

平成 30 年 5 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19035

研究課題名(和文)ネクチン依存性新規細胞間接着構造の同定と機能

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a novel Nectin-mediated cell-adhesion apparatus

研究代表者

圓岡 真宏 (Maruoka, Masahiro)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定助教

研究者番号：70736412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、乳腺におけるネクチン依存性の細胞間接着装置の役割を明らかにするとともに、乳腺以外の他の組織の構築に寄与するネクチン依存性の細胞間接着装置を探索・同定することである。代表者は乳腺におけるネクチン依存性の細胞間接着装置が妊娠時の乳腺発達に必須のプロラクチン受容体と相互作用することで、プロラクチン受容体のシグナル伝達を促進することや、その分子メカニズムを明らかにした。また、ネクチンの発現を可視化するレポーターマウスなどを用いて新規のネクチン依存性接着構造を見出した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to understand the role of Nectin-mediated cell-adhesion apparatus in mammary gland and to identify a novel Nectin-mediated cell-adhesion apparatus that contributes to the formation of functional tissue architecture other than mammary glands. I demonstrated that the Nectin-mediated cell-adhesion apparatus in the mammary gland interacts with the prolactin receptor essential for mammary gland development during pregnancy, thereby promoting the prolactin receptor signaling and revealed its molecular mechanism. In addition, using reporter mice that can visualize the expression of nectins, I identified a novel nectin-dependent cell adhesion apparatus.

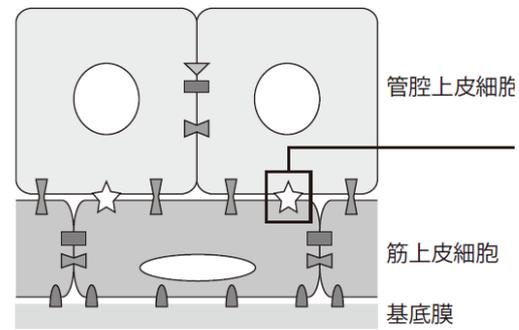
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ネクチン 細胞間接着 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

小腸などの上皮組織では、同種あるいは異種の上皮細胞同士が一層のシート状構造を呈しており、これらの細胞はアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、ギャップジャンクションおよびデスモソームの4種類の細胞間接着装置によって接着している。これらの接着装置を構成する接着分子やその結合分子はすでに同定されており、上皮組織の形成と維持の機構は分子レベルでかなり理解されている。一方、乳腺などの外分泌腺の上皮組織では、一層のシート状の管腔上皮細胞とそれらを取り囲む筋上皮細胞の二層構造を呈しており、管腔上皮細胞の基底側は筋上皮細胞の頭頂側と接着している。管腔上皮細胞同士は上記の4種類の接着装置によって、筋上皮細胞同士はタイトジャンクション以外の3種類の接着装置によってそれぞれ接着しており、管腔上皮細胞と筋上皮細胞とはデスモソームによって接着している(右図)。乳腺は、胎児期には管状の構造をしているが、思春期以降に伸長・分岐と終末腺房形成をしながら発達し、妊娠によって乳汁を分泌する乳腺葉を形成する構造に成熟する。この乳腺の発達過程にはエストロゲン、プロゲステロン、プロラクチン、成長ホルモンなどのホルモンやEGFやFGFなどの細胞増殖因子が関与している。

ネクチンはネクチン-1、-2、-3、-4からなるファミリーを形成しており、同じネクチン分子同士が結合するホモフィリックな相互作用だけでなく、異なるネクチン分子間でもヘテロフィリックに結合する。また、ホモフィリックな結合に比べてヘテロフィリックな結合の方が圧倒的に強いという特徴を有している。単層上皮組織ではネクチンがカドヘリンと共にAJを形成するが、二層上皮組織でのネクチンの存在や機能は解析されていなかった。研究代表者は乳線におけるネクチンの発現と分布を解析したところ、一層目の乳腺上皮細胞同士のアドヘレンスジャンクションにはカドヘリンとネクチン-2が関与しているが、管腔上皮細胞と二層目の筋上皮細胞との異種細胞間の接着にはネクチン-1とネクチン-4が、ヘミデスモゾームと異なる局在を示す新規の接着構造を形成して、細胞間接着の形成に関与していることを見出した。(右図)



- ▽タイトジャンクション
- アドヘレンスジャンクション
- ▲ヘミデスモゾーム
- ✧デスモゾーム
- ☆ネクチン-1とネクチン-4による細胞間接着構造

また、ネクチン-1の欠損マウスの妊娠時の乳腺の発達を解析したところ、乳葉の発達と乳汁の産生が障害されていた。さらに、ネクチン-4と結合する新規タンパク質としてプロラクチン受容体を同定し、ネクチン-4がプロラクチン刺激における受容体シグナル伝達経路の活性化を増強することを見出した。これらの結果から、ネクチンを介する接着装置はホルモンや増殖因子と協同して乳腺の発達を制御することが考えられた。

2. 研究の目的

ネクチンやその類似分子であるネクチン様分子(Nec1)は、細胞間接着装置として機能するだけでなく、PDGF受容体、VEGF受容体やインテグリンと同一細胞表面上でシスに結合し、細胞増殖や運動を制御することが示されている。これらのことから、乳腺発達においてネクチン-1とネクチン-4が形成する細胞間接着構造は、単に接着装置としての機能だけでなく、プロラクチン受容体とシスに結合し、そのシグナル伝達を増強することで乳腺分化を促進するものと考えられる。このようなネクチン-1とネクチン-4が作る新しい接着装置は、乳腺上皮のみならず、他の組織・器官でも形成されうると考えられる。そこで本研究では、

(1) 乳腺において、ネクチン-1とネクチン-4が如何にプロラクチン受容体シグナル伝達を増強しているのか、その分子メカニズムを解析する。

(2) ネクチン-1とネクチン-4の発現を可視化するレポーターマウスを作成し、乳腺以外でのネクチン依存性の細胞間接着装置の同定を行う。

これらの解析によって、ネクチン-1とネクチン-4が作る接着装置が担う組織形成への役割と、ネクチンにシスに結合する膜受容体などのシグナル伝達に及ぼす役割を解明する。

3. 研究の方法

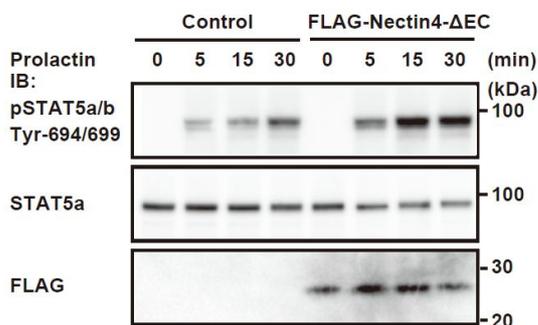
(1) 培養細胞を用いて、ネクチン結合タンパク質の探索および結合ドメインの解析を行う。また、乳腺由来の培養細胞株である EpH4 細胞を用いて、ネクチンの発現抑制株や変異体過剰発現株を用いてプロラクチン受容体シグナリングに与える影響を解析する。プロラクチン受容体はネクチン-4 と結合することから、ネクチン-4 に結合する分子をスクリーニングし、プロラクチン受容体シグナリングに關する分子を同定する。

(2) ネクチン-1 とネクチン-4 の遺伝子座に、スプライスアクセプター配列を含む tdTomato および GFP 遺伝子が蛍光タンパク質としてそれぞれ発現するように挿入された遺伝子改変マウスを作成した。これらのマウスはネクチン遺伝子の代わりに蛍光タンパク質が発現するため、ネクチン遺伝子は欠損状態になる。ネクチン-1 については Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配することでレポーターマウスとして完成され、FLP リコンビナーゼを発現するマウスと交配することで、Exon が lox で挟まれた flox マウスの遺伝子座となる。ネクチン-1 とネクチン-4 のレポーターマウスをそれぞれ交配し、得られた産子について両レポーター遺伝子が片方ずつ保持されたマウスを得た後、組織・臓器を取り出して各々の蛍光タンパク質の発現を組織切片を作成して解析する

4. 研究成果

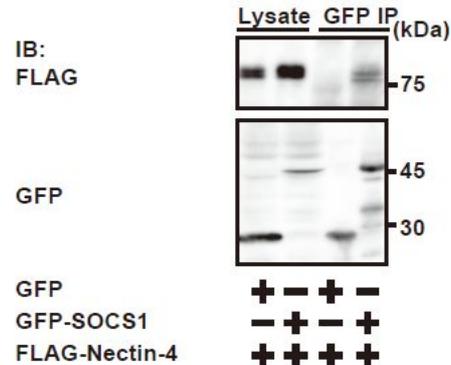
(1) 乳腺におけるネクチン依存性細胞間接着装置の機能解析

ネクチンが形成する細胞間接着装置の解析については、ネクチン-4 が妊娠時の乳腺発達に必要なプロラクチン受容体と相互作用することで、プロラクチン受容体のシグナル伝達を促進する。一方で、ネクチン-4 の細胞内領域 (FLAG-Nectin-4- EC) を過剰発現する乳腺細胞株においてもプロラクチン受容体シグナリングにおける活性化の指標である STAT5 のリン酸化が増強することが見出された。(下図)

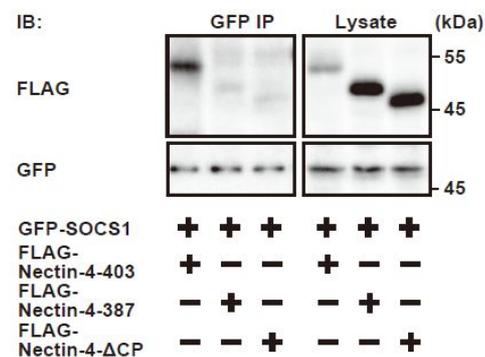
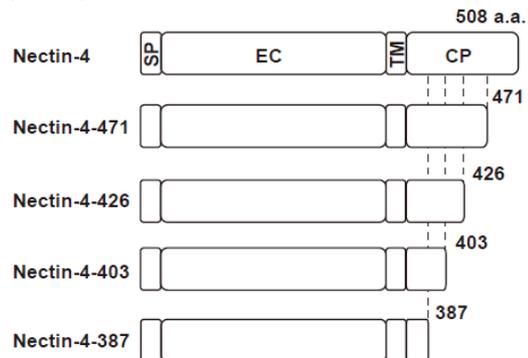


このことから、プロラクチン受容体の活性化において、ネクチン-4 の細胞質内領域が実

質的な働きを持つと考えられた。そこで、ネクチン-4 の細胞内ドメインに結合するタンパク質を探索した。プロラクチン刺激時にプロラクチン受容体の下流では JAK2-STAT5 経路が活性化されたのち、SOCS1 分子の発現が上昇する。SOCS1 は JAK2 に直接結合することでフィードバック阻害を行うが、ネクチン-4 の細胞内ドメインは SOCS1 に結合することを見出した。(下図)



そこでさらに SOCS1 のネクチン-4 に対する結合ドメインを解析した結果、SOCS1 の SH3 ドメインを介してネクチン 4 の細胞膜近傍の領域で結合することが明らかになった。(下図)



signaling pathway. J. Biol. Chem. 292(17):6895-6909
DOI: 10.1074/jbc.M116.769091
<学術論文 査読有>

3. Mizutani K, Kedashiro S, **Maruoka M**, Ueda Y, Takai Y. (2017) Nectin-like molecule-4/cell adhesion molecule 4 inhibits the ligand-induced dimerization of ErbB3 with ErbB2. Sci Rep. 7(1):11375.
DOI: 10.1038/s41598-017-10107-5
<学術論文 査読有>

4. Ueda Y, Kedashiro S, **Maruoka M**, Mizutani K, Takai Y. (2018) Roles of the third Ig-like domain of Necl-5/PVR and the fifth Ig-like domain of the PDGF receptor in its signaling. Genes Cells. 23(3):214-224
DOI: 10.1111/gtc.12564
<学術論文 査読有>

〔学会発表〕(計 3件)

1. Kitayama M, Mizutani K, **Maruoka M**, Suzuki H, Takai Y, Komori T. (2017) FUNCTIONAL ANALYSIS OF NECTINS IN MOUSE SUBMANDIBULAR GLANDS
23rd international Conference on Oral and Maxillofacial Surgery (Poster)
2017/3/31 ~ 4/3, Hong Kong Convention & Exhibition Centre, Hong Kong.

2. **丸岡 真宏** 水谷 清人 慶田城 迅 高井 義美 (2017) 乳腺分化における細胞間接着分子ネクチンの機能
第 64 回日本生化学会 近畿支部例会 (口頭発表)
2017/5/27, 大阪大学豊中キャンパス、大阪

3. **丸岡 真宏** 水谷 清人 慶田城 迅 高井 義美 (2017) ネクチン-4 は SOCS1 によるフィードバック阻害を抑制することで乳腺分化におけるプロラクチン受容体シグナル伝達を促進する
生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) (ポスター発表)
2017/12/6 ~ 12/9, 神戸ポートアイランド、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸岡 真宏 (MARUOKA MASAHIRO)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定助教
研究者番号：70736412