

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06934

研究課題名(和文)細胞極性蛋白質複合体による上皮タイトジャンクション形成の制御機構

研究課題名(英文)Regulation of tight junction formation by cell polarity proteins

研究代表者

鎌倉 幸子(Kamakura, Sachiko)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：80398081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞のタイトジャンクション(TJ)が形成されるためには、進化的に保存された細胞極性制御因子Par3が必要である。しかしながらPar3がTJ形成を促進する際の機序については不明な点が多い。私たちは最近、Par3に結合する新規タンパク質としてI型膜貫通タンパク質ParTR1を見出した。本研究では、ParTR1がTJ形成の負の調節因子であることを示し、ParTR1がTJ形成を抑制する分子機構を明らかにした。さらに、Par3がParTR1への結合を介してその機能を抑制し、TJ形成を促進するメカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、国内外の研究において長年不明であった「細胞極性蛋白質がどのようにTJを形成させるのか」という問いに対して、少なくとも部分的に答えを与え得るものと考えている。TJに関連するこれまでの研究において、claudin分子のオリゴマー化に対する負の制御因子の報告は極めて珍しく、この新規TJ制御因子の報告はインパクトを与えることが期待される。また、この制御因子がTJに特異的に局在する膜タンパク質であることからTJをターゲットとした創薬や薬物デリバリーの候補や、上皮に関連した疾患の理解や治療法の基礎を提供し得るかもしれない。

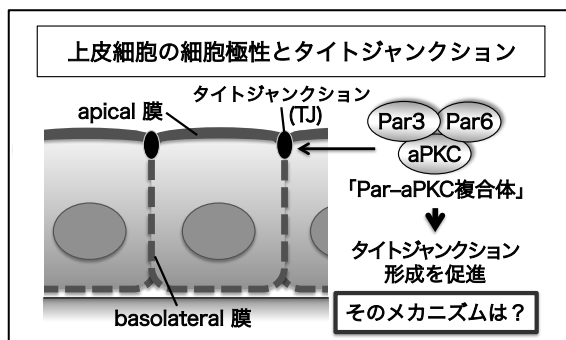
研究成果の概要(英文)：The evolutionarily conserved polarity regulator Par3 is known to promote TJ formation during epithelial cell polarization. However, the mechanism for Par3-mediated TJ formation has not been fully understood. Here, we have identified the transmembrane protein ParTR1 as a novel Par3-binding protein that localizes to TJs. During polarization of Madin-Darby canine kidney epithelial cells, ParTR1 negatively regulates TJ formation; the development of TJs is delayed by over-expression of ParTR1 and is conversely accelerated by its knockdown. ParTR1 interacts with the tetra-span transmembrane protein claudins, major constituents of TJ strands, to inhibit their functions. Meanwhile, Par3 prevents the ParTR1-claudin interaction in a manner dependent on its ability to associate with ParTR1. Thus, Par3 appears to promote TJ formation at least in part by suppressing ParTR1, a newly identified negative regulator of claudins.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：細胞極性 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

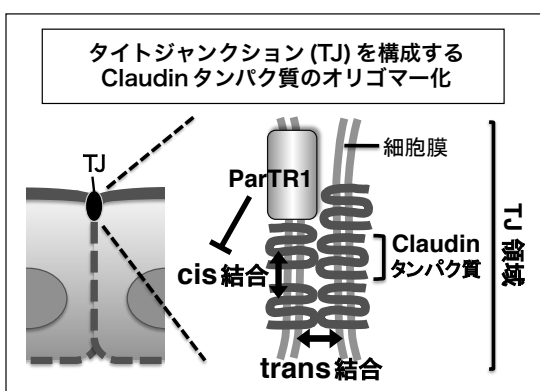
脊椎動物の体は6割以上が上皮細胞で構成され、この細胞が作る圧倒的な面積のシートが体内と体外の環境を隔て、脊椎動物の生命を支えている。上皮細胞は、外界に接する apical 膜と体内側に接する basolateral 膜という性質の異なる細胞膜ドメインを持ち、機能的にも形態的にも細胞極性を持つ (右上図参照)。この2つ



の膜ドメインを分かつのがタイトジャンクション (tight junction: TJ) であり、この TJ を構成する主要な蛋白質は claudin という一群の4回膜貫通型の蛋白質である。claudin が TJ 領域の細胞膜上で”cis”にオリゴマーを形成する一方、隣りの細胞膜の claudin とも”trans”に結合することで claudin strand (=TJ strand) を形成し、隣り合う細胞膜を (水分子の通過も制限できるほどに) 密着させ細胞間隙をふさいでいる (左下図参照)。claudin ファミリーに属するタンパク質は哺乳類では20種類余りの報告があり、個々の claudin 分子のイオン透過性の性質や結合蛋白質について明らかになりつつある一方で、claudin 自身のオリゴマー形成の直接的な調節因子については、ほとんど知られていなかった。

上皮細胞の極性形成の過程において TJ の形成は、細胞極性が形成されたランドマークとして捉えられる。細胞の極性は、進化的に保存された一群のタンパク質の働きによって形成・維持される。そのようなタンパク質のうち、アダプタータンパク質である Par3 は、上皮細胞では、TJ (あるいは将来の TJ 形成部位) に局在し、Par6-aPKC をリクルートする。aPKC は、Par6 と恒常的なヘテロダイマーを形成し極性形成のマスター酵素として機能し、basolateral 膜の形成に関わる細胞極性タンパク質 (Lgl や Par1 など) の働きを抑制することで、apical 膜

の領域を広げ、適切な位置に配置させる。このように Par3-Par6-aPKC からなる3者複合体 (Par-aPKC 複合体) は、細胞膜の polarization に重要な役割を果たすが、それに加え、TJ の形成を促進することがよく知られている。細胞膜の polarization のメカニズムについては理解が比較的進んでいる一方で、TJ を形成させるための分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。



2. 研究の目的

私達は最近、新規 Par3 結合蛋白質の1つとして膜貫通タンパク質 ParTR1 を見出し、TJ 形成の負の調節因子であることを見いだしていた。本研究は、この新規膜タンパク質が TJ 形成を調節する際の分子機序の解析を軸に、Par-aPKC 複合体による TJ 形成の制御メカニズムの解明を目的として下記の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) ParTR1 に対する抗体が市販されていなかったため、抗体の作製から行った。種々の発現コンストラクトを大腸菌に発現させ、性質の良いリコンビナントタンパク質を精製し、これを抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製した。この抗体が特異的に ParTR1 を認識することが確認できたため、種々の上皮細胞の抗体染色等に用いた。

(2) 上皮細胞の TJ 形成を観察する系としてイヌ腎上皮由来 MDCK 細胞を使用した。TJ 形成過程の解析にはカルシウムスイッチ法を用いた。これは低カルシウム培地により細胞間接着を壊し極性の無い状態にした後、通常の濃度のカルシウムを含む培地に戻し TJ の形成過程(極性形成過程)を追跡する方法である。解析には、TER 法 (transepithelial resistance 法; 上皮細胞シートの上下の電気抵抗の上昇を測定することで、機能的な TJ 形成を測定する方法) や、TJ タンパク質である ZO-1 (あるいは MDCK 細胞に発現している claudin-1、claudin-2、および occludin) に対する抗体で細胞染色する方法 (TJ 形成を形態学的に測定する方法) を用いた。

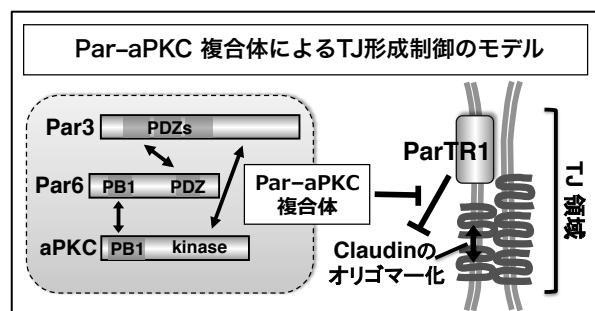
(3) RNA 干渉法 (RNAi) を用いたノックダウンを行い (2) の方法により、ParTR1 あるいは Par3 の TJ 形成における役割を検討した。

(4) claudin のオリゴマー形成を検討する系として HEK293 細胞を用いた。この細胞は、claudin を発現していないことが知られ、内在性 claudin の影響を受けずにオリゴマー形成を解析することが可能である。この細胞に種々の claudin タンパク質を過剰発現し、免疫沈降法による結合実験を行った。cis 結合を検討するために、異なる tag (FLAG tag および Myc tag) を付加した claudin タンパク質を共発現させ、FLAG tag に対する抗体で免疫沈降し、もう一方の Myc tag が付いた claudin タンパク質が共沈降するかどうかを検討した。また、trans 結合を検討する際は、FLAG-claudin を発現する細胞と Myc-claudin を発現する細胞を co-culture した後、同様の方法で共沈降により両者の結合を検討した。

4. 研究成果

私達は、未知の Par 結合蛋白質の同定を目的とし、Par3 の PDZ ドメインを bait に用いた yeast two-hybrid 法によるスクリーニングを行い、その過程で見出した Par3 結合蛋白質の 1 つを、ParTR1 (Par-interacting tight-junction

regulator1) と名付けた。私達の解析から、複数の上皮細胞において、内在性 ParTR1 は TJ に集積すること、腎尿細管由来の上皮細胞である MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) 細胞において、ParTR1 を RNA 干渉法によりノックダウンすると TJ 形成が著しく促進される一方、ParTR1 を過剰発現すると TJ 形成が抑制されることが分かった。ParTR1 は、いくつかの claudin タンパク質と強く結合し、そのオリゴマー形成を抑制したことから、ParTR1 が claudin strand 形成 (= TJ 形成) の直接的な負の調節因子であることが示唆された。さらに、ParTR1 と claudin の結合は、Par3 が ParTR1 と直接結合することによって抑制されることが分かった。以上の結果から、TJ 形成の負の調節因子である ParTR1 を抑制することによって、Par3 が TJ 形成を促進する可能性が示唆された (上図参照)。



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 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Takayanagi H, Hayase J, Kamakura S, Miyano K, Chishiki K, Yuzawa S, Sumimoto H. | 4. 巻 294 |
| 2. 論文標題 Intramolecular interaction in LGN, an adaptor protein that regulates mitotic spindle orientation. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J. Biol. Chem. | 6. 最初と最後の頁 19655-19666 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011457. | 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 Kiyohara Takuya, Miyano Kei, Kamakura Sachiko, Hayase Junya, Chishiki Kanako, Kohda Akira, Sumimoto Hideki | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Differential cell surface recruitment of the superoxide-producing NADPH oxidases Nox1, Nox2 and Nox5: The role of the small GTPase Sar1 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 480 ~ 493 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12590 | 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 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 鎌倉幸子、早瀬純也、住本英樹 |
| 2. 発表標題 新規Par3結合タンパク質によるタイトジャンクション形成の制御機構 |
| 3. 学会等名 令和2年度 日本生化学会 九州支部例会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|