

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590313

研究課題名（和文）：カドヘリンの細胞内輸送に関するアダプター分子群の同定

研究課題名（英文）：Identification of adaptor molecules involved in intracellular transport of cadherins

研究代表者：小澤 政之 (OZAWA MASAYUKI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90136854

研究成果の概要（和文）：E-カドヘリンは細胞間の接着分子で、上皮細胞では粗面小胞体で合成された後、細胞表面の側面膜領域に輸送されて、アドヘレンスジャンクションと呼ばれる接着装置を形成する。カドヘリンは $\beta$ -カテニンを介して $\alpha$ -カテニンと複合体を作るのであるが、 $\beta$ -カテニンと結合しないと E-カドヘリンは細胞表面に輸送されなくなる。ところが、E-カドヘリンを $\alpha$ -カテニンとのキメラ分子にしてやると、輸送されるようになることがわかった。このことは、カドヘリンの輸送において $\alpha$ -カテニンが重要である事を示している。

研究成果の概要（英文）：E-cadherin is a member of the cadherin family cell-cell adhesion molecules. After synthesis in rough endoplasmic reticulum, E-cadherin is transported to the baso-lateral membrane of epithelial cells, and forms cell adhesion complex called adherens junction. Cadherins forms complexes with  $\alpha$ -catenin through the interaction with  $\beta$ -catenin. Uncoupling of  $\beta$ -catenin-binding results in failure of cadherin transport to the cell surface. Chimeric molecules of E-cadherin with  $\alpha$ -catenin, however, are transported to the surface. Thus complex formation of cadherins with  $\alpha$ -catenin is critical for the transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：カドヘリン、 $\beta$ -カテニン、 $\alpha$ -カテニン、細胞内輸送

## 1. 研究開始当初の背景

代表研究者は E-カドヘリンの構造と機能を解析する目的で線維芽細胞のひとつ、L 細胞を使って来たが、上皮細胞のひとつ MDCK 細胞で変異 E-カドヘリンを発現させることを試みた。すると、これまでの L 細胞での発

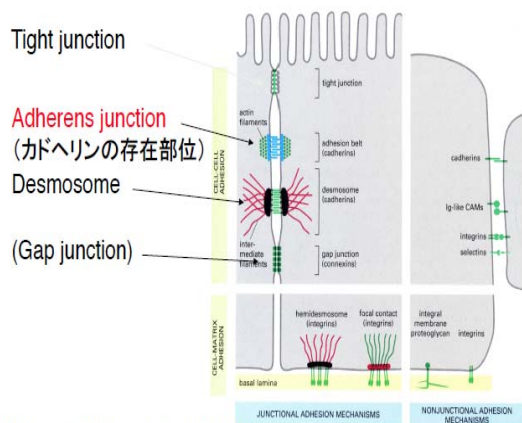
現と異なり、MDCK 細胞では $\beta$ -カテニン結合部位にアミノ酸置換あるいは欠失を導入して $\beta$ -カテニンが結合できなくなった E-カドヘリンは細胞表面に輸送されなくなることを見いだした（その理由は不明だが、L 細胞ではこれらの変異 E-カドヘリンの輸送は阻

害されず、相当量の変異 E-カドヘリンが細胞表面に輸送される) (下の図参照) (Miyashita Y, Ozawa M, Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein. *J. Biol. Chem.*, 282, 11540-11548, 2007; Miyashita Y, Ozawa M, A dileucine motif in its cytoplasmic domain directs b-catenin-uncoupled E-cadherin to the lysosome. *J. Cell Sci.*, 120, 4395-4406, 2007)。細胞表面に輸送されなかったカドヘリンはトランスゴルジネットワークに蓄積され、その後リソソームへと輸送されて最終的にはそこで分解される。



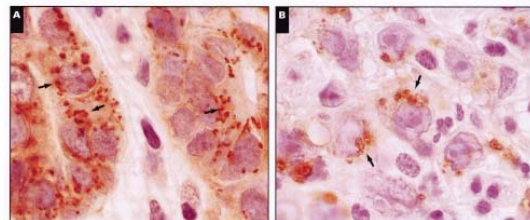
## 2. 研究の目的

E-カドヘリンはカルシウムイオン依存性の細胞間の接着分子で、上皮細胞では粗面小胞体で合成された後、側面膜領域に輸送されて、アドヘレンスジャンクションと呼ばれる接着装置を形成する (下の図参照)。接着分子として機能するためには、細胞表面に輸送されて始めて機能できるわけで、そのメカニズムを明らかにする事は、カドヘリンという



「Molecular Biology of the Cell」より

接着分子の生理的作用を理解する上で不可欠である。興味深い事に、悪性度の高いがんでは、カドヘリンが全く検出されない場合以外に、カドヘリンは合成されているにも関わらず、細胞表面に輸送されずに、細胞内のゴルジ領域に蓄積している場合も見いだされており (下の図参照)、いかなる理由で輸送が阻止されているのか、その解明が待たれている。



Carpenter et al., (2002)

細胞表面への輸送には各種アダプター分子との結合が不可欠であると考えられるので、本研究では、E-カドヘリンに結合するアダプター分子の同定を行う事を目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

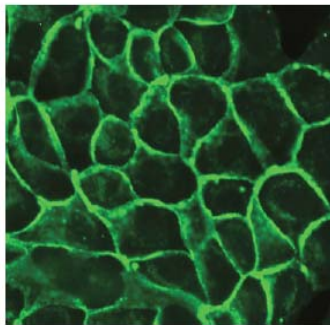
カドヘリンの細胞表面への輸送に既知のアダプター分子が関与している可能性も十分考えられたので、それらのアダプター分子とカドヘリンの結合を調べると同時に、新規の分子である可能性も考えられたので、two-hybrid 法等による探索も行った。1) 既知の分子に関しては、京都大学 中山和久先生、理化学研究所 大野博司先生から、各種アダプター分子複合体のサブユニットの発現ベクターあるいは cDNA を御与頂いて、結合の有無を調べる事とした。アダプター分子の同定は幾つかの方法を併用した。それは、以下に述べるようにアダプター分子の研究は依然として混沌とした状態にあるからである。例えば、グルコーストランスポーターの Glut8 と AP-2 の  $\beta 2$  サブユニットの結合は two-hybrid 法あるいは GST プルダウンアッセイで検出できるが (Schmidt et al., *J. Cell Sci.*, 2006)、HIV-1 ウイルスの Nef タンパク質と  $\mu 1$ 、 $\mu 2$ 、 $\mu 3$  サブユニットとの結合は two-hybrid 法でも検出可能であるが (Craig et al., *Virology*, 2000)、チロシナーゼと AP-1 複合体の  $\gamma$  と  $\sigma 1$  サブユニットの結合は three-hybrid 法を使って初めて検出が可能となっている (Theos et al., *Mol. Biol. Cell*, 2005)。これらの研究から、全く異なるアダプターサブユニットが結合することがわかる。

さて、具体的には、AP-1B 複合体あるいは AP-4 複合体といったクラスリンアダプター

分子を中心に、多様な手法（タグを付けたアダプター分子と E-カドヘリンの共発現後の免疫沈降反応、GST 融合タンパク質として発現させた E-カドヘリンの細胞質ドメインを用いたプルダウンアッセイ、two-hybrid 法を中心とした新規のアダプター分子群の検索等）を用いて E-カドヘリンの細胞質ドメインに結合するアダプター分子の探索を行った。

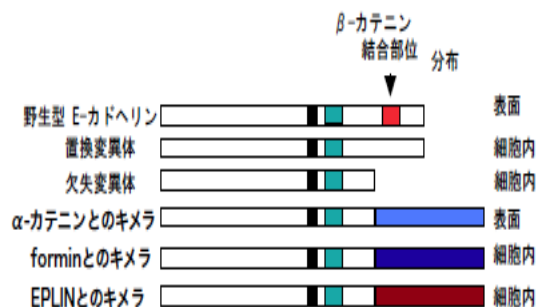
#### 4. 研究成果

研究の方法で述べたように、研究代表者らはこれまで、E-カドヘリンの細胞質ドメインに結合するアダプター分子の探索を行ってきた。しかしながら、これまでのところ目的の分子には到達できずにいた。ところが、本研究課題とは異なる目的で実験を行っている過程で、E-カドヘリンを $\alpha$ -カテニンとのキメラ分子にしてやると、細胞表面に輸送されるようになるという予想外の現象を見いだした（下の図参照）。これまでの予備的実



細胞表面に輸送された $\alpha$ -カテニンとのキメラE-カドヘリン分子

験では、 $\alpha$ -カテニンの全体が必要なわけではなく、異なる2つの部位が独立して機能する事が明らかになっている。また、近年、 $\alpha$ -カテニンに結合する分子として、フォルミン (formin) や EPLIN (epithelial protein lost in neoplasia) が報告されているが、これらの分子の機能ドメインを E-カドヘリンに連結させたキメラ分子を発現させても輸送は起こらない事も明らかになった。すなわち、カドヘリンの輸送には $\alpha$ -カテニンが決定的な役割を担っていると思われる。



この結果は、カドヘリンの細胞表面への輸送に関わるアダプター分子は、カドヘリンの細胞質ドメインに直接結合するのではなく、 $\alpha$ -カテニンに結合してカドヘリンの輸送を制御している可能性を強く示唆している。したがって、今後はこの方向の研究を展開することが重要であると考えている。

#### 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)

- ① Sato K, Watanabe T, Wang S, Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Yokoi K, Murase K, Sugiyama I, Ozawa M, Kaibuchi K, Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC, Mol. Biol. Cell., 22, 3103-3119, 2011. <http://www.molbiolcell.org/content/22/17/3103.long> (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

- ① 原口 みさ子、小沢 政之、snail による細胞内代謝調節機構、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21 日～24 日、国立京都国際会館 (京都市)
- ② 小林 和香子、小澤 政之、DLD1 colon carcinoma cells expressing lymphoid enhancer binding factor-1 show partial epithelial-mesenchyma transition、第 63 回日本細胞生物学会大会、2011 年 6 月 27 日～29 日、北海道大学 (札幌市)
- ③ 原口 みさ子、小沢 政之、スネイルは細胞の代謝を調節する、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- ④ Wakako Kobayashi, Masayuki Ozawa, Changes induced in DLD cells by expression of a regulatable LEF-1 protein、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 7 日～10 日、神戸国際会議場 (神戸市)
- ⑤ Masakazu Inada, Masayuki Ozawa, The cell adhesion molecules expressed on HEK293 cells、第 61 回日本細胞生物学会大会、2009 年 6 月 2 日～4 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp>  
<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~mdio/list/k/k2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤政之 (MASAYUKI OZAWA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90136854