

令和 2 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08735

研究課題名(和文)ジスルフィド結合を介したタイト結合機能調節：細胞増殖因子としての機能解明

研究課題名(英文)Tight junction regulates cell proliferation via disulfide bond formation

研究代表者

田中 敏(Tanaka, Satoshi)

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タイト結合膜蛋白occludinに含まれるジスルフィド結合の位置や機能を解析した。ジスルフィド結合は細胞外ループの2つのシステインにあり、occludinの低酸素下での安定性にHIF-1とユビキチン化を介して関与している。Occludinのユビキチン化は腫瘍細胞の増殖やアポトーシスに関与している。Occludinの細胞質内部分にあるシステインは容易に酸化されやすく、シグナル伝達に関与している可能性が考えられた。そのほかに、膜貫通部分の3つのシステインでもジスルフィド結合が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイト結合は上皮細胞間の最も外界に近い部位にあり、周囲環境に影響を受けているとともに、周囲の情報を細胞内に伝えていると推測されている。今回の研究ではタイト結合膜蛋白のジスルフィド結合に着目して、主に周囲酸化還元環境への反応性と細胞増殖のメカニズム解明を試みた。この研究が進むことにより、タイト結合を持つ組織の発生や、腫瘍の増殖機構解明が進む。また周囲からのバリアという観点から、アレルギーや感染症への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The location and the function of disulfide bond in occludin, a transmembrane protein in tight junction, was investigated. A disulfide bond in extracellular loop of occludin affects its stability under hypoxia via HIF-1 and its ubiquitination. Occludin affects cell proliferation and apoptosis via its ubiquitination. Cysteines in intracytoplasmic tail of occludin may be involved in cell signaling due to its high activity. Also 3 cysteines in transmembrane lesion of occludin form disulfide bond.

研究分野：病理学

キーワード：タイト結合 ジスルフィド結合 redox thioredoxin ユビキチン シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究対象の背景及び判明していたこと

タイト結合とは、上皮や血管内皮の細胞間に存在する微小構造である。細胞間の隙間を埋めるバリア機能のみでなく、細胞極性形成やシグナル伝達、輸送機能など様々な機能を持ち、発生や臓器形成に深くかかわっている。タイト結合は occludin、tricellulin、claudin、JAM などの膜貫通蛋白と ZO-1、ZO-2、ZO-3 などの膜裏打ち蛋白から構成されている。上皮組織では、外界と近接した部位にあり、タイト結合は外部環境の影響を受けやすいと考えられる。しかし従来のタイト結合研究は各々の蛋白発現調節の解析が主で、各分子の蛋白発現後の蛋白修飾、二次構造形成、細胞膜への輸送、タイト結合の構造形成に関する研究は全く進んでいなかった。特に外部の酸化還元状態に大きく影響されると思われる、タイト結合蛋白のジスルフィド結合に関してはほとんど検索されてなく、これまでは JAM のみが安定したジスルフィド結合を持つことが分かっているのみであった。

(2) 本研究の着想に至った動機

研究開始当初までにあった報告では、occludin が HCV 感染に際し小胞体へ集積すること、redox 依存性にオリゴマーを形成することが報告されてきていた。しかし、それらの現象の意義やメカニズムは明らかにされていなかった。これらの報告の関連性に着目し、occludin がジスルフィド結合を持ち、それを介した細胞内分布調節が起こっていること、ジスルフィド結合の調節の因子として、小胞体の thioredoxin family 蛋白による蛋白折り畳みとともに、外界の酸化還元環境を考える必要性を考えた。

(3) 研究開始前までの実験成果

そこで、上皮系組織での occludin のジスルフィド結合の影響を調べるために、上皮系培養細胞に occludin の野生型およびシステイン(Cys)変異型を発現させ、occludin の細胞内動態を検討してきた。その結果、1: occludin の Cys のうち、細胞外ループに存在する Cys216 や Cys237 をアラニン(Ala)変異させると、occludin が細胞質内に集積し、低酸素環境での occludin の分解が亢進する、2: occludin のユビキチン E3 リガーゼ ITCH 認識配列(PPxY)を変異させると、Cys 変異型 occludin の低酸素分解が抑制されることを見出した。また、3: PPxY 変異型 occludin はヌードマウス皮下に接種した腫瘍で増殖抑制性に働くことも判明した。これらの結果は、occludin がジスルフィド結合を介して周囲酸化還元環境を感知し、ユビキチン化を利用して細胞内分布や全体量を調節し、細胞増殖機能に関与することを示唆している。しかし、周囲環境が低酸素であることは細胞膜上の蛋白のジスルフィド結合を切断する方向に働くように思われ、Cys 変異型 occludin が影響されるとの実験結果と合わないと思われた。従って、occludin を始めとして、タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の機能解明には、細胞膜上だけでなく、細胞膜上に出るまでに受ける二次修飾の有無や細胞内成分の動態について詳細な検討を加える必要性を考えた。

2. 研究の目的

本研究は

- (1) occludin を始めとしたタイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の形成調節機構の解明、特に合成されてから小胞体での折り畳み、細胞膜へ移動する際のジスルフィド結合の影響、
- (2) 周囲酸化還元環境に対するタイト結合膜蛋白の反応性の検討、
- (3) タイト結合膜蛋白(特に occludin)のジスルフィド結合を介したユビキチン化等の二次修飾の影響を解析、
- (4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合を介した機能、特にタイト結合バリア機能や細胞増殖の関係、

を解明することにより、タイト結合の周囲酸化還元環境に対する上皮系細胞の反応のメカニズムを解明し、タイト結合の機能解明を目指した。

3. 研究の方法

概要: タイト結合膜蛋白とタグ(FLAG や GFP)を融合させた蛋白発現ベクター(野生型、Cys 変異型)を培養細胞に発現させる。発現細胞について、タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の存在部位の確認を行う。さらに、細胞内の蛋白動態や、蛋白二次修飾や細胞増殖性を測定する。周囲酸化還元環境による蛋白動態や細胞増殖の変化も測定する。また発現したタグ融合蛋白と相互作用を示す thioredoxin family を二次元電気泳動や質量分析などで検出する。

(1) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合を介した細胞内動態の確認

Occludin だけでなく、他のタイト結合蛋白(特に tricellulin)についても、発現ベクターを作成(一部は既に作成済みである)し、培養細胞(SiHa、Caco-2、HuCCT1、AMOC2、HEK293 など上皮系細胞を予定している)に発現させ、ジスルフィド結合の有無、位置を検討する。

上記について低酸素培養や、塩化コバルト曝露、H2O2 曝露下での変化を検討する。

(2) タイト結合蛋白のジスルフィド結合と二次修飾の関連

蛋白安定性に影響する修飾(リン酸化、ユビキチン化など)を測定する。

上記について低酸素培養や、塩化コバルト曝露、H2O2 曝露下での変化を検討する。

- (3) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出
ジスルフィド結合形成の見られる蛋白について共免疫沈降をする。
- (4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合と細胞増殖性の検討
タイト結合蛋白の野生型、Cys 変異型を細胞に安定発現させる。
ヌードマウス皮下に培養細胞を接種し、腫瘍の増殖性を検討する。

4. 研究成果

- (1) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合を介した細胞内動態の確認
Occludin 内の Cys 変異を 1 か所のみでなく、複数箇所に導入した蛋白発現ベクターを作成し、培養細胞で発現させた。Cys の-SH 基修飾試薬でジスルフィド結合の形成部位を検討したところ、occludin の細胞外ループ上にある Cys216 と Cys237 に分子内、もしくは分子間のジスルフィド結合が存在することが確認された。また、Cys409、Cys500 については安定したジスルフィド結合が存在しないことが確認された。さらに occludin 中でジスルフィド結合を形成しない状態の Cys は Cys409 と Cys500 のみであると確認された。
細胞外ループ上にある Cys216 と Cys237 を変異させた occludin は塩化コバルト曝露で野生型に比べより減少することが確認された。この傾向は低酸素状態と同様であり、HIF-1 が occludin の分解および Cys 変異型 occludin の分解亢進に直接関与していると考えられた。
- (2) タイト結合蛋白のジスルフィド結合と二次修飾の関連
リン酸化について検討したが、Cys 変異による occludin のリン酸化の変化は確認できなかった。ただし、Cys 変異によるわずかな occludin の分子量変化が見られ、何らかの二次修飾の変化が考えられる。今後のさらなる検討を要する。
ユビキチン E3 リガーゼ ITCH 結合部位 PPxY 変異型 occludin 発現細胞は塩化コバルト曝露状態で培養すると occludin の減少が野生型に比べ抑制された。このことから、低酸素の occludin 分解は、HIF-1 を介したユビキチン化が関連していることが推測された。また、細胞外ループ上にある Cys216 と Cys237 を変異させた occludin をさらに PPxY 変異型させると、塩化コバルト曝露下では Cys216 や Cys237 に変異がない occludin と同等の安定性を示した。
- (3) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出
共免疫沈降を行ったが、thioredoxin family 蛋白の検出には至らなかった。今後、実験条件のさらなる検討が必要と考えた。
- (4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合と細胞増殖性の検討
Occludin-FLAG 融合蛋白や GFP-occludin 融合蛋白の野生型および Cys 変異型の安定発現細胞株を作成した。
ヌードマウスの検討では、ユビキチン E3 リガーゼ ITCH 結合部位 (PPxY) を変異させた腫瘍細胞は、免疫染色で MIB-1 陽性率が低下し、増殖性に occludin の安定性が関与していることが示唆された。さらに、腫瘍中心部でのアポトーシスが亢進しており、occludin の安定性との関連が考えられた。
- (5) その他の成果
細胞内に位置する Cys409、Cys500 については遊離した状態で存在している一方、実験操作の過程で容易に Cys409-Cys500 のジスルフィド結合が形成される。このことから、細胞内でも一過性にジスルフィド結合が形成される可能性が考えられ、細胞内へのシグナル伝達に關与することが推測され、今後検討する予定である。
Occludin に存在する Cys のうち、Cys76、Cys82、Cys148 は膜貫通部分に存在する。これらの Cys について-SH 基修飾試薬を用いた検討では、ジスルフィド結合をもつ可能性が高いと考えられた。これらの Cys について、様々な組み合わせの変異型 occludin-FLAG 発現ベクターを作成した。今後、これらの Cys のジスルフィド結合と occludin の安定性などについて解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Satoshi, Aoyama Tomoyuki, Ogawa Marie, Takasawa Akira, Murata Masaki, Osanai Makoto, Saito Tsuyoshi, Sawada Norimasa	4. 巻 371
2. 論文標題 Cytotoxicity of Clostridium perfringens enterotoxin depends on the conditions of claudin-4 in ovarian carcinoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 278 ~ 286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.08.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Kotaro, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Endo Chihiro, Tanaka Satoshi, Sawada Norimasa, Watabe Tetsuya, Higashi Tomohito, Chiba Hideki	4. 巻 116
2. 論文標題 Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24600 ~ 24609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1913346116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 敏, 小野佑輔, 高澤 啓, 村田雅樹, 小山内誠, 澤田典均
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinの安定性はジスルフィド結合とHIF-1やユビキチン化によって制御されている
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 敏, 高澤 啓, 村田雅樹, 小山内誠, 澤田典均
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinのジスルフィド結合はユビキチン化を介してその安定性や細胞増殖を調節する
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 敏, 高澤 啓, 村田雅樹, 小山内誠, 澤田典均
2. 発表標題 タイト結合蛋白occludinはジスルフィド結合とユビキチン化を介して安定性が調節され、アポトーシス誘導を制御する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中 敏, 小野佑輔, 高澤 啓, 村田雅樹, 小山内誠, 澤田典均
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinはジスルフィド結合とHIF-1、ユビキチン化により安定性が制御される
3. 学会等名 108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 敏, 小野佑輔, 高澤 啓, 小山内誠, 澤田典均
2. 発表標題 ジスルフィド結合とHIF-1は別々の経路でタイト結合膜蛋白occludinの低酸素での安定性に関与している
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考