

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870014

研究課題名（和文） 細胞接着装置タイトジャンクションの再編成と分解制御

研究課題名（英文） Rearrangement and degradation mechanism of tight junction

研究代表者

小田 裕香子 (ODA YUKAKO)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：70452498

研究成果の概要：

多細胞生物の体は、上皮細胞シートによって覆われ異なる環境に分けられる。タイトジャンクションと呼ばれる細胞接着装置がバリアを構築し、様々な異なるコンパートメントの維持に機能している。発生過程や組織のターンオーバー、細胞分裂時など上皮細胞がダイナミックに動く際には、タイトジャンクションは崩壊および再編成されるが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、タイトジャンクションがいかにバリアを維持しつつ分解及び再編成されるのか、そのメカニズムを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	390,000	2,990,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞接着、バリア破綻

1. 研究開始当初の背景

(1) 多細胞生物の体は、上皮の細胞が互いに接着して形成されたシートによって区画化されることにより恒常性が維持される。上皮細胞間の機械的な強い接着は、アドヘレンスジャンクションにおける E-カドヘリンによって担われる。一方で細胞間隙をシールする

のは、細胞接着装置であるタイトジャンクション (TJ) である。TJ を構成する代表的なタンパク質は、月田・古瀬らによって発見されたクローディンとオクルーディンである。クローディンは、細胞膜上で紐状に並んで細胞周囲を取り囲み、隣の細胞のクローディンと結合することでシールする。クローディンをノックアウトするとバリアが破綻すること

から、クロードインは TJ 形成に必須である。

(2) 形態形成や組織形成は上皮細胞がシートの中でスライドし再配列することで可能になる。例えば、原腸形成時に上皮細胞の移動と再配列による収斂伸長運動 (convergent extension) が胚伸長の原動力となる。また、ショウジョウバエ胚発生時において、左右の上皮細胞の形態変化と移動により、背部閉鎖 (dorsal closure) が起こる。発生過程に限らず皮膚や小腸などでは、常に上皮シート内で細胞が形態変化しながらスライドすることで、組織がターンオーバーされる。この際に細胞接着装置は分解され再構築される。

(3) 細胞は個々の微細環境を守るため、バリア機能が保持されたまま形態変化し移動・再配置されなければならない。つまり、バリアとして機能する TJ には、細胞接着装置の中でとりわけ厳密な制御のもと崩壊・再編成されるシステムが備わっているはずである。しかしながら、TJ 構成タンパク質の分解と再配置のメカニズムはこれまでほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) 多細胞生物の発生過程や組織のターンオーバーなどの際、上皮細胞シートの中で細胞が動く。また、皮膚や小腸などの上皮組織では恒常的に細胞がターンオーバーしながら動いている。この過程において、細胞接着装置はダイナミックに崩壊と再編成され、リモデリングが行われる。上皮シートのバリア機能を担うタイトジャンクションは、接着の再編成をしつつバリア機能を維持しなければならない。このため、タイトジャンクションは巧妙な分解制御機構によって制御されているはずである。

(2) しかしながら、いかにしてバリアを保ちつつタイトジャンクションがリモデリングされるかについて、分子メカニズムは不明であった。本研究では、そのメカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タイトジャンクションの構成分子クロードインの制御に関わる分子を同定するため、クロードイン 1 に結合する分子をイーストツーハイブリッド法により探索した。その結果、リングドメインを有し、ユビキチン化に関与するリガーゼ LNX1 を同定した。LNX1 のタイトジャンクション分解機構を明らか

にするため、培養上皮細胞におけるタイトジャンクションの構成因子を観察対象とした。

(2) LNX1 の過剰発現によるタイトジャンクションへの影響を調べるため、蛍光抗体法・フリーズフラクチャー法によって詳細な形態観察を行った。また、ウェスタンブロッティングによって、クロードイン分解の定量的検討を行った。さらに、上皮シートの電気抵抗値を求め、バリア破綻を測定した。

(3) 一方、LNX のリングドメインに変異を導入したドミナントネガティブ変異体を作製し、野生型の LNX との比較を行った。

(4) クロードインの分解は、プロテアソームもしくはリソソームで行われる可能性が考えられた。そのため、どちらの分解経路かを決定するため、プロテアソームインヒビターもしくはリソソームインヒビターを処理し、クロードインの分解が抑制されるかを検討した。さらに分解経路は、ユビキチンの結合様式によって異なることが知られているため、ユビキチンのリジン変異体を用い、その結合様式を検討した。

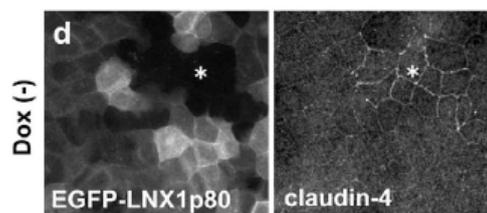


図 1. 蛍光抗体法による LNX-1 過剰発現によるクロードイン消失

4. 研究成果

(1) クロードイン 1 の C 末をベイトとしたイーストツーハイブリッド法によって、その結合因子候補として LNX 1 を同定およびクローニングした。LNX1 は PDZ ドメインを有しており、クロードインの PDZ binding motif と結合することが明らかとなった。

(2) LNX に対する特異的抗体を作製し、蛍光抗体法による局在を観察したところ、LNX1 はタイトジャンクションに局在することが明らかになった。

(3) 培養上皮細胞に LNX1 を過剰発現すると、タイトジャンクションの構成因子の中でも特にクロードインの消失が見られた。アドヘレンスジャンクションの構成因子である E-

カドヘリンには変化が見られなかった。

(4) LNX1 を過剰発現しクローデインが消失している細胞では、上皮細胞シートのバリアが破綻していることが TER 測定により明らかになった。

(5) また LNX1 を過剰発現すると、クローデインのユビキチン化による分解促進が示された。このユビキチン化の促進は、リング変異体 LNX1 では認められなかった。また、ユビキチンの変異体を用いた解析より、プロテアソームによる分解ではないことが示唆された。よって次に、エンドサイトーシスによる取り込みと引き続き起こるリソソームでの分解を検討した。クローデインはエンドソームマーカーと共局在を示し、リソソームの阻害剤によってその分解が抑制されたため、また、クローデインはエンドソーム-リソソームを介した経路によって分解されることが明らかになった。これにより、クローデインはエネルギー要求性のユビキチン化による厳密な分解制御を受けることが明らかになった。

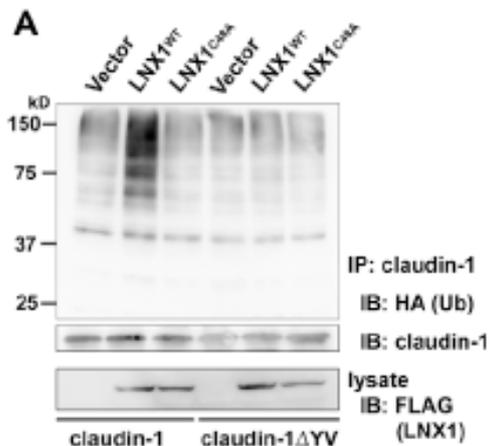


図 2. LNX1 によるクローデインのユビキチン化の促進

(6) 今後は、LNX の発現抑制によるクローデインの観察を行うとともに、*in vivo* における LNX の機能破綻解析を行うことで、クローデイン分解の重要性が明らかになると考えられる。

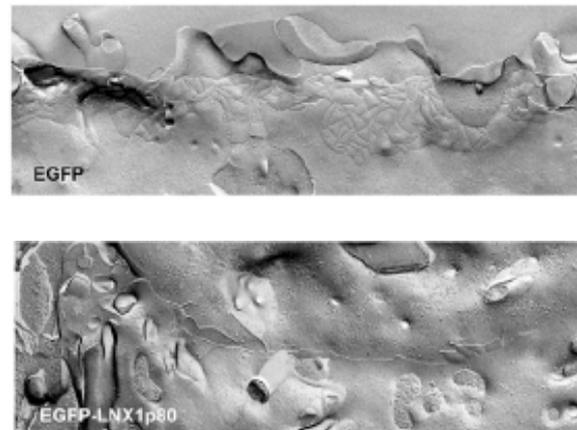


図 3. フリーズフラクチャー法による LNX1 過剰発現細胞におけるクローデインの消失の観察

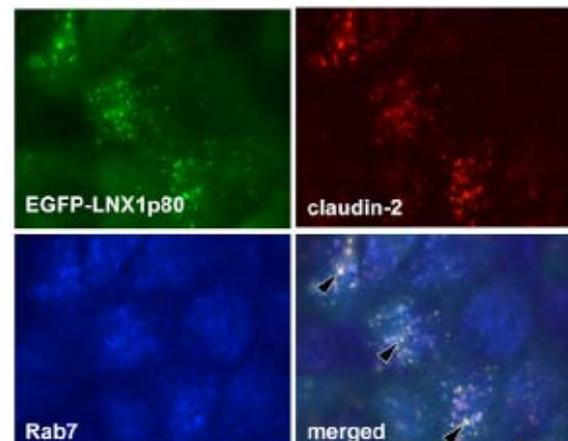


図 3. クローデインのエンドソームを介した取り込み

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)

①Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M.

The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells.

J Cell Sci. 2009 Apr 1;122(Pt 7):985-94.

査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 裕香子 (ODA YUKAKO)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：70452498

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者