

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25年 6月12日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012年度

課題番号：22570188

研究課題名（和文） 上皮細胞におけるカドヘリン・カテニン複合体局在化因子の探索

研究課題名（英文） Identification of localization factor for cadherin-catenin complex in epithelial cells

研究代表者

永瀨 昭良 (Nagafuchi Akira)

奈良県立医科大学・生物学・教授

研究者番号：80218023

研究成果の概要（和文）：本研究では上皮細胞においてカドヘリン・カテニン複合体の局在を規定する、上皮細胞特異的な因子の同定を行うために必要なカドヘリン・カテニン複合体完全欠損 F9 細胞の単離に成功した。この細胞を用いて未分化 F9 細胞にはアクチン系細胞骨格を必要としない、これまで想定されていなかったカドヘリン接着の新規様式が存在する可能性、この接着様式では未同定の β カテニン結合因子が機能している可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we succeeded in the isolation of cadherin-catenin-deficient mouse F9 cells as a tool to identify the epithelial factor, which determine the localization of cadherin-catenin complex in epithelial cells. Using the cadherin-catenin-deficient F9 cells, we perceive the possibility that there is a novel adhesion mode in undifferentiated F9 cells, which is independent of actin-based cytoskeletons. We also suggested the presence of an unexpected factor, which regulate localization of cadherin-catenin complex in non-epithelial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：細胞間相互作用・細胞外マトリックス、上皮極性

1. 研究開始当初の背景

（1）多細胞動物では多くの細胞が集まり、お互いに接着することにより1つの個体を形作っている。多数の細胞が接着して細胞集団を作った場合、単細胞の時とは異なりある種の社会性を持つことになる。そのた

め、細胞間接着は単に細胞をつなぎ合わせるだけではなく、細胞の分化や増殖、運動性の制御なども行っていると考えられている。しかしこのように精巧な制御が行われている分子機構に関してはまだ不明な点も多い。一方で細胞間接着は細胞骨格系と協

調して、組織・器官の複雑な形作りにも寄与している。形態形成運動の1つである上皮組織構築における細胞間接着の重要性は良い例である。実際、細胞間接着の異常は上皮細胞の癌化の重要な一段階であることが示されている。細胞接着には多くの分子が関与しているが、中でもカドヘリン・カテニン複合体は、細胞間の強固な接着において、中心的な役割を果たしている。この複合体は細胞間接着分子カドヘリンと細胞質因子 α カテニン、 β カテニンから構成されている。 β カテニンがカドヘリン分子の細胞質領域の末端と α カテニン分子のN末端に直接結合することにより、これら三者は安定な複合体を形成する。

(2) カドヘリン・カテニン接着複合体は単に細胞と細胞を強固に結合させるだけでなく、上述したような複雑な制御機構にも関与していることが予想されてきた。特に上皮組織構築においてカドヘリン・カテニン複合体が必須であることは、この構成因子を1つでも欠いた上皮細胞は単層上皮組織を構築できないことから、明らかにされている。当初、カドヘリン・カテニン複合体が機能しない場合、上皮極性も構築できないと考えられていた。しかし最近カドヘリン・カテニン複合体が機能していない状況でも上皮極性が樹立できる可能性が示され、細胞間接着と上皮極性形成との関係の再検討が必要になってきている。

(Harris and Peifer, JCB 2004; Baas et al., Cell 2004)

2. 研究の目的

(1) 単細胞上皮細胞ではリング状のアピカル膜境界領域が形成され、そこにはPAR-3複合体やネクチン・アファディン複合体、アクチン束も局在していることを見いだしている。さらにこの領域にカドヘリン・ β カテニン複合体が局在することも見いだしている。本研究では、この局在を規定している分子、具体的にはカドヘリン・ β カテニン複合体と相互作用する因子の同定、および機能解析を試みる。この因子は、細胞極性関連因子による細胞間接着装置の位置決定というこれまで想定されていない制御機構に関与していることが想定される。この制御機構が実際に生体内で機能しているかどうかを確認するために、カドヘリン・ β カテニン複合体がアピカル膜境界領域に局在することを妨げる因子の開発も試みる。具体的には β カテニン・カドヘリン融合タンパク質の利用を考える。この分子は、内在性のカドヘリン・ β カテニン複合

体と拮抗して、ドミナントネガティブ因子として働くことが想定される。このようなドミナントネガティブ細胞を培養細胞や初期胚で強制発現させることにより、上皮組織構築、細胞間接着装置複合体形成などへの影響を検討する。

(2) これらの解析と平行してPAR-3複合体やネクチンアファディン複合体など、アピカル膜境界領域に局在する因子が直接カドヘリン・ β カテニン複合体と相互作用するかどうかについて、試験管内での結合実験により検討する。

3. 研究の方法

基本的には申請者がこれまでに単離してきた、カドヘリン・カテニン複合体の構成因子が欠損しているため、単細胞状態で上皮細胞に分化する変異F9細胞を用いて解析を行う。このF9細胞にカドヘリン・カテニン複合体構成因子のさまざまな変異型分子を導入し、接着と無関係にアピカル境界に局在する分子を探索する。得られた、アピカル境界局在因子について、免疫沈降やクロスリンクによりその結合相手を同定し解析を進める。

4. 研究成果

研究の初期の段階でこれまで単離できていなかった、Eカドヘリン欠損F9細胞の単離に成功した。この細胞に β カテニンを発現させたところ予想に反して細胞間接着部位に濃縮した。未分化の非上皮F9細胞においては β カテニンのおもな結合相手はEカドヘリンと考えられていたが、それ以外の結合相手がいることが示唆された。上皮細胞におけるアピカル境界への局在に β カテニンが機能している可能性が示唆されていたが、 β カテニンにEカドヘリン以外の結合相手がいる場合、解析が複雑になる。そのため当初の予定を変更して、未分化F9細胞における β カテニンの結合相手の検索を始めた。最も可能性があるのはNカドヘリンTypeIIカドヘリンである。しかし、Nカドヘリンは未分化F9細胞においてはごく一部の細胞にしか発現していないことが報告されている。TypeIIカドヘリンに関してはDNAチップ解析から6番と11番の発現の可能性が考えられたが、ウェスタンブロットや蛍光抗体では検出できなかった。検出感度以下のこれらの分子の発現の可能性も否定できないが、新規 β カテニン結合タンパク質の存在の可能性も考慮しなければならなかった。これらの解析の過程で、F9細胞においてはこれまでに報告されていたアクチン依存性のカドヘリン依存性細胞接着機構とはアクチン依存性の異なる接着機構が存在する事が見いだされた。新しいカドヘリン類似接着分子の存在、または

カドヘリンの新しい接着様式が存在など今後の解析が必要である。

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 3 件)

- ① Functional analysis of ectodermal b-catenin during external genitalia formation
Ahmad Reza Mazahery, Kentaro Suzuki, Akira Nagafuchi, Masayasu Miyajima, Naomi Nakagata, Richard Behringer, and *Gen Yamada
Congenital Anomalies (Kyoto), 53(1): 34-41.
doi:10.1111/cga.12001, 2013
- ② Defining the roles of α -catenin in cell adhesion and cytoskeleton organization: isolation of F9 cells completely lacking cadherin-catenin complex.
Ozono K, Komiya S, Shimamura K, Ito T, *Nagafuchi A.
Cell Struct Funct. 36(1):131-43, 2011
https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/36/1/36_11009/_article
- ③ α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development
Shigenobu Yonemura, Yuko Wada, Toshiyuki Watanabe, Akira Nagafuchi, Mai Shibata
Nat. Cell Biol. 12(6): 533-542, 2010
doi: 10.1038/ncb2055

[学会発表] (計 4 件)

- ① Satoshi Urayama, Chiyoko Kobayashi and Akira Nagafuchi
Spindle orientation in cadherin-catenin complex-deficient F9 cells
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology.
平成 24 年 5 月 30 日 神戸

- ② Akira Nagafuchi, Satoshi Urayama and Chiyoko Kobayashi
b-catenin binding partner(s) other than E-cadherin support cell adhesion sites without ZO-1
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology.

平成 24 年 5 月 30 日 神戸

- ③ Chiyoko Kobayashi, Satoshi Urayama and Akira Nagafuchi
Functional analysis of E-cadherin-b-catenin fusion molecules
Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology.

平成 24 年 5 月 30 日 神戸

- ④ Kazutaka Ozono and Akira Nagafuchi.
Cytoplasmic α -catenin is not required for cadherin-mediated cell adhesion. The 61th Annual Meeting of the Japan Society for Cell biology. 平成 22 年 5 月 21 日
大阪

[図書] (計 2 件)

- ① 永渕昭良 羊土社
シグナル伝達キーワード事典
第 2 部生命現象から見たシグナル伝達因子
細胞接着
174-184 頁 (2012)

②永渕昭良 丸善出版

リップンコットシリーズイラストレイテッド細胞分子生物学

第I編 細胞および組織の構造と組織化

幹細胞とその分化、細胞外マトリックスと

細胞接着

2-27頁 (2012)

[その他]

ホームページ等

http://www.naramed-u.ac.jp/~biol/site/Department_of_Biology,_Nara_Medical_School.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永渕 昭良 (Nagafuchi Akira)
奈良県立医科大学・生物学・教授
研究者番号：80218023

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

米村 重信 (Yonemura Shigenobu)
独立行政法人理化学研究所・
電子顕微鏡解析室・室長
研究者番号：60192811
嶋村 健児 (Shimamura Kenji)
熊本大学・発生医学研究所・教授
研究者番号：70301140