

論文内容の要旨

申請者氏名 東口 泰奈

アクチン細胞骨格と細胞接着分子の連結は、細胞間接着や細胞移動に重要である。上皮細胞の接着結合では、E-cadherinがホモフィリックに結合し、細胞内のアクチン線維と連結することで上皮組織全体にかかる力の調節を行う。一方、移動性細胞では、先端で逆行性に移動するアクチン線維の駆動力が細胞接着分子を介して細胞外基質へ伝わることで移動が可能となるというクラッチモデルが提唱されている。申請者らの研究室は、これまでに神経軸索の伸長やガイダンスを担うShootin1aを同定した。また、Shootin1aが、軸索先端で逆行性移動するアクチン線維と細胞接着分子L1-CAMを連結し、軸索ガイダンスのための力を生み出すクラッチ分子として機能することが明らかとなった。一方、哺乳類にはShootin1aのスプライスバリエントShootin1bが存在するが、その機能は不明である。

そこで申請者は、本研究で、Shootin1bの局在機能解析を行った。まず、Shootin1bの発現をウエスタンブロット法で解析したところ、マウスの脳、肺、肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、腎臓、皮膚においてShootin1bの発現が検出された。そこで、これらの組織を用いて免疫組織染色を行ったところ、Shootin1bが特に上皮細胞の細胞膜近傍に局在し、E-cadherinおよびCortactinと共局在することがわかった。さらにShootin1bは、脾臓の樹状細胞にも発現していた。

そこで次に樹状細胞におけるShootin1bの機能解析を進めた。マウス骨髄由来の樹状細胞を培養し、樹状細胞内のShootin1bの局在を免疫細胞染色により解析したところ、Shootin1bが樹状細胞の先端に濃縮し、アクチン線維およびCortactin、L1-CAMと共局在することがわかった。また、EGFP-Shootin1bを発現させて細胞内におけるその挙動を一分子計測したところ、Shootin1bが樹状細胞の先端で逆行性移動するアクチン線維と相互作用することが明らかとなった。さらにアクチンの一分子計測を行ったところ、Shootin1bのノックアウトにより樹状細胞のアクチン線維の逆行性移動速度が上昇した。よって、Shootin1bが樹状細胞内でクラッチ分子として機能する可能性が示唆された。続いて、三次元環境下でケモカインCCL19の濃度勾配に従って移動する樹状細胞を解析したところ、Shootin1bのノックアウトにより樹状細胞の極性形成に異常が生じ（複数の先端の形成）、細胞移動速度が有意に減少した。これらの結果からShootin1bが樹状細胞においてクラッチ分子として機能し細胞移動を担うことが示唆された。

以上の一連の結果から、Shootin1bが脳、肺、肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、腎臓、皮膚といった組織に幅広く分布し、特に上皮組織の細胞間接着部位では、細胞接着分子E-cadherinおよびアクチン結合タンパク質Cortactinと共局在をすることが明らかとなった。また、Shootin1bが樹状細胞でクラッチ分子として機能し、ケモカインによる走化性の調節を行う可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 東口 泰奈

申請者らの研究室では、脳に発現し神経細胞の軸索の伸長およびガイダンスを担う Shootin1a を同定している。また、Shootin1a が、クラッチ分子として、軸索先端で Cortactin を介して逆行性移動するアクチン線維と相互作用し、細胞接着分子 L1-CAM と結合することで、アクチン線維と細胞外基質を連結して軸索伸長とガイダンスのための力を生み出すことが明らかとなってきた。一方、Shootin1a のスプライスバリエントとして Shootin1b が同定されていたが、その機能はわかっていなかった。

そこで申請者は、本研究で、Shootin1b の機能解析を目指した。Shootin1b のマウスにおける発現を解析したところ、Shootin1b の発現が、脳、肺、肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、腎臓、皮膚において検出された。また、Shootin1b が特に上皮細胞の細胞膜近傍に局在し、E-cadherin および Cortactin と共局在することがわかった。一方、Shootin1b は脾臓の樹状細胞にも発現していた。

そこで次に樹状細胞内の Shootin1b の局在を免疫細胞染色および一分子計測により解析したところ、Shootin1b が樹状細胞の先端端のアクチン線維および Cortactin、L1-CAM と共局在し、逆行性移動するアクチン線維と相互作用することが明らかとなった。さらにアクチンの一分子計測を行ったところ、Shootin1b のノックアウトにより樹状細胞のアクチン線維の逆行性移動速度が上昇した。よって、Shootin1b が樹状細胞内でクラッチ分子として機能することが示唆された。続いて、三次元環境下でケモカイン CCL19 の濃度勾配に従って走化性の移動をする樹状細胞の挙動を解析した。その結果、Shootin1b のノックアウトにより樹状細胞の極性形成に異常が生じ（複数の先端端の形成）、細胞移動速度が減少することがわかった。これらの結果から Shootin1b が樹状細胞においてクラッチ分子として細胞移動を担う可能性が示唆された。

以上の一連の結果から、Shootin1b が脳のみならず、肺や肝臓、胃、腸、脾臓、膵臓、腎臓、皮膚といった末梢組織にも幅広く分布することが明らかとなった。また、上皮組織の細胞間接着部位において、E-cadherin および Cortactin と共局在することから、Shootin1b がこれらの分子との相互作用を介して細胞接着を制御する可能性が示唆された。さらに、Shootin1b が樹状細胞でケモカインによる走化性を担い、その分子メカニズムとしてクラッチ分子として機能する可能性が示唆された。これまでに樹状細胞の細胞移動を担うクラッチ分子は報告がなく、本研究結果により、樹状細胞の細胞移動の分子メカニズムの解明が加速することが期待できる。

以上のように、本論文は Shootin1b の組織・上皮細胞における局在や樹状細胞の移動の分子メカニズムに新たな知見を示すもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。