

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790230
 研究課題名 (和文) ネクチン、インテグリン、血小板由来増殖因子受容体間の物理的・機能的相互作用
 研究課題名 (英文) Physical and functional interaction among nectin, integrin, and platelet-derived growth factor
 研究代表者
 扇田 久和 (OGITA, HISAKAZU)
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：50379236

研究成果の概要：新規の免疫グロブリン様接着分子ネクチンは細胞間接着の形成に重要であるが、その際、細胞-基質間接着分子インテグリン $\alpha v\beta 3$ の活性化が必要であった。細胞間接着形成後、ネクチンの作用によりインテグリン $\alpha v\beta 3$ は不活性化された。このことは細胞間接着の維持に重要であった。また、細胞間接着形成後も細胞が生存するために、ネクチンは血小板由来増殖因子受容体とも相互作用し、ネクチンの裏打ちタンパク質であるアフアディンと共に、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ-Akt系による生存シグナルを亢進した。

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

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：接着分子、細胞生存、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞の運動・増殖には細胞-基質間接着分子であるインテグリンや血小板由来増殖因子(PDGF)受容体を含む増殖因子受容体が大きな役割を担っている。また、細胞間接着の構造として上皮細胞では、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)があり、私共の研究室で見出されたAJに局在する新規の免疫グロブリン様接着分子ネクチンが、AJに局在する別の接着分子カドヘリンやTJに局在する接着分子クローディンと共に細胞間接着の形成において重要な役割を

果たしている。

運動・増殖している細胞細胞がお互いに接触して、細胞間接着を形成すると、細胞は運動と増殖を停止する。この現象は約半世紀前から細胞の運動と増殖の接触阻害として知られているが、その分子機構についてはほとんど明らかにされていない。一方、細胞間接着を形成し、運動と増殖を停止した後も細胞は生存し続ける必要がある。しかし、この細胞生存に細胞間接着がどのように関わるのかその分子機構についても不明な点が多い。これらの分子機構が解明に至っていない原

因の一つとして、これまで細胞の運動、増殖、接着、生存の各シグナル系についてはそれぞれ別々に研究されてきたことが挙げられる。そこで、本研究では細胞表面に存在する分子ネクチン、インテグリンおよびPDGF受容体に着目して、これらの分子の相互作用が細胞の運動、増殖、接着、生存といった細胞機能をどのように制御しているのか、統合的に検討する。

2. 研究の目的

(1) 運動している細胞どうしが接着して細胞間接着を形成していく過程で、インテグリン $\alpha v\beta 3$ は活性化した状態でネクチンと相互作用し、ネクチンによる細胞内シグナル伝達やそのシグナルを介した細胞間接着の形成を促進する。しかし、細胞間接着の形成後、インテグリン $\alpha v\beta 3$ は速やかに不活性化されるがその分子機構は不明であり、この点について解析を行う。

(2) 細胞間接着形成後の細胞生存には、PDGF受容体を介したシグナル伝達系とネクチンおよびその裏打ちタンパク質であるアフアディンがどのように相互作用して制御しているのかその分子機構について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞間接着形成後のインテグリン $\alpha v\beta 3$ 不活性化におけるネクチンの作用機構

MDCK上皮細胞を用いて、インテグリンの活性化に関わるI型ホスファチジルイノシトール5-キナーゼ γ (PIP $KI\gamma$)を導入することにより、細胞がコンフルエントな状態で不活性化されているインテグリン $\alpha v\beta 3$ が再活性化されるかどうか、インテグリンの細胞内領域と結合することによりインテグリンの立体構造を変化させるテーリンの細胞内局在の変化と共に観察した。PIP $KI\gamma$ の活性化には自身のリン酸化が重要であるが、ネクチンによる細胞間接着の形成により、PIP $KI\gamma$ のリン酸化（活性化）・脱リン酸化（不活性化）がどのように制御されているか、特に、脱リン酸化酵素の作用に着目して解析を行った。さらに、PIP $KI\gamma$ の活性化・不活性化に影響を及ぼす脱リン酸化酵素について、ネクチンがその活性制御にどのように関わっているか脱リン酸化活性を測定することにより解析した。

(2) PDGFによる生存シグナル活性化におけるネクチンの制御機構

PDGFによるPDGF受容体を介した生存シグナルとして、ホスファチジルイノシトール

(PI)3-キナーゼ-Akt系に着目した。PDGF受容体がネクチンやアフアディンとどのように相互作用しているか、免疫沈降法や共焦点レーザー顕微鏡を用いて生化学的、細胞生物学的に詳細に観察した。さらに、ネクチンやアフアディンがPI3-キナーゼ-Akt系のシグナル伝達や細胞生存そのものにどのような影響を及ぼしているのか、NIH3T3細胞においてネクチンやアフアディンをノックダウンすることにより解析した。さらに、アフアディンをノックアウトした胚性幹細胞を用いて胚様体を作製することにより、*in vivo*モデルにおけるアフアディンの細胞生存における役割についても解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞間接着形成後のインテグリン $\alpha v\beta 3$ 不活性化におけるネクチンの作用機構

① コンフルエントなMDCK細胞ではテーリンは細胞質に分布し、細胞膜に存在するインテグリン $\alpha v\beta 3$ とは共局在せず、すなわち、テーリンがインテグリン $\alpha v\beta 3$ と結合していないことから、インテグリン $\alpha v\beta 3$ は不活性型の状態にあった。しかし、PIP $KI\gamma$ を過剰発現させた細胞では、テーリンは細胞膜へと移行し、インテグリン $\alpha v\beta 3$ と結合してインテグリン $\alpha v\beta 3$ が再活性化された。その結果、一部の細胞間接着部位からE-カドヘリンのシグナルが消失し、アドヘレンスジャンクションが破壊された。このことから、PIP $KI\gamma$ がテーリンを介して細胞間接着部位のインテグリン $\alpha v\beta 3$ の活性化制御に重要な役割を果たしていること、また、細胞間接着形成後の細胞間接着の維持にはインテグリン $\alpha v\beta 3$ の不活性化が必要であることが明らかになった。このことは、細胞間接着形成による細胞の運動と増殖の接触阻害における分子機構の一つと考えられ、接触阻害機構の全容を解明する上で重要な知見である。

② PIP $KI\gamma$ の活性化には自身のリン酸化が重要であるが、逆に、PIP $KI\gamma$ が脱リン酸化されて不活性化される際に、どのような脱リン酸化酵素が関与しているか、様々な脱リン酸化酵素について検討したところ、PTP μ が最も効率よくPIP $KI\gamma$ を脱リン酸化した。さらに、PIP $KI\gamma$ とPTP μ をMDCK細胞に共発現させると、PIP $KI\gamma$ によるテーリンの細胞間接着部位への移行が阻害され、細胞間接着部位でテーリンがインテグリン $\alpha v\beta 3$ に結合することによるインテグリン $\alpha v\beta 3$ の再活性化が抑制された。

③ MDCK細胞において、PTP μ はネクチンと細胞間接着部位で共局在し、内在性のネクチン-3とPTP μ が共免疫沈降された。次に、ネ

クチン同士の結合により PIPKI γ の脱リン酸化（不活性化）が促進されるかどうか検討した。コンフルエントに培養した HEK293 細胞に PTP μ を導入すると、PIP KI γ は脱リン酸化された。さらに、PTP μ とネクチン-3 の両者を HEK293 細胞に導入すると、PIP KI γ の脱リン酸化はより促進された。このことから、ネクチンどうしの結合により、PTP μ を介して、PIP KI γ の脱リン酸化が促進されると考えられた。また、ネクチンどうしの結合により、PTP μ の酵素活性は上昇した。

④ 以上の結果より、図1のようなモデルが考えられる。すなわち、隣接する細胞間でネクチンどうしが結合すると、ネクチンは脱リン酸化酵素 PTP μ を活性化し、PIP KI γ の脱リン酸化を促進する。その結果、1) PIP KI γ の酵素活性は抑制され、細胞膜上でのホスファチジルイノシトール(4,5)ビスリン酸の産生が減少する、2) PIP KI γ 自身のテーリンへの作用も抑制される、などによりテーリンとインテグリン $\alpha\beta 3$ との結合が阻害されて、インテグリン $\alpha\beta 3$ が不活性化される。このような機構により、細胞間接着形成後、ネクチンはインテグリン $\alpha\beta 3$ 不活性化して、細胞間接着の維持に関与していると考えられる。

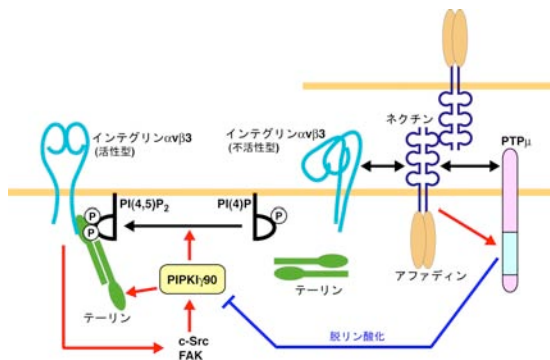


図1 細胞間接着形成後のネクチンによるインテグリン $\alpha\beta 3$ 不活性化の分子機構

(2) PDGFによる生存シグナル活性化におけるネクチンの制御機構

① NIH3T3細胞の細胞間接着部位でPDGF受容体とネクチン-3は共局在していた。また、NIH3T3細胞において、内在性のPDGF受容体とネクチン-3が共免疫沈降した。

② PDGF刺激によりAktのリン酸化は、ネクチン-3をノックダウンすることにより抑制された。一方、PDGF刺激によるPDGF受容体の自己リン酸化については、ネクチン-3のノックダウンによる影響はなかった。次に、ネクチン-3をノックダウンした細胞にネクチン-3を再導入すると、ほぼコントロールの細胞と同程度までAktのリン酸化は回復したが、アフアディンと結合できないネクチン変異体を再導入してもAktのリン酸化は回復しな

かった。このことから、PDGFによるAktのリン酸化にはネクチンとアフアディンの複合体形成が必要であると考えられる。

③ 同様に、NIH3T3細胞でアフアディンをノックダウンしても、Aktのリン酸化は抑制された。一方、PDGF受容体のリン酸化については変化なかった。さらに、アフアディンノックダウン細胞にアフアディンを再導入したところ、コントロールの細胞と同程度にまでAktはリン酸化されたが、ネクチンと結合できないアフアディン変異体を再導入してもAktのリン酸化は回復しなかった。このことから、PDGFによるAktのリン酸化にはネクチンとアフアディンの両者が必要であり、かつ、この両者が結合して複合体を形成していることが重要であると考えられる。

④ *in vitro*キナーゼアッセイにより、ネクチンやアフアディンをノックダウンした NIH3T3細胞において、PI3-キナーゼの活性はコントロール細胞と比較して有意に低下していることが見出された。

⑤ NIH3T3細胞で、Fasリガンドによりアポトーシスを誘導したところ、ネクチンやアフアディンをノックダウンした細胞では、コントロール細胞と比較してTUNEL陽性のアポトーシス細胞が有意に増加した。また、アフアディンをノックアウトした胚様体でも、野生型の胚様体と比較して TUNEL陽性のアポトーシス細胞が有意に増加した (図2)。

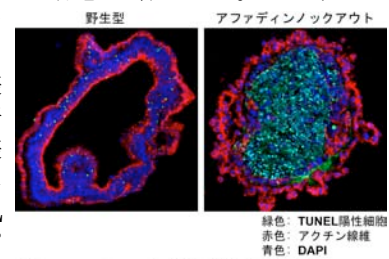


図2 アフアディンによる胚様体の細胞死抑制

⑥ 以上の結果から、ネクチン-アフアディン系は PDGF 受容体の下流、Akt の上流、すなわち、PI3-キナーゼ活性化の段階で PDGF による細胞内シグナル伝達を制御し、Akt のリン酸化を

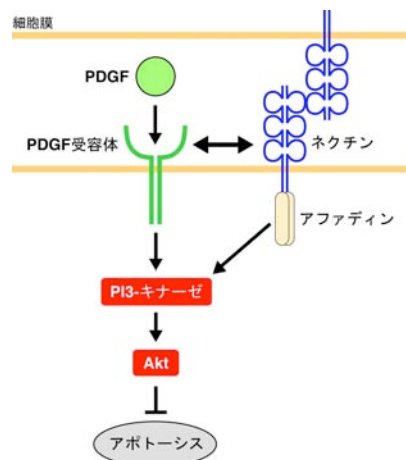


図3 ネクチン-アフアディン系によるPDGF受容体を介した細胞生存促進機構

増加させて細胞生存を促進していると考えられる (図3)。

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9件)

- ① Ogita, H., Ikeda, W., and Takai, Y. (2008). 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. 査読有り
- ② Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W., and Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9巻, 603-615. 査読有り
- ③ Kanzaki, N., Ogita, H., Komura, H., Ozaki, M., Sakamoto, Y., Majima, T., Ijuin, T., Takenawa, T., and Takai, Y. (2008). Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival. *J Cell Sci.* 121巻, 2008-2017. 査読有り
- ④ Komura, H., Ogita, H., Ikeda, W., Mizoguchi, A., Miyoshi, J., and Takai, Y. (2008). Establishment of cell polarity by afadin during the formation of embryoid bodies. *Genes Cells.* 13巻, 79-90. 査読有り
- ⑤ Sakamoto, Y., Ogita, H., Komura, H., and Takai, Y. (2008). Involvement of Nectin in Inactivation of Integrin $\alpha\beta 3$ after the Establishment of Cell-Cell Adhesion. *J Biol Chem.* 283 巻, 496-505. 査読有り
- ⑥ Nakata, S., Fujita, N., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Ogita, H., and Takai, Y. (2007). Regulation of Platelet-derived Growth Factor Receptor Activation by Afadin through SHP-2: Implications for Cellular Morphology. *J Biol Chem.* 282 巻, 37815-37825. 査読有り
- ⑦ Sakisaka, T., Ikeda, W., Ogita, H., Fujita, N., and Takai, Y. (2007). 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. 査読有り
- ⑧ Satoh, M., Matter, C. M., Ogita, H., Takeshita, K., Wang, C. Y., Dorn, G. W., 2nd, and Liao, J. K. (2007). Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1

and prevention of congestive heart failure by estrogen. *Circulation.* 115巻, 3197-3204. 査読有り

- ⑨ Wakamatsu, K., Ogita, H., Okabe, N., Irie, K., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Ishida-Yamamoto, A., Iizuka, H., Miyoshi, J., and Takai, Y. (2007). Up-regulation of loricrin expression by cell adhesion molecule nectin-1 through Rap1-ERK signaling in keratinocytes. *J Biol Chem.* 282巻, 18173-18181. 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ① 扇田久和、高井義美、組織形成における接着分子ネクチン-アフアディン系の役割、第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会合同大会、2008年12月9日、神戸
- ② 扇田久和、高井義美、がん化による細胞接着・運動・増殖異常とその分子機構、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月28日、名古屋
- ③ 扇田久和、高井義美、細胞間接着におけるネクチン、インテグリンおよび血小板由来増殖因子受容体間の相互作用、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会合同大会、2007年12月14日、横浜
- ④ 扇田久和、高井義美、細胞間接着形成におけるネクチンとインテグリンのクロストーク機構、第40回日本発生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、2007年5月28日、福岡

[図書] (計3件)

- ① Togashi, H., Ogita, H., and Takai, Y. (2009) *The Sticky Synapse*. in press. Springer.
- ② Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., and Rikitake, Y. (2008). *Annu Rev Cell Dev Biol.* 309-342. Annual Review.
- ③ Ogita, H. and Takai, Y. (2008). *Int Rev Cytol.* 1-54. Elsevier Inc.

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/mcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

扇田 久和 (OGITA, HISAKAZU)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 50379236

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし