

特集：観て考える，考えて観る—細胞内オルガネラの空間構造変化

細胞接着と細胞骨格

平子善章，尾張部克志

細胞・細胞間接着は細胞同士を結びつけて組織を構築し，細胞・基質間接着は異なる組織同士を結びつけ，より高次の器官へと導く．このように細胞接着は多細胞体制を形成・維持するうえで欠かせない機能である．接着装置は，後生動物が発達させた特殊な細胞構造で，細胞を他の細胞もしくは基質に結合するために，細胞膜を貫通する接着分子とそれを支える細胞骨格系からなっている．このしくみによって多細胞生物は力学的ストレスに対抗でき，細胞の選別や運動も可能にしている．本稿では，アドヘレンスジャンクション，フォーカルアドヒージョン，デスモソーム，ヘミデスモソームの4種の接着装置について，その概略と最近の話題について紹介し，最後に生化学と超微形態学とのドッキングを目指す筆者たちの試みについても紹介したい．

多細胞体制をもつ後生動物がいかにして，単細胞の原生生物の祖先から進化したのか，これは動物の進化を考える上で最も大きな課題の一つと言える．そして，その進化の過程において，細胞と細胞，また細胞と基質を結びつける細胞接着機能の獲得が必須のものであったことは間違いない．これまでに，カドヘリン様遺伝子が群体性の原生生物である襟鞭毛虫類に見つかり¹⁾，タリンや β カテニンのホモログが細胞性粘菌に存在していることが報告されている²⁾．これら接着関連分子が，原生生物においてどのような機能を担っているのか，はっきりしていない部分もあるが，接着に関わる分子は後生動物への進化に先んじて，原生生物においてすでに出現していたものと考えられる．原生生物の形成する群体や細胞性粘菌の移動体などに比べ，後生動物では細胞同士がより密接に協調し合って生命活動を行っている．そのため多細胞体を構成する各種細胞は秩序立った配列をして，全体として一定の形態を維持する必要がある．まずはこのような要求から後生動物での接着機能は進化を始め，その後の多細胞体制の機能的・構造的な

複雑化にともない，現在ある様々な接着分子と接着装置を発達させていったものと考えられる．

細胞を細胞に，または基質につなぐには，まず直接「接着剤」として働く分子が必要となる．このような役割を果たしているのが細胞膜から細胞外へと突き出した接着受容体である．しかし，多細胞体制をとることで大型化が可能になった動物では，大型化に比例してその体構造にかかる外部からの力学的ストレスも増大する．植物のもつ細胞壁のような強固な細胞外構造をもたない動物にとって，接着受容体を支えるのがリン脂質からなる細胞膜だけでは，この力学的ストレスに抗して体構造を維持するのは難しい．そこで，接着受容体と細胞骨格が，細胞骨格制御因子をアダプタータンパク質として結合し，接着装置の祖形がかたち作られたのではないだろうか．接着装置は個々の細胞のもつ細胞骨格ネットワークを別の細胞の細胞骨格ネットワークや細胞外基質に結びつけている．その結果，連結された細胞骨格によって多細胞体の体構造は強化され，また細胞骨格の調節・制御を通して，多細胞構造を変形することも可能となった．

細胞結合を担うタンパク質複合体には，じつに様々なものがあり，例えば神経組織のシナプスや筋組織にみられるジストロフィン-糖タンパク質複合体なども含まれる．タイトジャンクションとギャップジャンクションも特殊な機能をもつ細胞間結合である^{3,4)}．タイトジャンクションは，

名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻 (〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町)

Cell adhesion and cytoskeleton

Yoshiaki Hirako and Katsushi Owaribe (Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan)

上皮細胞間をシールすることで、上皮シートの頂端側空間と側底面側空間の間の物質の透過を制限している。このタイトジャンクションのバリア機能は、上皮シートによる体内のコンパートメント化において決定的に重要な役割を果たしている。ギャップジャンクションは隣り合う細胞の膜をつなぐチャンネルの集合からなる。無機イオンや小分子はこの直径約1.5nmのチャンネルを通して細胞間を直接移動でき、そのため細胞間での電氣的、代謝的な共役が可能となっている。以上に述べた以外にも多くの細胞結合が知られているが、本稿では、上皮や内皮において特によく発達し、しばしば電子顕微鏡下で細胞骨格と結合している様子が観察される、アドヘレンスジャンクション (AJ)、デスマソーム (DS)、フォーカルアドヒージョン (FA)、ヘミデスマソーム (HD) の4種の接着装置をあつかう。AJとDSは細胞・細胞間の接着装置で、カドヘリンファミリーに属するタンパク質が接着受容体として働いている。一方、細胞・基質間の接着装置であるFAとHDでは、インテグリンファミリーのタンパク質が接着受容体として存在する。これら接着装置に結合する細胞骨格に注目すると、AJとFAにはアクチン細胞骨格が、DSとHDには中間径線維が結合している。各接着装置のアダプタータンパク質は、これら細胞骨格の種類により決まっていますが、アクチン系のAJとFAにはビンキュリンや α アクチニンなどのアクチン結合タンパク質が集積し、DSとHDではプラケーキンファミリーに属するタンパク質が中間径線維と結合している。このような、機能も形態も異なるが、互いに共通する点も少なくない4種類の接着装置について以下に紹介する。最初に、アドヘレンスジャンクション、フォーカルアドヒージョン、デスマソームについて、その構成分子と細胞骨格との結合様式、それに関連した最近の話題について記述する。その後、筆者たちが研究対象としているヘミデスマソームについて少し詳しく述べていきたい。

1. アドヘレンスジャンクション

アドヘレンスジャンクション (AJ) では、主にクラシックカドヘリンに分類されるタンパク質が接着受容体として働いている (図1: AJ)。100種以上のタンパク質が属するカドヘリンファミリーの中で、クラシックカドヘリンは、最初に報告されたカドヘリンのサブタイプで、最も詳細にその機能が解析されている⁵⁾。以下、本稿ではクラシックカドヘリンのことをカドヘリンとよぶ。カドヘリンはI型の膜貫通型タンパク質で細胞外部分にカドヘリンリピートと呼ばれる5回の繰り返し構造をもち、この細胞外部分を介して基本的には同種親和的な細胞・細胞間結合を担っている。カドヘリンの細胞質部分には、アルマジロファミリーのタンパク質であるp120と β カテニンとの結合部位がある。p120は、細胞表面に存在するカドヘリン

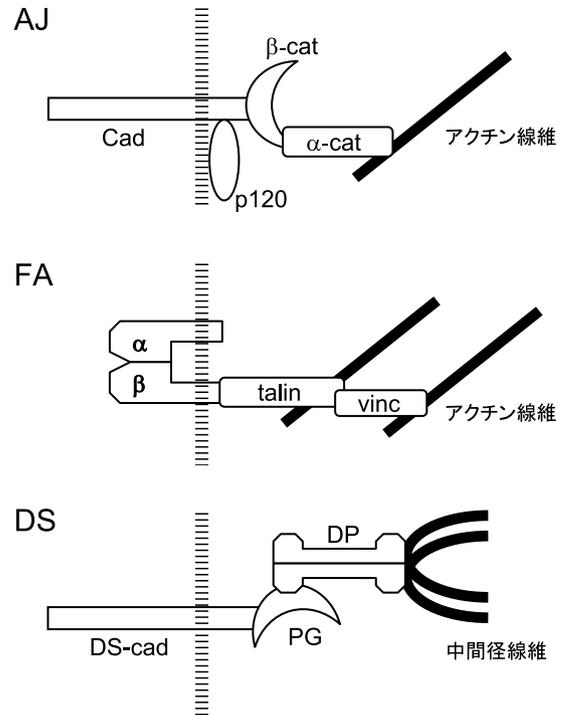


図1 接着装置の主要分子構造

AJ, FA, DSでは、図に示した以外にも多数の分子が関わっている。また、細胞骨格との結合に関しては、本文中の解説も参照されたい。Cad:カドヘリン, α -cat: α カテニン, β -cat: β カテニン, α :インテグリン α 鎖, β :インテグリン β 鎖, vinc:ビンキュリン, DS-cad:DSカドヘリン, PG:プラコグロビン, DP:デスマプラケーキン

のエンドサイトーシスや⁶⁾、低分子量Gタンパク質Racの活性化によるRhoの局所的な不活性化経路に関与して⁷⁾、カドヘリンの機能を制御している。 β カテニンは、その中央部分のアルマジロリピート領域でカドヘリンの細胞質部分のC端部分と結合し、さらにN端近くで α カテニンと結合することで、この二つの分子を結びつけている。そして、 α カテニンがアクチン線維に結合することで、AJのカドヘリン-カテニン複合体はアクチン細胞骨格につながるとめられていると考えられてきた。

AJに存在するもう一つの接着複合体としてネクチン-アフアディン系がある⁸⁾。ネクチンは細胞外領域に三つのイムノグロブリン様ループ構造をもつ1回膜貫通型タンパク質で、細胞・細胞間接着機能をもつ接着受容体である。アフアディンは、PDZドメインを介してネクチンの細胞質部分に結合し、C末端部にはアクチン線維結合領域をもつ。ネクチンとアフアディンはAJに濃縮して存在し、AJの形成や上皮細胞の極性化において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。

α カテニンは β カテニンとアクチン線維の両方に結合することができ、カドヘリンとアクチン細胞骨格を結びつける上で中心的な役割を果たしていると考えられてきた。し

かし、最近、これまでの定説とは異なり、 α カテニン β カテニンとアクチン線維の両者に同時に結合することはできず、むしろ両者への結合は相互排他的であるとする実験結果が報告された^{9,10}。その報告によると、 α カテニンはそのN末端領域で β カテニンと結合するが、同じ領域でホモ二量体も形成し、この二つの状態は互いに競合的な関係にある。そして、 β カテニンとの結合は、 α カテニンC末端領域のアクチンへの親和性を減少させる。一方、 α カテニンのホモ二量体は強くアクチン線維と結合するが、カドヘリン- β カテニン複合体とは結合しない。また、AJに近接して存在するアクチン線維は、カドヘリン-カテニン複合体に比べてかなり動的な構造であることも示された。この観察結果に従えば、両者の間の安定的な相互作用の存在を想定することは難しい。しかし、カドヘリンと α カテニンの融合タンパク質が野生型のカドヘリンとほとんど同等の接着活性を示すことから¹¹、 α カテニンがカドヘリン-カテニン複合体をアクチン細胞骨格に結びつけるのに重要な役割を果たしていることは間違いないと思われる。それでは、AJとアクチン線維は、どのようにして相互作用しているのだろうか？ 候補の一つは、直接/間接に α カテニンと相互作用するアフアディンを介して、AJがアクチン線維と結びついているとするものである。また、安定的な強い分子間相互作用は存在せず、多数の一時的な弱い相互作用の累積効果によって、AJとアクチン細胞骨格は結びついていると考えることもできる。いずれにしろ、AJと細胞骨格の関係については、これまで知られてきたモデルからの改訂が必要なようである。

2. フォーカルアドヒージョン

フォーカルアドヒージョン (FA) は、電子顕微鏡を用いた観察によって、線維芽細胞の基底側細胞膜が基質に密着している部位として最初に報告された¹²。FAにはアクチン線維束が結合していることから、細胞・基質間AJとも呼ばれるが、本稿ではFAに統一する。FAでは主に、 α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーからなるインテグリンファミリーに属するタンパク質が接着受容体として機能している(図1:FA)。18種類の α 鎖と8種類の β 鎖の組み合わせによって、少なくとも24種類のヘテロダイマーが形成され、それぞれのヘテロダイマーは独特な基質リガンドとの親和性を示す。培養細胞では間充織系だけでなく上皮系の細胞でもFAはよく観察される。一方、組織中では、腸間膜などの中皮や血管内皮など比較的限られた部位でのみ確認される。しかし、FAと類似の構造は多く知られている。例えば、骨格筋の筋腱接合部位やZ盤が筋膜と接するコストメア、平滑筋の細胞・基質間接着構造であるデンスプラークなどである。また、他のインテグリンに関わる多くの生命現象においても、一過的ではあるかもしれない

が、FAに似たタンパク質複合体が形成されているものと思われる。今日までに、FAに局在することのできるタンパク質は90種近く、またFAに局在するタンパク質と相互作用し機能を調節しているタンパク質も60種以上知られている¹³。このように、FAには非常に多くのタンパク質が関わっているが、これら150種以上のタンパク質が一堂にFAに会しているわけではない。むしろ、多数種の分子がFAに関わっている事実は、FAの複雑さを示すと同時に、多様性も示唆している。実際に、1個の細胞の中においてさえも異なる組成から成るFAが存在することが知られている¹²。FAを構成するタンパク質のうち、インテグリンとアクチン線維の両方に結合できるものとしては、タリン、テンシン、 α アクチニン、フィラミンなどが知られている。 α アクチニンとフィラミンはアクチン細胞骨格制御因子としても機能しており、タリンとテンシンは接着部位に特異的に局在する分子である。テンシンファミリーは、テンシン-1、-2、-3、CTENの4種類のタンパク質を含むが、CTENのみアクチン結合ドメインをもたない。最近、EGF刺激下の乳腺上皮細胞では、FA中のテンシン-3がアクチン結合能をもたないCTENに置き換えられ、その結果、細胞運動を促進していることが報告された¹⁴。

タリンはFAの形成において中心的な役割を担っているタンパク質の一つであり、インテグリン β 鎖の細胞質部分に結合し、インテグリンを活性化¹⁵。このタリンとインテグリンの相互作用はホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸(PIP₂)によって促進される。最近、PIP₂の産生に関わるホスファチジルイノシトール4-リン酸5-キナーゼtypeI γ (PIPKI γ)がタリンと直接結合し、FAに局在することが明らかにされた¹⁶⁻¹⁸。このことはPIPKI γ による局所的なPIP₂の産生が、FAの動態を制御していることを示唆する。興味深いことに、PIP₂はビンキュリンにも結合する¹⁹。ビンキュリンはN端側の頭部でタリンと結合し、C端側尾部ではアクチン細胞骨格と結合することでFAにアクチン細胞骨格をつないでいる。しかし、細胞質ゾル中では、ビンキュリンの頭部と尾部は分子内相互作用し、その結果、多くの分子間相互作用部位を不活化している²⁰。PIP₂のビンキュリン尾部への結合はこの分子内相互作用による不活性型を活性型にする効果をもつものと考えられてきた。しかし、アクチン結合能は保ったままPIP₂結合能のみを失ったビンキュリン変異体を用いた最近の研究により、PIP₂の結合はビンキュリンの活性化とFAへの局在化には不可欠ではなく、むしろPIP₂はビンキュリンとアクチン線維との結合を阻害することで、FAのターンオーバーを促進することが示唆された²¹。これらのことから、例えば、移動細胞のリーディングエッジに存在するFAでの局所的なPIP₂産生は、タリンによるインテグリンの活性化と新たなFA形成を促すと同時に、FA中のビン

キュリンとアクチン線維の結合を弱めることで、FAのターンオーバーをも促進し、リーディングエッジのさらなる前進を助けている可能性が考えられる。

3. デスモソーム

デスモソーム (DS) は中間径線維が結合する細胞・細胞間接着構造で上皮や心筋によく発達し、リンパ節の細網細胞や脳脊髄膜にも存在する²²⁾。電子顕微鏡下では、電子密度の高いDS斑 (プラーク) とよばれる構造により容易に判別され、プラークには中間径線維が結合している (図2: DS)。DSでは、カドヘリンファミリーに属するデスモグレイン (Dsg) とデスモコリン (Dsc) の二つのタイプのDSカドヘリンが接着受容体として働いている (図1: DS)。デスモグレインには異なる遺伝子由来する4種類のアイソフォーム (Dsg1, 2, 3, 4) が存在し、デスモコリンには3種類のアイソフォーム (Dsc1, 2, 3) が存在する。また、DSをもつ細胞はDsgとDscをそれぞれ少なくとも1種類、発現している。DSカドヘリンの細胞質部分にはアルマジロファミリーのタンパク質であるプラコグロビンがそのN末端部分を介して結合している。デスモプラーキンは、ホモの平行二量体を形成し、N端側でプラコグロビンのアルマジロリピートを含む中央部分と、C端側で中間径線維と結合する。このDSカドヘリン-プラコグロビン-デスモプラーキンの三者からなる複合体がデスモソームを構成する基本的な構成単位と考えられている。DSにはプラコグロビンの他に、同じアルマジロファミリータンパク質としてプラコフィリン-1, -2, -3が存在する²³⁾。プラコフィリンはAJのp120とより近い相同性を示し、また中間径線維を含むほとんどのDS構成タンパク質と結合することが報告されている。しかしp120がAJにおいて果たしているような機能をプラコフィリンがDSにおいて果たしているのかはわかっておらず、現在のところ、プラコフィリンはDSカドヘリン-プラコグロビン-デスモプラーキン複合体を横断的に結びつけ、DSの構造を強化する役割を担っているものと考えられている。

表皮などの重層上皮においてDSカドヘリンは、分化特異的な発現パターンを示す²⁴⁾。Dsg2とDsc2は、表皮では主に基底細胞層に発現するが、Dsg3とDsc3は基底細胞層とその直上の有棘細胞層に最も強く発現し、上層に向かって減少している。一方、Dsg1とDsc1は、表皮最上層部に強く発現し、下層に向かって次第に減少していく。Dsg4の発現は表皮最上層部に限定して認められる。このような発現パターンは、DSカドヘリンが接着だけでなく、表皮の分化パターン形成にも重要な役割を果たしている可能性を示唆する。実際に、表皮の下層部に発現するDsg2やDsc3を異所的に表皮上層部に発現させたトランスジェニックマウスでは、表皮細胞の異常増殖や角質の肥厚、脱

毛などが観察される。特に興味深いのは、Dsg3を角質層に蓄積するインボルクリンのプロモーターを使って表皮上層部に発現させた場合である²⁵⁾。その結果Dsg3は表皮層全体で一様に発現するようになり、その分布は口腔粘膜上皮におけるDsg3に類似する。そして、このトランスジェニックマウスでは、表皮角質層が組織学的に粘膜上皮によく似たものへと変化し、機能面においても、表皮角質層が本来もっている保水のための表皮バリアー機能を失っていた。これらの結果はDSカドヘリンが、重層上皮の分化特異的な構造と機能にも影響を与えていることを示している。

DS研究の比較的早い時期から、細胞・細胞間接着部位以外の細胞表面や細胞内に、DSの半プラーク (細胞・細胞間では鏡面对称で向き合っている2個のプラークの一方) が存在することが電子顕微鏡を用いた観察から知られていた^{26,27)}。しかし、この半プラークが新たにDSを形成するための前駆体構造なのか、それとも細胞接着部位から離脱・回収され分解へと至る過程にあるものなのかは、はっきりしていなかった。最近、デスモプラーキンとGFPの融合タンパク質を用いた実験により、デスモプラーキンはまず細胞内でプラコフィリン2とともに前駆体を形成し、その後、細胞間接着部位へと運ばれていく様子が観察された²⁸⁾。この前駆体の運搬にはアクチンと中間径線維の両方の細胞骨格系が関与していて、DSカドヘリンやプラコグロビンとは細胞膜到達後に相互作用し、DS形成へと至るようである。

4. ヘミデスモソーム

ヘミデスモソーム (HD) は、ケラチン線維が結合する細胞・基質間の接装置で、主に表皮などの重層上皮や気管上皮などの多列上皮に認められる²⁹⁾。DSプラークとよく似た電子密度の高い直径0.2~0.5 μm のプラーク構造をもち、そこにケラチン線維が結合する (図2左: HD)。このHDプラークのうち、ケラチンと結合している部分を内側プラーク、膜に接している部分を外側プラークと呼び分ける (図2右)。外側プラークはアンカリングフィラメントと呼ばれる微細な線維状構造によって細胞外の基底膜に結びつけられている。さらに基底膜はVII型コラーゲンから成るアンカリングフィブリルによって、I型およびIII型のコラーゲン線維につながれている。このように、基底細胞のケラチン細胞骨格からコラーゲン線維に至る一連のタンパク質複合体によって、上皮組織は結合組織に強く接着している。これらタンパク質複合体の重要性は、HDやアンカリングフィラメント、アンカリングフィブリルを構成するタンパク質を遺伝的に欠いたヒトの疾患や遺伝子改変マウスにおいて、共通して表皮の剥離が観察されることから裏付けられる³⁰⁾。

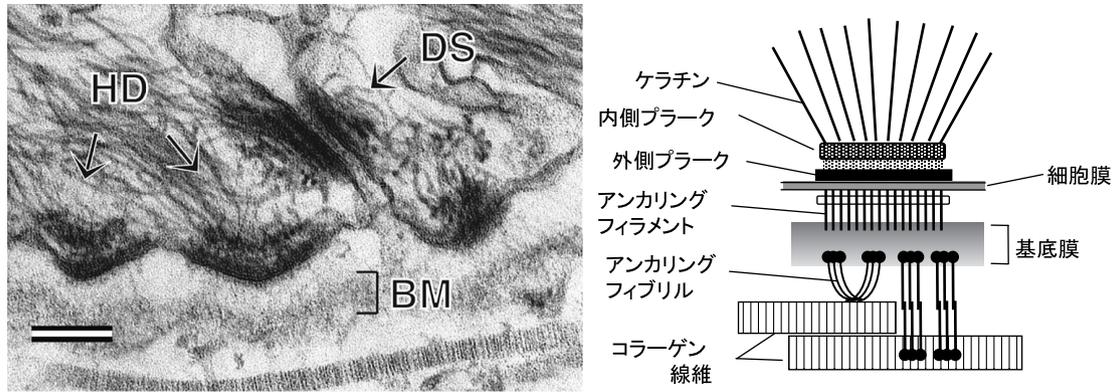


図2 ヘミデスモソームの電子顕微鏡像(左)とその模式図(右)

ウシ食道上皮基底細胞の細胞・基質間接着部位を電子顕微鏡で観察した。HD:ヘミデスモソーム, DS:デスモソーム, BM:基底膜, バー:0.25 μ m

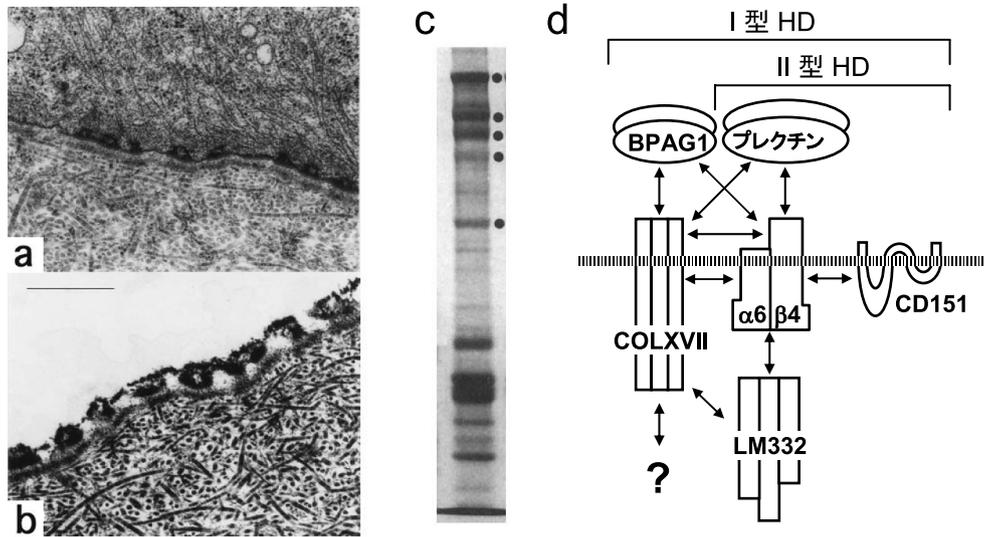


図3 ヘミデスモソームの単離と分子間相互作用

- ウシ角膜上皮基底細胞の電子顕微鏡像。
- ウシ角膜上皮細胞層を機械的に剥ぎ取った後の基底膜上に残ったヘミデスモソーム。
- EDTA処理によってbのヘミデスモソームを基底膜から剥がして得た単離画分のSDS-PAGE。主要5成分はレーンの右に点で示した。
- ヘミデスモソーム構成分子間の相互作用の模式図。 $\alpha 6$:インテグリン $\alpha 6$ 鎖, $\beta 4$:インテグリン $\beta 4$ 鎖, COLXVII:XVII型コラーゲン, LM332:ラミニン332

基底細胞の基底側細胞膜にのみ認められるHDはDSに比べてその組織中での存在量は非常に少ない。そのため、HDの生化学的解析はDSに比べて遅れていたが、ウシ角膜からの単離法が確立されたことから、その主要な構成タンパク質が5種類であることが明らかとなった³¹⁾(図3)。これらのタンパク質は現在までに、分子量の大きな方から、プレクチン、BPAG1/BP230、インテグリン $\beta 4$ 鎖、XVII型コラーゲン/BP180、インテグリン $\alpha 6$ 鎖として同定されている。プレクチンとBPAG1は、細胞質タンパク質でプラークを形成しケラチンとの結合能をもつ。一方、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ とXVII型コラーゲンは膜貫通型タンパク質で、その細胞外部分はアンカリングフィラメントを

構成している。これまでの研究により、各HD構成タンパク質間の相互作用が詳しく調べられている²⁹⁾。これらをまとめると、まず、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ は、 $\beta 4$ 鎖の細胞質部分を介してプレクチンのN末端部分に結合する。おそらく、この複合体形成が基礎となり、そこへXVII型コラーゲンとBPAG1が加わることで、成熟したHDが完成するものと思われる。XVII型コラーゲンのHDへの組み込みは主に $\beta 4$ 鎖の細胞質部分との相互作用によるが、プレクチンN末端部およびインテグリン $\alpha 6$ 鎖の細胞外部分との相互作用の存在も報告されている。また、BPAG1はXVII型コラーゲンの細胞質部分に結合することが最初に報告されたが、のちにインテグリン $\beta 4$ 鎖とも結合することが示

された。このように、HDタンパク質は、一つの分子上に複数の分子間相互作用ドメインをもち、互いに結びつき合って、安定した構造をつくっているものと考えられる。

ここまでに紹介してきたHDは主要5成分を全てもつタイプだが、プレクチンとインテグリン $\alpha 6\beta 4$ のみから構成されるヘミデスモソームも存在する^{32,33}。前者はI型、後者はII型のHDと呼ばれる(図3)。II型のHDは血管内皮や消化管上皮などの単層上皮およびシュワン細胞などに分布し、微細形態学的な特徴としては電子顕微鏡観察下で明瞭なブラーク構造をもたない。II型HDまで含めると、HDは上皮組織においては比較的広く存在する接着構造であると考えられることができる。I型HDをもつ重層上皮は、II型HDをもつ単層上皮に比べて、大きな力学的ストレスにさらされることを考えると、BPAG1とXVII型コラーゲンはI型HDにより強い接着力を与えているように思われるが、実験的な証拠はない。また、I型HDとII型HDの間に具体的にどのような構造上の違いが生じているのかもブラークの有無以外には全く不明である。最近、4回膜貫通型タンパク質であるCD151がインテグリン $\alpha 6\beta 4$ との結合を介してHDに局在していることが明らかとなった。CD151はI型だけでなくII型のHDにも存在するらしい。CD151の存在は必須ではないのでHDにおける機能は補助的なものであることが示唆されている³⁴。

HDはアンカリングフィラメントを介して基底膜と結合している。HD側に属するアンカリングフィラメント構成成分がインテグリン $\alpha 6\beta 4$ とXVII型コラーゲンだとすると、基底膜側からの構成成分としてラミニン332/ラミニン5がある³⁵。ラミニン332は、 $\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$ の3本のポリペプチドからなるヘテロ三量体で、これら各鎖はそれぞれプロセッシングを受けることがわかっている。このプロセッシングはラミニン332の細胞外マトリックスへの沈着やHD形成、細胞運動などさまざまな現象の制御に関わっている。HDではラミニン332は、主にインテグリン $\alpha 6\beta 4$ の細胞外リガンドとして機能しているものと考えられるが、XVII型コラーゲンのリガンドである可能性も示唆されている³⁶。ラミニン332は $\beta 3$ 鎖を介して、アンカリングフィブリルの構成タンパク質であるVII型コラーゲンとも結合している。つまり、HDとコラーゲン線維は、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ -ラミニン332-VII型コラーゲンという分子のつながりによって結ばれていることになる。このようなHDとラミニン332およびVII型コラーゲンの密接な関係は、組織を蛍光染色した場合にも容易に認めることができる³⁷(図4)。

(1) プラーキンタンパク質の選択的スプライシング

プレクチンとBPAG1は、デスモプラーキンなどともに中間径線維結合タンパク質のファミリーであるプラーキン

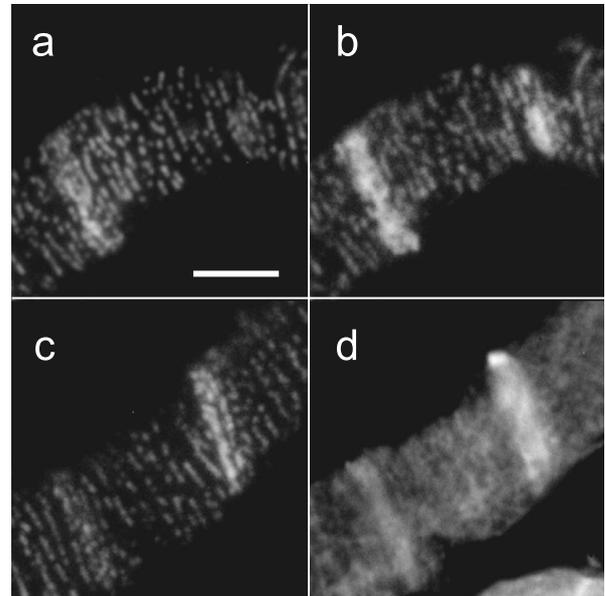


図4 ウシアボクリン汗腺筋上皮基底膜部の二重蛍光抗体染色像 BPAG1の示すHDのドット状の染色パターン(a)とVII型コラーゲンの染色パターンはほぼ一致している(b)。一方、基底膜の主要な構成タンパク質であるパルカン(d)はBPAG1(c)とは全く異なる染色像を示す。バー:5 μ m

ファミリーを形成している³⁸(図5)。HDではプレクチンとBPAG1のいずれも、N端側でHDの膜貫通型タンパク質と結合し、C端側で中間径線維と結合する。しかし、プレクチンとBPAG1はそれぞれ筋肉と神経組織でも重要な機能を担っている。最近、これらHDのプラーキンタンパク質には様々な選択的スプライシング産物が存在することが報告され、これまで予想されていなかったような働きをしていることがわかってきた。プレクチンを遺伝的に欠失したヒトの疾患では、表皮での水疱形成以外に成長に従い現れる筋萎縮症をとまなう。この疾患の発見によって初めてプレクチンの筋肉での役割が注目されるようになったのだが、この疾患は致死性ではない。ところが、その後、同じプレクチン遺伝子に変異をもつ、致死性の疾患が報告された。この場合、主な症状としては表皮水疱形成と幽門閉塞が認められる。2種類の疾患グループの変異箇所を比較すると、非致死性のグループのほとんどは、プレクチン分子の中央ロッド部分をコードするエクソン31に変異をもつものに対し、致死性のグループは、エクソン31以外の領域に変異をもっていた^{39,40}。プレクチンには、ロッドレス型と呼ばれるエクソン31にコードされるドメインを欠いた分子が、実際に神経や培養表皮角化細胞でタンパク質として(ごく少量ながら)存在している^{41,42}。これらのことから、非致死性のプレクチン疾患では、ロッドレス型のプレクチン分子が、全長型プレクチンの機能を部分的に代償しているものと推測されている。

BPAG1が神経など上皮以外の組織でも重要な機能を果

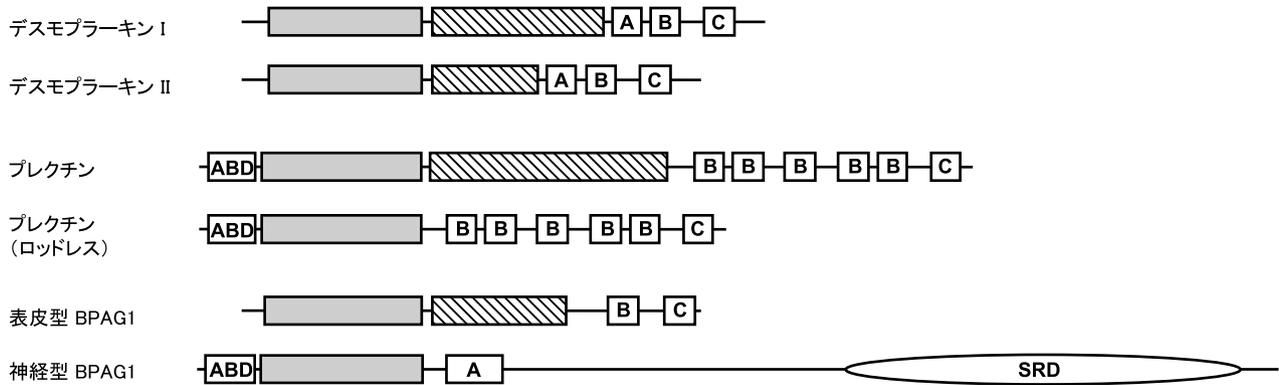


図5 プラキントキタンパク質のアイソフォーム

灰色の box はプラキンドメインを、斜線の box は α ヘリカルコイルドコイルドメインを示す。中間径線維結合ドメインは A, B, C のサブドメインをもつ。ABD はアクチン結合ドメインを、SRD はスペクトリンリピートドメインを表す。BPAG1 に関しては、表皮型と神経型を代表するもの一つずつ載せたが、実際には表皮型の N 末端ドメインに神経型の C 末端ドメインをもつものなど多様なアイソフォームが確認されている。

たしていることが明らかになったのは、BPAG1 の遺伝子ノックアウトマウスが表皮 HD の異常に加えて、神経組織と筋肉組織の障害に由来すると思われる四肢の筋異常緊張症を呈したことからだった⁴³⁾。その後、BPAG1 には、これまで知られていた表皮型に加えて、様々な選択的スプライシング産物が存在することがわかってきた^{44,45)} (図5)。これらスプライシングによって生じる全てのアイソフォームに共通な部分はプラキンドメインだけである。プラキンドメインの N 端側には表皮型の配列もしくはアクチン結合ドメイン (カルボニンホモロジドドメイン) を含む配列が付加され、C 端側には表皮型に認められるロッドドメインとプレクチンリピートからなる尾部もしくはスペクトリンリピートを含む尾部が付加される。N 端側アクチン結合ドメインをコードする領域を欠損する系統マウスでは筋異常緊張症だけが認められ、表皮に異常はない⁴⁶⁾。また、最近ヒトで報告された6番染色体と15番染色体間の転座による疾患では、転座が6番染色体上のBPAG1遺伝子のサブドメインAをコードする領域でおこり、その結果BPAG1の神経・筋肉型アイソフォームが正常に転写されなくなっていた⁴⁷⁾ (図5参照)。この患者では、やはり知覚と運動能力の発達障害が認められ、表皮には異常はなかった。このようなことから、表皮型BPAG1は表皮を含む重層上皮で主に機能し、図5にあげた神経型に代表されるアイソフォームは神経組織 (や筋肉組織) で主に機能しているものと考えられる。しかし、これらアイソフォームの中で存在がタンパク質レベルで確認されているのは、表皮型だけであり、その他のアイソフォームについては mRNA でのみ存在が報告されている。そのため新しく発見されたBPAG1のアイソフォームがどのような機能を担っているのか具体的にはあまりよくわかっていない。筆者たちが作製したBPAG1のプラキンドメインに対する

抗体でも、成体神経組織中にBPAG1タンパク質を検出することはできなかった (平子他, 未発表データ), もしかするとBPAG1の新規アイソフォームは発生時のみ一過的にタンパク質として発現されているのかもしれない。

(2) ヘミデスモソームの解体

インテグリン $\beta 4$ 鎖の細胞質部分はアミノ酸約1,000残基からなり、50残基程度の細胞質部分をもつ他のインテグリン β 鎖と比べるとはるかに大きい。 $\beta 4$ 鎖はこの細胞質部分を介してプレクチンの N 末端部分と相互作用し、HD 形成において中心的な役割を果たしているが、この相互作用は $\beta 4$ 鎖のリン酸化によって制御されることがわかっている。培養表皮細胞を EGF で刺激すると、HD は解体へと導かれ、このとき、 $\beta 4$ 鎖はチロシン、セリン、スレオニンにリン酸化を受ける。 $\beta 4$ 鎖のチロシンリン酸化を引き起こす Fyn キナーゼのドミナントネガティブ型を培養表皮細胞に導入すると、HD 解体は阻害される⁴⁸⁾。また、セリンとスレオニンのリン酸化はプロテインキナーゼ A (PKA) とプロテインキナーゼ C (PKC) によって引き起こされ、リン酸化を受けた $\beta 4$ 鎖はプレクチンとの結合親和性が減少する⁴⁹⁾。以上の実験結果は、 $\beta 4$ 鎖細胞質部分のリン酸化によって HD 解体が促進されることを示している。しかし、これらリン酸化修飾が HD 複合体中の $\beta 4$ 鎖におこり HD 構造をいわば直接的に解体しているのか、それとも細胞膜上に存在する HD には組み込まれていない $\beta 4$ 鎖をリン酸化し、HD への新たな組み込みを阻害することで、結果的に HD を解体するのかわかっていない。培養細胞の HD では、インテグリン $\alpha 6\beta 4$ が10分から30分程度で完全に入れ替わることが報告されているので^{50,51)}、後者の説の方がより実際におこっていることに近いのかも

しれない。

XVII型コラーゲンはII型膜貫通型タンパク質で、約1,000残基のC端側細胞外部分にはヒトの場合全長にわたって15個に分断されたコラーゲンドメインをもち、コラーゲン型ホモ三量体を形成する。球状の細胞質部分と長さ150~200nmのロープ状の細胞外部分からなる分子形態が観察されたことから、XVII型コラーゲンはラミニン332とともにアンカリングフィラメントの主要な構成成分であると考えられている^{52,53}。このようにアンカリングフィラメント構成タンパク質としてHDと基底膜を結ぶ役割を果たしていると考えられるXVII型コラーゲンであるが、培養細胞では、(少なくとも一部の)XVII型コラーゲン分子の細胞外部分は細胞膜直下の部位で切り離され、約120kDaの断片として培養液中に放出されることがわかっている^{54~56}。同様の断片は表皮組織中においても全長型のXVII型コラーゲン分子とともに存在している⁵⁴。この切断はADAMファミリーに属する膜結合型メタロプロテアーゼによって行われていて⁵⁷、切断部位近くのセリン残基がカゼインキナーゼ2によってリン酸化されると切断が抑制されることも最近報告された⁵⁸。XVII型コラーゲンの細胞外部分の切断とその切断の結果生じる断片の生物学的意味はよくわかっていないが、HD解体の際にXVII型コラーゲンの細胞外部分を切り離すことで、その細胞外リガンドからの脱離を行っている可能性が考えられる⁵⁹。また、TPA刺激下で、XVII型コラーゲンの(おそらく細胞質部分に含まれる)セリンおよびスレオニン残基がリン酸化を受けることも報告されているが⁶⁰、XVII型コラーゲンと他のHDタンパク質との間の相互作用への影響などは明らかでない。

5. 今後の課題：生化学と超微形態学のドッキング

細胞接着の研究は最近10年ほどの間にさらに大きく進展した。接着装置の主要な構成成分の1対1での分子間相互作用に関しては、かなり多くの部分が明らかになったといってもよいように思われる。特に発展が目覚ましかったのは、紙面の都合もあり言及しなかったが、接着と細胞内シグナル伝達との関わりについてだろう。また、近年盛んに導入されるようになった蛍光タンパク質標識分子を用いたライブイメージング技術によって、接着のよりダイナミックな側面やこれまであまり疑問とはされてこなかった現象についても明らかになりつつある。

これまでの接着に関する分子レベルの情報は、主に生化学的、分子生物学的な実験から得られたものである。これらの結果は、やはり細胞内での実験で検証し、さらに可能ならば構造解析の結果とも突き合わせながら考えていく必要がある。筆者たちが研究対象としているHDを例にとると、生化学的研究からHDの主要な構成成分は5種類であることが確定している。細胞質側プラークだけをみると構成タンパク質はプレクチンとBPAG1の2種類だけである。このことはHD研究の広がりということを考えた場合、FAやDSに比べて狭いことは否定できない。しかし、少ない構成分子種から成立しているということは、HDの構造を観察し、その全容を解析するにはFAやDSに比べてずっと有利である。そのような考えから、筆者たちは名古屋大学工学部の臼倉治郎博士との共同研究のもと、培養細胞のI型HDを急速凍結レプリカ法により観察することを目指して実験を始めた。最近、ケラチン線維が結合したHDと思われる構造を観察することができた(図6左)。そこでは、棒状分子が集合して中空の鳥かご状の構造が形成されていた。現在、HDプラークタンパク質の抗体を

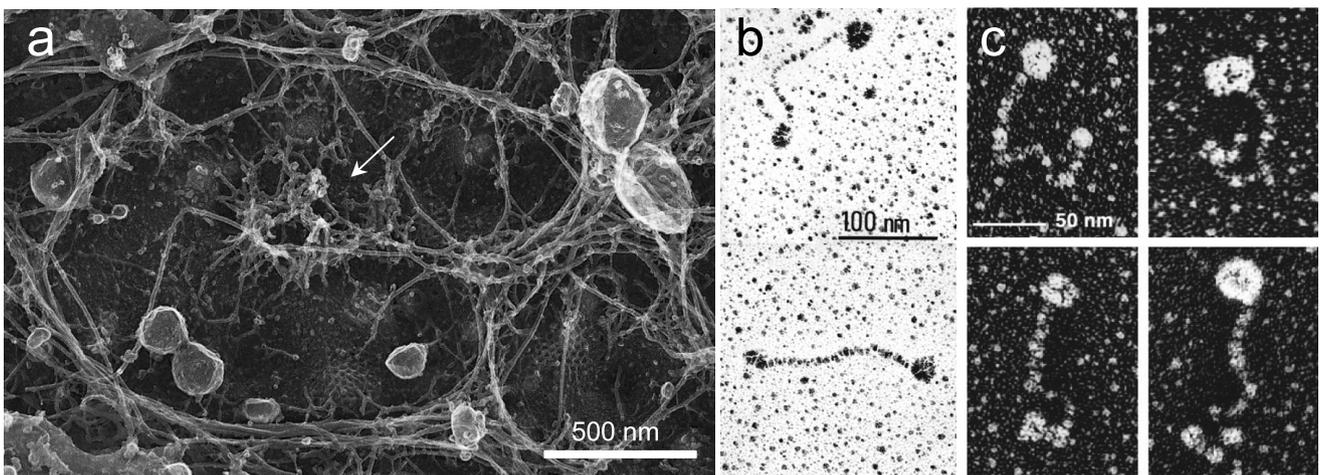


図6 ラット培養表皮細胞の基底側細胞膜裏打ち構造

急速凍結レプリカ法で観察したラット培養表皮細胞の基底側細胞膜裏打ち構造(a)。矢印は中間径線維が膜と連結されている場所と認められる構造を示す。低角度回転蒸着法で観察したプレクチン(b)とXVII型コラーゲン(c)。

使って、実際に観察された構造がHDなのかを確認中である。また並行して、HD主要5成分の分子形態を明らかにすべく、各分子の生化学的精製と低角度回転蒸着法による観察も行っている(図6右)。今後はさらに、BPAG1をもたずプラーク構造が観察されないII型HDについても解析を進めていく予定である。そして、これらの観察結果とすでに得られている分子間相互作用の情報を照らし合わせながら、最終的にはどの分子がどこにいくつ、どのように存在して1個のHDが成立しているのかを、明らかにできると考えている。ここに生化学的に解析の進んだ構造体(接着複合体)を直接「目」で見えて解析する意義があり、これからの生物学に「生化学と超微形態学のドッキング」が必要とされる所以である。HDの構造が明らかにできれば、同じインテグリンファミリーのタンパク質を接着受容体としてもつFAの研究や、同じプレーキファミリーのタンパク質をプラーク構成分子として中間径線維を結合しているDSの研究にも重要な示唆を与えることができると期待している。

本稿ではあまり言及できなかった細胞間接着についてのより詳細な総説は平成18年度の本誌第78巻7号に特集されているので、そちらを参考にされたい。

文 献

- King, N., Hittinger, C.T., & Carroll, S.B. (2003) *Science*, **301**, 361-363.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glockner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., et al. (2005) *Nature*, **435**, 43-57.
- Tsukita, S. & Furuse, M. (2002) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 531-536.
- Giepmans, B.N. (2004) *Cardiovasc. Res.*, **62**, 233-245.
- Halbleib, J.M. & Nelson, W.J. (2006) *Genes Dev.*, **20**, 3199-3214.
- Miyashita, Y. & Ozawa, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 11540-11548.
- Wildenberg, G.A., Dohn, M.R., Carnahan, R.H., Davis, M.A., Lobdell, N.A., Settleman, J., & Reynolds, A.B. (2006) *Cell*, **127**, 1027-1039.
- Takai, Y. & Nakanishi, H. (2003) *J. Cell Sci.*, **116**, 17-27.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W.I., & Nelson, W.J. (2005) *Cell*, **123**, 889-901.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J., & Weis, W.I. (2005) *Cell*, **123**, 903-915.
- Nagafuchi, A., Ishihara, S., & Tsukita, S. (1994) *J. Cell Biol.*, **127**, 235-245.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., & Yamada, K.M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 793-805.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, B. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 858-867.
- Katz, M., Amit, I., Citri, A., Shay, T., Carvalho, S., Lavi, S., Milanezi, F., Lyass, L., Amariglio, N., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 961-969.
- Tadokoro, S., Shattil, S.J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R.C., de Pereda, J.M., Ginsberg, M.H., & Calderwood, D.A. (2003) *Science*, **302**, 103-106.
- Di Paolo, G., Pellegrini, L., Letinic, K., Cestra, G., Zoncu, R., Voronov, S., Chang, S., Guo, J., Wenk, M.R., & De Camilli, P. (2002) *Nature*, **420**, 85-89.
- Ling, K., Doughman, R.L., Firestone, A.J., Bunce, M.W., & Anderson, R.A. (2002) *Nature*, **420**, 89-93.
- Sun, Y., Ling, K., Wagoner, M.P., & Anderson, R.A. (2007) *J. Cell Biol.*, **178**, 297-308.
- Ziegler, W.H., Liddington, R.C., & Critchley, D.R. (2006) *Trends Cell Biol.*, **16**, 453-460.
- Chen, H., Cohen, D.M., Choudhury, D.M., Kioka, N., & Craig, S.W. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 459-470.
- Chandrasekar, I., Stradal, T.E., Holt, M.R., Entschladen, F., Jockusch, B.M., & Ziegler, W.H. (2005) *J. Cell Sci.*, **118**, 1461-1472.
- Green, K.J. & Simpson, C.L. (2007) *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 2499-2515.
- Hatzfeld, M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 69-77.
- Dusek, R.L., Godsel, L.M., & Green, K.J. (2007) *J. Dermatol. Sci.*, **45**, 7-21.
- Elias, P.M., Matsuyoshi, N., Wu, H., Lin, C., Wang, Z.H., Brown, B.E., & Stanley, J.R. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 243-249.
- Jones, J.C. & Goldman, R.D. (1985) *J. Cell Biol.*, **101**, 506-517.
- Demlehner, M.P., Schafer, S., Grund, C., & Franke, W.W. (1995) *J. Cell Biol.*, **131**, 745-760.
- Godsel, L.M., Hsieh, S.N., Amargo, E.V., Bass, A.E., Pascoe-McGillicuddy, L.T., Huen, A.C., Thorne, M.E., Gaudry, C.A., Park, J.K., Myung, K., Goldman, R.D., Chew, T.L., & Green, K.J. (2005) *J. Cell Biol.*, **171**, 1045-1059.
- Litjens, S.H., de Pereda, J.M., & Sonnenberg, A. (2006) *Trends Cell Biol.*, **16**, 376-383.
- Uitto, J. & Pulkkinen, L. (2001) *Arch. Dermatol.*, **137**, 1458-1461.
- Owaribe, K., Nishizawa, Y., & Franke, W.W. (1991) *Exp. Cell Res.*, **192**, 622-630.
- Hieda, Y., Nishizawa, Y., Uematsu, J., & Owaribe, K. (1992) *J. Cell Biol.*, **116**, 1497-1506.
- Uematsu, J., Nishizawa, Y., Sonnenberg, A., & Owaribe, K. (1994) *J. Biochem.*, **115**, 469-476.
- Sachs, N., Kreft, M., van den Bergh Weerman, M.A., Beynon, A.J., Peters, T.A., Weening, J.J., & Sonnenberg, A. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 33-39.
- Miyazaki, K. (2006) *Cancer Sci.*, **97**, 91-98.
- Tasanen, K., Tunggal, L., Chometon, G., Bruckner-Tuderman, L., & Aumailley, M. (2004) *Am. J. Pathol.*, **164**, 2027-2038.
- Uematsu, J., Nishizawa, Y., Hirako, Y., Kitamura, K., Usukura, J., Miyata, T., & Owaribe, K. (2005) *Eur. J. Cell Biol.*, **84**, 407-415.
- Sonnenberg, A. & Liem, R.K. (2007) *Exp. Cell Res.*, **313**, 2189-2203.
- Pfendner, E., Rouan, F., & Uitto, J. (2005) *Exp. Dermatol.*, **14**, 241-249.
- Sawamura, D., Goto, M., Sakai, K., Nakamura, H., McMillan, J.R., Akiyama, M., Shirado, O., Oyama, N., Satoh, M., Kaneko, F., Takahashi, T., Konno, H., & Shimizu, H. (2007) *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1537-1540.
- Koster, J., van Wilpe, S., Kuikman, I., Litjens, S.H., & Sonnenberg, A. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 1211-1223.
- Fuchs, P., Spazierer, D., & Wiche, G. (2005) *Cell. Mol. Neuro-*

- biol.*, 25, 1141-1150.
- 43) Guo, L., Degenstein, L., Dowling, J., Yu, Q.C., Wollmann, R., Perman, B., & Fuchs, E. (1995) *Cell*, 81, 233-243.
- 44) Okumura, M., Yamakawa, H., Ohara, O., & Owaribe, K. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 6682-6687.
- 45) Leung, C.L., Zheng, M., Prater, S.M., & Liem, R.K. (2001) *J. Cell Biol.*, 154, 691-697.
- 46) Brown, A., Bernier, G., Mathieu, M., Rossant, J., & Kothary, R. (1995) *Nat. Genet.*, 10, 301-306.
- 47) Giorda, R., Cerritello, A., Bonaglia, M.C., Bova, S., Lanzi, G., Repetti, E., Giglio, S., Baschiroto, C., Pramparo, T., Avolio, L., Bragheri, R., Maraschio, P., & Zuffardi, O. (2004) *J. Med. Genet.*, 41, e71.
- 48) Mariotti, A., Kedeshian, P.A., Dans, M., Curatola, A.M., Gagnoux-Palacios, L., & Giancotti, F.G. (2001) *J. Cell Biol.*, 155, 447-458.
- 49) Wilhelmsen, K., Litjens, S.H., Kuikman, I., Margadant, C., van Rheenen, J., & Sonnenberg, A. (2007) *Mol. Biol. Cell*, 18, 3512-3522.
- 50) Geuijen, C.A. & Sonnenberg, A. (2002) *Mol. Biol. Cell*, 13, 3845-3858.
- 51) Tsuruta, D., Hopkinson, S.B., & Jones, J.C. (2003) *Cell Motil. Cytoskeleton*, 54, 122-134.
- 52) Giudice, G.J., Emery, D.J., & Diaz, L.A. (1992) *J. Invest. Dermatol.*, 99, 243-250.
- 53) Hirako, Y., Usukura, J., Nishizawa, Y., & Owaribe, K. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 13739-13745.
- 54) Hirako, Y., Usukura, J., Uematsu, J., Hashimoto, T., Kitajima, Y., & Owaribe, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 9711-9717.
- 55) Schäcke, H., Schumann, H., Hammami-Hauasli, N., Raghunath, M., & Bruckner-Tuderman, L. (1998) *J. Biol. Chem.*, 273, 25937-25943.
- 56) Hirako, Y., Nishizawa, Y., Sitaru, C., Opitz, A., Marcus, K., Meyer, H.E., Butt, E., Owaribe, K., & Zillikens, D. (2003) *J. Invest. Dermatol.*, 121, 1554-1556.
- 57) Franzke, C.W., Tasanen, K., Schacke, H., Zhou, Z., Tryggvason, K., Mauch, C., Zigrino, P., Sunnarborg, S., Lee, D.C., Fahrenholz, F., & Bruckner-Tuderman, L. (2002) *EMBO J.*, 21, 5026-5035.
- 58) Zimina, E.P., Fritsch, A., Schermer, B., Bakulina, A.Y., Bashkurov, M., Benzing, T., & Bruckner-Tuderman, L. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 22737-22746.
- 59) Hirako, Y., Yoshino, K., Zillikens, D., & Owaribe, K. (2003) *J. Biochem.*, 133, 197-206.
- 60) Kitajima, Y., Owada, M.K., Fujisawa, Y., Seishima, M., Yaoita, H., Hirako, Y., & Owaribe, K. (1995) *Epithelial Cell Biol.*, 4, 70-75.
-