

上皮細胞の細胞間接着におけるリゾホスファチジン酸の機能と作用機構

榎原 正太郎^{1,2}, 坂根 亜由子^{1,3}, 佐々木 卓也¹, 水谷 清人^{2,4}, 高井 義美²

1. はじめに

さまざまな種類の細胞は互いに接着して組織や器官を形成する。中でも細胞極性を発達させた上皮細胞は、隣り合う細胞どうしで密着帯 (tight junction: TJ) と接着帯 (adherens junction: AJ) からなる頂端結合複合体 (apical junctional complex: AJC) と呼ばれている細胞間接着装置を細胞の頂端側に形成して接着し、生体の内外を隔てる上皮シートを形成している¹⁾ (図1)。AJCは、上皮シートの機械的強度の維持やリモデリングおよびバリア機能を担うことにより、①臓器と組織の区画化、②臓器と組織の形態形成、③シグナル伝達経路の調節による細胞の生存、増殖、分化、移動、および極性の形成などを制御する。一方、AJCの破綻は、これらの機能に障害をもたらし、がんや炎症性腸疾患、神経変性疾患など種々の疾患の発症と進行を促進する²⁾。

AJCのAJは、上皮シートの機械的強度の維持やリモ

デリングを担うとともに、TJの形成と維持を制御している³⁾。TJは、可溶性分子の上皮シートでの拡散を防ぐ上皮バリアとして機能するとともに、細胞の頭頂膜ドメインと側底膜ドメインの境界として機能している⁴⁾。AJの主要な細胞接着分子 (CAM) はカドヘリンとネクチンであり、TJの主要なCAMはクローディンとjunctional adhesion molecule (JAM) である³⁻⁵⁾ (図1)。AJC、特にAJは2種類のF-アクチン骨格、すなわち細胞膜直下のメッシュ状のF-アクチン骨格と、細胞膜からやや離れた位置にある円周状のF-アクチン骨格によって裏打ちされている。どちらのF-アクチン骨格もミオシンIIと結合してアクトミオシン束 (AM束) を形成し、上皮シートの機械的強度の維持やリモデリングを制御している。カドヘリンは $\alpha E/\beta$ -カテニン複合体を介して、ネクチンはアフアディンを介してメッシュ状のF-アクチン骨格に連結している^{3,4,6)} (図1)。

筆者らは最近、AJCの形成におけるネクチン-アフアディン複合体の機能と作用機構を解析する過程で^{7,8)}、胎仔ウシ血清 (FBS) に含まれるリゾホスファチジン酸 (LPA) がLPA受容体 (LPA) 1/5の下流でジアシルグリセロール (DAG)-新型プロテインキナーゼC (nPKC) 経路とRho-ROCK経路の活性化を介して、ネクチン-アフアディン複合体と相補的に機能し、AJCの形成を促進することを見いだした⁹⁾。

2. AJCの形成におけるネクチン-アフアディン複合体の機能と作用機構

ネクチンは、細胞外領域に三つの免疫グロブリン様ドメインを持つ免疫グロブリンスーパーファミリーに属するCAMである⁵⁾。ネクチンファミリーにはネクチン-1, -2, -3, -4があり、ホモフィリックまたはヘテロフィリック (ネクチン-1と-3, -2と-3, -1と-4) に結合する。アフアディンはPDZドメインを介してネクチンの細胞内領域のC末端に結合する。上皮細胞におけるAJCの形成においては、まずネクチンがトランス結合して細胞間接着の形成を開始する (図2A)。このネクチンのトランス結合は、インテグリン $\alpha v\beta 3$ と協働してシグナル伝達経路を活性化し、F-アクチン細胞骨格を再編成する^{5,10)} (図2B)。このF-アクチン細胞骨格の再編成と、アフアディンと αE -カテニンとの結合が、ネクチンを介した細胞間接着部位に

¹徳島大学大学院医学研究科生化学分野 (〒770-8503 徳島市蔵本町3丁目18-15)

²神戸大学大学院医学研究科病態シグナル学部門 (〒650-0047 神戸市中央区港島南町1丁目5-6)

³徳島大学ポストLEDフォトリニクス研究所医光融合研究部門 (〒770-8506 徳島県徳島市南常三島町2丁目1)

⁴徳島大学先端酵素学研究所病態シグナル学分野 (〒770-8503 徳島市蔵本町3丁目18-15)

Function and mechanism of action of lysophosphatidic acid in promoting epithelial apical junctional complex organization

Shotaro Sakakibara^{1,2}, Ayuko Sakane^{1,3}, Takuya Sasaki¹, Kiyohito Mizutani^{2,4} and Yoshimi Takai² (¹Department of Biochemistry, Tokushima University Graduate School of Medicine, 3-18-15 Kuramotocho, Tokushima 770-8503, Japan, ²Division of Pathogenetic Signaling, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, 1-5-6 Minatojima-minami-machi, Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan, ³Department of Interdisciplinary Researches for Medicine and Photonics, Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University, 2-1 Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8506, Japan, ⁴Division of Pathogenetic Signaling, Institute of Advanced Medical Sciences, Tokushima, Japan, 3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950665

© 2023 公益社団法人日本生化学会

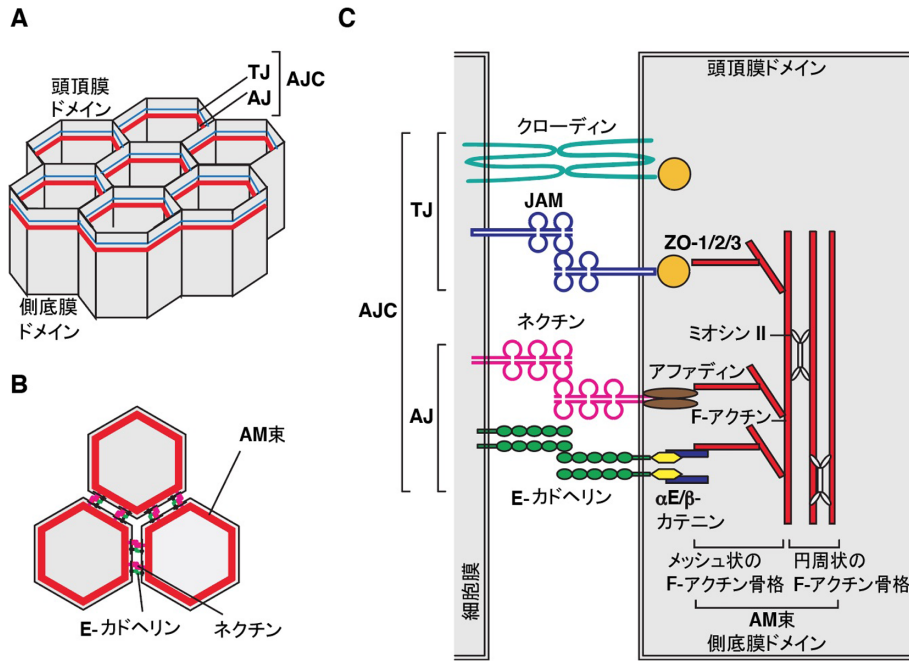


図1 AJCとその構成因子
(A)上皮細胞シート. (B)AJCとAM束. (C)AJCの構成因子.

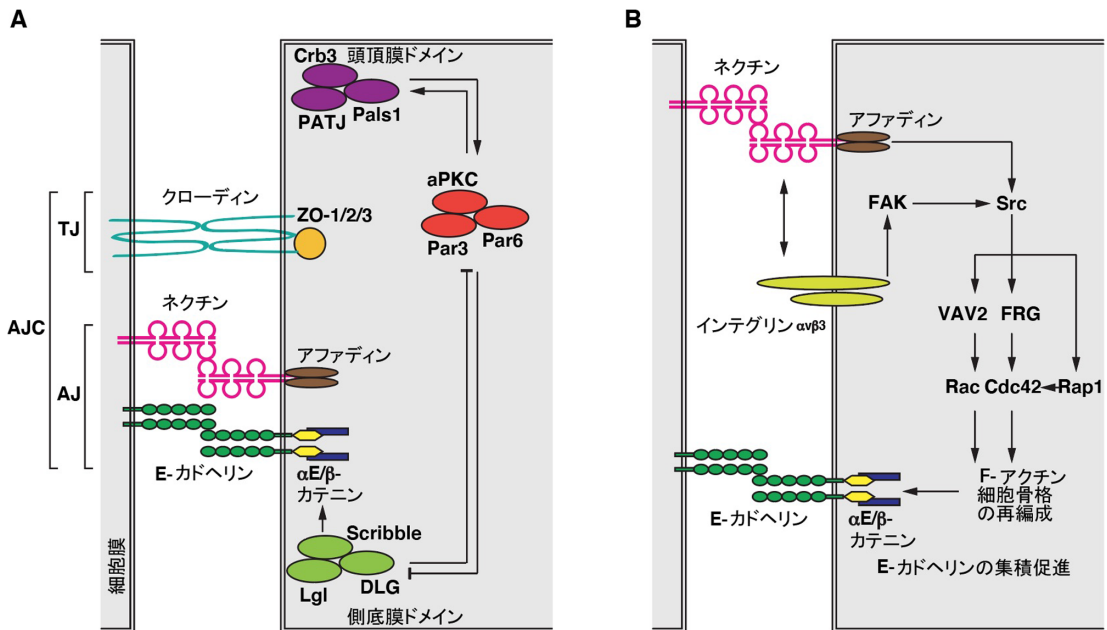


図2 AJCの形成におけるネクチン-アフアディン複合体の機能と作用機構
(A)CAMと細胞極性因子との相互作用, JAMとAM束は省略. (B)CAMとインテグリンとの相互作用によるシグナル伝達経路の活性化.

E-カドヘリンをリクルートし、そのトランス結合を促進してAJを形成する。さらに、AJの形成の間あるいはその後に、トランス結合したネクチンが、アフアディンとZO-1との結合を介して、まずJAMを、次にクローデインを、AJの頭頂側にリクルートしてTJを形成し、AJCを完成させる⁵⁾。一方、頂端基底極性の形成には、これらのCAM

とともに多くの細胞極性因子が関与している¹¹⁾(図2A)。まず、Scribble-DLG-Lgl複合体が、次にPar3-Par6-aPKC複合体が、最後にCrb3-Pals1-PATJ複合体が機能して頂端基底極性を形成する。しかし、AJがその頭頂側にTJを配置する機構はいまだ不明である。

なお、上皮シートでは同種の上皮細胞どうしが接着す

るが、たとえば、精巣では精子細胞とセルトリ細胞のように、異種の細胞どうしが接着している。ネクチンは、ホモフィリックにもヘテロフィリックにも結合し、この異種細胞間接着にも関与している¹²⁾。一方、カドヘリンには、E-カドヘリン以外にN-カドヘリンやVE-カドヘリン、P-カドヘリンなどが知られており、これらのカドヘリンはホモフィリックに結合するが、ヘテロフィリックには結合しない。したがって、カドヘリンは主として同種細胞間接着に関与している¹²⁾。

3. AJCの形成におけるLPAの機能と作用機構

これまでAJCの形成の機構の解析では、Ca²⁺スイッチアッセイが主として用いられてきた⁷⁾。この解析法では、培養上皮細胞を数μM程度の低Ca²⁺濃度で前培養し、その後、生理的な数mM程度のCa²⁺濃度で再培養する。しかし、FBSの存在下で再培養することが多いため、AJCの形成がCa²⁺単独、FBS単独、あるいはCa²⁺とFBSの両方に依存しているか不明であった。そこで筆者らは、AJCの形成におけるFBSの機能と作用機構をマウス乳腺細胞由来のEpH4細胞を用いて解析したところ、FBSがCa²⁺スイッチアッセイにおけるAJCの形成を促進する活性を示すことを明らかにした⁹⁾。E-カドヘリン、αE-カテニン、あるいはアフアディンを欠損させたEpH4細胞は、生理的な数mM程度のCa²⁺濃度の存在下で、FBSの非存在下ではAJCを形成せず、FBSの存在下ではAJCを形成した⁹⁾。これらの結果から、FBSに含まれる活性因子がAJC構成因子と相補的に作用してAJCの形成を促進すると考えられた。

そこで筆者らは、アフアディン欠損EpH4細胞を用いて、AJCの形成を促進するFBSの機能と作用機構の解析を進めた。まず、AJCの形成を促進するFBSに含まれる活性因子を同定することを試みた⁹⁾。血清を脂質抽出法であるBligh and Dyer法に供したところ¹³⁾、活性は水相ではなく有機相に検出されたことから、この活性因子は脂溶性であることが判明した。この有機相を固相C18カートリッジによって、中性脂質分画、脂肪酸分画、リン脂質/リゾリン脂質/糖脂質分画の3画分に分画した。その結果、活性はリン脂質/リゾリン脂質/糖脂質分画に検出された。さらに、ホスファチジン酸 (PA)、LPA、スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) などのリン酸モノエステルを加水分解してリン酸基を除去する、仔ウシ腸アルカリホスファターゼでFBSを処理すると、活性が失われたことから、活性因子はリン酸基を有する化合物であることが明らかになった。市販品のPA、LPAあるいはS1Pの中では、LPAのみにAJCの形成を促進する活性が認められた。LPAは、FBSの非存在下で培養したアフアディン欠損EpH4細胞だけでなく、Ca²⁺スイッチアッセイにおいて、FBSの非存在下で再

培養した野生型EpH4細胞でのAJCの形成を促進した。またLPAは、FBSの非存在下で培養したE-カドヘリンあるいはαE-カテニンを欠損したEpH4細胞においても、AJCの形成を促進した。以上の結果から、LPAは、血清に含まれるAJCの形成を促進する活性因子であることが明らかになった。さらに、LPAのこの作用は、LPA1/5とその下流のDAG-nPKC経路とRho-ROCK経路の活性化を介してなされていることも明らかになった⁹⁾ (図3)。

4. LPAの活性促進因子の同定

しかし、AJCの形成におけるFBSの有効濃度は2% (v/v) であるのに対して、市販品のLPAの有効濃度は2.5 μMであった。FBS中のLPA濃度は約5~10 μMであることから、血清にはLPAの活性を10倍以上増強する補因子が含まれていることが推定された。そこで筆者らは、FBSからこのLPAの補因子の精製を試みた。この補因子は、2% (v/v) のFBS中のLPA濃度である、200 nM LPAの存在下でのAJCの形成を促進すると考えられるため、この活性を測定することで補因子を検出した。この条件下では、200 nM LPA単独ではこの活性は示さなかった。まず、LPAの補因子がタンパク質であるか否かを検討するために、FBSをプロテイナーゼKや熱で処理すると、補因子の活性は消失したことから、LPAの補因子がタンパク質であることが示唆された。複数のカラムクロマトグラフィーを行い、FBSからLPAの補因子を、銀染色で数本のバンドが認められるまでに精製した。現在、質量分析法を用いて、このLPAの補因子の同定を試みている (未発表データ)。

5. AJCの形成におけるLPAとネクチン-1と-2との相互作用

ネクチンファミリーのメンバーではその構造と機能に共通点がある一方、異なる生化学的性質を有している。ネクチン-1と-3はPar3、インテグリン、およびウイリンに結合するが、ネクチン-2と-4はこれらの分子と結合しない⁵⁾。また、ネクチン-1と-3はCdc42の活性化を介したフィロポディアの形成を、ネクチン-2よりも強く誘導する⁵⁾。これらの特性から、AJCの形成におけるネクチン-1と-3の作用機構がネクチン-2と-4のそれとは異なることが考えられる。EpH4細胞はネクチン-1と-2を発現するため、本実験系を用いてAJCの形成におけるネクチン-1と-2の作用機構を解析した。その結果、ネクチン-2はアフアディンと協働してLPAと相補的にAJCの形成を促進したが、ネクチン-1はフィロポディアの形成を介してAJCを破壊した。アフアディンはネクチン-1と結合してこの作用を阻害してAJCの形成を促進した (未発表データ)。現在、

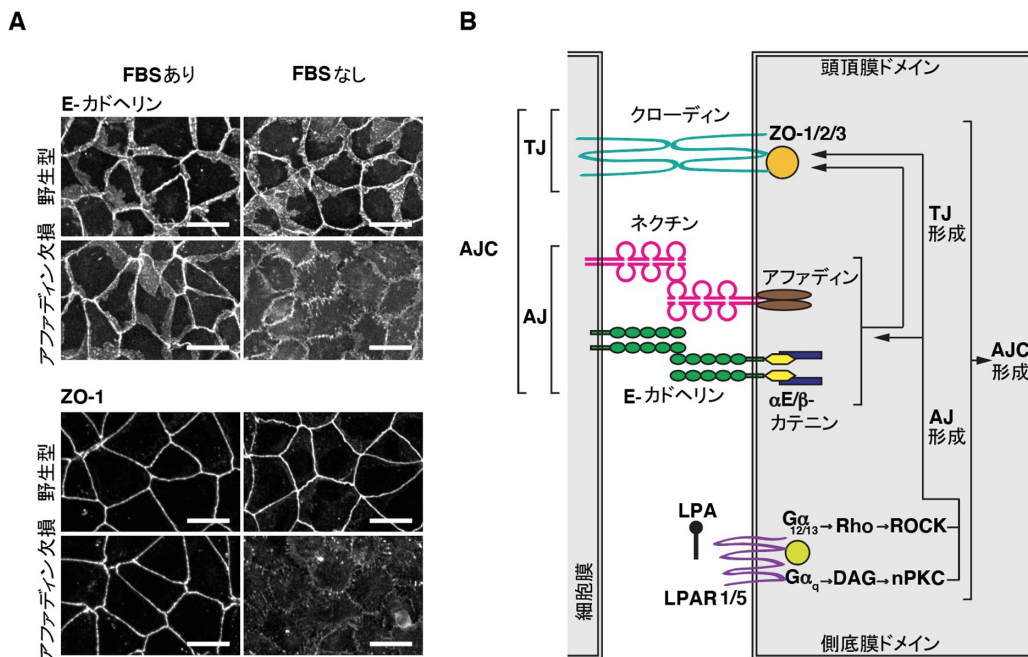


図3 AJC形成におけるLPAの機能と作用機構

(A) FBSとアフアディンが有するAJCの形成を促進する活性。野生型あるいはアフアディン欠損EpH4細胞をFBS含有培地あるいは非含有培地で8時間培養し、細胞を固定した後、E-カドヘリンあるいはZO-1に対する抗体で蛍光免疫染色し、観察した。スケールバーは25μmを示す。文献9より改変。(B) モデル図。JAMとAM束は省略。

AJCの形成におけるLPAとネクチン-1と-2との相互作用機構の解析を進めている。

6. おわりに

LPARはLPAR1-6が知られており、LPAはこれらの受容体を介して創傷治癒、増殖、生存、移動、分化などさまざまな細胞機能に関与している¹⁴⁾。血清中のLPA濃度は、炎症やさまざまながんの発症・進行過程において頻繁に上昇する¹⁵⁾。これまでにLPAはAJCを破壊すること、そして、がん細胞の浸潤と転移を促進することが示唆されていた。しかし、LPAがAJCの形成を促進する活性を有するという、今回の筆者らの知見から、LPAはがん細胞の浸潤と転移を抑制する可能性がある。また、血清中のLPA補因子は、LPAがAJCの形成を促進するか、あるいはAJCを破壊するか決定に関与している可能性や、LPAによりがん細胞の浸潤と転移を促進されるか、あるいは抑制されるかの決定に関与する可能性がある。一方、筆者らは、AJCの形成過程におけるネクチン-1と-2、アフアディンおよびLPAの作用機構と細胞極性因子との相互作用を解析することによって、長年未解決の頂端基底極性の形成機構を解明することができると考えている。AJCと頂端基底極性の形成・維持・破綻機構の全貌を解明することは、AJCの機能と作用機構の理解のみならず、がんを含めたさまざまな疾患の発症と進展の機構の理解や、これらの疾患の新たな診

断・治療・予防法の開発に貢献すると期待される。

謝辞

本稿で紹介した研究は、徳島大学大学院医学研究科の佐々木卓也教授と神戸大学大学院医学研究科の高井義美特命教授の研究室の多くの方々のご支援によって行われた。また、共同研究者である神戸大学大学院医学研究科の篠原正和准教授と北里大学大学院医療系研究科の丸尾知彦講師には多大なるご尽力をいただいた。これらの皆様に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Farquhar, M.G. & Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.*, **17**, 375-412.
- 2) Harris, T.J. & Tepass, U. (2010) Adherens junctions: From molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 502-514.
- 3) Takeichi, M. (2014) Dynamic contacts: Rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **15**, 397-410.
- 4) Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 285-293.
- 5) Takai, Y., Ikeda, W., Ogita, H., & Rikitake, Y. (2008) The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **24**, 309-342.
- 6) Campbell, H.K., Maier, J.L., & Demali, K.A. (2017) Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp. Cell Res.*, **358**, 39-44.
- 7) Sakakibara, S., Maruo, T., Miyata, M., Mizutani, K., & Takai,

- Y. (2018) Requirement of the F-actin-binding activity of I-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions. *Genes Cells*, **3**, 185–199.
- 8) Sakakibara, S., Mizutani, K., Sugiura, A., Sakane, A., Sasaki, T., Yonemura, S., & Takai, Y. (2020) Afadin regulates actomyosin organization through α E-catenin at adherens junctions. *J. Cell Biol.*, **219**, e201907079.
- 9) Sakakibara, S., Sakane, A., Sasaki, T., Shinohara, M., Maruo, T., Miyata, M., Mizutani, K., & Takai, Y. (2022) Identification of lysophosphatidic acid in serum as a factor that promotes epithelial apical junctional complex organization. *J. Biol. Chem.*, **298**, 102426.
- 10) Mizutani, K. & Takai, Y. (2016) Nectin spot: A novel type of nectin-mediated cell adhesion apparatus. *Biochem. J.*, **473**, 2691–2715.
- 11) Buckley, C.E. & Johnston, D.S. (2022) Apical-basal polarity and the control of epithelial form and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **23**, 559–577.
- 12) Rikitake, Y., Mandai, K., & Takai, Y. (2012) The role of nectins in different types of cell-cell adhesion. *J. Cell Sci.*, **125**, 3713–3722.
- 13) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917.
- 14) Yanagida, K. & Ishii, S. (2011) Non-Edg family LPA receptors: The cutting edge of LPA research. *J. Biochem.*, **150**, 223–232.
- 15) Valdés-Rives, S.A. & González-Arenas, A. (2017) Autotaxin-lysophosphatidic acid: From inflammation to cancer development. *Mediators Inflamm.*, **2017**, 9173090.