

令和元年6月3日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15226

研究課題名(和文) クローディン完全欠失上皮細胞の作製による細胞間隙輸送の再構成

研究課題名(英文) Reconstitution of paracellular transport by establishment of a claudin-deficient epithelial cell line.

研究代表者

古瀬 幹夫 (Furuse, Mikio)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号：90281089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：イヌ腎臓由来上皮細胞株MDCK II脂肪に内在的に発現するクローディンファミリー遺伝子のうち、クローディン2、クローディン4、クローディン3、クローディン7、クローディン1の遺伝子をゲノム編集技術の一つであるTALEN法を用いて破壊した。その結果、タイトジャンクションを欠失した上皮細胞株を樹立することに成功した。この細胞は上皮バリア機能が著しく低下したが、上皮細胞極性は正常であった。この細胞に上記クローディンのサブタイプを一つずつ再発現させることにより、いずれのクローディンサブタイプでも機能的なタイトジャンクションを再構成させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、特定のクローディンサブタイプだけで再構成されたタイトジャンクションの機能を解析することがはじめて可能となり、クローディンのサブタイプの機能特性の相違に基づく傍細胞経路の透過性制御の分子機構の理解が一層進む。さらに、本研究で世界に先駆けて樹立されたタイトジャンクション欠失上皮細胞の特性を解析することにより、上皮細胞におけるタイトジャンクションの意義を詳細に解析することが可能となった。その成果は上皮細胞生物学における細胞接着、細胞極性の研究領域で重要な知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have established an epithelial cell line which lacks claudin-based tight junctions by disrupting claudin family genes, including claudin-2, claudin-4, claudin-3, claudin-7 and claudin-1, by genome editing in MDCK II cells. The cells, designated claudin quin KO cells, lacked claudin-based tight junction strands and showed the remarkably reduced epithelial barrier function with normal epithelial polarity. Introduction of each of the above claudins into claudin quin KO cells reconstituted functional tight junctions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クローディン タイトジャンクション 上皮バリア機能 細胞間接着 上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、細胞間隙における水溶性分子の透過障壁としてはたらく細胞間接着装置タイトジャンクション (TJ) により、傍細胞経路の物質輸送を制御している。TJ の透過障壁構造の本体は膜タンパク質クローディングファミリーである。クローディングファミリーは 20 を超えるサブタイプからなる 4 回膜貫通タンパク質で、ほぼ全ての上皮で細胞あたり複数のクローディングサブタイプが共発現しており、TJ の機能を担う中核構造はこれらのサブタイプ分子がモザイク状に配置されたものと考えられている。各サブタイプごとの機能の特徴を知ることが当研究分野の重要な課題の一つであるが、従来の研究では、複数のサブタイプを発現する培養上皮細胞にあらたに 1 種類のサブタイプを遺伝子導入し、その前後で細胞シートの傍細胞輸送特性を比較することにより、導入したサブタイプの機能を推測してきた。その結果、クローディングには強いバリアを形成するタイプとチャネル様の穴を形成するタイプがあり、発現する各タイプの組み合わせが各上皮に特有の傍細胞輸送特性 (コンダクタンス、荷電選択性、サイズ選択性等) を規定するという TJ の構築と機能制御の基本概念が確立している。しかし、一連の研究には大きな問題が残されていた。すなわち、これまで TJ の機能は「複数のクローディングサブタイプの組み合わせの総和」として評価するしかなく、各サブタイプ単独の特性を直接測定することができなかった。各クローディングサブタイプ単独の正確なバリア/チャネル特性を知ることが、TJ の機能を還元論的に理解するために欠かせず、TJ の研究分野における重要な未解決課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、培養上皮細胞に発現しているクローディングサブタイプ全ての遺伝子を欠損させることにより、そのままでは TJ をもたないが、クローディングを強制発現させればそのクローディングで TJ が形成される「クローディング完全欠失上皮細胞株」を作製する。この細胞に特定のクローディングを単独で発現させ、TJ を再構成させるとともに、単独クローディングサブタイプにより形成される TJ のバリア/チャネル特性を直接測定することを本研究の目的とした。さらに、その特性を実際の組織と比較して解析することにより、上皮の傍細胞輸送を各クローディング単独の特性に基づき論理的に説明することを本研究の最終的な目標とした。

3. 研究の方法

(1) MDCKII 細胞に発現するクローディングサブタイプの決定とタンパク質の検出

材料として、イヌ腎臓由来上皮細胞株である MDCK II 細胞を用いた。まず、イヌゲノム配列情報を利用して、MDCK II 細胞に発現するクローディングタイプ cDNA 全てを RT-PCR により増幅して単離した。これら cDNA の 5' 側にエピトープタグ配列を結合させた形で発現ベクターにクローニングした。これらの発現ベクターを線維芽細胞に導入し、発現させたクローディングに対する既存の抗クローディング抗体の反応性を蛍光免疫染色法で調べた。

(2) クローディング欠失上皮細胞の作製

各クローディングに変異を入れるために、イヌゲノム情報を利用して作成された、ゲノム編集技術の一つである TALEN の発現プラスミドを MDCK II 細胞にトランスフェクションして 96 ウェルプレートにまき直し、さらにこれを 96 ウェルプレート 2 枚 (蛍光免疫染色用とバックアップ) に分けた。1 枚のプレートについて、欠損させるべきクローディングの抗体で蛍光免疫染色を行い、染色陰性の細胞を高い割合で含むウェルのバックアップ細胞を限界希釈によりまき直し、最終的にこのクローディングを欠失した細胞クローンを得て、変異導入を塩基配列決定により確認した。この操作を各クローディングサブタイプについて繰り返した。具体的には研究スタート時に樹立されていたクローディング 2 とクローディング 4 の二重欠失細胞を用いて、クローディング 3、クローディング 7、クローディング 1 遺伝子について TALEN による変異導入を順次実施して、これらクローディング遺伝子産物を発現していない細胞を取得した。その結果、研究成果の項に述べるように TJ の形態的特徴である TJ ストランドが完全に欠失したので、この細胞を TJ ストランド欠失 MDCK 細胞と名付けた。

(3) TJ ストランド欠失 MDCK 細胞の特性の解析

TJ ストランド欠失 MDCK 細胞、およびその樹立の過程で作成された細胞について、TJ 関連分子の局在を蛍光免疫染色で解析するとともに、フィルターカップで培養することにより上皮バリア機能を経上皮電気抵抗 (TER) およびフルオレセイン (分子量 332) の傍細胞経路流量の測定により評価した。さらに、これら細胞における TJ の形態を超薄切片法、凍結切断レプリカ法により電子顕微鏡観察した。

(4) 単独クローディングからなる TJ の再構成と機能解析

TJ ストランド欠失 MDCK 細胞に、欠失させたクローディング 1、クローディング 2、クローディング 3、クローディング 4、クローディング 7 の発現ベクターをそれぞれトランスフェクションすることにより、これらクローディングを単独で発現して TJ を再構成させた安定発現株を単離し、TER と傍細胞経路流量の測定から上皮バリア機能を測定した。また、これら細胞の TJ の形態と発達度を凍結切断レプリカ法により電子顕微鏡レベルで解析した。

4. 研究成果

(1) MDCKII 細胞に発現するクローディングサブタイプの決定とタンパク質の検出

RT-PCRの結果から、MDCKII細胞には上記以外に少なくとも、クローディング6、8、12、16、20、22がmRNAレベルで発現していることを明らかにした。MDCKII細胞がイヌ腎臓に由来することから、これらクローディングファミリーのイヌcDNAをクローニングし、発現ベクターに組み込んで、マウス線維芽細胞に強制発現させ、マウス、ヒト、マウスのクローディングファミリーに対して作製された自作あるいは市販されている既存の抗体がこれらイヌクローディングタンパク質を認識するかを調べた。その結果、イヌのクローディング6、8、12、16、20は既存抗体により蛍光抗体法で検出できることが明らかになった。

(2) TJストランド欠失MDCK上皮細胞の樹立とその性状の解析

ゲノム編集による人為的変異導入により、クローディング1、クローディング2、クローディング3、クローディング4、クローディング7を多重に欠失する上皮細胞株(クローディング5重欠失細胞)2クローンの樹立に成功した。これらの細胞では、親株であるMDCKII細胞、および実験の過程で得られたクローディング多重欠失細胞と比較して、TJの膜タンパク質であるオクルディンの蛍光免疫染色の顕著に低下していること、細胞間接着部位の形状が直線的であること明らかとなり、クローディングの多重欠失の蓄積の結果、この細胞に何らかの変化が生じたことが示唆された。そこでこの細胞の上皮バリア機能をTER、フルオレセインの傍細胞経路流量により評価したところ、出発材料であったクローディング2、クローディング4二重欠失細胞と比較して著しく低下していた。クローディング2、クローディング4、クローディング3、クローディング7を欠失する細胞(クローディング4重欠失細胞)でも同様に上皮バリア機能が大きく低下していた(図1)。次に、これらの細胞を凍結割断レプリカ法により電子顕微鏡観察したところ、クローディング5重欠失細胞では、TJの最大の形態学的特徴であるTJストランド構造が完全に欠失していた。またクローディング4重欠失細胞では、不連続な一本のTJストランドが観察された。したがって、クローディング5重欠失細胞はクローディングによりTJを完全に失った細胞であると判断した。クローディング5重欠失細胞を本報告書ではTJストランド欠失MDCK細胞と記載する。

本研究における予想外の結果として、TJストランド欠失MDCK細胞では、タイトジャンクションストランドがないにもかかわらず、超薄切片法では一見タイトジャンクションに見える細胞膜のきわめて近接した接着部位が細胞間に見られた。ちなみに、クローディングの細胞質領域に結合し、TJ形成に必要であることが報告されているTJの裏打ちタンパク質ZO-1、ZO-2を二重に欠失させたMDCKII細胞(別のプロジェクトで作成済み)では、隣り合う細胞には明らかな間隙が存在し、TJストランド欠失MDCK細胞のような細胞膜の密着は観察されなかった。様々な分子量のFITCデキストランを用いて傍細胞経路流量を測定したところ、TJストランド欠失MDCK細胞は、ZO-1・ZO-2二重欠失MDCK細胞と比較して、分子量4kDaより大きいトレーサーに対して明らかなバリア機能を有することが明らかになった。

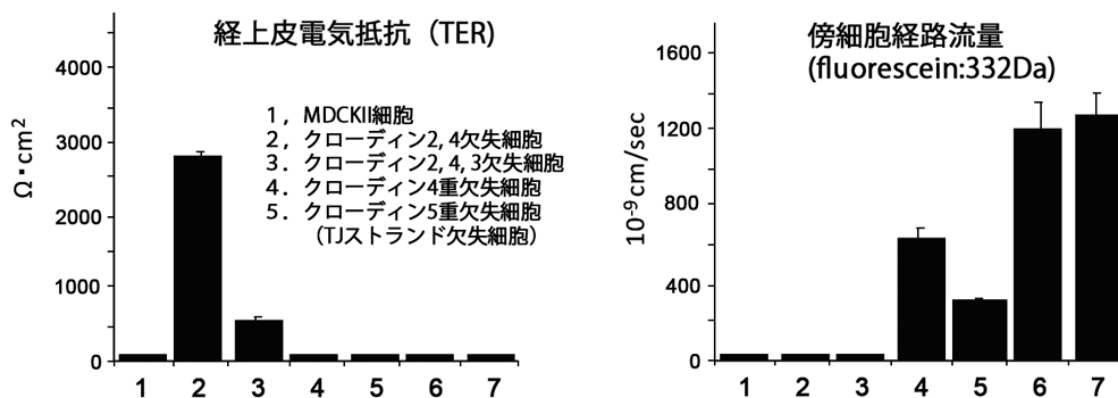


図1. クローディング多重欠失細胞の上皮バリア機能

(3) クローディング欠失上皮細胞におけるクローディングサブタイプの単独発現とTJの再構成

TJストランド欠失MDCK細胞に、欠失させたクローディング1、クローディング2、クローディング3、クローディング4、クローディング7の発現ベクターをそれぞれ導入し、これらクローディングを安定的に発現する細胞クローンを樹立した。いずれの細胞クローンにおいても、蛍光免疫染色において、導入したクローディングサブタイプが本来のTJの領域に局在し、TJストランド欠失MDCK細胞では極めて弱かったオクルディンのシグナルが増強された。次に、各クローディングサブタイプを単独で発現するこれらの細胞クローンの上皮バリア機能をTER、フルオレセインの傍細胞経路流量により評価したところ、クローディング2を発現する細胞以外ではコントロール細胞と比較してTERの顕著な上昇が見られ、クローディング2を含む全てのサブタイプについて、傍細胞経路流量の顕著な低下が観察された(図2)。クローディング2が陽イオン選択性チャネル様の特性をもつことからTERは上がらないとの想定も考え合わせて、いずれのクローディングを単独で発現させた細胞クローンにおいても機能的なTJが再構成されていることが示された。さらに、クローディング1を単独で発現する細胞クローンを凍結割断レプリカ法により解析した結果、連続したTJストランドが再構成されていることが確認された。

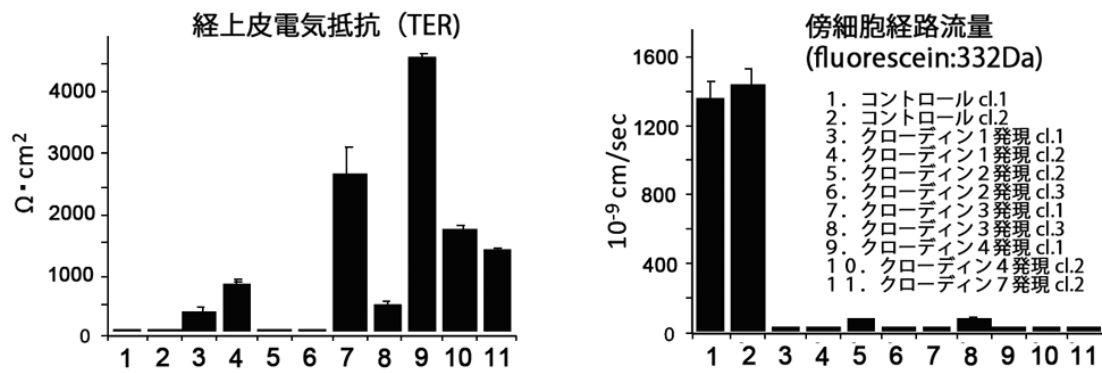


図2. TJストランド欠失MDCK細胞にクローディン各サブタイプを単独で発現させてTJを再構成させた細胞のバリア機能

以上、当初の目的の通り、ゲノム編集技術を利用してクローディン遺伝子をMDCK II細胞で多重に欠失させることにより、TJストランド欠失MDCK細胞、すなわちTJを持たない上皮細胞株を樹立することに成功した。さらにこの細胞にクローディンのサブタイプを単独で再発現させることにより、ほぼそのクローディンのサブタイプだけで形成された機能的なTJを再構成させ、その特性を生理学的に解析することに成功した。クローディン2に関しては、従来電解質を透過させるチャンネル様特性を持つことが知られていたが、その活性が他のサブタイプとのモザイク形成で生じるものでなく、クローディン2単独で発揮されていることが示唆される。今回、遺伝子発現を欠失させた5つのクローディン以外に、まだMDCKII細胞にはRT-PCRレベルで検出されるクローディンのサブタイプが発現している。今後、任意のクローディンサブタイプで再構成されたTJの機能特性を調べるためにTJストランド欠失MDCK細胞を広く用いるには、本細胞において、残りの内在性クローディンサブタイプが発現量が少ないことをRNAseq等で確認し、かつ再構成させたTJにこれらサブタイプが混入しないことを抗体で確認する必要がある。

一方、TJストランド欠失細胞において見出された2細胞間の細胞膜密着構造と高分子トレーサーに対する傍細胞バリア機能は、TJのバリアが2つの要素、すなわちクローディンが形成するTJストランドによる電解質等の低分子に対するバリア構造に加え、クローディンに依存しない細胞膜密着による高分子に対するバリア構造から構成されるという新しい概念を提唱するものである。今後、この細胞膜密着構造を構成する接着分子を同定してその機能を解明することを通じてTJの分子解剖と機能の理解がさらに進展することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- (1) Castro Dias M, Coisne C, Lazarevic I, Baden P, Hata M, Iwamoto N, Francisco DMF, Vanlandewijck M, He L, Baier FA, Stroka D, Bruggmann R, Lyck R, Enzmann G, Deutsch U, Betsholtz C, Furuse M, Tsukita S, Engelhardt B. Claudin-3-deficient C57BL/6J mice display intact brain barriers. *Sci Rep.* 9(1):203 (2019). doi: 10.1038/s41598-018-36731-3. 査読有
- (2) Tokuda S, Hirai T, Furuse M. Claudin-4 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: Claudin-4 is dispensable for the permeability properties of tight junctions in wild-type MDCK cells. *PLoS One.* 12(8):e0182521 (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0182521. eCollection 2017. 査読有

(3)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Furuse M, Otani T, Sugawara T, Tokuda S, Watanabe M, Furuse K, Nagata O. Establishment of a tight junction-deficient epithelial cell line by genome editing of claudin genes. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences. 2019
- (2) Otani T, Tokuda S, Furuse M. ZO family proteins regulate epithelial polarity independent of tight junction strand assembly. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences. 2019
- (3) Otani T, Tokuda S, Furuse M. ZO family proteins regulate epithelial polarity independent of Tight Junction strand assembly. 第70回日本細胞生物学会大会 2018
- (4) Sugawara T, Furuse M. Angulin-1 regulates vertical elongation of tricellular tight junction by interacting with scaffolding proteins. 第70回日本細胞生物学会大会 2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/dcs/>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大谷 哲久

ローマ字氏名：(OTANI, Tetsuhisa)

研究協力者氏名：菅原 太一

ローマ字氏名：(SUGAWARA, Taichi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。