

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02440

研究課題名(和文) 3細胞結合領域の細胞間隙バリアの分子機構と生理的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of the paracellular barrier at triellular junctions

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) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：トリセルラータイトジャンクション(tTJ)は、3つの上皮細胞の頂点が集まる3細胞間結合において細胞間隙をシールすることにより上皮バリア機能寄与する細胞間結合である。tTJの構成分子として膜タンパク質トリセルリンとアンギュリンファミリーが知られていたが、これら分子のtTJ形成における役割には不明な点が多い。本研究において、我々は、トリセルリンではなく、アンギュリン-1が3細胞間結合における細胞膜の密着に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの体の最も基本的な防御機能である上皮バリア機能がはたらくためには、上皮細胞同士の隙間における物質の漏れを防ぐ必要がある。上皮の細胞間隙には、隣り合う2細胞間の隙間と、3つの上皮細胞の角に挟まれる点状の3細胞間の隙間が存在する。前者をシールする細胞間結合タイトジャンクションについては多くの知見の蓄積があるのに対して、後者を塞ぐ細胞間結合トリセルラータイトジャンクションの仕組みについては不明な点が多かった。本研究はトリセルラータイトジャンクション形成の分子機構をこれまでになく詳細かつ明快に示したといえる。上皮バリア機能に関わる本研究は、医学分野への波及も期待される。

研究成果の概要(英文)：Tricellular tight junctions (tTJs) are intercellular junctions that seal the intercellular space at tricellular contacts, where the vertices of three epithelial cells meet, and contribute to the epithelial barrier function. Tricellulin and angulin family of membrane proteins are known constituents of tTJs, but the roles of these proteins in tTJ formation remains elusive. In this study, we have demonstrated that angulin-1, not tricellulin, is responsible for the plasma membrane contact at tricellular contacts.

研究分野：細胞生物学

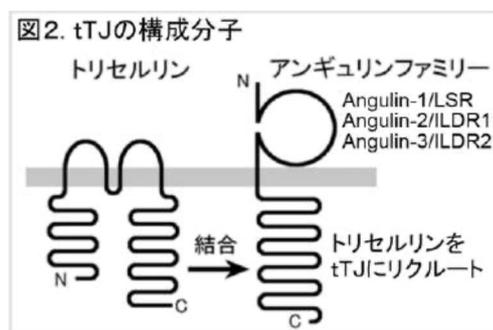
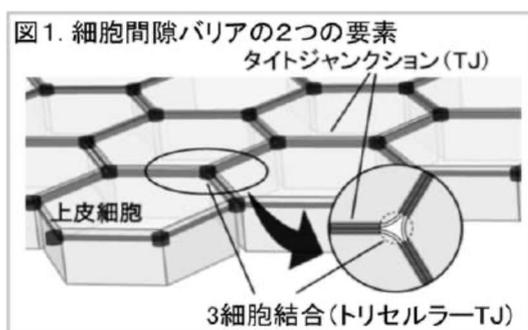
キーワード：タイトジャンクション トリセルラータイトジャンクション 3細胞結合 アンギュリン トリセルリン 上皮バリア機能

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

多様に分化した上皮に共通する本質的な役割は、体の内外や体内の区画を仕切るバリアとしてはたらくことにより各区画に特有の液性環境を形成・維持することである。この上皮バリア機能は生体防御、各器官の生理機能、恒常性維持に必須であり、破綻すれば様々な病態を引き起こすことから、その仕組みの解明は生物学上のきわめて重要な課題である。上皮がバリアとして機能するためには上皮細胞同士の隙間における漏れを防ぐ必要があり、そのために脊椎動物の上皮細胞は細胞間結合タイトジャンクション(TJ)によって隣り合う2細胞の隙間をジッパー状にシールしている。一方、上皮の細胞間隙には、多角形の上皮細胞の頂点が3つ出会う「3細胞結合」とよばれる領域が多数存在し、この領域もシールしなければ上皮は漏れてしまう。3細胞結合をTJによって連続的に閉じることは原理的に不可能であるが、興味深いことに3細胞結合にはトリセルラータイトジャンクション(tTJ)とよばれる特殊な形態のTJ構造が存在しており、これが3細胞結合の細胞間隙バリアを担うと考えられてきた(図1)。

研究開始当時より、tTJの特異的構成分子として、トリセルリンと申請者が見出したアンギュリンファミリー(アンギュリン1/LSR, アンギュリン2/ILDR1, アンギュリン3/ILDR2)の2種類の膜タンパク質が知られていた(図2)。特に重要な知見として、(1)アンギュリンがトリセルリンをtTJに局在化させること(2)トリセルリン変異がヒト非症候性遺伝性難聴の原因であり、遺伝子欠失マウスも難聴のみを示すことがあげられる。したがって、アンギュリンの機能は、3細胞結合へのトリセルリンの局在化であるとの見方が大勢であった。ところが、アンギュリンファミリータンパク質が、tTJへのトリセルリンの局在化に加え、細胞間隙バリアに関わる別の機能を有することを示す複数の傍証が申請者の研究グループで得られていた。全身の上皮に発現するトリセルリンの遺伝子変異はヒトでは無症候群性難聴を引き起こすのみであり、トリセルリン遺伝子欠失マウスも難聴以外に目立った表現型がないにもかかわらず、アンギュリン1欠失マウスは致死であることも、アンギュリンにトリセルリンの3細胞結合への局在化以外の機能があることを暗示していた。



2. 研究の目的

トリセルリンの3細胞結合への局在化以外のアンギュリンの生理機能を明らかにして、先行するトリセルリン研究の成果により過小評価されていたと思われるtTJの役割を解明するとともに、tTJの分子基盤と細胞間隙バリアにおける作動メカニズム、上皮バリア機能における意義、アンギュリンが3細胞結合に集積するメカニズムに関する新しい知見を得ることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1)上皮細胞としての形態、タイトジャンクションの発達度、上皮バリア機能を安定的に測定できる培養上皮細胞であるMDCKII細胞を用いて、ゲノム編集によりアンギュリン1欠失細胞、およびトリセルリン欠失細胞を樹立して、上皮バリア機能をトレーサー流測定、経上皮電気抵抗測定により評価するとともに、tTJの形態を凍結切断レプリカ法、超薄切片法で観察した。併行して、アンギュリン1が結合する細胞質タンパク質を同定し、組換えタンパク質を用いた結合実験により相互作用の様式の解明を試みた。またMDCKII細胞やマウスの上皮組織において、蛍光免疫染色によってtTJの特徴的な形態の光学顕微鏡レベルによる可視化を試みた。

(2)マウス由来上皮細胞EpH4細胞を用いてアンギュリン1欠失細胞を樹立し、この細胞にアンギュリン1の様々な欠失変異体を戻し発現させてその局在を解析することにより、3細胞結合への局在化に必要なドメインを明らかにして、その3細胞結合への集積メカニズムの解明を試みた。

4. 研究成果

(1)tTJの特徴的な構造の光学顕微鏡による可視化

tTJは3細胞結合部位において、TJが存在する上皮細胞の細胞間接着の頂端側から基底側に長

く伸びる構造として観察されることが、過去の凍結切断レプリカ法による解析から知られていた。マウス腎臓の集合管上皮細胞や小腸上皮細胞の凍結切片における tTJ 構成分子アンギュリン 1、トリセルリンの蛍光免疫染色から、実際にこれらの分子が 3 細胞結合部位で頂端側から基底側に長く伸長している様子が可視化できた。さらに、3 細胞結合部位では、クローディン、オクルディン、ZO-1 といった TJ 構成分子が tTJ 構成分子と共局在して、頂端側から基底側に伸長していた。したがって、tTJ には TJ 構成分子も含まれることが初めて示唆された。

(2) アンギュリン 1 欠失 MDCK II 細胞におけるバリア機能の低下と tTJ 形成不全

MDCK II 細胞からゲノム編集により樹立したアンギュリン 1 欠失細胞を詳しく観察したところ、TJ 構成分子の 3 細胞結合における伸長が失われ、さらに上皮バリア機能の顕著な低下が見られた。

アンギュリン 1 欠失細胞にアンギュリン 1 を戻し発現させると、トリセルリンや TJ 構成分子の 3 細胞結合における基底側への伸長および上皮バリア機能は回復した。MDCK II 細胞、アンギュリン 1 欠失細胞の 3 細胞結合部分を、細胞シートに水平な超薄切片を作製して電子顕微鏡観察したところ、MDCK II 細胞では細胞間隙がほとんど閉じていたのに対して、アンギュリン 1 欠失細胞では明らかなギャップが観察された (図 3)。さらに、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察では、アンギュリン 1 欠失細胞において、tTJ のセントラルシーリングエレメント構造が乖離しており、超薄切片法における観察を反映すると考えられる tTJ の異常な形態が観察された。

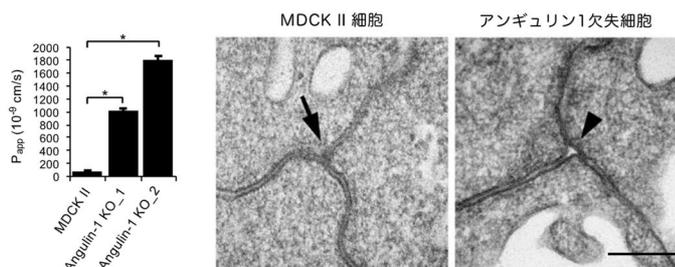


図3. (左) MDCK II 細胞とアンギュリン1欠失細胞2クローンの細胞シートにおける蛍光トレーザーの透過量の比較。アンギュリン1欠失細胞はMDCK II細胞と比較して著しい透過性を示す。(右) MDCK II 細胞とアンギュリン1欠失細胞の3細胞結合の細胞シートに水平な超薄切片の電子顕微鏡写真。MDCK II細胞では3細胞結合部位は閉じているが、アンギュリン1欠失細胞では大きな隙間が観察される。スケールバー：200 nm

(3) アンギュリン 1 のカルボキシル末端と ZO-1 の結合

アンギュリン 1 欠失細胞にアンギュリン 1 の C 末端の PDZ ドメイン結合モチーフを欠失した変異分子を戻し発現させると、3 細胞結合の細胞間隙が閉じ、上皮バリア機能も回復した。ところが、この細胞では 3 細胞結合においてアンギュリン 1 変異分子は基底側に伸長するにもかかわらず、TJ 構成分子である ZO-1、クローディンの基底側への伸長は回復しなかった。このような観察から、アンギュリン 1 の C 末端に TJ の裏打ちタンパク質である ZO-1 が結合することがわかっていたが、組換えタンパク質による試験管内結合実験により、アンギュリンの C 末端には ZO-1 の 3 つの PDZ ドメインのうち PDZ2 が結合することが明らかになった。ZO-1/ZO-2 二重欠失細胞ではアンギュリン 1 は 3 細胞結合に濃縮しないが、この細胞に ZO-1 全長を戻したアンギュリン 1 は 3 細胞結合に濃縮し、かつ基底側に伸長し、ZO-1、クローディンも共局在した。ところが、ZO-1/ZO-2 二重欠失 MDCK II 細胞に PDZ2 ドメインを欠く ZO-1 変異分子を戻した場合、アンギュリン 1 はやはり 3 細胞結合に濃縮して基底側に伸長したものの、ZO-1 変異分子とクローディンは基底側に伸長しなかった。さらに、アンギュリン 1 欠失 MDCK II 細胞に、アンギュリン 1 と ZO-1 の PDZ1 ドメインを人為的に結合させたキメラ分子を発現させると、この分子とともにクローディンが 3 細胞結合において基底側に伸長した。したがって、クローディンが tTJ においてアンギュリン 1 に沿って基底側に伸長するためには、ZO-1 の仲介が必要であることが示唆された。

(4) アンギュリン 1 による 3 細胞結合の細胞膜密着形成におけるクローディン非依存性

3 細胞結合の膜密着形成は、MDCK II 細胞からゲノム編集技術により樹立したクローディン欠失細胞でも損なわれず、この細胞からさらにアンギュリン 1 を欠失させると失われた。クローディン/JAM-A 欠失細胞でも 3 細胞結合の膜密着形成は維持されていた。したがって、アンギュリン 1 は TJ 形成に必要なクローディンや JAM-A には依存することなく 3 細胞結合の膜密着を形成する活性があることが明らかになった。

(5) tTJ 形成と上皮バリア機能におけるトリセルリンの寄与

上記のアンギュリン 1 による 3 細胞結合における細胞膜密着形成が、アンギュリンによって 3 細胞結合にリクルートされるトリセルリンを介するか否かを調べるために、MDCK II 細胞からゲノム編集によりトリセルリン欠失細胞を樹立した。トリセルリン欠失細胞は上皮バリア機能に目立った低下を認めず、超薄切片法による電子

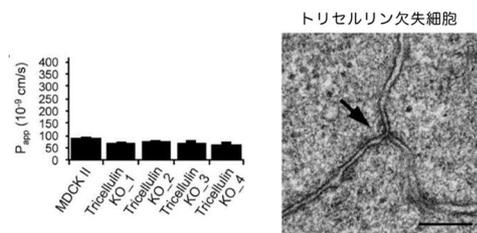


図4. (左) MDCK II 細胞とトリセルリン欠失細胞4クローンの細胞シートにおける蛍光トレーザーの透過量の比較。トリセルリン欠失細胞の透過性の低下は見られない。(右) トリセルリン欠失細胞の3細胞結合の細胞シートに水平な超薄切片の電子顕微鏡写真。3細胞結合部位は閉じている。スケールバー：200 nm

顕微鏡観察において3細胞結合における細胞膜密着形成が見られた(図4)。3細胞結合部位の凍結切断レプリカ法による解析では、セントラルシーリングエレメントは形成されるが、これに結合する短いTJ構造がほとんど失われていることが明らかとなった。

(6) アンギュリン1の3細胞結合への集積機構

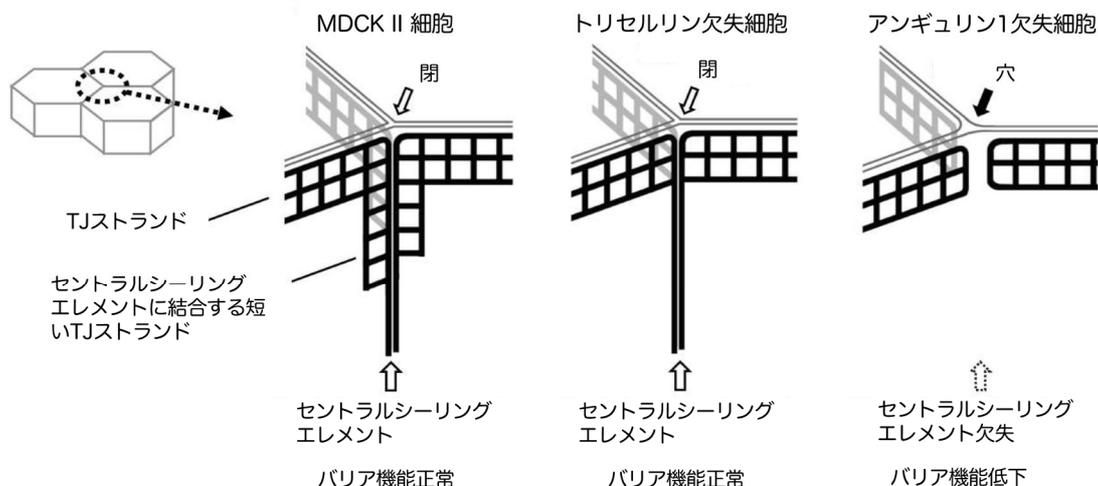


図5. 本研究のまとめ、アンギュリン1は3細胞結合部位の細胞間隙の閉鎖とtTJ形成、上皮バリア機能に必須である。トリセルリンはtTJにおいて、セントラルシーリングエレメントに結合する短いTJストランドの形成に必要であるが、上皮バリア機能における寄与は小さい。

アンギュリン1欠失 EpH4 細胞にアンギュリン1の様々な欠失変異体やスプライシングバリエーションを戻してその局在を解析することによって、アンギュリン1の細胞膜直下の細胞質領域に存在するシステインのクラスターが高度にパルミトイル化脂質修飾を受けること、この脂質修飾および細胞外領域の両方がアンギュリン1の3細胞結合への集積に必要であることが明らかになった。

以上の結果より、アンギュリン1はクローディンやトリセルリンに依存することなく3細胞結合の細胞膜密着形成と十分な上皮バリア機能に寄与することが初めて明らかになった。本研究は、不明な点が多かったtTJの形成メカニズムを明らかにしたもので、医学的問題とも関連の深い上皮バリアの分子機構に重要な知見を与える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Otani Tetsuhisa, Nguyen Thanh Phuong, Tokuda Shinsaku, Sugihara Kei, Sugawara Taichi, Furuse Kyoko, Miura Takashi, Ebnet Klaus, Furuse Mikio	4. 巻 218
2. 論文標題 Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3372 ~ 3396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201812157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Izumi Yasushi, Furuse Kyoko, Furuse Mikio	4. 巻 132
2. 論文標題 Septate junctions regulate gut homeostasis through regulation of stem cell proliferation and enterocyte behavior in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs232108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.232108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oda Yukako, Sugawara Taichi, Fukata Yuko, Izumi Yasushi, Otani Tetsuhisa, Higashi Tomohito, Fukata Masaki, Furuse Mikio	4. 巻 295
2. 論文標題 The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required for angulin-1 assembly at tricellular contacts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 4289 ~ 4302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.010491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hempstock Wendy, Sugioka Shiori, Ishizuka Noriko, Sugawara Taichi, Furuse Mikio, Hayashi Hisayoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Angulin-2/ILDR1, a tricellular tight junction protein, does not affect water transport in the mouse large intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67319-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hartmann Christian, Schwietzer Ysabel Alessa, Otani Tetsuhisa, Furuse Mikio, Ebnet Klaus	4. 巻 1862
2. 論文標題 Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183299 ~ 183299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2020.183299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Otani Tetsuhisa, Furuse Mikio	4. 巻 30
2. 論文標題 Tight Junction Structure and Function Revisited	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Cell Biology	6. 最初と最後の頁 805 ~ 817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tcb.2020.08.004	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 Sugawara Taichi, Furuse Kyoko, Otani Tetsuhisa, Furuse Mikio	4. 巻 10.02
2. 論文標題 Angulin-1 seals tricellular contacts independently of tricellulin and claudins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 323378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.10.02.323378	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Otani T, Nguyen TP, Furuse M.
2. 発表標題 Genetic dissection of tight junctions
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本発生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugawara T, Oda Y, Fukata Y, Higashi T, Fukata M, Furuse M.
2. 発表標題 Assembly of angulin-1/LSR in vertices of three epithelial cells is determined by the cytoplasmic palmitoylation.
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本発生生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taichi Sugawara, Mikio Furuse
2. 発表標題 Angulin-1 regulates vertical elongation of tricellular tight junction by interacting with scaffolding proteins
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tetsuhisa Otani, Shinsaku Tokuda, Mikio Furuse
2. 発表標題 ZO family proteins regulate epithelial polarity independent of Tight Junction strand assembly
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mikio Furuse, Tetsuaki Otani, Taichi Sugawara, Shinsaku Tokuda, Mika Watanabe, Kyoko Furuse, Osamu Nagata
2. 発表標題 Establishment of a tight junction-deficient epithelial cell line by genome editing of claudin genes
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tetsuhisa Otani, Shinsaku Tokuda, Mikio Furuse
2. 発表標題 ZO family proteins regulate epithelial polarity independent of tight junction strand assembly
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菅原太一, 古瀬京子, 古瀬幹夫
2. 発表標題 Angulin-1 regulates the plasmic membrane sealing and epithelial barrier function at tricellular contacts independent of tricellulin and claudins
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原太一, 古瀬京子, 大谷哲久, 若山友彦, 古瀬幹夫
2. 発表標題 アンギュリンはトリセルリンに依存せず3細胞結合の細胞膜密着構造を形成する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅原太一, 古瀬京子, 大谷哲久, 若山友彦, 古瀬幹夫
2. 発表標題 上皮のトリセルラーコンタクトにおけるバリア形成機構
3. 学会等名 第52回臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古瀬幹夫
2. 発表標題 上皮細胞の隙間をシールする分子機構
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 クローディン欠損上皮細胞株の製造方法、クローディン欠損上皮細胞株	発明者 古瀬幹夫	権利者 大学共同利用機 関法人自然科学 研究機構
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-226655	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

生理学研究所細胞構造研究部門 http://www.nips.ac.jp/dcs/

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
研究協力者	菅原 太一 (Sugawara Taichi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	University of Muenster			