

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770168  
 研究課題名 (和文) 上皮細胞間の接着構造に局在する新規因子の機能解析  
 研究課題名 (英文) Functional analysis of novel components that localize to cell-cell adhesive structures in epithelial cells  
 研究代表者  
 足立 誠 (ADACHI MAKOTO)  
 京都大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：30335244

## 研究成果の概要：

我々は、上皮細胞間接着構造の形成機構解析および機能解析を目的とし、主に3つの課題について研究を行なった。1. 上皮細胞間接着装置の裏打ちに局在する MUPP1 とその近縁分子 Patj の生化学的および細胞生物学的機能解析を行なった。両者の間には様々な生化学的性質上の相同性が認められたが、驚くべきことに細胞内での機能は全く異なり、Patj のみが有為に細胞間接着構造並びに細胞極性の形成維持に関与していることが明らかになった。2. 細胞間接着装置の裏打ちに局在する新たな分子 IQGAP3 を同定した。この分子は増殖を行なっている細胞にのみ発現が認められ、またその発現は細胞の増殖に必要不可欠であることが明らかになった。また IQGAP3 は癌遺伝子産物の Ras と結合してその活性を制御することでその機能を発揮していることを見出した。3. GFP 融合 cDNA 発現ライブラリーを用いた局在スクリーニングにより、ARHGAP12 と SPAL3 という低分子量 GTP 結合蛋白質制御因子が新たな接着構造の構成分子として同定された。これらの研究成果により、細胞間接着構造の形成機構およびその新たな機能についての我々の理解は飛躍的に深まった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

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：細胞内・細胞間情報伝達、細胞接着、極性形成、細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞間接着装置には隣り合う細胞同士を密に接着させるという機能だけでなく、上皮細胞に頂端—基質方向への極性を持った

細胞形態を形成・維持させるための機能など、新たな機能が存在することが明らかになりつつあった。また様々な手法を用いた研究により、この領域に存在する分子が多く同定さ

れつつあり、その中にはクローディンファミリーを中心とした膜貫通型の細胞接着因子のほか、細胞膜直下の裏打ちに局在して接着構造を支える ZO-1 などの裏打ち分子が含まれている。細胞接着の活性はクローディンによって直接的に担われていると明らかにされていたが、一方で接着構造・細胞極性の形成がどのような分子機構で制御されているのかについては未知な点が多かった。また、接着構造によって制御されるより新たな細胞内機能の存在の可能性も考えられたが、根拠に乏しいものが多かった。さらに、そのような新たな機能を支えるものを含め、接着構造を作る未知の構成因子がまだ複数存在することも十分に考えられた。

## 2. 研究の目的

細胞間接着装置の機能、またそれを形成する分子機構を明らかにするために、まずは既知の構成因子ではあるがその機能がまだ十分に明らかにされていない物について、様々な側面から解析を行ない、その生化学的性質および分子機能を明らかにする。本研究においては、MUPP1 およびその近縁分子である Patj という2つの分子について、詳細な解析を行なう。また、接着構造の新たな構成因子を同定し、そしてその機能解析を行なうことを通じて、細胞間接着構造の持つ新たな機能を明らかにすることを目的とする。具体的には、既に接着装置に局在することが明らかにされている分子に対する新たな結合因子の同定によって、または接着装置に局在する分子を遺伝子ライブラリーからスクリーニングすることで、新たな構成因子を同定し、そのクローニングと機能解析を行なう。

## 3. 研究の方法

(1) 以前に当研究室によって細胞間接着装置に局在することが明らかにされていた膜裏打ち分子 MUPP1 およびその構造上の近縁分子である Patj (この分子は他の研究グループによって同定されていた) について、生化学的性質および細胞内機能など様々な側面から比較検討する。具体的には、i) すでに MUPP1 か Patj のどちらか一方に対して結合することが報告されている分子の、MUPP1/Patj 両分子に対する結合能を検討する。ii) また、Yeast Two-Hybrid 法、免疫沈降法などによって両者に対する新たな結合因子を探索する。iii) 次いでこれらの結合因子全てに対する MUPP1/Patj 上の結合部位を同定する。iv) MUPP1 と Patj に対する特異的抗体を用いて両者の細胞内での挙動 (安定に接着構造が維持されている状態と接着構造の形成過程の挙動) を比較検討する。v)

さらに RNAi 法によって両分子の細胞内での発現を各々単独で、もしくは両者を同時に抑制することで、両者の細胞内機能を詳細に検討する。vi) RNAi を行なった細胞に対し MUPP1 もしくは Patj の全長の cDNA を exogenous に発現させ、RNAi の表現型が復帰することを確認したのち、iii) で同定された様々な結合分子に対する結合領域を欠損した変異 MUPP1/Patj 分子を作製し、それらの cDNA を全長分子の場合と同様に RNAi 処理した細胞に exogenous に発現させる。各変異型分子がどの程度 RNAi の表現型を回復させることが出来るか (あるいは出来ないか) を解析することで、MUPP1/Patj にとってどの分子との結合が機能的に有為であるのかを明らかにする。

(2) 一方、既知の接着構造因子に対する結合分子として IQGAP3 をクローニングした。この分子は当時ゲノムプロジェクトから遺伝子の存在は知られていたものの、どのような機能を持っているかは全く不明であった。ただ細胞接着制御やニューロンの軸索伸長、および細胞運動などへの関与が既に報告されていた IQGAP1 および IQGAP2 と構造上の類似性を有していた。そこでまず IQGAP1,2,3 各々に対する特異的抗体をウサギおよびマウスで作製し、それを用いて各分子の培養上皮細胞及びマウス個体内における発現パターンを免疫染色法によって詳細に解析した。また培養上皮細胞において RNAi による発現阻害を行ない、それらの表現型の解析を行なった。さらに IQGAP3 に対する特異的な結合因子の探索を行ない、その IQGAP3 上での結合領域の同定を試みるとともに、IQGAP3 の RNAi がその結合因子へどのような影響を及ぼすのかを調べた。

(3) 接着装置の新たな構成因子を同定する更なる方策として、様々な上皮細胞から精製した cDNA に対する GFP 融合分子のライブラリーを作製し (GFP 融合 cDNA 発現ライブラリー)、これらを培養上皮細胞にレトロウイルスを用いて発現させた。この細胞を蛍光顕微鏡下で観察し、発現した GFP 融合分子の蛍光が接着装置に局在している細胞をスクリーニングした。その細胞を単離し、導入されていた cDNA クローンを精製し、シーケンスすることで接着装置に局在する新たな分子を同定した。得られた cDNA に対してウサギの特異的抗体を作製し、培養細胞、マウス組織内での発現パターンを免疫染色法によって詳細に解析した。

## 4. 研究成果

(1) MUPP1 に対する結合因子として知られていた ZO-3、また Patj に対する結合因子として知られていた Pals1 と JAM1 は、各々

MUPP1 と Patj の両方に結合することが明らかになった。ただ ZO-3 と JAM1 は MUPP1 と Patj に対し同程度の結合強度を持っていたが、一方 Pals1 は Patj に対しより強固に結合した。一方 Yeast Two-Hybrid Screening によって MUPP1 に対する新規の結合因子として細胞接着分子である nectin を同定した。nectin もまた MUPP1 と Patj の両方に結合したが、MUPP1 により強く結合した。MUPP1 上の nectin との結合領域を同定し、その領域を欠損させた MUPP1 を用いて調べたところ、MUPP1 と nectin との結合は MUPP1 が細胞接着領域へ効率よく局在するために必要であることが明らかになった。また、さらに新たな MUPP1/Patj の結合因子として細胞極性の中心的な制御因子である Par6 を同定し、これは Patj により強く結合した。Patj は Par6 に結合することで、Par6 がそのエフェクターである aPKC と結合するのを競合的に阻害することが明らかになり、このことから Par6 による極性制御の新たな分子機構を見出すことができた。特異的抗体を用いた観察から、MUPP1 と Patj は共に培養上皮細胞のアピカル面と細胞接着装置に局在しており、したがって細胞内局在はほぼ同一であった。しかし一方、培養上皮細胞での RNAi による MUPP1 の発現阻害では、見かけ上細胞に対し何の異常も引き起こさなかったが、一方 Patj の RNAi は接着構造・極性形成に顕著な異常を生じさせた。したがって MUPP1 と Patj は様々な結合相手を共有し、またその細胞内局在もきわめて相同であるにもかかわらず、細胞内での機能には大きな差が存在することが明らかになった。Patj の RNAi を行なった細胞に全長の Patj の cDNA を exogenous に発現させると細胞は正常に戻ったが、Pals1 との結合部位を欠損した Patj の cDNA を発現させても表現型の回復は見られなかった（他の分子に対する結合部位を欠損した Patj では顕著に回復した）。このことから、Patj は Pals1 と結合することがその機能を発揮する上で特に重要であることが明らかになった。

(2) 培養上皮細胞における IQGAP3 の発現パターンを解析したところ、この分子は細胞間接着構造に局在するが、その発現は驚くべきことに分裂増殖している細胞に限られることが見出された。一方 IQGAP1,2 も細胞間接着構造に局在していたが、IQGAP3 と異なりその発現に細胞増殖との関連は認められなかった。細胞内での発現を RNAi によって抑制したところ、IQGAP1 の抑制は何ら細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、IQGAP3 の抑制によっては顕著に阻害された。一方、血清飢餓によって静止期にある細胞に exogenous に IQGAP1 または IQGAP3 を発現させると、IQGAP3 を発現させた場合のみ

細胞増殖が回復した。これらのことから IQGAP3 は細胞増殖に必要な十分な機能を担っていることが明らかになった。これらの機能の裏付けとなる分子機構を明らかにするために IQGAP3 の結合分子を探索したところ、細胞増殖の中心的な制御因子であり癌遺伝子産物としても知られる Ras が見い出された。RNAi によって IQGAP3 の発現を抑制した細胞において Ras の活性化状態を検討したところ、Ras の活性が顕著に阻害されていることが見出された（このような効果は IQGAP1 の RNAi では見られなかった）。これらのことから、IQGAP3 は細胞内で Ras と結合し、その活性化を促進、あるいは維持することで細胞増殖を正に制御していることが示唆された。この結果は細胞接着装置と細胞増殖とを明確に関連づけるとともに、Ras の新たな制御機構の存在を示したものである。

(3) GFP 融合 cDNA 発現ライブラリーを用いた培養上皮細胞での局在スクリーニングにより、ARHGAP12 と SPAL3 という低分子量 GTP 結合蛋白質制御因子が新たな接着構造の構成分子として同定された。作製した特異的抗体を用いた免疫組織学的観察により、両分子ともマウスの様々な組織において細胞間接着構造に明確に局在していることが明らかになった。

## 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)

(1) Adachi, M., Hamazaki, Y., Kobayashi, Y., Itoh, M., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2009) Similar and distinct properties of MUPP1 and Patj, two homologous PDZ domain-containing tight junction proteins. *Mol. Cell. Biol.* 29:2372-2389. (査読有)

(2) Nojima, H. \*, Adachi, M. \*, Matsui, T., Okawa, K., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2008) IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat. Cell Biol.* 10:971-978. (\*equal contribution) (査読有)

(3) Matsuda, M., Kobayashi, Y., Masuda, S., Adachi, M., Watanabe, T., Yamashita, J. K., Nishi, E., Tsukita, S. and Furuse, M. (2008) Identification of adherens junction-associated GTPase activating proteins by the fluorescence localization-based expression cloning. *Exp. Cell Res.* 314:939-949. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

足立 誠、タイトジャンクションに局在する2つの類似したPDZドメイン含有分子MUPP1とPatjの解析、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、2007年12月12日パシフィコ横浜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/publications/tsukita2008-1/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

足立 誠 (ADACHI MAKOTO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30335244

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：