

## 細胞の極性形成に重要な細胞間接着分子の結合メカニズムを解明

－ 1 分子蛍光顕微鏡と高速原子間力顕微鏡で明らかになった 2 分子間のらせん形結合 －

ExCELLS/国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科の内橋貴之教授と、大学共同利用機関法人自然科学研究機構 生命創成探究センター (ExCELLS) の西口茂孝特任研究員 (現職: 国立大学法人 大阪大学大学院工学研究科 特任助教)のグループは、国立大学法人東海国立大学機構 岐阜大学糖鎖生命コア研究所の笠井倫志特任准教授と共同で、細胞の極性形成に重要な細胞と細胞をつなぐ細胞間接着分子であるセルサーカドヘリン<sup>\*1</sup>の結合構造をナノメートル (100 万分の 1 ミリメートル) のスケールで可視化することに世界で初めて成功しました。研究グループは、1 分子蛍光顕微鏡<sup>\*2</sup>と高速原子間力顕微鏡<sup>\*3</sup>を用いて、セルサーカドヘリン 2 分子がらせん状に絡み合って結合する結合メカニズムを明らかにしました。セルサーカドヘリンを介した細胞間接着は、体毛の生える方向を決める細胞の極性形成や、脳神経のネットワークの形成等に重要であることから、セルサーカドヘリンの結合メカニズムを解明することで、私たちの複雑なからだの形作りやセルサーカドヘリンの結合障害によって生じる疾患発症の原理解明に繋がることが期待されます。

本研究成果は、国際科学雑誌「Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (米国科学アカデミー紀要)」(米国東部時間 2023 年 4 月 24 日) に掲載されました。

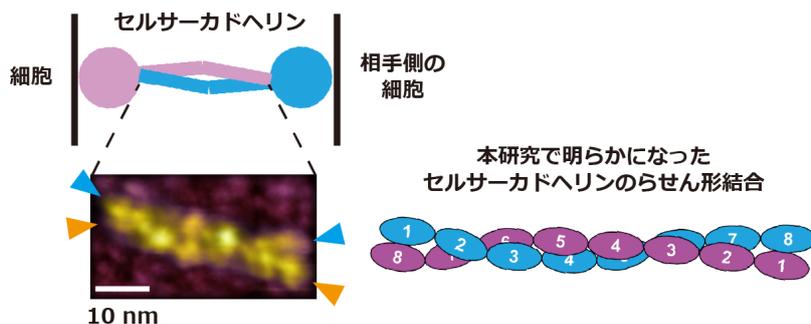


図 本研究で明らかになったセルサーカドヘリンの結合様式

## 発表のポイント

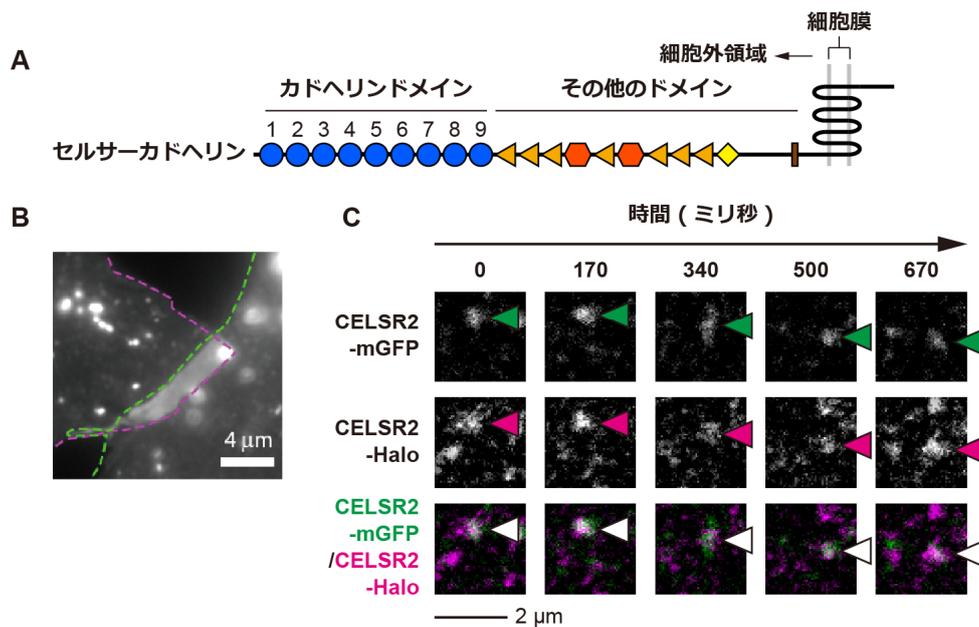
1. 細胞の極性形成に重要な細胞間接着分子であるセルサーカドヘリンの液中における結合構造を世界で初めて観察した。
2. 1 分子蛍光顕微鏡と高速原子間力顕微鏡を用いて、セルサーカドヘリンの 2 分子が逆平行に相対して、らせん状に結合する結合メカニズムを明らかにした。
3. セルサーカドヘリンの結合メカニズムを解明することで、私たちの複雑なからだの形作りや、セルサーカドヘリンの結合障害によって生じる疾患発症の原理解明に繋がることが期待される。

## 背景

私たちの複雑なからだの形作りは、臓器や組織を構成する細胞同士の接着（細胞間接着）によって制御されています。細胞間接着分子の一種であるセルサーカドヘリンは、体毛の生える方向や、神経細胞が移動する方向等の細胞の極性形成に重要であり、脳神経のネットワーク形成等の組織の複雑化にも関与することが知られています。細胞や臓器を用いた実験により、セルサーカドヘリンの生理学的な重要性は明らかになっていましたが、セルサーカドヘリンがどのようにして細胞と細胞をつなぐのかという結合メカニズムについては、セルサーカドヘリンを 1 分子のスケールで解析することが技術的に難しいため、これまで明らかにされていませんでした。

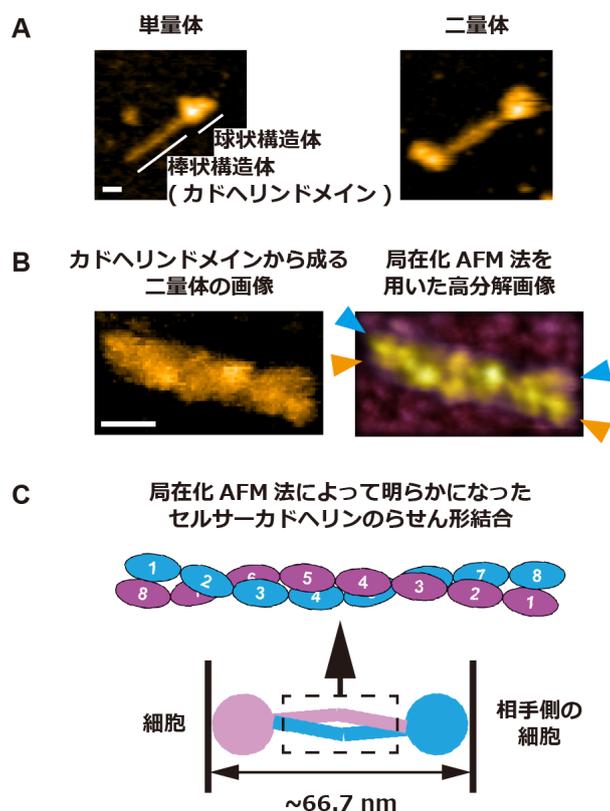
## 本研究の内容

研究グループは、異なる 2 色の蛍光分子で標識したセルサーカドヘリン（CELSR2-mGFP、CELSR2-Halo）を個別に発現する 2 種類の細胞を混合し、2 種類の細胞と細胞の境界における CELSR2-mGFP と CELSR2-Halo の動きを 1 分子蛍光顕微鏡で追跡しました。1 分子蛍光顕微鏡による観察の結果、細胞と細胞の境界において、2 色の蛍光分子が同一箇所に局在しながら長時間（～1 秒）・長距離（～1 マイクロメートル）移動することが明らかとなり、セルサーカドヘリン 2 分子が細胞と細胞の間で結合することで細胞をつないでいることが示唆されました（図 1）。



**図 1.** 1 分子蛍光顕微鏡による蛍光分子で標識したセルサーカドヘリンの観察。(A) セルサーカドヘリンのドメイン構成。セルサーカドヘリン間の結合を担う細胞外領域は 9 個のカドヘリンドメインとその他の複数のドメインから構成される。(B) 蛍光標識したセルサーカドヘリンを発現する細胞と細胞の境界の蛍光顕微鏡画像。緑とマゼンタで示した破線が隣り合う細胞の辺縁部を示している。隣り合う細胞が重なった領域でセルサーカドヘリンが濃縮していることから、細胞間界面で細胞間接着が生じている。(C) 異なる 2 色の蛍光分子で標識したセルサーカドヘリンの 1 分子蛍光顕微鏡画像。2 色の蛍光分子で標識したセルサーカドヘリン (CELSR2-mGFP と CELSR2-Halo) を別々に発現する細胞と細胞の境界で、2 色の蛍光標識セルサーカドヘリンが同一箇所を移動していることから、2 つの分子が細胞間で結合していることがわかる。

続いて、哺乳動物細胞から精製したセルサーカドヘリンの液中構造を、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) で観察した結果、セルサーカドヘリンはカドヘリンドメインと呼ばれるドメイン群から構成される棒状構造と、それ以外のドメイン群から構成される球状構造の 2 つの特徴的な構造を有しており、さらにカドヘリンドメインから成る棒状構造が逆平行に重なることで 2 つの分子が結合していることがわかりました (図 2)。高速 AFM で観察したセルサーカドヘリン 2 分子が逆平行に相對した結合構造は、1 分子蛍光顕微鏡で観察した、隣り合う細胞間における 2 分子間の結合状態を反映していると考えられます。さらに、高速 AFM で取得したセルサーカドヘリンの画像データに、近年開発された高分解能画像解析手法である局在化 AFM 法<sup>\*4</sup>を適用した結果、セルサーカドヘリンを構成する細胞膜遠位側の 8 個のカドヘリンドメインが、らせん状に絡み合って相互作用することで、2 分子間の結合構造が形成されることがわかりました (図 2)。また、ビーズを用いたセルサーカドヘリンの結合活性評価により、8 個のカドヘリンドメインの内、細胞膜遠位側から数えて 4 番目のカドヘリンドメインが 2 分子間の結合に特に重要であることが明らかになりました。



**図 2.** セルサーカドヘリンの高速 AFM 画像. (A) セルサーカドヘリン 1 分子 (単量体) とセルサーカドヘリン 2 分子 (二量体) の高速 AFM 画像。カドヘリンドメインから構成される棒状構造体が逆平行に重なることで二量体が形成されている。(B) 8 個のカドヘリンドメインから成る分子の二量体の高速 AFM 画像 (左図) と局在化 AFM 法を適用した高分解能画像 (右図)。8 個のカドヘリンドメインが全て重なり、かつらせん状に絡み合うことで二量体を形成している。色付きの矢頭は二量体を構成する個々の分子の両端を示す。(C) 高速 AFM と局在化 AFM 法によって明らかになったセルサーカドヘリンの結合モデル。A と B の高速 AFM 画像のスケールバーは 10 nm。

### 本研究の発見の意義

本研究結果は、これまで生理学的な重要性が報告されていたセルサーカドヘリンによる細胞間接着メカニズムの解明に大きく貢献する成果です。セルサーカドヘリンはカドヘリンと呼ばれる細胞間接着分子の一種ですが、過去に結合様式が報告されているクラシカルカドヘリン<sup>\*5</sup>では、2 個のカドヘリンドメインが 2 分子間の結合に必要であることに対して、セルサーカドヘリンではこれまでに報告されているカドヘリンの中で最も多い、8 個のカドヘリンドメインが細胞間の結合に関与することが本研究で明らかになりました。8 個のカドヘリンドメインを介した 2 量体<sup>\*6</sup>は、クラシカルカドヘリンの 2 量体 (37.3–38.5 nm) よりも 2 倍近く大きい (~66.7 nm) ことから、セルサーカドヘリンが細胞間の距離を大きく保つことで、細胞間の情報交換に必要な細胞外小胞<sup>\*7</sup>等の分子を通過させるためのスペーサーとして働く可能性を示しています。今後さらに詳細な解析を進めることで、本研究で発見したセルサーカドヘリンの結合構造の機能的意義を明らかにすることが期待されます。

## 今後の研究の展望

1. 本研究では、セルサーカドヘリンの結合様式および結合に必要な領域が明らかになった一方で、セルサーカドヘリンを構成する個々のドメインの詳細な役割について明らかにする必要があります。今後、X線結晶構造解析<sup>\*8</sup>やクライオ電子顕微鏡<sup>\*9</sup>を用いた構造解析により、セルサーカドヘリンの各ドメインが2分子間の結合に与える影響を明らかにすることを予定しています。
2. 精製したセルサーカドヘリンの90%以上が、カドヘリンドメインから成る棒状構造を介した2量体を形成していた一方で、その他のドメインから成る球状構造を介した複合体もわずかに観察されたことから、セルサーカドヘリンは細胞膜の足場が存在する実際の細胞間隙では多様な結合構造を形成する可能性があります。今後は、セルサーカドヘリンを発現する細胞や、セルサーカドヘリンを固定したリポソーム<sup>\*10</sup>を高速AFMやクライオ電子顕微鏡を用いて観察することで、より生理環境に近い条件での構造解析を予定しています。
3. セルサーカドヘリンが細胞間隙を広げるスペーサーとして働くことで、細胞間の情報交換に必要な分子を通すという仮説を検証することは、セルサーカドヘリンの結合様式の機能的意義の解明に必要です。今後は一部のドメインを欠損させた分子を培養細胞や動物個体で発現させることで、どのような影響が生じるか解析することを予定しています。

## 用語説明

### \*1 セルサーカドヘリン

細胞と細胞をつなぐ細胞外領域、細胞膜を貫通する7回膜貫通領域、細胞内領域から構成される。カドヘリンスーパーファミリーおよび接着型Gタンパク質共役受容体に分類され、細胞の極性形成に必須の分子である。相手側の分子と結合することで細胞と細胞をつなぐ。

### \*2 1分子蛍光顕微鏡

蛍光1分子由来の微弱な蛍光を輝点として検出可能な蛍光顕微鏡。個々の蛍光輝点を識別することで、分子の拡散計数や、相互作用する分子の数、移動量、結合時間等を計測することが出来る。

### \*3 高速原子間力顕微鏡 (高速AFM)

先端の直径が数ナノメートルの針を、観察対象物(タンパク質等)に接触することで、その表面形状を観察する顕微鏡。溶液中において、観察基板に吸着させた観察対象物を高速(～10フレーム/秒)でスキャンすることにより、その動きをリアルタイムに画像化することが出来る。

### \*4 局在化AFM法

AFM画像の高分解能解析手法。1分子あるいは異なる分子の複数枚の画像信号の局所的最大値

を重ね合わせることで、AFM の針の先端の大きさに由来する分解能の低下を排除した、高分解能画像を再構成することが出来る。

#### \*5 クラシカルカドヘリン

細胞と細胞をつなぐ細胞外領域、細胞膜を貫通する 1 回膜貫通領域、細胞内領域から構成される。セルサーカドヘリンと同じく、カドヘリンスーパーファミリーに分類される細胞間接着分子であり、からだの形作りに必要不可欠の分子。

#### \*6 2 量体

2 つの分子が物理的・化学的な力によって集合した分子。

#### \*7 細胞外小胞

細胞から分泌される脂質二重膜からなる小胞。細胞が相手側の細胞にタンパク質や核酸を内包した細胞外小胞を送ることで情報を伝達することが知られている。

#### \*8 X 線結晶構造解析

タンパク質の結晶を X 線を用いて解析することで、タンパク質を構成する原子の配置を特定する解析手法。

#### \*9 クライオ電子顕微鏡

急速凍結した分子に電子線を照射することで分子の微細構造を観察することが出来る顕微鏡。

#### \*10 リボソーム

人工的に作製された脂質二重膜からなる球体。細胞を模倣した足場として、細胞膜に提示される分子間の相互作用を解析するための有効な材料の一つ。

### 研究サポート

本研究は、科学研究費補助金 若手研究 (22K14577; 西口茂孝)、基盤研究 (17K07333; 18H05269; 20H03225; 笠井倫志; 21H01772; 内橋貴之)、挑戦的研究 (22K18943; 内橋貴之)、新学術領域研究 (18H05424; 笠井倫志; 21H00393; 内橋貴之)、ExCELLS 連携研究 (18-101; 内橋貴之)、ExCELLS 一般共同利用研究 (22EXC312; 笠井倫志) 等の支援を受けて実施されました。

### 論文情報

雑誌名:

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

論文名:

Antiparallel dimer structure of CELSR cadherin in solution revealed by high-speed atomic force microscopy

著者: Shigetaka Nishiguchi\*, Rinshi S. Kasai\*, Takayuki Uchihashi\* (\*責任著者)

DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2302047120>

URL: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2302047120>