

平成 20 年 10 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590276
 研究課題名（和文） 細胞間接着分子ネクチン - アファディン系と細胞極性因子による細胞極性の形成機構
 研究課題名（英文） Cell polarization mechanisms by nectin-afadin adhesion system and Par polarity proteins
 研究代表者
 藤田 直之(FUJITA NAUYUKI)
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授
 研究者番号：50403192

研究成果の概要：

本研究によって私共は、細胞極性因子 Par-3 は上皮細胞のアドヘレスジャンクション(AJ)とタイトジャンクション(TJ)の形成に必須の役割を果たすが、接着分子ネクチンによって形成される初期の細胞接着には必須でないことを見出した。Par-3 はネクチンとその裏打ち分子アファディンとの結合を促進するが、一方、アファディンは Par-3 とネクチンの結合には関わらない。アファディンとネクチンとの結合だけでは AJ と TJ の形成には十分ではなく、Par-3 とアファディンが協調的に働いて、AJ と TJ の形成を制御している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：細胞間接着・細胞極性・ネクチン・アファディン・Par-3

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着と細胞極性は、多細胞生物の発生や分化の過程における組織構築や正常組織の維持など様々な生命現象に重要な細胞機能であり、細胞接着は極性の形成や調節に重要な役割を果たしている。上皮細胞は細胞間接着と細胞極性の形成が極めて発達した細胞の一つであり、細胞間接着が形成される際、細胞に極性が生じ、細胞の頭頂側と側基底側が区別できるようになる。主な細胞間接着機構として、タイトジャンクシ

ン(TJ)とアドヘレスジャンクション(AJ)が知られており、これらの細胞間接着装置は頭頂側から基底側にかけて規則正しく並んでいる。しかしながら、細胞極性が生じる過程において、TJ が AJ の頭頂側に位置する作用機序については現在全く不明である。

TJ においてはクローディン、オクルーディン、junctional adhesion molecule (JAM) が主要な接着分子であり、細胞内領域でZO-1、-2、-3 を介してアクチン細胞骨格に連結している。AJ においてはカドヘリン

が主要な接着分子であり、その細胞内領域でカテニン、 β -カテニンを介してアクチン細胞骨格に連結している。TJは水溶性分子を自由に通過させないバリア機能と頭頂側と基底側にある細胞膜上のタンパク質や脂質の混在を防ぐフェンス機能を有し、AJは細胞間の機械的な接着に担い、主にカドヘリンがこの接着の中心的な役割を果たしていると考えられてきたが、カドヘリンだけでは説明のできない現象も少なくない。私が所属する研究室では、AJに存在する新規の接着分子ネクチンとネクチンをアクチン細胞骨格に連結する裏打ちタンパク質アファディンからなる新規の細胞間接着機構ネクチン-アファディン系を見出している。これまでに私の指導の下、大学院生がネクチンどうしの結合によりAJとTJの形成を促進する分子機構を世界に先駆けて明らかにしてきている。すなわち、ネクチンどうしが結合すると、低分子量Gタンパク質Rap1、Cdc42、Racが活性化される。活性化されたCdc42とRap1は、アクチン細胞骨格の再編成を引き起こし、ネクチンによる細胞間接着部位にカテニンを介してカドヘリンをリクルートする(Sato et al., J. Biol. Chem., 2006)このときリクルートされたカドヘリンはトランス結合していないカドヘリンでその接着活性は弱い、ネクチンによって活性化されたRap1がアファディンに結合し、この複合体p120^{ctn}に作用すると、p120^{ctn}とカドヘリンの細胞内領域との結合が促進され、その結果カドヘリンの接着活性が高まり、AJ形成が促進する。さらに、ネクチン-アファディン系がAJの形成だけでなくTJの形成にも必須であることを示し、このTJ形成はネクチン-アファディン系による細胞間接着形成に依存的であり、必ずしもカドヘリンによるAJの形成に必要としない(Yamada et al., Oncogene, 2006)。これは細胞間接着と極性形成の分子機構に関する全く新しい概念を提唱するものである。一方、TJ形成には、細胞極性因子Par-3が関与している。私共は、これまでにネクチンがアファディン以外にもPar-3と直接結合することを明らかにしており、細胞間接着部位のネクチンとアファディンの結合には、Par-3が必要であることを明らかにしつつある(Ooshino et al., J. Cell Sci., in revision)。このことは、細胞極性因子がネクチン-アファディン系を制御し、その結果AJとTJの形成および極性の形成を制御している可能性も示唆しており、細胞間接着分子と細胞極性因子による細胞間接着および極性形成における新たな分子機構の発見につながるものと期待される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの細胞間接着と細胞極性についての研究の経験と成果をもとに、(1)細胞極性因子による細胞間接着形成機構、(2)細胞極性因子および細胞間接着分子による細胞極性の形成機構、(3)TJとAJの位置決定にかかわる分子機構の三点に焦点をあてて各分子の相互作用を解明することを目的としている。また、細胞間接着形成後、ネクチンとアファディンはAJにとどまるが、Par-3複合体はTJに局在することが知られている。これらの分子機構についても明らかにする。以上の研究を通じて、細胞間接着分子とその裏打ちタンパク質および細胞極性因子の三者間による細胞間接着形成および細胞極性形成機構の分子レベルでの解明を目指すとともに、長年不明である細胞間接着形成後の極性形成において、TJとAJが細胞間接着部

位の頭頂側からこの順序で整列して配置される機序の全貌解明に取り組みたい。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養とトランスフェクション

FLAG-ネクチン-1、GFP-E-カドヘリンを発現しているMDCK細胞を以前に報告されている通りに作製した。細胞は10% fetal calf serumを含むDulbecco's modified Eagle mediumで培養維持した。DNAのトランスフェクションはLipofectamine 2000 reagentとAmaya Nucleofector kitを使用した。

(2) 抗体と発現ベクター

アファディン抗体、ネクチン抗体は以前に報告されている通りに作製した。E-カドヘリン抗体とPar-6抗体はそれぞれ竹市博士(Center for Developmental Biology, RIKEN, Kobe, Japan)と大野博士(Yokohama City University, Yokohama, Japan)より供与していただいた。他の抗体はコマーシャルソースより購買した。Par-3 cDNAは大野博士(Yokohama City University, Yokohama, Japan)より供与していただいた。Par-3 cDNA、アファディン cDNA、V12Rac(Racの dominant active mutant) cDNAをpEGFP、pCMV-FLAGにサブクローニングした。

(3) ノックダウン実験

Par-3、アファディンのノックダウンはH1プロモーターをもつpBS-H1を利用したshort hairpin RNA(shRNA)法によって行った。犬Par-3、マウスPar-3、犬aPKC、犬Par-6、犬アファディンのノックダウンのためのインサートはそれぞれ、

```
5' -GACACAGAAGAAAGTTCAA-3'      、
5' -GACAGACTGGTAGCAGTAT-3'      、
5' -AGTTCTGTTGGTGCGAATA-3'      、
5' -GACTTCAGACCTGTGTCTT-3'      、
5' -GACAATCCTGCTGCTTACC-3'      を用いた。犬Par-3、
マウスPar-3、犬aPKC、犬Par-6、Luciferaseのスクランブル配列はそれぞれ
5' -AAGAAGAAGAAGCTCTCA-3'      、
5' -GGTGGTAACAACGGTAACT-3'      、
5' -GCATCTATCGTTGTCATCG-3'      、
5' -GTGTAGTGTCTGTACTAA-3'      、
5' -CGTACGCGGAATACTTCCA-3'      を用いた。
```

(4) カルシウムスイッチ実験

FLAG-ネクチン-1、GFP-E-カドヘリン発現MDCK細胞、野生型MDCK細胞のカルシウムスイッチ実験は以前に報告されている通りに行った。すなわち、細胞(1 X 10⁵)を18mmのカバーグラスに培養し、トランスフェクション後72時間後に細胞をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、2mMカルシウム、無血清で1時間培養した。次に細胞を2・Mカルシウムで3時間培養し、その後2mMカルシウムで4時間培養した。

(5) 免疫蛍光染色

細胞は-20℃のアセトン/メタノール(50/50)混合液で1分、または1% formaldehyde (PBS)で15分間固定した。その後、0.2% Triton X-100を含むPBSで15分間処理した。1%牛血清アルブミン(BSA)と1mMカルシウムを含むTris-buffered saline (TBS)で1時間ブロックした後、細胞を抗体で1時間インキュベーションし

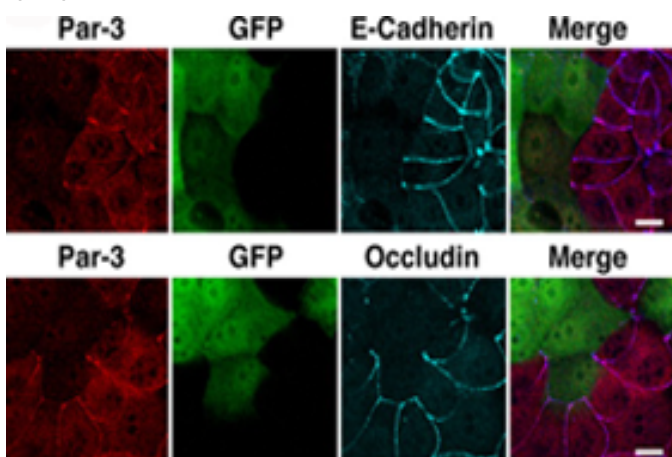
た。サンプルを三回、1 mM カルシウムを含む TBS で洗淨した後、二次抗体と 30 分インキュベーションした。サンプルを 1 mM カルシウムを含む TBS で洗淨したのち、confocal laser scanning microscope で観察した。

(6) 他の方

細胞 dissociation アッセイ、TJ のバリアー機能アッセイ、細胞 spread アッセイ、Rac-1 pull down アッセイは以前に報告されている通りに行った。タンパク質の定量は Bradford 法を用いた。SDS 電気泳動は従来の方法で行った。

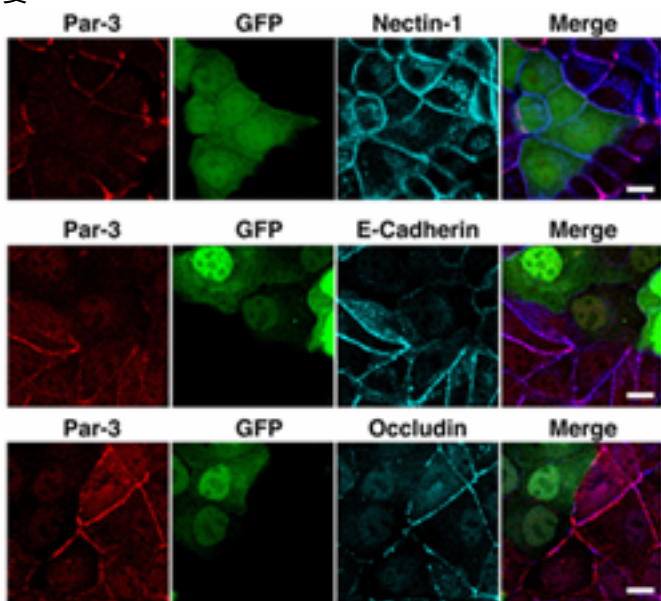
4. 研究成果

(1) AJ と TJ の形成における Par-3 の必要性



ノックダウン MDCK 細胞に GFP を発現させ、野生型 MDCK 細胞は GFP を発現していない。カルシウムスイッチをした後、野生型細胞では E-カドヘリン、オクルーディンはそれぞれ AJ と TJ に局在した。一方、Par-3 ノックダウン MDCK 細胞同士の接着部位では E-カドヘリン、オクルーディンのシグナルが著明に減少した。これらのことより、Par-3 は AJ と TJ の形成に必須であることが明らかになった。

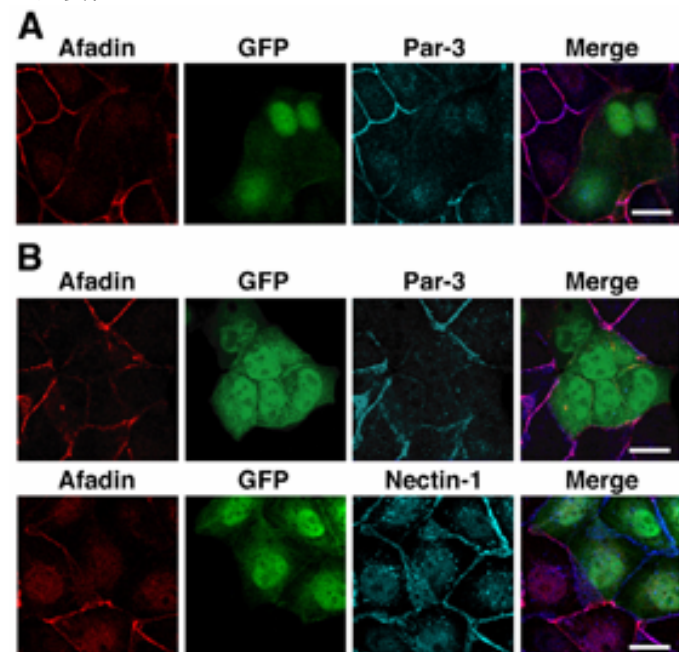
(2) ネクチンによる接着形成における Par-3 の必要性



ネクチン-1 を発現している MDCK

細胞 (GFP を発現していない細胞) ではネクチン-1 による接着部位に E-カドヘリン、オクルーディンが濃縮していた。これらの細胞に Par-3 をノックダウンさせると (GFP 発現)、E-カドヘリン、オクルーディンが、ネクチン-1 のシグナルは変化しなかった。これらのことより、Par-3 はネクチンによる接着形成に必要でないことが明らかとなった。

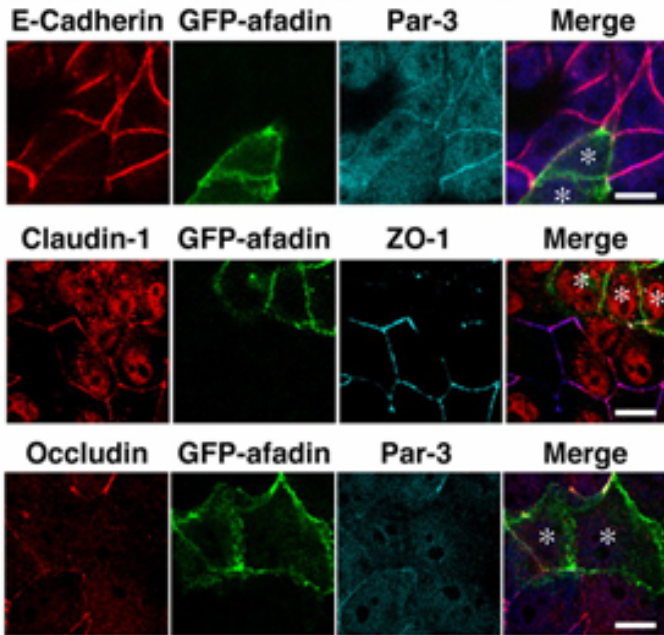
(3) ネクチンとアフアディンの共局在における Par-3 の必要性



野生型 MDCK 細胞 (GFP を発現していない) にカルシウムスイッチを行うと、アフアディンと Par-3 は細胞間接着部位に共局在した。しかし、GFP を発現させた Par-3 ノックダウン MDCK 細胞では、アフアディンのシグナルが接着部位より消失した (図 A)。同様にネクチン-1 MDCK 細胞で、アフアディンと Par-3 はネクチン-1 と共局在した (図 B)。Par-3 ノックダウンさせると (GFP を発現させると) アフアディンのシグナルが接着部位より消失した。以上の結果から、Par-3 はネクチンとアフアディンの共局在に必須であることが明らかとなった。

(4) AJ と TJ 形成における Par-3 とアフアディンの協調作用

Par-3 ノックダウン MDCK 細胞に GFP-アフアディンを強制発現させてカルシウムスイッチを行った。GFP-アフアディンは細胞間接着に濃縮されたが、E-カドヘリン、オクルーディン、ZO-1 は細胞間接着部位には濃縮しなかった。これらの結果より、Par-3 はネクチンとアフアディンの結合を制御し、アフアディンと協調して AJ と TJ の形成を制御していると考えられる。



6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直之(FUJITA NAOYUKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：50403192

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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 3 件)

Nakata S, Fujita N, Kitagawa Y, Okamoto R, Ogita H, Takai Y. Regulation of platelet-derived growth factor receptor activation by afadin through SHP-2: implications for cellular morphology J. Biol. Chem. 282, 37815-27825 (2007) 査読有

Ooshio T, Fujita N, Yamada A, Sato T, Kitagawa Y, Okamoto R, Nakata S, Miki A, Irie K, Takai Y. Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions. J. Cell Sci. 120, 2352-2365 (2007) 査読有

Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, Fujita N, Takai Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. Curr. Opin. Cell Biol. 19, 593-602 (2007) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

中田信輔、藤田直之、北川雄一、扇田久和、高井義美(阪大院・分子生物学、神大院・医・分子細胞生物学)

Binding of afadin to SHP-2 stimulates dephosphorylation of PDGF receptor and inhibits the PDGF-induced Ras activation
第 66 回日本癌学会学術総会 H19.10.05 パシフィコ横浜

上江洲章吉、菊池直也、梅田一彰、藤田直之、中西宏之(熊大・院・医学薬学研究部・細胞情報薬理学)

新しいリン脂質結合タンパク質 SGIP1 による初期エンドソームでの EGF 受容体のソーティング