



## Requirement of the F-actin-binding activity of l-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions

Sakakibara, Shotaro

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7158号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007158>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Requirement of the F-actin-binding activity of l-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions

接着結合と密着結合の形成促進における 1-アファディンの  
アクチン結合活性の必要性について

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
シグナル統合学・病態シグナル学  
(指導教員：的崎 尚 教授)

榎原 正太郎

#### 〔はじめに〕

極性を形成した上皮細胞は、隣り合う細胞が互いに接着して接着装置を形成し、シート状につながることで上皮シートを構築する。この細胞間接着装置としては主として密着結合と接着結合およびデスモソームの三つが知られている。このうち密着結合は、上皮シートにおける水溶性分子の拡散を制御するバリアとしての機能と、頭頂部と基底側面部における細胞形質膜領域の極性を形成するフェンスとしての機能を有している。接着結合は、隣り合う細胞を機械的に結合することにより、上皮シートの強度を維持すると共に上皮シートの変形を制御する機能を有している。さらに、接着結合は密着結合とデスモソームの形成と維持を制御する機能も有している。これらの細胞間接着装置は多くのアクチン結合タンパク質を介してアクチン細胞骨格によって裏打ちされており、このアクチン細胞骨格は細胞間接着装置の形成と維持および機能の制御に関与している。アファディンはこのアクチン結合タンパク質の一つである。アファディンには大きく分けて 1-アファディンと s-アファディンの 2 つのバリエントが存在する。1-アファディンは、その N 末端より二つの RA ドメイン、一つの FHA ドメイン、一つの DIL ドメイン、一つの PDZ ドメイン、三つのプロリンリッチ領域、一つのアクチン結合ドメインを有している。s-アファディンは C 末端領域の 3 番目のプロリンリッチ領域とアクチン結合ドメインを欠失している。1-アファディンは全ての組織で発現するのに対し、s-アファディンは脳のみに発現している。密着結合は細胞間接着分子であるクローディンとオクルーディンおよび JAM-1 がそれぞれ隣り合う細胞間で結合して形成される。また、アクチン結合タンパク質である ZO-1 と ZO-2 および ZO-3 がこれらの分子の細胞膜領域に結合している。接着結合は細胞間接着分子であるネクチンと E-カドヘリンがそれぞれ隣り合う細胞間で結合して形成される。また、1-アファディンはネクチンの細胞質領域に、 $\beta$ -カテニンと p120 カテニンは E-カドヘリンの細胞質領域に結合し、アクチン結合タンパク質である  $\alpha$ E-カテニンがこの  $\beta$ -カテニンに結合している。これまでの解析から、上皮細胞が細胞間接着装置を形成する際、(1) まず隣り合う細胞間のネクチンが結合して細胞間を接着させる。(2) 1-アファディンはこのネクチンの細胞質領域に結合すると共に、 $\alpha$ E-カテニンとも結合し、ネクチンによって形成された接着部位に E-カドヘリンをリクルートして接着結合を形成する。(3) さらに、1-アファディンは、ZO-1 と結合し、まず JAM-1 を、引き続いてクローディンとオクルーディンを接着結合の頭頂側にリクルートして密着結合を形成することが明らかになっている。しかし、この接着結合と密着結合の形成過程における 1-アファディンのアクチン結合活性の役割は不明であった。

#### 〔結果〕

##### I. アファディンノックアウト Eph4 細胞の樹立

従来、接着結合と密着結合の形成における 1-アファディンの役割は、shRNA により 1-アファディンをノックダウンした MDCK 紡錘形細胞を用いて解析され、1-アファディンをノックダウン

した MDCK 細胞では野性型の MDCK 細胞に比べ、接着結合と密着結合の形成速度の低下が認められることから、1-アファディンは接着結合と密着結合の形成を促進する機能があることが示されていた。しかし、この 1-アファディンをノックダウンした MDCK 紹胞では野性型の MDCK 紹胞に比べ、アファディンの発現量は著しく低下しているが完全に消失はしておらず、1-アファディンが接着結合と密着結合の形成に必須であるかは不明であった。そこで、本研究では、まずゲノム編集技術の CRISPR/Cas9 法を用い、マウス乳腺上皮細胞株の Eph4 紹胞において 1-アファディンをコードする遺伝子の破壊を行い、アファディンノックアウト Eph4 紹胞を作製した。アファディンの発現量をウェスタンプロット法で検討したところ、1-アファディンは、野生型 Eph4 紹胞では検出されたのに対して、アファディンノックアウト Eph4 紹胞では全く検出されなかった。一方、アファディンノックアウト Eph4 紹胞における、ネクチン-1 や E-カドヘリン、 $\alpha$ -E-カテニン、クローディン-3、および ZO-1 の発現量は、野生型 Eph4 紹胞におけるそれぞれのタンパク質の発現量と同程度であった。さらに、1-アファディンの発現と局在を蛍光免疫染色法で検討したところ、1-アファディンは野生型 Eph4 紹胞では隣り合う細胞間に集積していたが、アファディンノックアウト Eph4 紹胞では全く集積していなかった。これらの結果から、アファディンノックアウト Eph4 紹胞ではアファディンが完全に消失していることが確認された。

## II. 接着結合と密着結合の形成促進における 1-アファディンの必要性

そこで、このアファディンノックアウト Eph4 紹胞と野生型 Eph4 紹胞を用いて、接着結合と密着結合の形成における 1-アファディンの役割を、細胞間接着構造形成に関する評価系であるカルシウムスイッチアッセイ法で再検討した。Eph4 紹胞を通常カルシウム濃度 (2 mM) で培養すると、ネクチン-1 や E-カドヘリン、 $\alpha$ -E-カテニン、クローディン-3 および ZO-1 は、アファディンノックアウト Eph4 紹胞と野生型 Eph4 紹胞の隣り合う細胞間に同程度に集積していたが、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を用いて培地中ににおけるカルシウムをキレートして培養すると、両者の細胞は丸くなって、これらのタンパク質は隣り合う細胞間に集積していなかった。アファディンノックアウト Eph4 紹胞と野生型 Eph4 紹胞を再び通常カルシウム濃度 (2 mM) で培養すると、これらすべてのタンパク質は時間経過と共に隣り合う細胞間に再集積した。しかし、アファディンノックアウト Eph4 紹胞では、野生型 Eph4 紹胞に比べ、隣り合う細胞間におけるこれらのタンパク質の再集積の速度は低下していた。これらの結果から、1-アファディンが完全に消失した Eph4 紹胞においても、1-アファディンをノックダウンした MDCK 紹胞を用いた以前の実験結果と同様に、1-アファディンは接着結合と密着結合の形成を促進することが明らかになった。

## III. 接着結合と密着結合の形成促進における 1-アファディンのアクチン結合活性の必要性

次に、接着結合と密着結合の形成促進における 1-アファディンのアクチン結合活性の必要性について検討した。そのために、まずアファディンノックアウト Eph4 紹胞に 1-アファディン、アクチン結合ドメインと 3 番目のプロリンリッチ領域を欠失している s-アファディン、あるいはアクチン結合ドメインのみを欠失している 1-アファディンの変異体を再発現させた細胞株を作製し、これらの細胞株を用いて同様のカルシウムスイッチアッセイを行った。その結果、1-アファディンを再発現させた細胞株と野生型 Eph4 紹胞では、ネクチン-1 や E-カドヘリン、 $\alpha$ -E-カテニン、クローディン-3 および ZO-1 は隣り合う細胞間に同程度に集積した。しかし、s-アファディンあるいはアクチン結合ドメインを欠失した 1-アファディンを再発現させた細胞株では、アファディンノックアウト Eph4 紹胞と同様に、隣り合う細胞間におけるこれらのタンパク質の再集積の速度は低下していた。これらの結果から、接着結合や密着結合の形成の促進には 1-アファディンのアクチン結合活性が必要であることが明らかになった。

### 〔考察〕

上皮細胞が細胞間接着装置を形成する際、隣り合う細胞間でのネクチン同士の結合は細胞内シグナル伝達分子の Src、Rap1、Rac および Cdc42 などを活性化し、アクチン細胞骨格の再編成を引き起こす。一方、細胞間接着装置の形成はアクチン細胞骨格を破壊する分子によって阻害される。1-アファディンはネクチンの細胞質領域に結合すると共に、E-カドヘリンの細胞質領域に  $\beta$ -カテニンを介して結合している  $\alpha$ -E-カテニンとも結合し、ネクチンによって形成された接着部位に E-カドヘリンをリクリートして接着結合を形成する。さらに、1-アファディンは ZO-1 と結合してクローディンやオクルーディンおよび JAM-1 を接着結合の頭頂側にリクリートして密着結合を形成する。これらの 1-アファディンと  $\alpha$ -E-カテニンおよび ZO-1 はすべてアクチン結合タンパク質である。本研究から、1-アファディンは接着結合と密着結合の形成を促進する機能があり、その機能には 1-アファディンのアクチン結合活性が必要であることが明らかになった。この本研究の結果とこれまでの知見から、1-アファディンのアクチン結合活性の少なくとも一つの役割は、1-アファディンと  $\alpha$ -E-カテニンおよび ZO-1 との結合を制御することによって接着結合と密着結合の形成を促進することであると考えられる。しかし、1-アファディンのアクチン結合活性が 1-アファディンとこれらのタンパク質との結合をどのように制御するかは今後さらに解析する必要がある。

神戸大学大学院医学(系)研究科 (博士課程)

| 論文審査の結果の要旨                    |  |    |        |
|-------------------------------|--|----|--------|
| 受付番号                          | 甲 第 2782 号   | 氏名 | 榎原 正太郎 |
| 論文題目<br>Title of Dissertation | <p>Requirement of the F-actin-binding activity of l-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions</p> <p>接着結合と密着結合の形成促進における l-アファディンのアクチン結合活性の必要性について</p> |    |        |
| 審査委員<br>Examiner              | <p>主査<br/>Chief Examiner 南 康博</p> <p>副査<br/>Vice-examiner 榎本 元祐</p> <p>副査<br/>Vice-examiner 伊藤 俊樹</p>  |    |        |

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

上皮細胞は、隣接細胞が接着して接着装置を形成しシート状に繋がる。細胞間接着装置として密着結合、接着結合、デスマゾームがあり、密着結合は上皮シートにおけるバリア機能と頭頂部と基底側面部における細胞膜領域の極性を形成するフェンス機能を、接着結合は上皮シートの強度の維持やその変形を制御する機能を持つ。これら細胞間接着装置はアクチン結合タンパク質を介してアクチン細胞骨格によって裏打ちされる。アクチン結合タンパク質アファディンには l-アファディンと s-アファディンの2つのバリエントが存在し、s-アファディンでは l-アファディンに存在する C 末端領域の 3 番目のプロリンリッチ領域とアクチン結合ドメインが欠失している。密着結合は細胞間接着分子クローディン、オクルーディン及び JAM-1 が隣接細胞間で結合して形成され、アクチン結合タンパク質 ZO-1, ZO-2 及び ZO-3 がこれらの分子の細胞膜領域に結合している。接着結合は細胞間接着分子ネクチンと E-カドヘリンが隣接細胞間で結合し形成され、l-アファディンはネクチンの細胞質領域に、β-カテニンと p120 カテニンは E-カドヘリンの細胞質領域に結合し、α-E-カテニンがこの β-カテニンに結合している。上皮細胞が細胞間接着装置を形成する際、隣接細胞間のネクチンが結合し細胞間を接着させ、l-アファディンはネクチンの細胞質領域と α-E-カテニンに結合し、ネクチンによって形成された接着部位に E-カドヘリンを動員して接着結合を形成する。さらに、l-アファディンは ZO-1 と結合し、続いて JAM-1、クローディン、オクルーディンを接着結合の頭頂側に動員して密着結合を形成するが、接着結合と密着結合の形成過程における l-アファディンのアクチン結合活性の役割は不明であった。

l-アファディンをノックダウン(KD)した MDCK 細胞では野生型細胞に比べ、接着結合と密着結合の形成速度の低下が認められ、l-アファディンは接着結合と密着結合の形成を促進することが示されていたが、l-アファディンを KD した MDCK 細胞ではアファディンの発現は完全には消失しておらず、l-アファディンが接着結合と密着結合の形成に必須であるかは不明であった。本研究では、まず CRISPR/Cas9 法により上皮細胞株 EpH4 細胞において l-アファディン遺伝子を破壊し、アファディンノックアウト(KO) EpH4 細胞を作製した。l-アファディンは野生型細胞では検出されたが、アファディン KO 細胞では検出されなかった。一方、アファディン KO 細胞におけるネクチン-1、E-カドヘリン、α-E-カテニン、クローディン-3 及び ZO-1 の発現は、野生型細胞における発現量と同程度であった。また、l-アファディンは野生型細胞では隣接細胞間に集積していたが、アファディン KO 細胞では全く集積しておらず、アファディン KO 細胞ではアファディンが完全に消失していた。

また、アファディン KO EpH4 細胞と野生型細胞を用いて、接着結合と密着結合の形成における l-アファディンの役割を検討した。EpH4 細胞を通常カルシウム濃度で培養すると、ネクチン-1 や E-カドヘリン、α-E-カテニン、クローディン-3 及び ZO-1 は、アファディン KO 細胞と野生型細胞の隣接細胞間で同程度に集積していたが、EDTA を用いてカルシウム

ムをキレートすると細胞は丸くなり、これらのタンパク質は細胞間に集積していなかった。アファディン KO 細胞と野生型細胞を再び通常カルシウム濃度で培養すると、これら全てのタンパク質は時間経過と共に隣接細胞間に再集積したが、アファディン KO 細胞では、野生型細胞に比べ、隣接細胞間でのこれらのタンパク質の再集積速度が低下していた。次に、アファディン KO EpH4 細胞に 1-アファディン、アクチン結合ドメインと 3 番目のプロリンリッヂ領域を欠失する s-アファディン、またはアクチン結合ドメインのみを欠失する 1-アファディンの変異体を再発現させた細胞株を作製し同様の解析を行ったところ、1-アファディンを再発現させた細胞株と野生型細胞では、ネクチン-1 や E-カドヘリン、 $\alpha$ -E-カテニン、クローディン-3 及び ZO-1 は隣接細胞間に同程度に集積したが、s-アファディンまたはアクチン結合ドメインを欠失した 1-アファディンを再発現させた細胞株では、アファディン KO 細胞と同様に、隣接細胞間におけるこれらのタンパク質の再集積速度は低下しており、接着結合や密着結合の形成の促進には 1-アファディンのアクチン結合活性が必要であることが明らかになった。

上皮細胞が細胞間接着装置を形成する際、隣接細胞間でのネクチン同士の結合は細胞内シグナル伝達分子 Src、Rap 1、Rac、Cdc42 などを活性化し、アクチン細胞骨格の再編成を誘導する。一方、細胞間接着装置の形成はアクチン細胞骨格を破壊する分子により阻害される。1-アファディンはネクチンの細胞質領域に結合すると共に、E-カドヘリンの細胞質領域に $\beta$ -カテニンを介して結合している  $\alpha$ -E-カテニンとも結合し、ネクチンにより形成された接着部位に E-カドヘリンを動員して接着結合を形成する。1-アファディンは ZO-1 とも結合しクローディン、オクルーディン及び JAM-1 を接着結合の頭頂側に動員して密着結合を形成する。本研究は、1-アファディンには接着結合と密着結合の形成を促進する機能があり、その機能には 1-アファディンのアクチン結合活性が必要であることを明らかにしたもので、細胞間接着機構について重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。