

氏名	いち 居 哲 夫
学位(専攻分野)	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第127号
学位授与の日付	平成19年7月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学研究所統合生命科学専攻
学位論文題目	カドヘリン結合蛋白p120カテニンによる微小管動態と細胞運動の制御

論文調査委員 (主査) 教授 上村 匡 教授 西田 栄介 教授 米原 伸

論文内容の要旨

p120カテニン (p120) は、カドヘリン結合タンパクの一つであるが、その機能については未知の部分が多い。申請者は、p120の機能について哺乳類培養細胞株を用いた実験により解析を行い、新しい生物活性を見いだすことに成功している。

まず、MDCK細胞を用い、RNAi法によってp120の発現抑制 (ノックダウン) を行った。その結果、p120の減少に応じて、カドヘリン量も減少することが分かった。この効果は調べた限り、カドヘリンに特異的で、ZO-1やI-afadinなど、他の細胞間接着部位のタンパク質には影響がなかった。この結果により、p120には、カドヘリン量を高く保つ役割があることが明らかになった。その一方で、この実験系の限界も示した。すなわち、p120を減少させた場合に観察される表現型が、カドヘリンが減少したことによる二次的な影響である可能性が常に生じる。つまり、仮に、カドヘリン量の調節以外の役割がp120にあったとしても、それを明示できない可能性があった。

そこで、p120に、カドヘリン量に関する以外の活性がある可能性を検討するため、内在のカドヘリンが検出されないNeuro2a (N2a) 細胞を用いて引き続き実験を行った。その結果、p120がノックダウンされたN2a細胞では、wound healing assayにおける傷部分への細胞の這い出しが抑制される一方、低密度培養では、個々の細胞の運動の移動距離が増加した。両者の実験で共通したのは、細胞の形態が安定しないという表現型であった。これらの結果から、p120には、カドヘリン量を高く保つ活性とは独立に、細胞運動に関係する活性があることが明らかになった。次に、この活性が、どのような仕組みで生じるのかを検討した。まず、p120が微小管結合活性を持つことを見つけ、次に、p120がノックダウンされた細胞では、ノコダゾール耐性微小管が減少することが明らかになった。また、生細胞において微小管端の挙動を追跡すると、p120ノックダウン細胞においては、個々の微小管の、脱重合に転じる頻度 (カタストロフ頻度) が上昇していた。このことにより、p120が、微小管動態の調節に関わっていることが初めて明らかになった。さらに、このような、微小管の安定性の変化が、細胞運動への表現型に関与するかどうかを検討した。N2a細胞をノコダゾール処理すると、wound healing assayにおいては、細胞の這い出しが抑制され、低密度培養下では細胞の移動距離が増加した。これらの現象は、p120が微小管動態を制御し、その結果、細胞運動に影響するという解釈と矛盾しない。これらのことから、p120は、大きく分けて、カドヘリンの量に関係した活性と、カドヘリンには関係しない活性の2つを持ち、後者の活性は、細胞運動や微小管安定性に関係することを明らかにした。

申請者は、さらに、これら2つの活性が、どのように協調して機能しうるかを明らかにしようと試みた。N2a細胞に野生型のカドヘリン、および、p120に結合できない変異カドヘリンを強制発現したところ、変異カドヘリンによって細胞が接着したコロニーでは、細胞が不均一に凝集した部分が形成された。このような異常がどのように生じたか検討するために、細胞の運動に着目し、コロニーの変化を経時的に追った。野生型カドヘリン発現細胞のコロニー中では、細胞はコロニーの周辺部に向かって移動し、上皮様コロニーは広がった。この動きによって、分裂後の細胞が上皮層に取り込まれる余地が生じ、細胞の密度や、その層の厚さが一様に保たれる様子が観察された。一方、p120を結合できない変異型カドヘリンを発

現する細胞では、細胞の移動は方向性を失う傾向にあり、これが細胞の異常な集積を起こす原因であると解釈できた。これらの結果から、p120とカドヘリンの結合が、上皮様コロニー内で、細胞の方向性を持った移動を促進する効果を持つことが示唆された。

以上の研究により、カドヘリンとp120の協調により、接着増大と方向性を持った細胞運動の促進の2つが生じ、この両者のバランスにより細胞層の均一な伸展が生み出される、という新しいモデルを構築することができた。

論文審査の結果の要旨

細胞接着分子カドヘリンは、カテニンと総称される細胞内タンパク質と結合しているが、その一つ、p120カテニン(p120)の機能については未解明の部分が多い。申請者は、p120の機能を明らかにするため哺乳類培養細胞株を用いた研究を行った。

まず、MDCK細胞を用いてp120のRNAiによる発現抑制(ノックダウン)実験を行っている。その結果、カドヘリン量の減少が観察された。この結果は他の研究者によっても観察されており、p120がカドヘリンの安定化のために重要であることが確認された。しかし、このp120の活性のためには、本分子のアルマジロリピート部分が必要であるとされ、一方、N末端部分には別の活性があることが別の研究により示唆されていた。そこで申請者は、後者の活性に関与するp120の機能を解明するため、Neuro2a(N2a)細胞を用いて引き続き実験を行った。この細胞はカドヘリンを発現しないので、カドヘリン安定化とは独立の機能を明快地検出できることが期待できた。

この材料の変更は優れた選択であった。すなわち、p120がノックダウンされたN2a細胞では、カドヘリンとは無関係に、種々の異常が発見された。第一に、細胞移動に関する異常である。p120の欠失により、細胞層を傷害した時に起きる細胞移動が抑制され、また、個々の細胞の運動能にも変化があった。第二に、微小管の安定性に変化が見いだされた。まず、p120を過剰発現すると、微小管と共局在することが分かった。そして、p120をノックダウンした細胞では、微小管のノコダゾール耐性が減弱していた。さらに、生細胞において微小管端の挙動を追跡すると、p120ノックダウン細胞においては、個々の微小管の脱重合に転じる頻度が上昇していた。以上の結果から、p120が、微小管動態の調節に関わるということが初めて明らかになった。

次に、上記の2つの現象に関連があるかどうかを確認するため、N2a細胞をノコダゾール処理した時の細胞運動の様子を観察した。その結果、この処理により、細胞は、p120ノックダウンの時と同様な変化を示すことが明らかになった。以上の観察から、申請者は、p120が微小管動態を制御しており、その結果、細胞運動に影響を与えるのではないかと推論している。

申請者は、さらに、これらのp120の活性が、カドヘリン発現細胞においてどのように働いているかを検討するための実験を行っている。N2a細胞に野生型のカドヘリン、および、p120に結合できない変異カドヘリンを強制発現させ、両者を比較すると、前者では細胞が均質に配列したコロニーが形成されるのに対し、後者では、細胞が不均一に凝集していた。さらにタイムラプスムービーによる観察から、野生型カドヘリン発現細胞のコロニーでは、細胞がコロニーの周辺部に向かって整然と移動しているのに対し、変異型カドヘリンを発現する細胞の場合には、移動の方向性を失う傾向にあり、これが細胞の異常な集積を起こす原因であると解釈できた。これらの結果から、p120とカドヘリンの結合が、コロニー内で、細胞の方向性を持った移動を促進する効果を持つことが示唆された。

以上の結果から、p120がカドヘリンと協調して細胞運動の制御を行うこと、また、この活性は微小管の重合制御を介しているらしいことが明らかになった。これらの発見は、p120の役割について新しい視点を提供するものであり、大変意義深い。

よって、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。

平成19年6月14日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。