

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590193

研究課題名（和文） クローディンの組成とその変異体によるタイト結合の細胞間透過性制御の研究

研究課題名（英文） Paracellular permeability of tight junction examined by different combination of claudins or claudin-1 mutants.

研究代表者

稲井 哲一郎（INAI TETSUICHIRO）

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00264044

研究成果の概要（和文）：マウス大腸癌由来のCMT93-I細胞とCMT93-II細胞の比較解析の結果、細胞間透過性がclaudin-2の発現で亢進することがわかった。これは、タイト結合の機能が発現するclaudinの組み合わせに依存することを示している。また、claudin-1の細胞外第一ループで保存された54番目と64番目のシステイン残基は、タイト結合ストランドの形成に必須であることがわかった。54番目のシステイン残基をアラニンに置換した変異体の発現は細胞間電気抵抗を増加させることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We found by comparative analysis of mouse rectum CMT93-I and -II cells that expression of claudin-2 caused increase of paracellular permeability. This suggests that tight junction function may depend on combination of claudin species expressed in the cells. We found that two cysteine residues (54C, 64C) conserved in the first extracellular loop of claudin-1 were necessary for the formation of tight junction strands and that replacement of 54C to alanine caused increase of transepithelial electrical resistance.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：タイト結合、クローディン、細胞間透過性、フリーズフラクチャー、共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

タイト結合(TJ)を形成する膜蛋白 claudin は、少なくとも27種からなるファミリーを形成している。claudinは、N末端とC末端を細胞質側に向けて細胞膜を4回貫通し、2つの細胞外ループ(ECL1, ECL2)と1つの細胞内ループを持っている。一般的に、各組織の

上皮細胞には複数の claudin が発現しており、それらの claudin の組み合わせと比率により、その組織の TJ の形態と機能が決定されると考えられている。さらに ECL1 と ECL2 が TJ の形態と機能の制御に関与しているとされているが、詳細は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

(1) claudin-1 の ECL1 に変異を導入し、それらの変異体を TJ を形成する MDCK II 細胞および TJ を形成しない HEK 細胞で発現し、TJ の形態と機能の変化を調べて ECL1 の機能を調べる。

(2) CMT93-II 細胞の内因性 claudin の発現を変化させて細胞間透過性の変化を調べることで、発現する claudin の組み合わせによる細胞間透過性制御機構を調べる。

3. 研究の方法

(1) claudin family には ECL1 に W-GLW-C-C motif という保存されたアミノ酸がある。マウスの claudin-1 の 54 番目と 64 番目のシステインの一方または両方をアラニンに置換したものを C54A, C64A, C54&64A とする。これらの変異体の N 末端に EGFP を付与し、タイト結合を形成しない HEK 細胞で発現して、タイト結合の形態をフリーズフラクチャー法で調べる。また、タイト結合を形成する MDCK II 細胞で発現して、細胞間透過性を TER と 4 kDa FITC-dextran の flux で調べる。

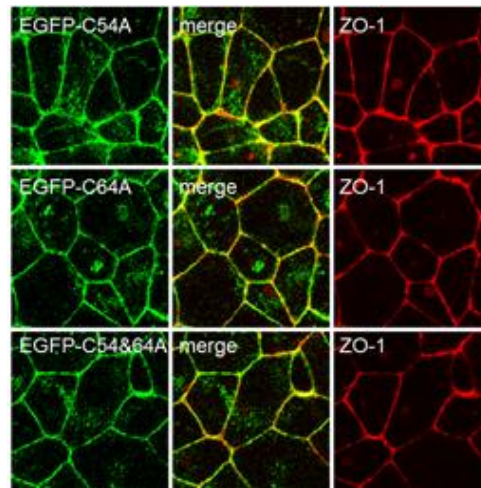
(2) CMT93-I と -II 細胞は、claudin-4, -6, -7, -12 を発現している。CMT93-II 細胞はさらに claudin-2 を発現し、その細胞間電気抵抗 (TER) は CMT93-I 細胞の約 1/7 であった。protein kinase C の阻害剤で CMT93-II 細胞の claudin-2 の発現を抑制し、細胞間透過性の変化を TER により調べて、CMT93-I 細胞と比較する。

4. 研究成果

(1) claudin-1 の ECL1 変異体、EGFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A によるタイト結合の形態と機能の解析

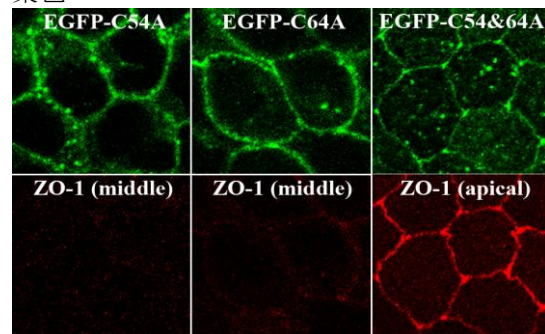
①タイト結合を形成しない HEK 細胞でのタイト結合の形態の解析: EGFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を発現する HEK 細胞をタイト結合の裏打ち蛋白 ZO-1 で蛍光免疫染色した (図 1)。3 種の変異体は ZO-1 と共存し、細胞膜に局在した。これらの細胞をフリーズフラクチャー法により観察したが、タイト結合のストランドは認められなかった (データ省略)。この結果から、claudin-1 の ECL1 のシステイン残基は、タイト結合の形態形成に必須であるが、細胞膜への局在に対しては影響しないことがわかった。

図 1 EGFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を発現する HEK 細胞の ZO-1 による免疫染色



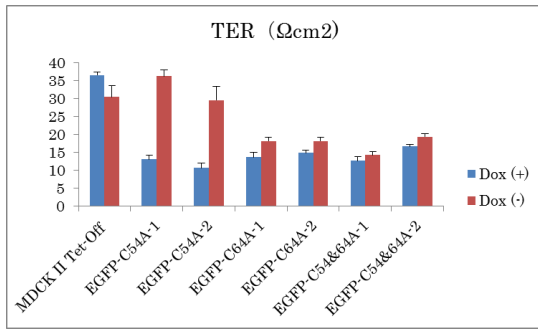
②タイト結合を形成する MDCK II 細胞でのタイト結合の機能の解析: EGFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を MDCK II 細胞で発現すると、EGFP-C54A, EGFP-C64A は側面膜に局在し、タイト結合領域には局在しなかった。EGFP-C54&64A は、タイト結合領域には局在し、ZO-1 と共存した (図 2)。

図 2 EGFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を発現する MDCK II 細胞の ZO-1 による免疫染色



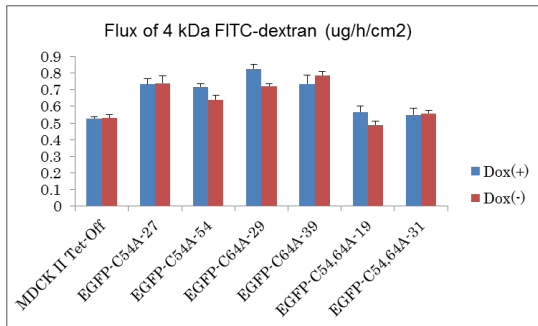
今回用いた発現系では、培地からドキシサイクリン (Dox) を除去することで発現が誘導される。EGFP-C54A の発現で細胞間電気抵抗 (TER) が上昇したが、EGFP-C64A または EGFP-C54&64A の発現では変化がなかった (図 3)。イムノブロットによる解析で、内因性の claudin-1, -2, -3, -4, -7 の発現量に大きな変化はなかった (データ省略)。

図 3 GFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を発現する MDCK II 細胞の TER



4 kDa FITC-dextran の flux は、GFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A の発現で変化がなかった (図 4)。

図 4 GFP-C54A, EGFP-C64A, EGFP-C54&64A を発現する MDCK II 細胞の 4 kDa FITC-dextran の flux

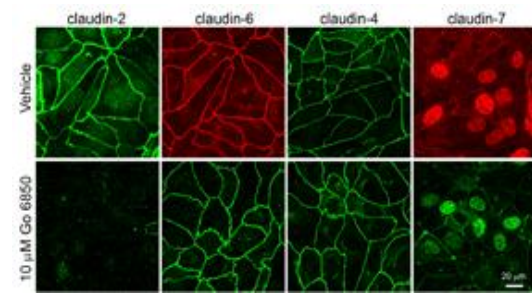


これらの結果から、claudin-1 の細胞外第一ループで保存されたシステインは、タイト結合ストランドの形成に必須であるが、細胞膜には輸送には関与しないことがわかった。これらの変異体の発現で細胞間透過性に基本的に変化はなかったが、GFP-C54A の発現でのみ TER が顕著に増加した。TER 上昇のメカニズムは不明だが、少なくとも MDCK II 細胞の内因性の claudin の発現の変化によるものではないことはイムノブロットで確認している。

(2) CMT93-II 細胞の claudin-2 発現抑制による細胞間透過性の解析

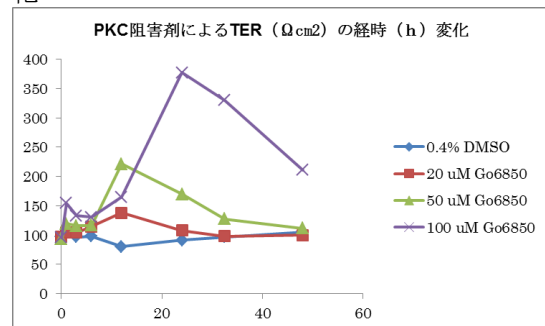
マウス大腸癌由来の CMT93-I 細胞と CMT93-II 細胞は claudin-4, -6, -7, -12 を発現する。CMT93-II 細胞はさらに claudin-2 を発現し、TER は CMT93-I 細胞の約 1/7 であった。このことから、claudin-2 の発現が TER の減少に関与することが考えられた。CMT93-II 細胞を PKC の阻害剤である Go6850 で阻害すると、claudin-2 の発現が抑制され、claudin-4, -6, -7 の発現は変化しなかった (図 5)。

図 5 Go6850 による CMT93-II 細胞の claudin-2 の発現抑制



CMT93-II 細胞に 0, 20, 50, 100 μM の Go6850 を投与し、48 時間まで経時的に TER を測定した (図 6)。その結果、Go6850 の濃度依存的に TER が上昇した。

図 6 PKC 阻害剤 Go6850 による TER の経時変化



これらの結果から、CMT93-II 細胞の細胞間透過性の亢進は claudin-2 の発現によることがわかった。CMT93-I 細胞と CMT93-II 細胞の比較解析の結果と考え合わせると、タイト結合の機能が発現する claudin の組み合わせに依存することが示唆される。

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 14 件)

1. Shimasaki S, Yamamoto E, Murayama E, Kurio H, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H, Subcellular localization of tektin2 in rat sperm flagellum, *Zoolog Sci*, 査読有, Vol.27, No.9, 2010, pp.755-61

2. Inai T, Kamimura T, Hirose E, Iida H, Shibata Y, The protoplasmic or exoplasmic face association of tight junction particles cannot predict paracellular permeability or heterotypic claudin compatibility, *Eur J Cell Biol*, 査読有,

Vol. 89, No. 7, 2010, pp. 547-556

3. Zhu HL, Shibata A, Inai T, Nomura M, Shibata Y, Brock JA, Teramoto N, Characterization of Nav1.6-mediated Na⁺ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens, *J Cell Physiol*, 査読有, 2010, 223(1):234-43.

4. 稲井哲一朗、最近の研究と技術 タイト結合研究の新展開、顕微鏡、査読無、45巻、3号、2010、190-192

5. 稲井哲一朗、タイト結合の形態と機能 福岡歯大誌、査読有、36巻、3号、2010、101-110

6. Kobayashi K, Inai T, Shibata Y, Yasui M, Dynamic changes in amniotic tight junctions during pregnancy, *Placenta*, 査読有, Vol. 30, No. 10, 2009, pp. 840-7

7. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y, Freeze-fracture electron microscopic study of tight junction strands in HEK293 cells and MDCK II cells expressing claudin-1 mutants in the second extracellular loop, *Histochem Cell Biol*, 査読有, Vol. 131, No. 6, 2009, pp. 681-690

8. Inai T, Shibata Y, Heterogeneous expression of endothelial connexin (Cx) 37, Cx40, and Cx43 in rat large veins, *Anat Sci Int*, 査読有, Vol. 84, 2009, pp. 237-245

9. Kurio H, Murayama E, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H, Intron retention generates a novel isoform of CEACAM6 that may act as an adhesion molecule in the ectoplasmic specialization structures between spermatids and Sertoli cells in rat testis, *Biol Reprod*, 査読有, Vol. 79, No. 6, 2008, pp. 1062-73

10. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y, Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors, *Anat Rec*, 査読有, Vol. 291, No. 5, 2008, pp. 577-85

11. Murayama E, Yamamoto E, Kaneko T, Shibata Y, Inai T, Iida H, Tektin5, a new

Tektin family member, is a component of the middle piece of flagella in rat spermatozoa, *Mol Reprod Dev*, 査読有, Vol. 75, No. 4, 2008, pp. 650-8

12. Sengoku A, Inai T, Shibata Y, Formation of aberrant TJ strands by overexpression of claudin-15 in MDCK II cells, *Histochem Cell Biol*, 査読有, Vol. 129, No. 2, 2008, pp. 211-22

13. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y, Comparative characterization of mouse rectum CMT93-I and -II cells by expression of claudin isoforms and tight junction morphology and function, *Histochem Cell Biol*, 査読有, Vol. 129, No. 2, 2008, 223-32

14. 稲井哲一朗、柴田洋三郎、タイト結合の構造と機能、福岡医学雑誌、査読有、99巻、2008、25-31

〔学会発表〕(計15件)

稲井哲一朗、タイト結合膜蛋白 claudin-10b と claudin-15 による形態と機能の解析、第52回 日本顕微鏡学会九州支部総会・学術講演会、2010年12月4日、九州大学病院地区

稲井哲一朗、タイト結合の形態と機能(特別講演)、日本解剖学会第66回九州支部学術集会、2010年10月9日、福岡県歯科医師会館

稲井哲一朗ほか、タイト結合膜蛋白 claudin とタイト結合の形態と機能についての研究、第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010年3月28日~3月30日、岩手医科大学

稲井哲一朗ほか、タイト結合ストランドの形態は細胞間透過性と関連するか?、第8回コネキシン研究会、2009年11月27日~28日、九州大学医学部

稲井哲一朗ほか、タイト結合ストランドの形態と細胞間透過性、日本解剖学会・第65回九州支部学術集会、2009年11月7日、琉球大学医学部

稲井哲一朗ほか、タイト結合ストランドの形態と claudin-1 の細胞外第二ループとの関連、第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009年3月28~30日、岡山理科大学

稲井哲一郎ほか、claudin-1の細胞外第二ループとタイト結合の形態、第7回コネクション研究会、2008年12月19-20日、京都(京都府立医科大学主催)

稲井哲一郎ほか、claudin-1の細胞外第二ループの変異によるタイト結合の形態の変化、第50回日本顕微鏡学会九州支部総会、2008年12月6日、久留米大学医学部

Inai T et al, Freeze-fracture electron microscopy of tight junction strands formed by expression of claudin-1 mutants in the second extracellular loop. L06-32, poster, 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), November 2-7, 2008, ICC Jeju, Jeju island, Korea

稲井哲一郎ほか、claudin-1の細胞外第二ループの変異によるタイト結合の形態と機能の変化、日本解剖学会・第64回九州支部学術集会、2008年10月25日、福岡大学医学部

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲井 哲一郎 (INAI TETSUICHIRO)
福岡歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 00264044

(2) 研究分担者

柴田 洋三郎 (SHIBATA YOSABURO)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 90037482
廣瀬 英司 (HIROSE EIJI)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号: 40380620

(3) 連携研究者

()

研究者番号: