

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790209

研究課題名（和文）細胞間接着分子と細胞-基質間接着分子による上皮細胞の極性形成機構

研究課題名（英文）Mechanisms of epithelial polarization by cell-cell and cell-matrix adhesion molecules

研究代表者

池田 わたる（IKEDA WATARU）

神戸大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90362699

研究成果の概要：

上皮細胞にはアドヘレンスジャンクション（AJ）とタイトジャンクション（TJ）という二つの主要な細胞間接着装置が存在し、必ず TJ は AJ の頭頂側に位置する。これを上皮細胞の極性というが、その形成機構は明らかではない。本研究では、上皮細胞の極性形成機構の解明を目指し、細胞間接着分子を中心に解析を行った。その結果、TJ 構成因子が TJ の形成されるべき場所に集積するには、AJ の接着分子ネクチンが重要であることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、ネクチン、カドヘリン、JAM、クローディン、細胞極性

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物にとって細胞間接着は必須の細胞機能である。特に上皮細胞の細胞間接着を理解することは、がんなどの様々な疾患や発生過程における組織構築に深く関わることから医学的・生物学的に極めて重要である。上皮細胞には様々な種類があるが、その中でも円柱上皮細胞はお互いに接着することで非常に丈の高い構造を維持している。円柱上皮細胞（以下、上皮細胞）の細胞間接着部位では、頭頂側から基底側に向かって接着装置

タイトジャンクション（密着結合、TJ）、接着装置アドヘレンスジャンクション（接着結合、AJ）、および接着装置の存在しないラテラル領域が順番に規則正しく並んでおり、丈の高さとともにこの秩序のことを上皮細胞の極性という。しかし、この上皮細胞の極性形成の制御機構は非常に重要な研究課題であるにもかかわらず未だに解明されていない。TJ は、接着分子のクローディンと JAM、裏打ちタンパクの ZO-1、-2、-3 によって構成されている。JAM には極性因子複合体

(PAR3・PAR6・aPKC)の一つ PAR3 も結合する。AJ は、接着分子のカドヘリン、裏打ちタンパク質の α -、 β -カテニンによって構成されている。さらに AJ には、私の所属する研究室で見出された接着分子ネクチンとその裏打ちタンパク質アフアディンも局在している。私どもはネクチンがカドヘリンを細胞間接着部位にリクルートし、その接着活性を制御することで AJ を完成させることを見出している。また、ネクチンは TJ の構成分子を AJ 付近にリクルートすることで TJ 形成に関与することも明らかとなっている。しかし、どのようにして AJ の上に TJ 構成因子がリクルートされるのか、その分子機構は不明である。TJ と AJ 以外のラテラル領域にはカドヘリンが弱く分布しているが、私はネクチン様分子 Necl ファミリーの一つである Necl-2 がこの領域に特異的な接着分子として機能していることを見出している。一方、上皮細胞は細胞外基質によって構成される基底膜の上に接着分子インテグリンを介して接着している。このように、上皮細胞における細胞間や細胞-基質間の接着を担う構成分子は数多く明らかとなっているが、上皮細胞の極性形成機構は未だに明らかではなかった。

2. 研究の目的

上皮細胞における細胞間や細胞-基質間の接着を担う構成分子は数多く明らかとなっているが、「どのようにして TJ は AJ の頭頂側にできるのか?」、「どのようにして上皮細胞は丈が高くなるのか?」、そして「どのようにして細胞間接着部位では頭頂側から TJ、AJ、および TJ と AJ 以外のラテラル領域と順番に並んでいるのか?」という問題は明らかになっていない。そこで本研究では、これらの問題を解明するために、細胞間接着分子に着目して解析を行い、上皮細胞の極性形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞間接着分子が形成する集合体の局在解析

細胞間接着活性のない線維芽細胞株 L 細胞に、TJ の接着分子クロードインと JAM、AJ の接着分子ネクチンとカドヘリンなどを同時に複数発現させ、各接着分子が形成する集合体が同一細胞間接着面でどのような局在を示すか蛍光免疫染色法とコンフォーカルレーザー顕微鏡によって解析した。

(2) 細胞間接着分子集合体の局在化における裏打ちタンパク質の役割

各々の接着分子には特異的な裏打ちタンパク質が結合している。各々の裏打ちタンパク質は、接着分子をアクチン細胞骨格などに連結させることで、細胞間接着を強固なもの

にする機能がある。また、細胞間接着による細胞内シグナル伝達も制御している。TJ のクロードインや JAM には ZO-1 が結合する。また、JAM には極性因子の一つ、Par-6 が結合する。AJ のネクチンにはアフアディンが、カドヘリンにはカテニンが結合する。そこで、裏打ちタンパク質と結合できない各接着分子の変異体を用いることで、裏打ちタンパク質の役割を解析した。また、特定の裏打ちタンパク質を、RNA 干渉法でノックダウンさせた場合についても解析を行った。

(3) 上皮細胞の丈の高さの制御機構

上皮細胞には細胞間接着装置 TJ と AJ が頭頂側付近に存在し、それ以外のラテラル面は細胞同士が接着しているが、TJ や AJ のようにアクチン細胞骨格で裏打ちされている特徴的な接着装置は存在しない。このラテラル領域に局在する Necl-2 が、上皮細胞の丈の高さを制御している可能性があることから、その解析を行った。具体的には、線維芽細胞に Necl-2 を発現させ、Necl-2 によってどのような接着面が形成されるのか、またその他の接着装置の構成因子の局在がどのようになるのかを解析した。一方、上皮細胞で発現している Necl-2 を RNA 干渉法でノックダウンさせた場合についても解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞間接着分子が形成する集合体の局在解析

線維芽細胞に TJ の接着分子クロードインと JAM、AJ の接着分子ネクチンとカドヘリンを様々な組み合わせで発現させ、各細胞間接着分子の局在を網羅的に解析した。これまでの報告通り、それぞれの接着分子を単独で発現させた場合、各接着分子は細胞間接着部位に濃縮し、細胞間接着を形成した。AJ のネクチンとカドヘリンを同時に発現させた場合、上皮細胞における AJ の様に、両者は同一の細胞間接着部位の濃縮し共局在していた (図 1)。TJ の分子と AJ の分子を同時に発現させた場合 (ネクチンとクロードイン、ネクチンと JAM、カドヘリンとクロードイン、カドヘリンと JAM)、いずれの分子も細胞間接着部位に濃縮したが、両者は共局在することはなく、解離していた。TJ のクロードインと JAM を同時に発現させた場合、意外なことに両者は共局在せず、解離していた (図 1)。しかし、クロードインと JAM が発現している細胞にさらにネクチンを加えると、クロードインと JAM は共局在するようになった (図 2)。この時、ネクチンはクロードインと JAM とは共局在していなかった。このネクチンのような効果は、カドヘリンには無かった (図 2)。以上のことから、ネクチンは TJ の構成因子を AJ 近傍にリクルートするだけでなく、TJ 構

成因子を同一部位に集積させる機能があることが明らかとなった。この機能が、ネクチンによる TJ 形成の重要な役割の一つであった。

今後、頭頂-基底軸方向での詳細な解析を進めることで、TJ が AJ の頭頂側に形成される分子機構が明らかとなることが期待される。上皮細胞の基底面は、基質-細胞間接着分子インテグリンによって規定されると考えられることから、インテグリンの解析も視野に入れて検討する必要がある。

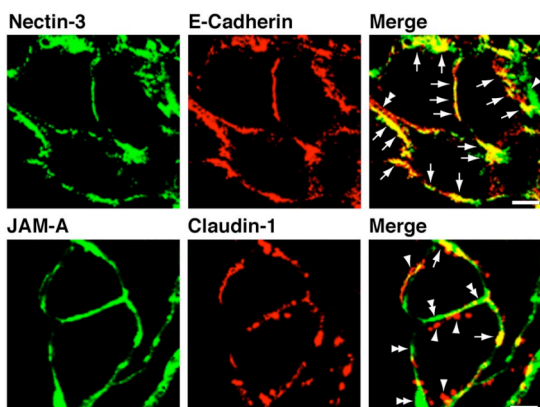


図1. ネクチンとカドヘリンを発現させたL細胞と JAM とクロードインを発現させたL細胞。矢印、共局在している部位；矢頭または二重矢頭、共局在していない部位。

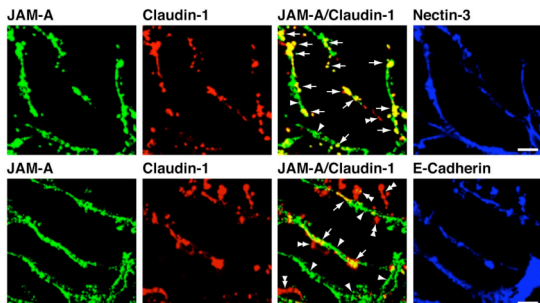


図2. JAM、クロードイン、ネクチンを発現させたL細胞と JAM、クロードイン、カドヘリンを発現させたL細胞。矢印、共局在している部位；矢頭または二重矢頭、共局在していない部位。

(2) 細胞間接着分子集合体の局在化における裏打ちタンパク質の役割

(1)で述べたように、TJ 構成因子を同一部位に集積させるにはネクチンが重要であった。そこで、ネクチンの裏打ちタンパク質であるアフアディンが、この機能に重要であるのかを検討した。前述のようにクロードイン、JAM、ネクチンの三者を同時に発現させた細胞では、クロードインと JAM は共局在し、これらとは解離してネクチンが局在する。この細胞において、RNA 干渉法でアフアディンを

ノックダウンするとクロードインと JAM は共局在せずに解離するようになった。またクロードインと JAM に加え、アフアディンと結合できないネクチン変異体を発現させた場合も同様の結果になった。以上のことから、ネクチンはアフアディンを介して TJ 構成因子の集積することが明らかとなった。

今後、(1)と同様に頭頂-基底軸方向での詳細な解析を進めることで、TJ が AJ の頭頂側に形成される分子機構が明らかとなることが期待される。

(3) 上皮細胞の丈の高さの制御機構

一般的な線維芽細胞に TJ は無いが、AJ は存在する。しかし、AJ は上皮細胞では細胞を取り囲むように連続したベルトのような局在を示すが、線維芽細胞では連続することはなく、点状に存在している。そこで、線維芽細胞に Nec1-2 を発現させることで、新たな細胞間接着面が形成されるのか、また、点状の AJ はどうなるのかを解析した。線維芽細胞 NIH3T3 に Nec1-2 を発現させると、明らかに面の細胞間接着が形成され、まるで上皮細胞のラテラル領域の様であった。また、内在性に発現する AJ 構成因子が Nec1-2 の局在領域の頭頂側より局在することが明らかとなった。しかしながら、Nec1-2 によって細胞間接着面は増加したが、それによって細胞の丈の高さが高くなることはなかった。また、上皮細胞 Caco-2 において Nec1-2 を RNA 干渉法でノックダウンすると、Nec1-2 のタンパク減少は認められるものの、顕著な丈の高さの変化は認められなかった。おそらく、これらの問題点は、上皮細胞と線維芽細胞において発現している細胞骨格の違いに起因する可能性が考えられる。そのため、今後、細胞骨格の違いも視野に解析することで、上皮細胞の丈の高さの制御機構が明らかになることが期待される。

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10件)

- ① Ogita, H., Ikeda, W., Takai, Y. Roles of cell adhesion molecules nectin and nectin-like molecule-5 in the regulation of cell movement and proliferation. *J Microsc.* 231 巻, 455-465, 2008, 査読有り
- ② Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., Ogita, H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9 巻, 603-615, 2008, 査読有り

- ③ Kuramitsu K., Ikeda, W., Inoue, N., Tamaru, Y., Takai, Y. A novel role of nectin: implication in the co-localization of JAM-A and claudin-1 at the same cell-cell adhesion membrane domain. *Genes Cells*. 13 巻, 797-805, 2008, 査読有り
- ④ Takahashi, M., Rikitake, Y., Nagamatsu, Y., Hara, T., Ikeda, W., Hirata, K., Takai, Y. Sequential activation of Rap1 and Rac1 small G proteins by PDGF locally at leading edges of NIH3T3 cells. *Genes Cells*. 13 巻, 549-569, 2008, 査読有り
- ⑤ Nagamatsu, Y., Rikitake, Y., Takahashi, M., Deki, Y., Ikeda, W., Hirata, K., Takai, Y. Roles of Necl-5/poliovirus receptor and Rho-associated kinase (ROCK) in the regulation of transformation of integrin alphaVbeta3-based focal complexes into focal adhesions. *J Biol Chem*. 283 巻, 14532-14541, 2008, 査読有り
- ⑥ Amano, H., Ikeda, W., Kawano, S., Kajita, M., Tamaru, Y., Inoue, N., Minami, Y., Yamada, A., Takai, Y. Interaction and localization of Necl-5 and PDGF receptor β at the leading edges of moving NIH3T3 cells: implications for directional cell movement. *Genes Cells*. 13 巻, 269-284, 2008, 査読有り
- ⑦ Komura, H., Ogita, H., Ikeda, W., Mizoguchi, A., Miyoshi, J., and Takai, Y. Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies. *Genes Cells*. 13 巻, 79-90, 2008, 査読有り
- ⑧ Morimoto, K., Satoh-Yamaguchi, K., Hamaguchi, A., Inoue, Y., Takeuchi, M., Okada, M., Ikeda, W., Takai, Y., Imai, T. Interaction of cancer cells with platelets mediated by Necl-5/poliovirus receptor enhances cancer cell metastasis to the lungs. *Oncogene*. 27 巻, 264-273, 2008 査読有り
- ⑨ Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., Fujita, N., and Takai, Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 19 巻, 593-602, 2007, 査読有り
- ⑩ Minami, Y., Ikeda, W., Kajita, M.,

Fujito, T., Amano, H., Tamaru, Y., Kuramitsu, K., Sakamoto, Y., Monden, M., Takai, Y. Necl-5/poliovirus receptor interacts in cis with integrin alphaVbeta3 and regulates its clustering and focal complex formation. *J Biol. Chem*. 282 巻, 18481-18496, 2007, 査読有り

[学会発表] (計 7件)

- ① 池田わたる、Regulatory Mechanism of Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation and Its Loss in Cancer Cells、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場
- ② 岸本恵実、Necl-5/PVR as a Membrane Cue for Attracting Growing Microtubules to Leading Edges of Moving NIH3T3 Cells、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日、名古屋国際会議場
- ③ 蔵満薫、Formation of apico-basal polarity by two lg-like cell-cell adhesion molecules nectin and JAM、第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜
- ④ 天野恭志、Formation of a ternary complex of Necl-5, PDGF receptor, and integrin $\alpha\beta 3$ at leading edges of moving cells、第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜
- ⑤ 永松裕一、Necl-5 と Rho キナーゼによるフォーカルコンプレックスからフォーカルアドヒージョンへの移行の制御、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学学会合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑥ 高橋玄倫、NH3T3 細胞における PDGF 刺激時の運動先端端への Rap1 のリクルートによる Rac1 の活性化、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学学会合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ⑦ 河野智、Necl-2 によるインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ と ErbB2 の局在とシグナル伝達の制御、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学学会合同大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 1件)

- ① Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y. (2008). *Annu Rev Cell Dev Biol*. 309-342. Annual Review.

〔その他〕
ホームページ
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 わたる (IKEDA WATARU)
神戸大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90362699

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし