

論 文 要 旨

**Studies on intracellular trafficking of E-cadherin:
dual roles of a dileucine motif in E-cadherin transport**

E-カドヘリンの細胞内輸送機構の研究
—E-カドヘリン輸送におけるダイロイシンモチーフの2つの役割—

宮下 矢替衣

【序論および目的】

カドヘリンはカルシウム依存性の細胞間接着分子である。カドヘリンは細胞の形態形成や極性維持に必要であり、転移性癌細胞ではE-カドヘリンの消失が観察される。E-カドヘリンは細胞外領域で2量体を形成し、隣接した細胞のE-カドヘリンとホモフィリックな結合を形成することによって接着している。また細胞内領域では β -カテニンと結合し、 α -カテニンを介してアクチンフィラメントと結合し、隣接する細胞の細胞骨格を連結する役割をしている。

E-カドヘリンは常に膜に発現した状態を保っているわけではなく、一定時間間隔で細胞内に取り込まれ、一部は膜に戻り、残りは分解に向かい、また新しく合成されたE-カドヘリンが膜へと輸送されるという動的な状態を保っている。細胞はE-カドヘリンの細胞膜への輸送、細胞内への取り込みやリサイクリングを調節することによって接着の強さを調節しており、カドヘリンの動的な細胞内輸送を明らかにすることは重要なことである。

まず第1部ではE-カドヘリンのC末端側に結合している β -カテニンに注目した。 β -カテニンが結合しないE-カドヘリンは小胞体で輸送が停止し、細胞膜へ発現しないことが知られている。一方で私たちのグループは、細胞内領域をもたないE-カドヘリンは膜に発現することを見出していた。よってE-カドヘリンの膜輸送システムにおける細胞内領域の役割について研究を行った。

次に第2部では、E-カドヘリンの細胞膜近傍に結合しているp120に注目した。p120はカテニン的一种で、p120がカドヘリンから離れるとカドヘリンの膜からの消失が起こることが知られているが、詳細なメカニズムについてはまだ分かっていなかった。そこでp120がE-カドヘリンの膜での発現量を制御するメカニズムについて研究を行った。

第1部 E-カドヘリンの細胞表面への輸送における β -カテニンの結合の意義とダイロイシンモチーフの役割

【材料および方法】

さまざまな細胞内領域を欠失または置換した変異体を作製、MDCK細胞に安定的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡や、生化学手法を用いて検出した。

【結 果】

- (1) β -カテニンが結合しないE-カドヘリンは膜へ輸送されず直接ライソゾームへ輸送され、分解されていた。
- (2) 細胞内領域をもたないE-カドヘリンは膜に発現し、またそれは側底部であった。
- (3) 細胞外領域のみのE-カドヘリンは頂端部、側底部両方に輸送されたため、側底部への輸送には膜に結合していることが重要である。
- (4) 細胞内領域をもたず、細胞外領域の1から3を欠失または2量体を作れない変異体は頂端部

へも輸送された。

- (5) 細胞膜近接部位にあるダイロイシンをダイアラニンに置換すると β -カテニンが結合しない E-カドヘリンでも膜へ輸送され、それは側底部であった。

【結論及び考察】

β -カテニンが結合しない E-カドヘリンは小胞体で品質管理を受け、輸送が停止するのではなく、ゴルジ体から直接ライソゾームへ輸送されることによって品質管理を受けていることが明らかになった。またそのライソゾームへの輸送には膜近接部位にあるダイロイシンモチーフが重要である。このモチーフは GGA や AP-1, -3, -4 のような TGN-エンドソーム-ライソゾーム間の輸送を調節しているクラスリン関連アダプター分子による認識サイトとして働いていると考えられる。また E-カドヘリンのダイロイシンモチーフは側底部への輸送シグナルであるという報告があったが、今回細胞内領域がない E-カドヘリンも側底部へ輸送されたため、E-カドヘリンの側底部への輸送に細胞内領域は必要ないことが明らかになった。

(Journal of Cell Science Vol.120, No.24 2007 年 掲載)

第2部 p120 による E-カドヘリンエンドサイトーシスの制御とダイロイシンモチーフの役割

【材料および方法】

p120 非結合および LA 置換変異体を作製し、MDCK 細胞に安定的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡や、生化学手法を用いて検出した。

【結果】

- (1) p120 非結合 E-カドヘリンは早期エンドソームに蓄積が見られた。
- (2) エンドサイトーシス速度を調べた結果、2 時間で細胞表面にあった野生型 E-カドヘリンが約 7%、p120 が非結合 E-カドヘリンは約 35%細胞内に取り込まれた。また野生型の E-カドヘリンと p120 非結合 E-カドヘリンのダイロイシンをダイアラニンに置換すると野生型は 1%、p120 非結合型は 3%にまで取り込みが抑制された。
- (3) p120 非結合 E-カドヘリンの取り込みはクラスリン依存性であった。
- (4) p120 RNA 干渉によって p120 をノックダウンすると、野生型の E-カドヘリン量は減少したのに対して LA 置換型ではほとんど減少しなかった。また p120 ノックダウンによって E-カドヘリンは細胞内小胞に多く見られるのに対し、LA 置換型では膜に留まったままであった。またそのときの取り込み効率は有意差はなかったものの平均すると野生型の方が多く取り込まれていた。
- (5) p120 非結合 E-カドヘリンはリサイクリングの効率も落ちていた。

【結論及び考察】

p120 非結合 E-カドヘリンはエンドサイトーシスが野生型よりも約 5 倍亢進しており、その取り込みはクラスリン依存的であった。また多くは早期エンドソームに局在し、リサイクリングも抑制されていることが分かった。p120 が結合しないことによる E-カドヘリンのエンドサイトーシスの亢進には細胞内領域にあるダイロイシンモチーフが重要な役割を果たしていることが分かった。ダイロイシンモチーフはエンドサイトーシスを行うクラスリン関連アダプタータンパク質である AP-2 などによる認識サイトであり、p120 結合部位から 13 残基しか離れていないため、p120 が E-カドヘリンに結合することによってこの部位を隠すことによってエンドサイトーシスを調節していると考えられる。

(Journal of Biological Chemistry Vol.282, No.15 2007 年 掲載)