

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15793

研究課題名(和文)上皮細胞の接着帯におけるアクトミオシン束の裏打ち機構

研究課題名(英文) Mechanism underlying the association of actomyosin bundles with adherens junctions in epithelial cells

研究代表者

榊原 正太郎 (SAKAKIBARA, Shotaro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教

研究者番号：80836396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞は、隣り合う細胞同士が細胞間接着によって接着し、生体の内外を隔てる上皮シートを形成している。この細胞間接着のうち接着帯(AJ)は上皮シートの機械的強度の維持とリモデリングを担っている。AJはアクトミオシン束(AM束)によって裏打ちされており、AJの機能にはAM束が必須であるが、AJにおけるAM束の裏打ち機構は不明であった。研究代表者は、AJに局在する足場タンパク質のアファディンが  $\gamma$ -カテニン複合体に結合することにより、 $\gamma$ -カテニン複合体のF-アクチンへの結合能が上昇すること、それによってAJのAM束による裏打ちが可能となり、上皮シートの機械的強度が高まることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞は、隣り合う細胞同士が細胞間接着によって接着し、生体の内外を隔てる上皮シートを形成している。この上皮シートの破綻はさまざまな疾患の発症と進行に関わる。本研究成果を端緒として、AM束による上皮シートの機械的強度の維持とリモデリングを担うタンパク質-タンパク質相互作用のネットワークの解明が進むことで、新たな疾患バイオマーカーの開発や創薬標的の創出につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Actomyosin-undercoated adherens junctions are critical for epithelial cell integrity and remodeling. Actomyosin associates with adherens junctions through E-catenin complexed with  $\gamma$ -catenin and E-cadherin in vivo; however, in vitro biochemical studies in solution showed that E-catenin complexed with  $\gamma$ -catenin binds to F-actin less efficiently than E-catenin that is not complexed with  $\gamma$ -catenin. Although a "catch-bond model" partly explains this inconsistency, the mechanism for this inconsistency between the in vivo and in vitro results remains elusive. We herein demonstrate that afadin binds to E-catenin complexed with  $\gamma$ -catenin and enhances its F-actin-binding activity in a novel mechanism, eventually inducing the proper actomyosin organization through E-catenin complexed with  $\gamma$ -catenin and E-cadherin at adherens junctions.

研究分野：生化学、細胞生物学

キーワード：細胞間接着 アドヘレンスジャンクション アクトミオシン束 カドヘリン-カテニン複合体 アファディン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体内においては、様々な種類の細胞同士が互いに接着し、組織や器官を形成することによって固有の役割を果たしている。例えば、上皮細胞や血管内皮細胞は隣り合う細胞同士が細胞間接着によって接着し、それぞれ生体の内外を隔てる上皮シートや血管の内外を隔てる管腔構造を形成している。特に中枢神経系においては、毛細血管の内皮細胞は周皮細胞やアストロサイトと共に血液脳関門 (BBB) を形成し、中枢神経系のホメオスタシスを維持している。上皮シートの破綻はがんの周辺組織への浸潤や他臓器への転移に関わることが知られている。また BBB については、その破綻がアルツハイマー型認知症を含めた多くの神経疾患と関わりと考えられていることに加え、中枢神経系へのドラッグデリバリーの観点からも創薬標的としての有用性が期待されている。さらに、中枢神経系では、神経細胞同士、または神経細胞とさまざまなグリア細胞が互いに接着することが、ヒトの記憶と学習の基盤であるシナプス可塑性に重要であることが知られており、その破綻がアルツハイマー型認知症を含めた多くの神経疾患と関わりと考えられている。

細胞間接着は細胞間接着タンパク質およびその裏打ちタンパク質といった構成因子からなるが、これまでに研究代表者が所属する研究室ではこれらの構成因子のうちネクチン - アファディン系を見出し、上述したさまざまな種類の細胞同士からなる多様な細胞間接着がネクチン - アファディン系を含めた少数の構成因子により共通の原理で形成維持されていることを明らかにしてきた。これらの細胞間接着構成因子はさまざまな疾患において、発現レベルの変化や機能の異常が報告されており、その機能や作用機構の解明は疾患バイオマーカーの開発や創薬標的の創出につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

このような治療的アプローチを視野に入れ、本研究では培養上皮細胞をモデル系として細胞接着構成因子の機能や作用機構のさらなる解明を目指した。極性を形成した上皮細胞は、隣り合う細胞同士が密着帯 (TJ) と接着帯 (AJ) などの細胞間接着装置によって接着し、生体の内外を隔てる上皮シートを形成している。TJ は上皮シートのバリア機能を担い、AJ は上皮シートの機械的強度の維持を担っている。脳血管内皮細胞では TJ は BBB の機能に重要な役割を果たしている。AJ は F-アクチンとミオシンからなる AM 束によって裏打ちされており、AJ の機能にはアクトミオシン束 (AM 束) が必須である。In vivo においては、接着分子であるカドヘリンの細胞内領域に  $\beta$ -カテニン複合体が結合しており、これを介してカドヘリンが AM 束に連結されている。しかし、これまでに行われた in vitro の研究から、F-アクチンは  $\beta$ -カテニン複合体には結合できないことが示されており、in vivo における観察結果との矛盾が生じている。この矛盾を解明するために国内外の多くの研究者が精力的に研究を行ってきたが、in vivo において F-アクチンが  $\beta$ -カテニン複合体に結合する機構の全容は解明されていなかった。

近年、この矛盾を部分的に説明可能な「Catch-bond モデル」というモデルが提唱された。このモデルでは、 $\beta$ -カテニン複合体に張力が加わることにより、F-アクチンと  $\beta$ -カテニン複合体との間に一過性の結合が起こるとされている。その後の構造学的アプローチから、 $\beta$ -カテニン複合体に張力が加わることにより、E-カテニンの F-アクチンとの結合に関わるドメインの構造変化が引き起こされ、F-アクチンとの一過性の結合が生じることが証明されている。しかし、細胞内において AJ の AM 束による裏打ち構造を維持するためには、この一過性の結

合を安定化する必要があると考えられるが、その機構は不明であった。

### 3. 研究の方法

上記の問題に取り込むために、(1) 野生型とアフアディン欠損 EpH4 細胞を用いた蛍光免疫染色による AJ における AM 束の裏打ち構造の形態学的解析、(2) 野生型とアフアディン欠損 EpH4 細胞を用いた shroom3 の過剰発現による頂端収縮の解析、(3) F-アクチン共沈降アッセイを用いたアフアディンによる E-カテニン複合体のアクチン結合能の制御機構の生化学的解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) AJ における AM 束の裏打ち機構におけるアフアディンの役割

AJ における適切な AM 束の形成にアフアディンが必要であることを、野生型とアフアディン欠損 EpH4 細胞を用いた蛍光免疫染色により検討した。いずれの細胞においても、E-カドヘリンは細胞間接着部位に濃縮していたが、細胞間接着部位の F-アクチンの局在が、野生型とアフアディン欠損 EpH4 細胞では異なっていた。野生型 EpH4 細胞では、F-アクチンのシグナルが細胞間接着部位で一本の線として観察されたのに対し、アフアディン欠損 EpH4 細胞では、複数の線として観察され、細胞形質膜から離れた位置に観察された。この結果から、アフアディンが AJ における適切な AM 束の形成を制御していることが示唆された。

アフアディンは N 末端側より、RA ドメイン (RA1 と RA2)、FHA ドメイン、DIL ドメイン、PDZ ドメイン、coiled-coil 領域 (CC 領域)、F-アクチン結合領域 (FAB) を有する。これまで、アフアディンの CC 領域が、E-カテニンとの結合に必要なかつ十分な領域であることを見出していたので、アフアディンの CC 領域を介した E-カテニンへの結合が、AJ における適切な AM 束の形成に関与しているかを解明するため、全長の野生型アフアディン、CC 領域を欠失させたアフアディン変異体 (アフアディン-CC) あるいは CC 領域のみのアフアディン (CC-アフアディン) を、アフアディン欠損 EpH4 細胞に発現させ、AM 束の形成を蛍光免疫染色で解析した。野生型アフアディンを発現させた細胞では、野生型 EpH4 細胞と同様に F-アクチンのシグナルが細胞間接着部位で一本に観察された。しかし、アフアディン-CC を発現させた細胞では、F-アクチンのシグナルは野生型のように回復しなかった。一方で、CC-アフアディンを発現させた細胞では、F-アクチンのシグナルが野生型のように回復した。これらの結果から、アフアディンの E-カテニン結合部位の CC 領域が、AJ における AM 束の形成に必要なかつ十分であることが示され、E-カテニンへのアフアディンの結合が、AJ における AM 束の形成の制御に関与していることが明らかになった。

#### (2) AJ における AM 束の裏打ち構造の細胞機能に対するアフアディンの役割

AJ における AM 束の裏打ち構造は上皮シートの収縮に必要である。また、ショウジョウバエの発生期の上皮細胞の頂端収縮において、アフアディンのショウジョウバエホモログの Canoe が、AJ と AM 束の適切な連結を制御することが報告されている。そこで、上皮細胞の頂端収縮にアフアディンが必要であることを検討するため、Rho キナーゼ結合タンパク質 shroom3 を、野生型とアフアディン欠損 EpH4 細胞に発現させたところ、野生型では頂端収縮が認められたのに対して、アフアディン欠損 EpH4 細胞では頂端収縮が認められなかった。また、細胞間接着部位への F-アクチンの集積が回復しなかったアフアディン-CC 発現細胞では、shroom3 の発現による頂端収縮が認められず、細胞間接着部位への F-アクチンの集積が回復した野生型アフアディンを入れ戻

した細胞と CC-アファディン発現細胞では、shroom3 の発現による頂端収縮が認められた。shroom3 の発現による頂端収縮が認められた細胞では、F-アクチンが AJ に局在していたが、頂端収縮が認められなかった細胞では、F-アクチンが細胞膜から解離していた。これらの結果から、アファディンの E-カテニン結合部位の CC 領域は、shroom3 発現による頂端収縮において、AJ における AM 束の形成に必要かつ十分であることが明らかになった。

### (3) In vitro におけるアファディンによる $\beta$ -カテニン複合体のアクチン結合能の制御機構

E-カテニンは N 末端側より、N ドメイン、M ドメイン、C ドメインを有する。N ドメインは、E-カテニンの二量体化を担う領域であるとともに  $\beta$ -カテニン結合領域でもあり、 $\beta$ -カテニンが N ドメインに結合すると E-カテニンは二量体を形成できない。M ドメインは 3 つのサブドメイン (MI, MII, MIII サブドメイン) から成るドメインで、E-カテニンが構造的に閉じた状態では、MII と MIII サブドメインによって MI サブドメインが覆われるため、MI サブドメイン中のピンキュリン結合部位が露出されない。しかし、張力によって E-カテニンが構造的に伸展すると、MI サブドメインが露出してピンキュリンとの結合が可能となる。アファディンと E-カテニンとの結合を生化学的に解析するため、種々の E-カテニン断片や E-カテニン変異体を作製し、アファディンの CC 領域との結合を検討した。アファディンの CC 領域は、MII と MIII のサブドメインと C ドメインを含む E-カテニン断片 (MII-C) や、MIII のサブドメインと C ドメインを含む E-カテニン断片 (MIII-C) とは結合したが、全長 (FL) の E-カテニン、MI と MII と MIII のサブドメインと C ドメインを含む E-カテニン断片 (MI-C) および C ドメインのみの E-カテニン断片 (C) とは結合しなかった。また、アファディンの CC 領域は、E-カテニンの N 末を  $\beta$ -カテニンの断片に置換した変異体 ( $\beta$ -Cat) とは結合せず、その変異体の MI ドメインにさらに変異を導入して E-カテニンを構造的に伸展させた変異体 ( $\beta$ -Cat-CA) とは結合した。これらの結果から、構造的に閉じた状態の E-カテニンでは、MI サブドメインが MIII サブドメインを覆うことで MIII サブドメインへのアファディンの結合を阻害し、アファディンは構造的に伸展した E-カテニンにのみ結合することが明らかになった。

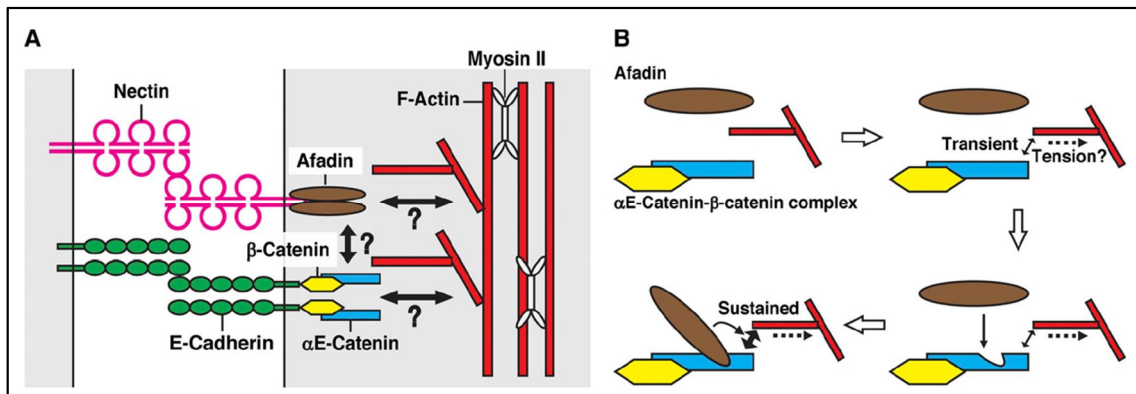
次に、E-カテニンの F-アクチン結合活性に対する E-カテニンへのアファディンの結合の影響を、精製タンパク質を用いた F-アクチン共沈降アッセイによって解析した。E-カテニンおよびその変異体は、単独では弱い F-アクチン結合活性しか示さない。しかし、生化学的にアファディンの CC 領域と結合することが確認された E-カテニンの変異体は、アファディンの CC 領域が存在すると、F-アクチン結合活性の増強が認められた。これらの結果から、アファディンの CC 領域は E-カテニンの MIII サブドメインと結合し、その F-アクチン結合活性を増強することが明らかになった。

### (4) まとめ

本研究において、アファディンが E-カテニンとの結合を介して AM 束の形成を制御すること明らかにした。これまで、AJ の接着分子カドヘリンの細胞内領域には  $\beta$ -カテニン複合体が結合しており、カドヘリンが  $\beta$ -カテニン複合体を介して AM 束を構成する F-アクチンに連結することによるという機構が考えられていた。一方で、これまでに行われた in vitro の研究から、F-アクチンは  $\beta$ -カテニン複合体には結合できないことが示されていた。この矛盾を部分的に説明可能な「Catch-bond モデル」というモデルが提唱され、このモデルによって、 $\beta$ -カテニン複合体に加わった張力によって引き起こされた、E-カテニンの F-アクチン結合ドメインの構造変化により、 $\beta$ -カテニン複合体と F-アクチンとの一過性の結合が生じることが証

明されている。しかし、細胞内において AJ の AM 束による裏打ち構造を維持するためには、この一過性の結合を安定化する必要があると考えられるが、その機構は不明であった。本研究により、アフアディンが E-カテニンに結合することで、アフアディンが  $\alpha$ -カテニン複合体と F-アクチンの一過性の結合を安定化する「くさび」として機能し、AJ の AM 束による持続的な裏打ちを可能とする機構を明らかにした (図 1)。これらの成果を論文としてまとめ、Journal of Cell Biology 誌に投稿し掲載された (参考文献)。

(図 1) 上皮細胞の接着帯におけるアフアディンによる AM 束の裏打ち構造の制御機構



(参考文献)

Sakakibara, S., Mizutani, K., Sugiura, A., Sakane, A., Sasaki, T., Yonemura, S., & Takai, Y. (2020) Afadin regulates actomyosin organization through E-catenin at adherens junctions. *J. Cell Biol.*, 219(5), e201907079.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakakibara S, Sakane A, Sasaki T, Shinohara M, Maruo T, Miyata M, Mizutani K, Takai Y.	4. 巻 298
2. 論文標題 Identification of lysophosphatidic acid in serum as a factor that promotes epithelial apical junctional complex organization.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102426.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shotaro Sakakibara, Kiyohito Mizutani, Ayumu Sugiura, Ayuko Sakane, Takuya Sasaki, Shigenobu Yonemura, Yoshimi Takai	4. 巻 219
2. 論文標題 Afadin regulates actomyosin organization through E-catenin at adherens junctions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201907079.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------