

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870019

研究課題名（和文）：哺乳類上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御機構の解析

研究課題名（英文）：The mechanism for apical domain development of mammalian epithelial cell.

研究代表者

堀越 洋輔 (HORIKOSHI YOSUKE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任研究員

研究者番号：60448678

研究成果の概要：

細胞極性、すなわち細胞を構成する様々なタンパク質を秩序だてて配置させることは、個体の発生や組織の構築に必須である。上皮細胞の TJ (Tight Junction) や膜ドメインは、極性化した上皮細胞で観察される特徴的な構造である。

今回の解析により (1) aPKC, PAR-3, PAR-6 からなる三者複合体 (aPKC-PAR 複合体) の機能阻害により、上皮細胞の微絨毛の形成が阻害されると共に、アピカル膜ドメインの形成される位置が異常になること。(2) この異常は、PAR-3 と aPKC, PAR-6 からなる三者複合体の形成が阻害された結果であること。(3) PAR-3 がイノシトールリン脂質と結合すること。以上の 3 点を明らかとし、上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御機構に PAR-3 aPKC-PAR-6 三者複合体の形成が必須である事を明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：細胞極性、アピカル膜ドメイン、aPKC-PAR 複合体、微絨毛、上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

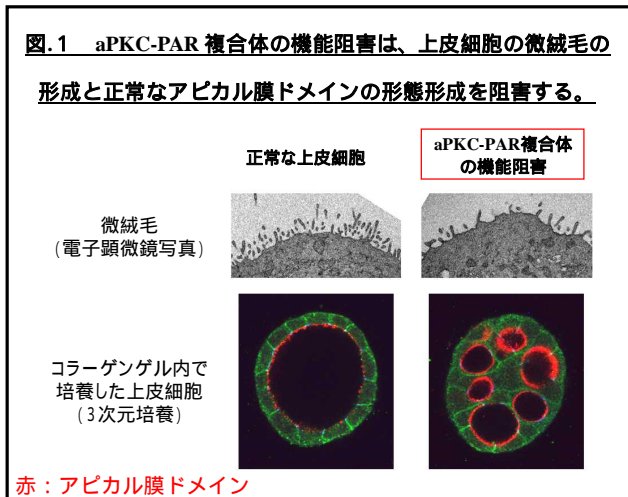
(1) 上皮細胞の極性制御における aPKC-PAR 複合体の役割

我々は aPKC, PAR-3, PAR-6 からなる 3 者

複合体 (aPKC-PAR 複合体) の機能阻害により、上皮細胞のタイトジャンクションの形成を阻害する事を報告してきた。

一方、極性化した上皮細胞は、異なる膜ド

メインであるアピカル膜ドメイン^{注1}とバソラテラル膜ドメインを形成する。しかし、上皮細胞が形成するアピカル膜ドメインの制御に関わる詳しい分子機構については不明であった。興味深い事に、上皮細胞に由来する癌や炎症性疾患などの病変部位では、アピカル膜ドメインの異常が観察されており、その制御機構を明らかとする事は、それら病態の新しい治療法の分子基盤を確立できると考えられる。この考えを支持する報告として、下等生物を使った遺伝学的な解析から、上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御に働く分子の欠損により、細胞増殖を伴った細胞形態の異常が観察されている。先に紹介した、aPKC-PAR 複合体もその候補分子でありアピカル膜ドメインの制御に何らかの機能を発揮していると考えられた。今回、哺乳類の培養上皮細胞においても aPKC/PAR 複合体の構成分子である PAR-3 を発現抑制すると、正常な上皮細胞が形成するアピカル膜ドメインの形成や微絨毛の発達が阻害される事を突き止めていた(図1)。しかし、その詳しい分子機構については以前不明であった。



注1: 極性化した上皮細胞のアピカル膜は、脂質膜が突出してできた微絨毛を形成している。

(2) 上皮細胞のアピカル膜ドメインの制御機構とイノシトールリン脂質シグナル伝達との役割

上皮細胞のアピカル膜ドメインの制御にイノシトールリン脂質代謝に関わる PTEN^{注2}が必要である事が報告され、この報告の中で、PTEN が PI(3,4,5)P₂ を産生し、その下流で、aPKC を活性化させる可能性が浮上してきたが、その詳しいメカニズムは不明である。

注2: PTEN はイノシトールリン脂質である

PI(3,4,5)P₃ から PI(4,5)P₂ 合成するイノシトール代謝酵素の一つである。

(3) 上皮細胞の微絨毛形成と脂質膜の形状制御機構

上皮細胞のアピカル膜ドメインは、細胞膜が管腔側に突出した構造を持つ。興味深い事に、脂質に直接結合し、脂質膜の形状を変化させるタンパク質群の存在が明らかとなってきた。これら分子は、脂質膜の変形活性をもつ BAR、RCB ドメインのいずれかを持つ。RCB ドメインを持つ蛋白質は、脂質膜を突出させる機能を持つ事が明らかとなり、これらドメイン構造を持つ蛋白質が上皮細胞の微絨毛の形成に機能する可能性が考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御に関わる制御機構を分子レベルで明らかとする事である。この解析により、を通じ、上皮細胞がもつアピカル膜ドメインの形成・制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) アピカル膜ドメインの形成・制御における aPKC-PAR 複合体の役割の解析

aPKC-PAR 複合体を形成する事が、上皮細胞の持つアピカル膜ドメインの形成・制御機構に関わるか、PAR-3 発現抑制細胞を新たに樹立した。PAR-3 は、aPKC との結合を解し、PAR-6 を含む三者複合体を形成する^{注3}。この細胞に、aPKC と結合できない PAR-3 変異体を過剰発現させ^{注4}、PAR-3 と aPKC との結合がアピカル膜ドメインの形成・制御に必要であるか検証した。また、コントロールの上皮細胞に Lgl を過剰発現させ、PAR-3-aPKC-PAR-6 三者複合体の形成を抑制させ^{注4}、これら複合体の形成が正常な上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成・制御に必要であるか検証した。

注3: aPKC は、PAR-6 と結合し複合体を形成している。

注4: Lgl は、PAR-3 と競合して aPKC と PAR-6 を含む三者複合体を形成する。また、細胞に Lgl を過剰発現させると、PAR-3 を含む aPKC-PAR-6 三者複合体の形成が抑制され、Lgl-aPKC-PAR-6 三者複合体が細胞内でより多く形成される。

(2) aPKC-PAR 複合体とイノシトールリン脂質シグナル伝達との関係についての解析

PAR-3, aPKC, PAR-6 が上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成にどのように働くか明らか

かとするために、脂質との結合するか脂質の精製標品を使い検証した。また、イノシトールリン脂質シグナル伝達の中で、PAR-3, aPKC, PAR-6 が働いているか明らかとするため、イノシトールリン脂質の精製標品を用いて同様に検証を行った。

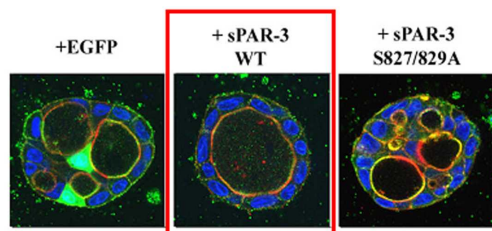
4. 研究成果

(1) アピカル膜ドメインの形成・制御における aPKC-PAR 複合体の役割の解析

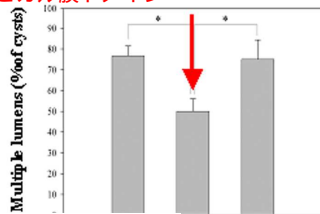
aPKC-PAR 複合体の形成がアピカル膜ドメインの形成・制御に必須であるか、方法(1)を使い検証した。その結果、PAR-3 を発現抑制した上皮細胞に PAR-3 の野生型を過剰発現させると、正常な上皮細胞が形成するアピカル膜ドメインを形成する事が明らかとなった(図2)。一方、aPKC と結合できない PAR-3 変異体を過剰発現させても正常な上皮細胞が形成するアピカル膜ドメインを形成しなかった。また、Lgl を正常細胞に過剰発現させ、aPKC-PAR 複合体の形成を阻害したところ、PAR-3 の発現抑制した上皮細胞で観察されるアピカル膜ドメインの異常が同様に観察された(図3)。

これらの結果から、aPKC-PAR 複合体の形成が正常な上皮細胞を形成するアピカル膜ドメインの形成・制御に必要である事が明らかとなった。

図.2 PAR-3 と aPKC との結合は、正常な上皮細胞が形成するアピカル膜ドメインの形成に必要



赤：アピカル膜ドメイン

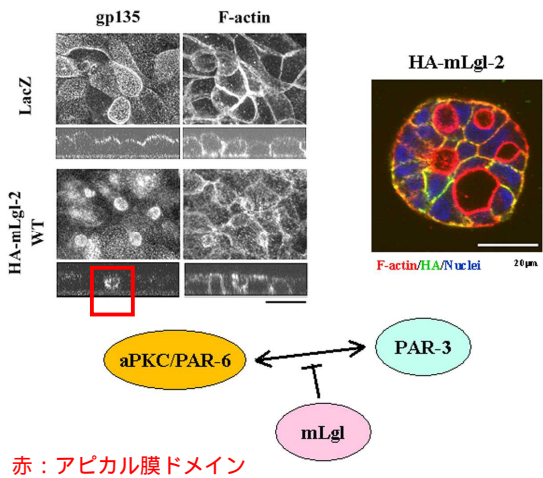


PAR-3 野生型

aPKC と結合できない PAR-3 変異体

図.3 Lgl 過剰発現による aPKC-PAR 複合体の形成

阻害は、正常な上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成を阻害する。

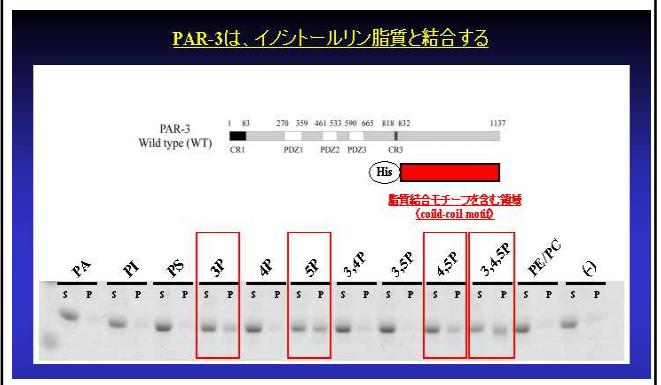


(2) aPKC-PAR 複合体とイノシトールリン脂質シグナル伝達との関係についての解析

aPKC-PAR 複合体がイノシトールリン脂質シグナル伝達の中で機能しているか明らかとするため、それら分子の精製蛋白質を使いウシ脳より抽出された脂質を用いてリボソームを作成し結合するか検討を行った。その結果、上記脂質から作成されてリボソームと PAR-3 が結合する事が明らかとなった。この結果を踏まえ、精製標品のイノシトールリン脂質を使い同様の検討を行った。その結果、イノシトールリン脂質である、PI(3,4,5)P₃、PI(4,5)P₂ と結合する事が明らかとなった(図4)。

これらの結果から、aPKC-PAR 複合体がイノシトールリン脂質と結合し、正常な上皮細胞のアピカル膜ドメインの形成に機能を足している可能性が示唆された。

図.4 PAR-3 はイノシトールリン脂質と結合する。



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 1件)

堀越洋輔、鈴木厚、山中智行、佐々木和教、
水野恵子、澤田元、米村重信、大野茂男
Journal Cell Science、122、1595 -1606、2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

堀越 洋輔

東京大学・分子細胞生物学研究所・特任
研究員

研究者番号：60448678

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし