

令和 2 年 12 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08269

研究課題名(和文)上皮細胞におけるトリセルラージャンクションの構築機構とその役割

研究課題名(英文)Dissecting the mechanism of constructing tricellular junctions in epithelial cells

研究代表者

小田 裕香子(Oda, Yukako)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70452498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮組織のバリア機能はタイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置によって担われる。タイトジャンクションのバリア機能は、2つの細胞間を接着するクローディングファミリーによって担われることが知られる。しかしながら3つの細胞が集まるトリセルラージャンクション(tTJ)の構築機構に関しては不明な点が多い。本研究では、上皮細胞のtTJ構築において最も上流で制御するLSR/Angulin-1のtTJへの局在化機構の解明を行い、脂質修飾が重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイトジャンクションは上皮のバリア機能を担う、隣り合う2つの細胞間の接着装置である。トリセルラージャンクションは、3つの細胞が出会う特殊な細胞間の接着装置であり、タイトジャンクションと共にバリア機能に重要な役割を果たす。しかしながら、トリセルラージャンクションはタイトジャンクションに比べると研究が遅れており理解が進んでいない。本研究課題では、トリセルラージャンクションの構築に重要な役割を果たすLSR/Angulin-1分子に着目し、その局在制御機構の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：Tight junction plays a role of barrier function in epithelia. Tight junction is composed of claudin family which seal bicellular junctions. However, constructing mechanism of tricellular junction is still unknown. In this research, palmitoylation is required for LSR/Angulin-1 to localize tricellular junction which regulates tricellular junction constitution in the most upstream.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 タイトジャンクション トリセルラージャンクション バリア

1. 研究開始当初の背景

上皮組織は、異なる環境を分けるバリアとして働く。このバリア機能はタイトジャンクション (TJ) と呼ばれる細胞間接着装置によって担われる (図 1)。TJ の構成因子である Claudin ファミリーのノックアウトマウスは、胎生致死や脱水、難聴などの病態を示すことから、TJ は生体内におけるバリア機能に必須の役割を果たしているといえる。claudin は細胞の周りを取り囲み、細胞間隙をシールすることでバリア機能を発揮している (図 1)。しかしながら、上皮細胞シートには claudin による 2 細胞間の接着ではカバーできない、3 つの細胞が接着するトリセルラージャンクションが存在する。トリセルラージャンクションは、上皮細胞シートにおける多角形の個々の細胞の“頂点”に相当する。トリセルラージャンクションは、1970 年代にその特殊な構造が報告されて以来、機能や役割は長らく不明であったが、近年、2 細胞間接着とは異なった重要な機能を果たす可能性が明らかになりつつある。このような状況の中、トリセルラージャンクションに局在し、バリア機能を担う分子としてトリセルリンが報告されたが (Ikenouchi *et al.*, *J. Cell. Biol.* 2005)、トリセルラージャンクションの構造や機能についてはいまだ不明な点が多かった。

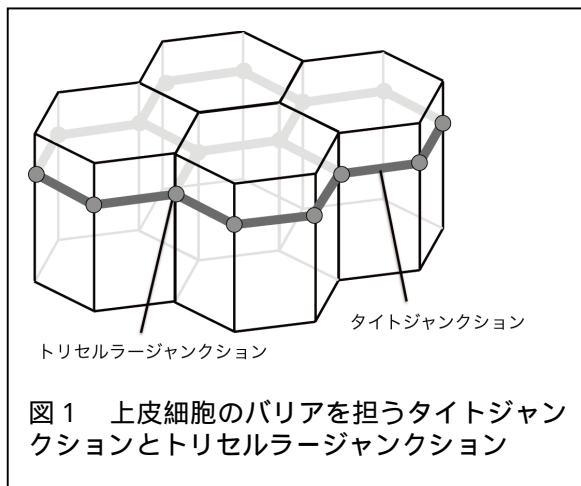


図 1 上皮細胞のバリアを担うタイトジャンクションとトリセルラージャンクション

2. 研究の目的

我々はこれまでに、細胞内局在を指標にした発現スクリーニングにより、トリセルラージャンクションでバリア機能を発揮し、かつトリセルリンのトリセルラージャンクションへの局在を制御する分子群 Angulin family の同定に成功した (Masuda and Oda *et al.*, *J. Cell. Sci.* 2011, Higashi *et al.*, *J. Cell. Sci.* 2013)。

Angulin family はトリセルリンのトリセルラージャンクションへの局在を制御する。すなわち、Angulin family はトリセルラージャンクションを構成する分子群の最上流に位置し、下流の分子の局在および機能を制御しながらバリア機能を発揮する。トリセルラージャンクションにおけるバリア機能は、上皮組織が恒常的に機能する上で、また創傷時やがんなどの病態において重要であるが、その最上流のトリガーは不明である。そこで本研究は、LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在機構を解明することで、トリセルラージャンクションのバリア構築メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に必要な配列領域の検討

LSR/Angulin-1 の細胞質領域について様々な長さに削り、トリセルラージャンクション局在化に必要な領域を検討した。

(2) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化メカニズムの解明

(1) で同定した配列内にはシステインが多く含まれており、クラスターを形成していることがわかった。そこで、このシステインクラスターに変異を導入し、当該システインが LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化を制御しているかを検討した。

(3) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に脂質が関与する可能性の検討

システインへの翻訳後修飾として脂質修飾が知られており、LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に関して脂質が関与するかどうかを検討した。

(4) LSR/Angulin-1 と結合するタンパク質のスクリーニング

LSR/Angulin-1 と協調して機能するタンパク質を網羅的に探索・同定するため、LSR/Angulin-1 の細胞質領域をベイトに yeast two-hybrid screening を行った。

(5) LSR/Angulin-1 の脂質修飾を担う酵素

の同定

脂質修飾の一つであるパルミトイル化を触媒する酵素として DHHC ファミリーが知られる。DHHC ファミリーが LSR/Angulin-1 のパルミトイル化を促進するかを検討した。

(6) 脂質修飾酵素と LSR/Angulin-1 の結合の検討

酵母 two-hybrid screening により結合タンパク質候補として取れてきた DHHC6 が LSR/Angulin-1 と結合するかを検討した。

(7) DHHC6 機能欠失の影響の検討

内在性の DHHC6 を検出するため、特異的に認識する抗体を作成した。DHHC6 の機能欠失による LSR/Angulin-1 の局在化への影響を検討するため、培養上皮細胞において DHHC6 遺伝子のノックダウン及びノックアウトを行った。

4. 研究成果

(1) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に必要な配列領域の検討

LSR/Angulin-1 の細胞質領域について様々な長さに着目した変異体を上皮細胞に導入し、局在を免疫染色により検討した結果、細胞膜直下の約 40 アミノ酸の領域が LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に必要であることがわかった。

(2) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化メカニズムの解明

(1) で同定した領域内のシステインクラスターに着目し、システインをセリンに置換した変異体を上皮細胞に導入した。局在を免疫染色により検討した結果、システインが LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に必要であることがわかった。

(3) LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクション局在化に脂質が関与する可能性の検討

システインへの翻訳後修飾として脂質修飾に着目した。培養上皮細胞に対してメチル-β-シクロデキストリン処理を行い、コレステロールを細胞内から枯渇させると LSR/Angulin-1 のトリセルラージャンクションへの局在が変化し、コレステロールの影響

を受けることがわかった。

(4) LSR/Angulin-1 と結合するタンパク質のスクリーニング

LSR/Angulin-1 の細胞質領域について、3種類の長さのコンストラクトを作成し、それぞれをベイトとして酵母 two-hybrid screening を行ったところ、脂質修飾であるパルミトイル化を触媒する酵素である DHHC ファミリーの一つである DHHC6 を同定した。

(5) LSR/Angulin-1 の脂質修飾を担う酵素の同定

DHHC ファミリーが LSR/Angulin-1 のパルミトイル化を促進するかに関して、LSR/Angulin-1 とそれぞれの DHHC を過剰発現させた培養細胞に放射性標識したパルミチン酸を取り込ませ、代謝ラベル実験を行った。LSR/Angulin-1 で免疫沈降し、SDS-PAGE にて展開したところ、LSR/Angulin-1 が複数の DHHC によってパルミトイル化されていることがわかった。また、APEGS 法によっても LSR/Angulin-1 がパルミトイル化されていることがわかった。また、(2) で得られたシステイン変異体ではパルミチン酸の取り込みが少なくなり、システイン残基がパルミトイル化修飾されていることが示唆された。

(6) 脂質修飾酵素と LSR/Angulin-1 の結合の検討

酵母 two-hybrid screening により結合タンパク質候補として取れてきた DHHC6 が LSR/Angulin-1 と結合するかを検討するため、両者を過剰発現させた細胞を用い、免疫沈降を行ったところ、両者の結合を確認した。

(7) DHHC6 機能欠失の影響の検討

培養上皮細胞において DHHC6 遺伝子の破壊を行い、LSR/Angulin-1 のパルミトイル化への影響を検討したところ、目立った変化は認められなかった。結合は認められたものの DHHC6 が重要でないか、他の DHHC が重複した機能を持っていると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Oda Y, Sugawara T, Fukata Y, Izumi Y, Otani T, Higashi T, Fukata M, Furuse M

The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required

for angulin-1 assembly at tricellular contacts

Journal of Biological Chemistry 295(13), 4289-4302 (2020)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 岡田 拓也、小田 裕香子、一條 遼、豊島 文子 出産後の皮膚収縮における表皮細胞のダイナミクス解析 日本分子生物学会・日本生化学会合同年次大会 (ConBio2017)、2017 年
2. 廣田 紗奈、小田 裕香子、豊島 文子、細胞分裂軸制御におけるメカノセンサーの機能解析 第 41 回日本分子生物学会、2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www2.infront.kyoto-u.ac.jp/Toyoshima-HP/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 裕香子 (Yukako Oda)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教
研究者番号：70452498

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)研究協力者

()