

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18390080

研究課題名（和文） 細胞間接着シグナリングによる細胞極性の形成機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of formation of cell junctions and polarity

研究代表者

入江 賢児 (IRIE KENJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：90232628

研究成果の概要： 本研究では、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着による細胞極性の形成機構に焦点を絞り、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着の形成から接着シグナリングを介したタンパク質および細胞骨格の不均衡な局在の形成機構、すなわち細胞極性確立の分子機構を明らかにすることを目的として、研究を行なった。研究の結果、次のような研究成果を得た。ネクチンによるアドヘレンスジャンクションおよびタイトジャンクションの形成には、アフアディンとアクチン細胞骨格が必須の役割を果たすことを明らかにした。アネキシンIIをノックダウンした細胞では、タイトジャンクションはカドヘリンによる細胞間接着形成なしに形成されること、タイトジャンクションの形成にはネクチン-アフアディン系は必須であることを明らかにした。さらに、アドヘレンスジャンクションおよびタイトジャンクションの形成には、アフアディンと Par-3 が協調的に機能することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：細胞極性、細胞間接着、ネクチン、アフアディン、アドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、Stau1、RNA 局在

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生や分化の過程では、細胞内においてさまざまなタンパク質が時間的に不均等に局在または合成され、これが各細胞の運命決定・特異的な機能発現に重要な役割を果たしている。これらタンパク質の不均衡な局在や局所的な合成は、細胞骨格の不均衡な配置などの細胞極性に依存しており、

多細胞生物においては細胞間接着が細胞極性の形成すなわち細胞骨格やタンパク質の不均衡な局在に重要な役割を果たしている。細胞極性形成の生化学的な分子機構の解明は、個体の発生や維持の制御機構を理解する上でも大変重要である。発生や分化の過程で重要な細胞間接着系としてカドヘリン-カテニン系が重要であることはすでに確立し

ているが、カドヘリン-カテニン系だけでは説明がつかない細胞間接着も数多く報告されている。私は平成12年度12月まで名古屋大学大学院理学研究科で、細胞増殖を制御するシグナル伝達系を解析し、マウス新規MAPKKKであるTAK1およびその活性化因子TAB1、TAB2を単離するなど、MAPキナーゼカスケードが細胞増殖制御に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。平成12年度12月から平成17年3月まで大阪大学大学院医学系研究科において、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着機構を解析し、上皮細胞においてネクチン-アフアディン系の細胞間接着機構がカドヘリン依存性アドヘレンスジャンクションのみならずクロードイン依存性タイトジャンクションの形成も制御していることを明らかにしてきた。また、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着機構が細胞極性形成に重要な役割を果たすPar-3や微小管の位置決定に重要な役割を果たすIQGAP1の局在制御に関与することも明らかにしてきた。さらに、ノックアウトマウスの解析からネクチン-アフアディン系の細胞間接着機構が毛様体の色素上皮細胞と無色素上皮細胞間の異種細胞間接着に必須の役割を果たし、目の形態形成に関与することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの細胞内シグナル伝達系と細胞間接着研究の経験と成果をもとに、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着による細胞極性の形成機構に焦点を絞り、ネクチン-アフアディン系の細胞間接着の形成から接着シグナリングを介したタンパク質および細胞骨格の不均等な局在の形成機構、すなわち細胞極性確立の分子機構を明らかにすることを目的としている。また従来までのタンパク質の局在機構に加え、最近神経細胞などで報告されているmRNA局在と局所的翻訳機構を上皮細胞においても存在するかどうか検討する。

これまでカドヘリン-カテニン系を中心とした上皮細胞の細胞間接着と細胞極性形成の解析から、この系がアドヘレンスジャンクションだけでなくタイトジャンクションの形成にも必要であり、上皮細胞においてアドヘレンスジャンクションの上(アピカル側)にタイトジャンクションが形成するという、上皮細胞で最も重要な細胞極性の確立に中心的役割を果たすことが示唆されてきた。私はネクチン-アフアディン系の細胞間接着がアドヘレンスジャンクションだけでなくタイトジャンクションの形成にも必須であることを示し、また最近ネクチン-アフアディン系がカドヘリン-カテニン系非依存的にタイトジャンクションの形成を制御することを

明らかにしている。また、ネクチン-アフアディン系が極性形成因子Par-3の局在に必要であることも明らかにしている。これらの結果は、ネクチン-アフアディン系がカドヘリン-カテニン系非依存的にPar-3の局在を含めた細胞極性の確立に関与することを示唆しており、これらの研究を発展させることにより、アドヘレンスジャンクションの上(アピカル側)にタイトジャンクションが形成するという、上皮細胞で最も重要な細胞極性の確立の分子機構を明らかにできると考えている。また、mRNA局在と局所的翻訳機構を上皮細胞においても存在するのかどうかを検討し、従来までのタンパク質の局在機構の研究から新たな展開に発展させる。

3. 研究の方法

(1) 細胞間接着と細胞極性の形成機構

私は、これまでの研究結果から、運動している細胞の細胞膜に局在するネクチンが、他方の細胞の膜表面に散在しているネクチンを認識し、集積したネクチンがアフアディンを介して、カドヘリンをリクルートすることで細胞間接着の形成を開始させると考えている。また、ネクチンの結合が低分子量G蛋白質のCdc42とRacの活性化を介してこの接着形成をさらに促進すると考えている。さらに、ネクチンがCdc42の活性化を介して極性蛋白質複合体Par-6/aPKCを活性化すること、およびPar-3を直接結合することで、細胞極性の形成に関与すると考えている。そこで、ネクチン、アフアディン、低分子量G蛋白質、Par-3/Par-6/aPKC複合体による細胞間接着および細胞極性の形成の分子機構を解析する。

(2) 上皮細胞における mRNA・タンパク質の局在機構と細胞間接着・細胞極性との関連

私はこれまでに、ネクチン-アフアディンの細胞間接着系や上皮細胞における極性形成に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。また最近、ショウジョウバエにおいてmRNA局在において重要な役割を果たすRNA結合タンパク質Staufenが、上皮細胞において不均等に局在することを見出している(未発表)。そこで、Staufenが上皮細胞におけるmRNA局在にどのように関与するかを明らかにする。また、Staufenの不均等な局在に、ネクチン-アフアディン系やカドヘリン-カテニン系などの細胞間接着系やPar3/Par-6/aPKCなどの細胞極性因子複合体がどのように関与するかを明らかにする。さらに、mRNA・タンパク質の局在機構が上皮細胞の細胞極性の形成・維持および機能発現にどのように関与するかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 細胞間接着と細胞極性の形成機構

ネクチンによるアドヘレンスジャンクションおよびタイトジャンクションの形成には、アファディンとアクチン細胞骨格が必須の役割を果たすことを明らかにした (Sato et al., *J. Biol. Chem.*, 2006)。アネキシン II をノックダウンした細胞では、タイトジャンクションはカドヘリンによる細胞間接着形成なしに形成されること、タイトジャンクションの形成にはネクチン-アファディン系は必須であることを明らかにした (Yamada et al., *Oncogene*, 2006)。さらに、アドヘレンスジャンクションおよびタイトジャンクションの形成には、アファディンと Par-3 が協調的に機能することを明らかにした (Ooshio et al., *J. Cell Sci.*, 2007)。ケラチノサイトにおいて、ネクチンによる接着がロリキュリンの発現を制御すること、その制御には Rap1-ERK 経路が関与することを見出した (Wakamatsu et al., *J. Biol. Chem.*, 2007)。

(2) 上皮細胞における mRNA・タンパク質の局在機構と細胞間接着・細胞極性との関連

ショウジョウバエ *Staufen* は、mRNA の局在制御を介して、卵母細胞の前後軸決定や神経細胞の分化などの「細胞の運命決定」に関与している。ショウジョウバエ *Staufen* の哺乳類オルソログである *Stau1* は、神経細胞において mRNA 局在への関与が示唆されていた。最近、*Stau1* 依存的な mRNA 分解機構 (*Stau1*-mediated mRNA decay: SMD) が見出され、SMD の活性が筋分化過程において上昇することが報告された。しかしながら、*Stau1* が筋分化にどのように関与しているのか不明であった。我々は *Stau1* が mRNA 制御を介して筋分化の運命決定を担っているか検討し、*Stau1* をノックダウンした C2C12 筋芽細胞では、筋の分化誘導処理にตอบสนองして誘導される転写因子である myogenin の発現が分化誘導を行わなくても上昇し、分化誘導処理を行わない場合でも筋分化が進行することを見出した。さらに、*Stau1* と共に SMD に関与している *Upf1* をノックダウンした細胞では、分化誘導処理を行わない場合、筋分化は進行しないことから、*Stau1* は SMD 非依存的に筋分化を抑制することが示唆された (図 1、Yamaguchi et al., *Genes Cells*, 2008)。

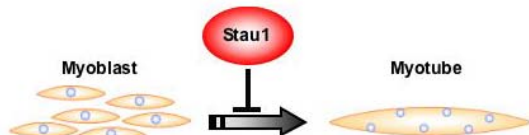


図 1 RNA 結合タンパク質 *Stau1* は筋分化に抑制的に機能する。

哺乳類における RNA 結合タンパク質の一つである heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) は、DNA や RNA およびタンパク質と相互作用し、転写、スプライシング、翻訳などさまざまな機能を持つことが知られている。しかし、hnRNP K のストレス応答への関与は全く不明であった。そこで、hnRNP K のストレス応答への関与を検討した。まず、ストレス条件下での hnRNP K の局在変化を解析した。その結果、核に局在していた hnRNP K が、ストレス条件下で細胞質に形成される Stress Granule に局在することが明らかとなった。Stress Granule はストレス時に、翻訳の停止した mRNA および RNA 結合タンパク質などが細胞質に凝集してできる粒状の構造物であり、ストレス時において mRNA を一時的に貯蔵する機能があると考えられている。さらに、hnRNP K の新たな結合因子として見出した RNA binding motif protein 42 (RBM42) も Stress Granule に局在することが明らかになった。次に、ストレス条件下での細胞の viability が、hnRNP K および RBM42 のノックダウンによって変化するか解析を行った。その結果、hnRNP K のノックダウン細胞では、viability の回復に遅れが生じた。一方、RBM42 のノックダウン細胞では viability の回復に影響が見られなかった。しかし、hnRNP K のノックダウンによる viability への影響は、RBM42 のノックダウンによってさらに増大した。以上のことから、hnRNP K および RBM42 が細胞のストレス応答に関与することが示唆された (Fukuda et al., *Genes Cells*, 2009)。

これらの RNA 結合タンパク質と細胞極性形成との関わりは今後の研究課題である。

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 9 件)

① Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., *Irie, K.

hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP levels during stress conditions.

(*Genes Cells*, 14 巻 2 号: 113-128, 2009) 査読有

② Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T., *Irie, K.

Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells.

(*Genes Cells*, 13 巻 6 号: 583-592, 2008) 査読有

③ Hasegawa, Y., *Irie, K., Gerber, A.P. Distinct roles for Khd1p in the localization and expression of bud-localized mRNAs in yeast.

(*RNA*, 14 巻: 1-15, 2008) 査読有 * : corresponding author

④ 入江賢児 酵母における mRNA 局在と局所的翻訳の制御機構、*実験医学*, 2007; 25: 31-38. レビュー

⑤ Wakamatsu, K., Ogita, H., Okabe, N., Irie, K., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Ishida-Yamamoto, A., Iizuka, H., Miyoshi, J., *Takai, Y. Up-regulation of loricrin expression by cell adhesion molecule nectin-1 through Rap1-ERK signaling in keratinocytes.

(J Biol Chem., 282 卷 25 号:18173-18181, 2007) 査読有

⑥ Ooshio, T., Fujita, N., Yamada, A., Sato, T., Kitagawa, Y., Okamoto, R., Nakata, S., Miki, A., Irie, K., *Takai, Y. Cooperative roles of Par-3 and afadin in the formation of adherens and tight junctions.

(J Cell Sci., 120 卷 14 号:2352-2365, 2007) 査読有

⑦ Inagaki, M., Irie, K., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., *Takai, Y.

Role of cell adhesion molecule nectin-3 in spermatid development.

(Genes Cells, 11 卷 9 号:1125-1132, 2006) 査読有

⑧ Yamada, A., Fujita, N., Sato, T., Okamoto, R., Ooshio, T., Hirota, T., Morimoto, K., Irie, K., *Takai, Y. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells.

(Oncogene, 25 卷 37 号:5085-5102, 2006) 査読有

⑨ Sato, T., Fujita, N., Yamada, A., Ooshio, T., Okamoto, R., Irie, K., *Takai, Y.

Regulation of the assembly and adhesion activity of E-cadherin by nectin and afadin for the formation of adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells.

(J Biol Chem., 281 卷 8 号:5288-5299, 2006) 査読有

[その他]

ホームページ

研究代表者の研究室のホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/public/basic-med/molcellbiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 賢児 (IRIE KENJI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：90232628

(2) 研究分担者

内木 隆寛 (NAIKI TAKAHIRO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教
研究者番号：70420081

(3) 連携研究者

なし