

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特別推進研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20002009

研究課題名（和文）カドヘリン接着分子群と細胞骨格の連携による細胞行動制御

研究課題名（英文）Regulation of cell behavior through the interplays of cadherin cell adhesion molecules and cytoskeleton

研究代表者

竹市 雅俊（TAKEICHI MASATOSHI）

独立行政法人理化学研究所・高次構造形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号：00025454

研究成果の概要（和文）：

カドヘリン細胞接着分子群と細胞骨格系の連携機構について研究し、エプリンが上皮型接着から繊維芽細胞型接着の転換制御に関わること、Fat4 および Dachous1 が神経上皮細胞の頂端部ドメイン形成に必要であること、Willin が接着部位の収縮を制御すること、Celsr1 が神経板の平面内極性的に必要なこと、プロトカドヘリン 17 が軸索の集団的伸展を制御すること、などを明らかにした。さらに、微小管マイナス端に結合する因子 Nezha/CAMSAP3 を同定し、中心体に依存しない微小管の研究分野を前進させた。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the mechanisms of the cooperation between cadherin superfamily members and cytoskeletal proteins. The findings include 1) EPLIN is involved in the epithelial to mesenchymal transition of junctional architecture, 2) Fat4 and Dachous1 are required for apical domain formation in neuroepithelial cells, 3) Willin regulates junctional constriction, 4) Celr1 is required for PCP formation of the neural plate, 5) protocadherin17 regulates collective axon extension. Furthermore, we identified Nezha/CAMSAP3 as a microtubule minus-end anchoring protein, and thereby advanced the research fields of non-centrosomal microtubules.

交付決定額：

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	62,500,000	18,750,000	81,250,000
2009年度	56,300,000	16,890,000	73,190,000
2010年度	61,800,000	18,540,000	80,340,000
2011年度	61,800,000	18,540,000	80,340,000
2012年度	61,800,000	18,540,000	80,340,000
総計	304,200,000	91,260,000	395,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：カドヘリン、カテニン、アクチン、微小管、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

カドヘリンは、スーパーファミリーを形成する細胞膜タンパク質群で、その中、クラシックカドヘリン（たんにカドヘリンとよぶ）は細胞間接着のために重要な役割を果たす。カドヘリンの特性の一つは、アクチンや微小管等の細胞骨格系と相互作用することだが、細胞骨格系は細胞の形や運動を直接制御しているため、これらの連携がより複雑な多細胞体形成現象を制御している可能性が高い。しかしながら、その連携の機構は十分解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、カドヘリン分子群と細胞骨格系の相互作用の仕組みを解き明かしながら、組織形成、形態形成への関与を探ることを目的として立案された。当初、以下、4つの問題を明らかにすることを旨とし研究を開始した。「運動の接触阻害の機構」、「アクチン線維を介したカドヘリンフローによる細胞運動の制御」、「微小管マイナス端による細胞接着制御」、「カドヘリンスーパーファミリー分子群による細胞行動制御」である。しかし、研究の進展に伴い、カドヘリンフローに関しては、この現象に特定した問題を解決することは困難であることが判明し、これに関連する課題を「アクチン系によるカドヘリン接着制御」と修正し研究を進めた。また、運動の接触阻害の課題については今なお研究を継続中のため、ここでの成果の報告は省略し、研究が完了次第、本特別推進研究の成果として公表する予定である。

3. 研究の方法

研究材料としては研究課題に応じ、種々の上皮細胞株、マウス胚、ニワトリ胚を用いた。研究対象の分子の機能解析には、RNAi や遺伝子ノックアウト法を利用した。分子の細胞内分布を検出するためには主として蛍光抗体法を使った。また、生細胞における分子の動態観察のために、蛍光色素タグを付けた分子を発現させ、タイムラプス観察を行った。

4. 研究成果

(1) アクチン系によるカドヘリン接着制御：

上皮細胞間の主要な接着構造である接着帯 (adherens junction (AJ) ; 正式には zonula adherens) の構成成分カドヘリンは、 α カテニンを介してアクチン繊維と相互作用しており、この過程はカドヘリンの細胞接着活性のために必須である。私達は、カドヘリン- α カテニン複合体がアクチン繊維の上を流れるように動く (フロー) ことを見だし、当

初、その生物学的役割を明らかにすることを目指した。そのためには、 α カテニンとアクチン繊維の結合を媒介する分子を同定することが有効と考え、その探索を行ったがフローに関与する分子は見つからず方針を変更することとした。そして、予備実験の過程で見いだされた次の問題に着目し研究を展開した。

私達は、アクチン重合因子 EPLIN を α カテニン結合分子として同定していたが、今回、EPLIN が、上皮細胞コロニーの中で、中心部の典型的な上皮型 AJ には分布するが周縁部の AJ には分布しないこと、そして、中心部の AJ にはアクチンが沿って分布するのに対し、周縁部 AJ ではアクチンが直角に交わり、繊維芽細胞様の AJ に変化していることを見いだした。この現象が意味するところを探った結果、EPLIN がアクチン線維の収縮によって生じる張力に依存して AJ に局在すること、周縁部のアクチンがこの力の状態を破壊して EPLIN を除去し、AJ をより動的な形に変えていることが明らかになった。上皮細胞の AJ は組織を安定に維持するために必要であるが、発生期や組織修復時においては細胞集団の再編成が必要で、その変換機構の一端を明らかにすることができた。

(2) 微小管マイナス端による細胞接着制御：

動物細胞には2種類の微小管、中心体から重合する中心体微小管とそれ以外の非中心体微小管とがある。中心体微小管の動態は広く研究されてきたが、非中心体微小管については、その安定性や重合起点、さらには生物学的役割そのものについて不明な部分が多い。私達は、今回、非中心体微小管のマイナス端に結合するタンパク質 Nezha (別称 CAMSAP3) を発見した。カドヘリンの細胞質には p120 カテニン (p120) が結合し、カドヘリンの安定性に必要であることが知られているが、その生理的作用機構は確定していない。私達は、p120 が PLEKHA7 と結合することをまず見つけ、次に PLEKHA7 に結合する分子を探索した結果、Nezha が同定された。Nezha は細胞間接着部位及び細胞質に点刻状に分布しており、細胞質微小管のマイナス端と結合して、その重合の起点の役割を果たしていることが明らかになった。この発見に続いて以下の研究を展開した。

AJ に結合している Nezha-微小管の機能：キネシン分子群の一つ KIFC3 (マイナス端に向けて動くモータータンパク質) がこの微小管経路で AJ に向けて移動することが明らかとなった。KIFC3 が何らかの分子を運んでいると想定し、その同定を試みた結果、カドヘリンのユビキチン化を阻害する分子を運ん

でいるという確証を得た（論文準備中）。

細胞質に分布する Nezha の役割：Nezha は細胞質にも多く存在する。その役割を知るため、Nezha を siRNA によってノックダウン (KD) した時の細胞の反応を、上皮細胞株を用いて観察した。その結果明らかになったことは、①Nezha KD 後、非中心体微小管が減少し、その代わり中心体微小管が増える。②ゴルジ装置が断片化する。③逆に Nezha を過剰発現させると、中心体微小管が消滅し、また、ゴルジが細胞質側に移動する。以上の結果から、Nezha が非中心体微小管の安定化・維持のために重要な役割を果たしていること、中心体の微小管重合活性を抑制していること、さらには、Nezha 由来の微小管がオルガネラの配置に重要であることなどが明らかになった。また、類似の表現型が、Nezha 関連分子 CAMSAP2 の KD によっても観察されること、Nezha/CAMSAP2 の二重ノックダウンによって増強されることも見出した。

細胞形態・運動性における Nezha の役割：非中心体微小管は種々の細胞行動を制御していると予想された。実際、Nezha KD 後の細胞を観察すると、周縁部の突起形成が促進され、さらに、アクチンストレス繊維が増えていた。Nezha 由来微小管と中心体由来微小管を比較すると、後者では脱チロシン化が増強されている。また、微小管に結合し活性が抑制されるとされる GEF-H1 (RhoGEF の一種) の活性が Nezha KD 後に上昇していた。両者の関係を調べた結果、GEF-H1 が脱チロシン化微小管から離脱するためその活性が上がり、その結果ストレス繊維が増えると結論づけられた。これらの発見により、1つの細胞内において重合起点が異なる微小管は、異なる生理作用があることが初めて明らかになった。

(3) カドヘリンスーパーファミリー分子群による細胞行動制御：

Fat カドヘリン及びその下流因子 Willin の研究：Fat カドヘリンは類似分子 Dachous と相互作用して細胞極性、増殖などを制御していることがショウジョウバエを用いた研究により明らかになっているが、脊椎動物における機能については不明だった。マウス脳で発現する両分子の役割を調べたところ、胎児大脳皮質を構成する神経上皮細胞頂端部の形成・維持のために必要であることが分かった。次に、ショウジョウバエにおいて Fat の下流で Hippo シグナル系に関与しているとされる Expanded の脊椎動物ホモログ Willin の細胞生物学的な機能解析を行った。その結果、①本分子は Par3 と共同して aPKC を接着帯に局在させる、②aPKC は直接 ROCK をリン酸化することにより ROCK を細胞質に止める、③それにより接着帯における ROCK の量を調節

し過剰な収縮を押さえている、という新しい細胞接着の制御機構が明らかとなった。aPKC は細胞極性形成を始めとする様々な細胞現象に関与しており、本発見は、その機能解明に大きく貢献できた。ただし、Fat および Hippo シグナルとの関係は未解決のままである。

Celsr1 (Flamingo) カドヘリンによる細胞間接着の極性的な収縮を介した神経管形成：神経管は神経板が胚の前後軸に沿って閉じる現象である。その前提として、神経板が内側（神経上皮細胞の頂端部側）に向けて湾曲する必要がある。古典的には、神経上皮の頂端部が収縮することにより曲がる、とされているが、もし単純に収縮するならば上皮は椀状に曲がるだけで、神経管が正しく閉じるためには頭尾軸に沿った湾曲が必要である。しかしその仕組みは謎であった。今回私達は、トリ胚の神経管を詳しく観察することにより、平面内極性 (PCP) シグナル因子 Celsr1 (カドヘリンスーパーファミリー群の1つ) が、神経板の頂端部側の AJ において、湾曲方向に沿う部分だけに局在し、その部分を裏打ちしているアクトミオシンを収縮させ、これが神経板を一方向に曲げていることを明らかにした。Celsr1 はこの機能を果たすため、Celsr1 → Dishevelled → DAAM1 → PDZ-RhoGEF → ROCK の順番にこれらの分子を AJ に集結させ、最後にアクトミオシンを収縮させていた。以上の発見により、初期発生の中核をなす神経管の形成という基本過程の仕組みを明らかにすることができた。

プロトカドヘリン 17/19 の機能解析：プロトカドヘリン群は主として神経系で発現されるが、その生物学的機能についてはほとんど解明されていない。ここでは、ヒトの神経疾患に関与することが知られる Pcdh19 及びそれに近縁の Pcdh 17 に焦点を当て、その機能研究を行った。両者について結合因子の解析を行い、同じサブファミリーに属する Pcdh10 について私達がすでに明らかにしたように、WAVE 複合体が結合することが分かった。さらに、WAVE 複合体と機能的に協調する他のアクチン重合制御因子の結合も認めた。一方、両分子のノックアウトマウスを作製し表現型解析を進め、Pcdh 17 ノックアウトマウスでは扁桃体の神経軸索の伸長異常を見出した。その原因を探った結果、正常の成長円錐は他の軸索上を遊走するが、Pcdh 17 ノックアウトマウスの成長円錐は他の軸索と接した時、移動が停止してしまうことを見出した。そして、成長円錐が他の軸索上を動くために、Pcdh 17 に結合したアクチン重合制御因子が関与することが示唆された。以上、この研究により、軸索の集団的な伸展の機構が始めて

解明された (論文投稿中)。なお、Pcdh19 ノックアウトマウスについては、ヒト病態と関連づけが可能な変異が見つかり研究を継続中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Ishiuchi, T., and Takeichi, M. (2012) Nectins localize Willin to cell-cell junctions. *Genes to Cells* 17, 387-397.
2. Hirano, S., and Takeichi, M. (2012) Cadherins in brain morphogenesis and wiring. *Physiol. Rev.* 92, 597-634.
3. Nishimura, Y., Honda, M., and Takeichi, M. (2012) Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural tube closure. *Cell* 150, 1084-1097.
4. Vassilev, V., Mandai, M., Yonemura, S., and Takeichi, M. (2012) Loss of N-cadherin from the endothelium causes stromal edema and epithelial dysgenesis in the mouse cornea. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 53, 7183-7193.
5. Tanaka, N., Meng, W., Nagae, S., and Takeichi, M. (2012) Nezh/CAMSAP3 and CAMSAP2 cooperate in epithelial-specific organization of non-centrosomal microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 20029-20034.
6. Ishiuchi, T., and Takeichi, M. (2011) Willin and Par3 cooperatively regulate epithelial apical constriction through aPKC-mediated ROCK phosphorylation. *Nature Cell Biol.* 13, 860-866.
7. Oda, H., and Takeichi, M. (2011) Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J. Cell Biol.* 193, 1137-1146.
8. Togashi, H., Kominami, K., Waseda, M., Komura, H., Miyoshi, J., Takeichi, M., and Takai, Y. (2011) Nectins establish a checkerboard-like cellular pattern in the auditory epithelium. *Science* 333, 1144-1147.
9. Takeichi, M. (2011) Self-organization of animal tissues: cadherin-mediated processes. *Dev. Cell* 21, 24-26.
10. Taguchi, K., Ishiuchi, T., and Takeichi, M. (2011) Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J. Cell Biol.* 194, 643-656.

11. Meng, W., and Takeichi, M. (2010) Adherens Junction: Molecular architecture and regulation. In "Cell-Cell Junctions, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, ed. W.J. Nelson & E. Fuchs," pp. 49-61, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. Ishiuchi, T., Misaki, T., Yonemura, S., Takeichi, M., and Tanoue, T. (2009) Mammalian Fat and Dachsous cadherins regulate apical membrane organization in the embryonic cerebral cortex. *J. Cell Biol.* 185, 959-967.
13. Ito, S., and Takeichi, M. (2009) Dendrites of cerebellar granule cells correctly recognize their target axons for synaptogenesis in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 12782-12787.
14. Nishimura, T., and Takeichi, M. (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 89, 33-54.
15. Abe, K., and Takeichi, M. (2008) EPLIN mediates linkage of the cadherin-catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 105, 13-19.
16. Nishimura, T., and Takeichi, M. (2008) Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development* 135, 1493-1502.
17. Nakao, S., Platek, A., Hirano, S., and Takeichi, M. (2008) Contact-dependent promotion of cell migration by the OL-protocadherin-Nap1 interaction. *J. Cell Biol.* 182, 395-410.
18. Meng, W., Mushika, Y., Ichii, T., and Takeichi, M. (2008) Anchorage of microtubule minus-ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. *Cell* 135, 948-959.

[学会発表] (計 19 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.cdb.riken.go.jp/en/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹市 雅俊 (TAKEICHI MASATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・高次構造形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号：00025454

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし