Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell-cell adhesion via activation of RhoA

木村，律子

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2010-08-10
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙3123
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003123

※ 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。

氏　　名	木村　律子
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博ろ第 3123 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の　日　付	2010 年 8 月 10 日

【 学位論文題目 】

Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell?cell adhesion via activation of RhoA （血管内皮細胞特異的接着分子(ESAM)と MAGI-1 の相互作用が RhoA を介して細胞接着を成熟化させる）

審　査　委　員

主　査　　教　授　中村　俊一
　　教　授　古瀬　幹夫
　　准教授　平島　正則

（論文博士関係）

学位論文の内容要旨

Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell–cell adhesion via activation of RhoA

血管内皮細胞特異的接着分子(ESAM)と MAGI-1 の相互作用が
RhoA を介して細胞接着を成熟化させる

（指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻　林　祥剛教授）

木村　律子

Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)は、immunoglobulin superfamily に属する type 1 型膜タンパク質である。ESAM は、その細胞外ドメインを介して homophilic に結合し、血管内皮細胞間の Tight junction に機能すると考えられているが、未だ不明な点が多い。

ESAM KO マウスの phenotype は正常で血管形成や脈管構造に形態的異常は見られなかった。しかし、悪性黒色腫（melanoma）細胞や Lewis 肺癌細胞を ESAM KO マウスと野生型マウスに移植し、腫瘍形成について比較したところ、ESAM KO マウスでは、腫瘍の増殖抑制が認められ、さらに腫瘍内での血管形成の減少をみた。このことから ESAM が腫瘍の栄養血管新生に関与していること、ESAM の発現抑制により、腫瘍の栄養血管新生が抑制され、腫瘍細胞の増殖が抑制されることが示唆された。このことから ESAM は今後の癌治療、特に分子標的治療への応用に関して、興味深い分子である。

ESAM に関して細胞接着における機能をさらに解析するため、ESAM を発現していない Chinese hamster ovary (CHO) cell に ESAM 発現ベクターを導入して、Stable transfectant を作成した。Ca 非存在下で Adhesion assay を行ったところ、細胞接着の増強がみられた。さらに、細胞内ドメインを欠く Deletion mutant の遺伝子を導入したところ、同様の接着能がみられた。このことから、ESAM は Ca 非依存的に homophilic な接着をおこし、細胞接着には ESAM の細胞外ドメインが関与し、細胞内ドメインは、重要でないことを明らかにした。

一方、ESAM の細胞内領域において、その C 末端に Membrane associated guanylate kinase (MAGUK) with inverted domain structure 1 (MAGI-1)が PDZ ドメインを介して直接結合することが近年報告された。MAGI-1 は細胞膜裏打ち蛋白であり、膜蛋白を裏打ちして細胞骨格に結合させると考えられている。そこで我々は ESAM と MAGI-1 の結合における機能的意味を探るべく、CHO cell に ESAM および MAGI-1 発現ベクターを導入して、Stable transfectant を作成し、ESAM における MAGI-1 の局在や細胞接着の制御への役割を検討した。

ESAM および MAGI-1 発現 Stable transfectant において Ca 非存在下で Adhesion assay を行ったところ、ESAM のみ発現、ESAM ・MAGI-1 共発現で比較して接着能に差がみられなかったことより、MAGI-1 は ESAM を介した immature な細胞接着には関与しないことが判明した。

また、Stable transfectant において、MAGI-1 単独で発現させると MAGI-1 は細胞内にびまん性に存在するが、ESAM を共発現させると、MAGI-1 の発現が本来の細胞膜直下に局在し、さらにアクチンの膜直下における重合がみられた。

一方で、PDZ ドメインを欠損させた ESAM の mutant を発現させた場合、MAGI-1 は細胞内にびまん性に留まり、さらにアクチンの膜直下における重合が有意に減少した。

次に ESAM、MAGI-1 共発現の Stable transfectant を用いて dissociation assay を行ったところ、ESAM に MAGI-1 を共発現させると細胞間接着が増強され、さらにその接着はアクチン脱重合剤によって抑制されることを示した。また PDZ binding motif を欠く ESAM を発現させた場合も同様に接着抑制がみられた。以上のことから ESAM は、細胞内において MAGI-1 と PDZ ドメインを介して結合することでアクチンの重合を促進し、細胞間接着を増強していることが考察された。

一方で、細胞を播種後、細胞増殖して細胞同士が接着する際に、ESAM と MAGI-1 の colocalization が起こり、その後細胞接着面においてアクチンの重合化が起こることを、時系列を追って示した。

また、ESAM、MAGI-1 共発現の Stable transfectant を用いて、RhoA 活性化をみる Pull down assay を行うと、ESAM および MAGI-1 単独発現細胞よりも、ESAM ・MAGI-1 共発現細胞において有意に RhoA の活性化がみられた。

さらに、RhoA 阻害剤によって、ESAM による MAGI-1 の細胞膜直下への局在誘導や細胞接着能増強が抑制されることがわかった。

以上より、PDZ ドメインを介して ESAM が MAGI-1 と結合することで、MAGI-1 の細胞内局在を制御し、さらには RhoA を介してアクチンの重合が起こることにより、細胞接着を成熟化させることがわかった。

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	乙 第 2087 号	氏　名	木村律子
論文題目 Title of Dissertation	Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell–cell adhesion via activation of RhoA 血管内皮細胞特異的接着分子(ESAM)と MAGI-1 の相互作用が RhoA を介して細胞接着を成熟化させる		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 中村俊一 副　査 Vice-examiner 古瀬幹夫 副　査 Vice-examiner 平島正則		
審査終了日	平成 22 年 7 月 21 日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Endothelial cell-selective adhesion molecule (ESAM)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する１型膜タンパク質である。ESAMは、その細胞外ドメインを介して血管内皮細胞間のTight junction形成に関与するが、未だ不明な点が多い。本研究ではESAMを介する細胞接着の分子メカニズムを理解するため細胞レベルでの解析を行った。

申請者はESAMを発現していないCHO細胞にESAM発現ベクターを導入して、安定株を作成した。Ca非存在下でAdhesion assayを行ったところ、細胞接着の増強がみられた。さらに、細胞内ドメインを欠く遺伝子を導入したところ、同様の接着能がみられた。一方、ESAMの細胞内領域において、そのC末端にMembrane associated guanylate kinase (MAGUK) with inverted domain structure 1 (MAGI-1)がPDZドメインを介して直接結合することが近年報告された。そこで申請者はESAMとMAGI-1の結合における機能的意味を探るべく、CHO細胞にESAMおよびMAGI-1発現ベクターを導入して安定株を作成し、細胞接着の制御への役割を検討した。Ca非存在下でAdhesion assayを行ったところ、ESAMのみ発現、ESAM・MAGI-1共発現で比較して接着能に差がみられなかった。また、MAGI-1単独で発現させるとMAGI-1は細胞内にびまん性に存在するが、ESAMを共発現させると、MAGI-1の発現が本来の細胞膜直下に局在し、さらにアクチンの膜直下における重合がみられた。一方で、PDZドメインを欠損させたESAMのmutantを発現させた場合、MAGI-1は細胞内にびまん性に留まり、さらにアクチンの膜直下における重合が有意

に減少した。次にESAM、MAGI-1共発現の安定株を用いてdissociation assayを行ったところ、ESAMにMAGI-1を共発現させると細胞間接着が増強され、さらにその接着はアクチン脱重合剤によって抑制されることを示した。またPDZ binding motifを欠くESAMを発現させた場合も同様に接着抑制がみられた。以上のことからESAMは、細胞内においてMAGI-1とPDZドメインを介して結合することでアクチンの重合を促進し、細胞間接着を増強していることが示された。また、ESAM、MAGI-1共発現の安定株を用いて、RhoA活性化をみるPull down assayを行うと、ESAMおよびMAGI-1単独発現細胞よりも、ESAM・MAGI-1共発現細胞において有意にRhoAの活性化がみられた。さらに、RhoA阻害剤によって、ESAMによるMAGI-1の細胞膜直下への局在誘導や細胞接着能増強が抑制されることがわかった。以上より、PDZドメインを介してESAMがMAGI-1と結合することで、MAGI-1の細胞内局在を制御し、さらにはRhoAを介してアクチンの重合が起こることにより、細胞接着を成熟化させることがわかった。

本研究は、ESAMがMAGI-1とPDZドメインを介して結合することでアクチンの重合を促進し、細胞間接着を増強していることを明らかにしたものであり、細胞接着の分子メカニズムを理解する上で有力な知見を得たものとして価値ある集積と認める。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。