

京都大学	博士 (医学)	氏名	山崎 裕自
論文題目	ZO-1/2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens (アドヘレンスジャンクション構築におけるZO1/2依存的なミオシン-2配向制御)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>上皮細胞間接着装置では、アドヘレンスジャンクション(AJ)に並行して構築されるタイトジャンクション(TJ)において、クローディンなどの膜貫通蛋白質群が細胞を取り巻くベルト状に高次構築され、細胞間バリアとしての機能を発揮する。このような膜貫通蛋白質の高次構造形成には、細胞膜裏打ち蛋白質群が重要な役割を果たしていると考えられる。なかでも、MAGUK (membrane-associated guanylate kinase-like homologues) family の sub-family としてタイトジャンクションに局在する細胞膜裏打ち蛋白質であるZO1/2/3は、AJ形成過程においては、カドヘリンによる接着部位に局在するという特徴的な性質を示す。これまでに、上皮由来Eph4細胞においてジーンターゲット法、RNAi法を併用することで、ZO-1/2発現欠失上皮細胞(ZO1(ko)/ZO2(kd)Eph4細胞)が樹立され、この細胞を用いてZO1/2は、TJ形成に必須な裏打ち蛋白質であることが明瞭に示された。しかしながら、AJ形成時におけるZO1/2の役割は、いまだはっきりとわかっていないため、本研究において、上皮型AJ形成過程におけるZO1/2の役割を検討した。はじめに、蛍光染色法を用いてAJ構成蛋白質の局在を観察し、野生型と徹底的に比較した。ZO-1/2発現欠失上皮細胞においては、上皮型AJに本来組み込まれているミオシン-2が、AJから分離していた。ZO蛋白質を強制発現するとミオシン-2はAJに組み込まれ、上皮型AJ/TJで構成される細胞間接着装置の構築が確立した。ミオシン-2が上皮型AJに組み込まれることは、細胞間接着装置の形成過程に重要な一局面であると思われた。ZO蛋白質は、N末から3つのPDZドメイン、SH3ドメイン、Gukドメイン、アクチン結合ドメインを持った裏打ち蛋白質であるが、ミオシン-2の配向制御に重要なドメインを明らかにするために、ZO蛋白質のN末欠失コンストラクトをZO1(ko)/ZO2(kd)Eph4細胞に導入してミオシン-2を観察した。結果、PDZ-1/2を欠失したコンストラクトを発現させるとミオシン-2がAJに組み込まれることがわかった。次に、AJ形成過程において、ミオシンのシグナル制御を調べるため、small G family蛋白質の関与について調べたところ、RhoAドミナントアクティブの強制発現により、ミオシン-2が上皮型AJに組み込まれることがわかった。Eph4細胞の細胞間接着装置形成過程におけるRhoAの活性化状態について、Raichu-probe RhoAを用いたFRET解析により時空間的に解析したところ、細胞間接着形成時に、特徴的なRhoAの動的活性化状態が見いだされた。この特徴的なRhoAの活性化パターンは、ZO-1/2発現欠失上皮細胞において観察されなかった。以上のことからZO1/2は、細胞膜裏打ち骨格的蛋白質としての役割とシグナル伝達蛋白質としての役割の両面から、上皮細胞間接着装置の高次構築形成を時空間的に制御することが示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

上皮細胞シート構築が多細胞生物の形態形成に必須な働きをしていることはよく知られており、シート形成過程を理解することは、非常に重要な課題である。上皮細胞シートにおけるAdherens Junction形成過程の詳細な解析の結果、カドヘリン接着に始まるPuncta Adherensの形成から成熟したZonula Adherensまで段階的なステップを経ることを見いだした。接着分子の高次構造形成には、裏打ち蛋白質群が重要な働きを担っていると考えられ、月田研究室ではZO分子に着目して解析を行っている。梅田らによって確立されたZO1(ko)/2(kd)Eph4細胞を用いて、ミオシン-2の配向パターンを指標にPre-zonula Adherensという新しい形成ステップを定義した。ZO分子の欠失により、Adherens JunctionがPre-zonula adherensにとどまってしまうことを明らかにした。さらに、Pre-zonula AdherensからZonula Adherensへのステップに関わるシグナル解析を行い、その最終ステップにおいて、ZO分子依存的なRhoA活性が必須であることを示した。以上の研究は、上皮細胞シートにおけるAdherens Junction形成に関わるZO分子のシグナル面の機能解明に貢献し、癌発生源の90%以上を占める上皮細胞の正常構造、機能の理解に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものとみとめる。なお、本学位授与申請者は、平成20年10月27日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降