

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790283

研究課題名(和文)細胞膜裏打ち分子アフアディンによる細胞間接着の形成機構

研究課題名(英文) Mechanism of the formation of cell-cell adhesion by a peripheral membrane protein afadin

研究代表者

栗田 宗一 (Kurita, Souichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：30595484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間接着の形成における細胞間接着分子の裏打ちタンパク質間の相互作用の役割についてアフアディンを中心に解析した。ネクチンの裏打ち分子アフアディンとカドヘリンの裏打ち分子PLEKHA7の新規の相互作用を見出し、この相互作用が上皮細胞のアドヘレンスジャンクション形成において重要な役割を担っていることを解明した。また、長らく不明であったアフアディンの β -カテニン結合部位を同定した。また、主に神経系に発現するアフアディンのアイソフォーム、s-アフアディンがネクチンとより強く結合することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of the interactions among peripheral membrane proteins that bind to cell-cell adhesion molecules in the formation of cell-cell adhesion and obtained the results, as follows: A novel interaction between afadin and PLEKHA7, which associate with cell adhesion molecules nectin and cadherin, respectively, is critical for the proper formation of adherens junctions in epithelial cells. We identified an β -catenin-binding region of afadin. A short isoform of afadin, s-afadin, which is expressed mainly in the nervous system, binds more preferentially to nectins as compared to afadin.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞間接着 アフアディン

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着は発生過程における組織や臓器、器官の形成と維持および機能発現に必須である。また、がん化の過程においては細胞間接着が破壊されて接着能が低下し、運動能が亢進してがん細胞が浸潤・転移することなどから、細胞間接着の制御機構は医学的にも重要である。特に上皮細胞ではタイトジャンクション、アドヘレンスジャンクションという特徴的な接着装置が形成され、上皮シートの形態と機能を保つことで組織・器官が維持される。細胞間接着は主に細胞間接着分子とその細胞質領域に結合する裏打ちタンパク質によって構成される。タイトジャンクションは主に接着分子クロードリンとそれに結合するZOタンパク質によって、アドヘレンスジャンクションは主に接着分子カドヘリンとネクチン、およびそれらの裏打ちタンパク質、カテニンとアフアディンによって構成される。細胞間接着の形成機構に関して、これまでは細胞間接着分子を主体に研究が行われてきたが、裏打ちタンパク質の機能と作用機構についてはまだ不明な点が多い。

アフアディンはネクチン以外の接着分子の裏打ちタンパク質ZO-1、 α -カテニンと相互作用することが知られている。また、培養上皮細胞でアフアディンをロックダウンすると細胞間接着の形成が顕著に阻害されることから、細胞間接着形成におけるアフアディンを中心とする裏打ちタンパク質間の相互作用の役割が強く示唆されている。しかし、その詳細な分子機構にはまだ不明な点が残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、アフアディンを中心とした裏打ちタンパク質間の相互作用に着目し、細胞間接着の形成における裏打ちタンパク質間相互作用の機能と作用機構を解明することを目的とした。本研究では特に、上皮細胞の細胞間接着形成における(1)アフアディンとPLEKHA7の新規相互作用の機能の解明、(2)アフアディンと α -カテニンの相互作用の役割の解明を目的とした

3. 研究の方法

(1) 上皮細胞間接着の形成におけるアフアディンとPLEKHA7の相互作用の機能：

アフアディンとPLEKHA7の結合をGSTプルダウン、免疫沈降法により解析した。また、接着分子を発現しないL線維芽細胞にネクチンを発現させ、人為的に形成させたネクチン接着部位にPLEKHA7がリクルートされるか検討した。Eph4マウス乳腺上皮細胞においてアフアディンおよびPLEKHA7をロックダウンし、それぞれの局在の変化を免疫染色法により検討した。さらに、アフアディンに結合できないPLEKHA7をPLEKHA7ロックダウン細胞に発現させ、免疫染色により細胞間接着形成の異常について検討した。

(2) 上皮細胞間接着の形成におけるアフアディンと α -カテニンの結合の役割：

アフアディンと α -カテニンの結合は、ネクチン系とカドヘリン系をつなぐ相互作用として知られていたが、その相互作用の詳細は不明であった。GSTプルダウンによりアフアディンの α -カテニン結合部位を検討した。

(3) s-アフアディンとネクチンの結合の制御機構：

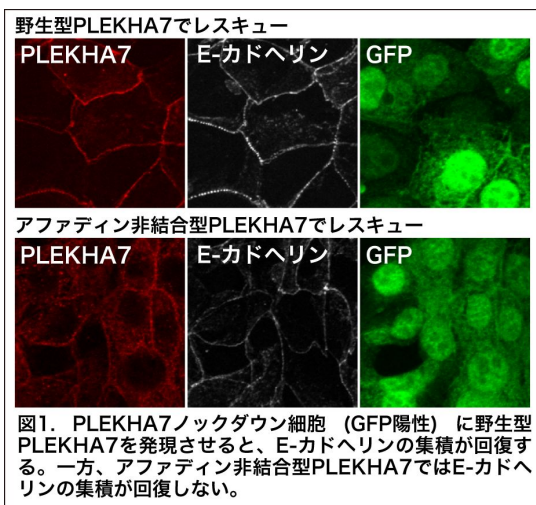
当初、ネクチンとアフアディンの結合によってアフアディンと他の裏打ちタンパク質との相互作用が変化するという仮説に基づき研究を進めていた。ネクチンとアフアディンの結合はネクチン同士のトランス結合によって促進されることから、ネクチンのトランス結合をミミックしてアフアディンとの相互作用を誘導する系を構築していた。その過程で、主に脳に発現するアフアディンのアイソフォーム、s-アフアディンがトランス結合していないネクチンにも強く結合することを見出したため、s-アフアディンとネクチンの結合について免疫沈降法で解析した。また、s-アフアディンが脳で神経細胞とグリア細胞のどちらに発現しているかについて、初代培養の神経細胞とアストロサイトを用いて検討した。

4. 研究成果

本研究では、アフアディンを中心とする細胞間接着分子裏打ちタンパク質の相互作用が細胞間接着の形成において果たす役割を解明することを目的に研究を行い、以下の研究成果を得た。

(1) 上皮細胞間接着の形成におけるアフアディンと PLEKHA7 の相互作用の機能：

アフアディンは PLEKHA7 の PH ドメインを含む領域と結合し、PLEKHA7 はアフアディンの RA ドメインと PDZ ドメインを含む領域と結合することを明らかにした。アフアディン結合部位を欠失させた PLEKHA7 変異体では、アフアディンとの結合が顕著に低下した。EpH4 細胞でアフアディンをノックダウンすると、PLEKHA7 の細胞間接着部位への集積が消失した。また、L 細胞にネクチン接着を形成させると、そこにアフアディン依存的に PLEKHA7 が集積することを明らかにした。一方で、カドヘリン接着部位への PLEKHA7 の集積にはアフアディンは必要ないことも明らかになった。EpH4 細胞で PLEKHA7 をノックダウンすると、E-カドヘリンの細胞間接着部位への集積、すなわちアドヘレンスジャンクションの形成が阻害されたのに対して、ネクチンとアフアディンの集積は変化しなかった。そこに野生型の PLEKHA7 を発現させると E-カドヘリン集積が回復したが、アフアディンに結合できない PLEKHA7 変異体を発現させると、この変異体は細胞間接着部位に集積せず、E-カドヘリン集積も回復しなかった (図 1)。



これらの結果から、アフアディンと PLEKHA7

の相互作用は上皮細胞のアドヘレンスジャンクション形成において重要な役割をもつことが明らかとなった。

(2) 上皮細胞間接着の形成におけるアフアディンと α -カテニンの結合の役割：

アフアディンの C 末端側、プロリンリッチ領域の後ろの領域が α -カテニンに結合することを明らかにした。この領域を構造予測プログラムで解析すると、コイルドコイルを形成すると予測され、アフアディンに存在する新規のタンパク質結合ドメインを形成するものと考えられた。この部位を欠失させたアフアディンは α -カテニンと結合しないことも明らかにした。

3) s-アフアディンとネクチンの結合の制御機構：

ネクチンには 1 から 4 までのメンバーがあるが、s-アフアディンはネクチン-1、-2、-3 と強く結合し、ネクチン-4 とはアフアディンと同程度しか結合しないことを明らかにした。また、その強い結合には s-アフアディンの PDZ ドメインが必須であることを明らかにした。また、s-アフアディンはアストロサイトでは検出されず、神経細胞で検出され、その発現は神経細胞特異的であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

(ここに記入した論文は全て査読有り)

*Kobayashi, R., *Kurita, S., Miyata, M., Maruo, T., Mandai, K., Rikitake, Y., and Takai, Y. (*: equal contribution) s-Afadin binds more preferentially to the cell adhesion molecules nectins than l-afadin. *Genes Cells*, 19, 853-863 (2015)

Suzuki, T., Mizutani, K., Minami, A., Nobutani, K., Kurita, S., Nagino, M., Shimono, Y., Takai, Y. (2014)

Suppression of the TGF- β 1-induced protein expression of SNAI1 and N-cadherin by miR-199a. *Genes Cells*, 19, 667-675 (2014)

Kurita, S., Yamada, T., Rikitsu, E., Ikeda, W., and Takai, Y. Binding between the junctional proteins afadin and PLEKHA7 and implication in the formation of adherens junction in epithelial cells. *J Biol Chem*, 288, 29356-29368 (2013)

Yamada, T., Kuramitsu, K., Rikitsu, E., Kurita, S., Ikeda, W., and Takai, Y. Nectin and junctional adhesion molecule are critical cell adhesion molecules for the apico-basal alignment of adherens and tight junctions in epithelial cells. *Genes Cells*, 18, 985-998 (2013).

Sugiyama, H., Mizutani, K., Kurita, S., Okimoto, N., Shimono, Y., and Takai, Y. (2013) Interaction of Necl-4/CADM4 with ErbB3 and integrin $\alpha_6\beta_4$ and inhibition of ErbB2/ErbB3 signaling and hemidesmosome disassembly. *Genes Cells*, 18, 519-528 (2013)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 栗田宗一、山田知広、力津絵津子、池田わたる、高井義美、PLEKHA7 binds to afadin and regulates the formation of adherens junctions in epithelial cells. 第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等:

神戸大学大学院医学研究科 病態シグナル学
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/ps/index.html>

滋賀医科大学医学部 分子病態生化学
<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqbioch2/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗田 宗一 (Kurita Souichi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30595484

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし