリンの両者において、ECドメイン以外の領域がなくても分子が結合可能なことから、C末端側の球状構造は結合に必須ではないことが示唆された。

精製分子の構造解析により無脊椎動物のカドヘリンの構造的特徴が明らかになったが、*in situ*でのこれらのカドヘリンの構造は不明である。本研究で私はAFMの高いSN比を利用して、昆虫組織切片上の細胞間ジャンクションを対象としたカドヘリンの構造解析手法の開発に取り組んだ。私は徳安法を応用した方法を用いて超薄組織切片を作製し、細胞間ジャンクションと推定される領域において、細胞間隙の一部を分子が網目状に架橋した構造体をAFM観察によって特定した。

以上の研究結果を総合して、私はAFMと精製分子を用いた一分子構造解析により、昆虫E-カドヘリンと祖先型カドヘリンの両者において、①N末端側のECドメイン群が球状構造を形成する特徴は共通する一方で対応するドメインは相同でないこと、②ECドメイン以外のドメイン群で結合に必須でない球状構造を形成する特徴が共通することを明らかにした。また、組織切片を用いた実験により、AFMが精製分子の構造解析だけでなく、*in situ*での細胞間接着装置の構造解析にも応用可能であることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (西 口 茂 孝)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	松野 健治
	副 査	教 授	西田 宏記
	副 査	教 授	黒田 俊一
	副 査	招聘准教授	小田 広樹

論文審査の結果の要旨

本論文は、「はじめに」と「まとめ」に加えて、3章で構成されている。

クラシカルカドヘリン（以後カドヘリンと省略する）は後生動物の形態形成に必須の細胞間接着タンパク質である。カドヘリンはアドヘレンスジャンクションを構成する一回膜貫通型タンパク質であり、細胞外領域は細胞間接着を担い、細胞質領域はカテニタンパク質を介して細胞骨格と連動して形態形成に関わる。カドヘリンは同じ種類のカドヘリンと特異的に結合する結合特異性を持ち、形態形成での細胞選別に関わる。カドヘリンは様々な動物で同定されているが、カドヘリンの細胞外領域のドメイン構成が系統関係を反映して多様化していることが明らかとなっている。脊椎動物の E-カドヘリンの細胞外領域は、5 つの EC ドメインが連なった棒状構造をしており、細胞膜から最も遠位の EC1 で同種のカドヘリンと特異的に結合する。一方、昆虫に存在する昆虫 E-カドヘリンは E-カドヘリンの機能的な相同分子であることが示唆されているが、細胞外領域が 7 つの EC ドメインとその他のドメインで構成されており、N 末端側の 6 つの EC ドメインが接着に必須である点で E-カドヘリンと異なる。E-カドヘリンと昆虫 E-カドヘリンは 17 個の EC ドメインとその他のドメインを持つ共通の祖先型カドヘリンから、異なるドメインを失って短縮化して進化したことがゲノム解析によって示唆されていた。しかし、E-カドヘリンの構造および結合メカニズムが精力的に研究されてきた一方で、これまで、昆虫 E-カドヘリンや祖先型カドヘリンの構造および結合メカニズムはほとんど明らかになっていないなかった。本論文では、昆虫 E-カドヘリンや祖先型カドヘリンの構造および結合メカニズムの解明を目的として研究がなされた。

本論文では、X 線結晶解析に比して解像度は低いものの多くの利点を持つ原子間力顕微鏡を用いて、昆虫のクラシカルカドヘリン分子の立体構造と結合特異性などの解析を行っている。まず、ショウジョウバエの E-cadherin の構造と結合メカニズムの解析を行い、続いて、カドヘリンドメイン（EC ドメイン）を多く含む祖先型カドヘリン（ショウジョウバエの N-cadherin）について解析している。最後に、ツヤケシイイゴミムシダマシの弾性器官の切片における細部接着構造を、原子間力顕微鏡を用いて観察している。その結果、細胞外ドメインの一部が球状構造を取ること、一部にフレキシブルに折れ曲がる部位があることを観察し、ホモフィリック接着特異性をにう EC ドメインの特定を培養細胞やマイクロビーズによる集合アッセイで初めて明らかにしている。

以上の研究結果を総合して、本論文では、AFM と精製分子を用いた一分子構造解析により、昆虫 E-カドヘリンと祖先型カドヘリンの両者において、①N 末端側の EC ドメイン群が球状構造を形成する特徴は共通する一方で対応するドメインは相同でないこと、②EC ドメイン以外のドメイン群で結合に必須でない球状構造を形成する特徴が共通することが明らかにされた。さらに、組織切片を用いた先駆

的な実験により、AFM が精製分子の構造解析だけでなく、in situ での細胞間接着装置の構造解析にも応用可能であることを示した。

これらの研究成果は細胞生物学研究において新しい見解をもたらしたのみならず、今後のカドヘリン研究の発展に寄与するもので、理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。