

平成22年5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790308
 研究課題名 (和文) タイト結合分子オクルディンによる微絨毛形成およびフェンス機能の調節機構の解明
 研究課題名 (英文) Research of the mechanism that occludin regulate microvilli formation and fence function in epithelial cells
 研究代表者
 村田 雅樹 (MURATA MASAKI)
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：10404592

研究成果の概要 (和文)：

タイト結合分子である occludin の発現により上皮極性の指標である微絨毛の形成が促進される。この変化は微絨毛関連分子 (ezrin, radixin, moesin, EBP-50) の発現量ではなくリン酸化を制御することにより、分子の局在を変化させることによる変化であった。また、occludin の C 末側の細胞質ドメインのみを導入した場合でも同様の変化が見られることから、上皮における微絨毛形成には occludin の C 末側の細胞質ドメインを介した微絨毛関連分子のリン酸化が関与していると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Expression of occludin induces microvilli formation in epithelial cells. But there is no change in the expression of the molecules associated with microvilli (ezrin, radixin, moesin, and EBP-50) at protein and mRNA level. Occludin regulates the localization of ezrin by controlling the phosphorylation of ezrin in this time. In addition, a similar change is seen when introducing only C-terminal cytoplasmic domain of occludin is transfected in non-epithelial cells. Occludin may play an important role in the formation of microvilli in epithelial cells by phosphorylation of molecules associated with microvilli via the C-terminal cytoplasmic domain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：病理学、組織・細胞、シグナル伝達、タイト結合、上皮極性

1. 研究開始当初の背景

生体内で組織や細胞は、極性という偏りのある構造を維持することで、その機能を保っている。体表を覆う上皮細胞における極性の指標は、最も頂部側に存在する細胞間接着

装置であるタイト結合と、頂部側細胞膜に存在する微絨毛である。

タイト結合は、細胞間隙の物質の通過を制御し、組織内外の偏りを維持するバリア機能と、細胞膜を頂部側と側壁基底側とに区域

化して、細胞としての極性を維持するフェンス機能を有している。

タイト結合は複数の膜貫通型蛋白および膜裏打ち蛋白という複数の蛋白からなる複合体である。膜貫通型蛋白のひとつである occludin はタイト結合に最も普遍的に存在する蛋白であり、タイト結合機能以外にも、アポトーシスや細胞増殖・分化等の細胞内シグナル伝達系に関わる機能を有していると考えられている。

微絨毛は頂部側細胞膜から突出した指状の構造で、栄養物の吸収や、細胞運動、細胞接着に関与すると考えられている。ERM タンパク質 (ezrin, radixin, moesin) は微絨毛に局在し、軸である actin と膜タンパク質とを架橋することで微絨毛の形成に重要な役割を果たしている。

これまで当教室において、胎生期の様々な細胞成分を模倣し分化する性質を有する F9 細胞や血管内皮細胞株に、形態のみならず機能的なタイト結合の形成を誘導可能な tet-on システムを導入した系を確立し、上皮細胞のタイト結合形成の過程を解析し (Satohisa S, et al. Exp Cell Res. 2005. 310:66-78, Fujibe M, et al. Exp Cell Res. 2004. 295:36-47, Chiba H, et al. Exp Cell Res. 2003. 286:288-297)、微絨毛形成も誘導可能であることを見出した (Chiba H, et al. JCB. 2006. 175:971-980)。以上からタイト結合の形成と微絨毛形成は密接にかかわっていると考えられたが、その詳細な機構は不明である。

ヒト腫瘍細胞が脱分化し極性を失うと、occludin が進行性に減少することや (Tobioka H, et al. Virchows Arch. 2004. 445:472-476, Tobioka H, et al. Hum Pathol. 2004. 35:159-164, Tobioka H, et al. J Pathol. 2002. 198:207-212)、MAP kinase の上流に当たる Raf を高発現させた細胞株では occludin の発現が低下し、微絨毛形成の抑制が認められる (Lan M, Kojima T, Murata M, et al. Exp Cell Res. 2006. 312:111-120, Lan M, et al. Carcinogenesis. 2004. 25:2385-2395) ことが、当教室の研究より明らかとなっており、未発表であるが、occludin 欠損肝細胞株において、野生型に比べ微絨毛形成が低下していることも見出した。以上から、occludin は極性の維持や微絨毛形成においても重要な役割を担っている可能性が考えられる。

しかし、現在までのところ極性の形成と維持の機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、フェンス機能の維持や微絨毛形成といった上皮極性の形成・維持における occludin の役割に着目して、その分子機構を明らかにしたい。

2. 研究の目的

(1) occludin 欠損マウス肝細胞株を用いて、tet-on システムによる occludin の発現調節が可能な細胞株を樹立する。

(2) occludin の接着阻害が可能な細胞外ドメインを認識する抗体を作成する。

(3) occludin の発現に伴う細胞内情報伝達系の変化を、特に以下の分子を中心に検討し、フェンス機能の維持や微絨毛形成といった上皮極性の形成・維持に関わるシグナルを同定する。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株

初代培養肝細胞を継代培養する事によって得られた occludin 欠損マウス肝細胞株と野生型マウス肝細胞株 (Murata M, Kojima T, et al. Exp Cell Res. 2005. 310:140-151) を使用した。また、occludin 欠損マウス肝細胞株に occludin を一過性に過剰発現させた際の変化についても検討した。

さらに野生型 occludin 発現ベクターとともに、occludin の機能を実行する上で必須の領域と推定される C 末側の細胞質ドメインを様々な程度に欠いた欠損型 occludin 発現ベクターを導入した細胞株 (Osanai M, Murata M, et al. Cancer Res. 2006. 66:9125-9133) を導入した細胞株を使用した。

(2) タイト結合の変化の検討方法

①凍結割断レプリカ法により、タイト結合ストランドの変化を検討した。

②免疫染色法により蛋白の局在や構成蛋白の種類の変化を検討した。

③Western blot 法および PT-PCR 法によりそれぞれ蛋白および mRNA の発現変化を検討した。

④フェンス機能に関しては、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、apical 側の細胞膜に取り込ませた色素や apical 側の細胞膜に発現している蛋白の局在の変化を観察し検討した。

(3) 微絨毛の変化の検討方法

①電子顕微鏡や走査電子顕微鏡を用いて微絨毛形成の変化を検討した。

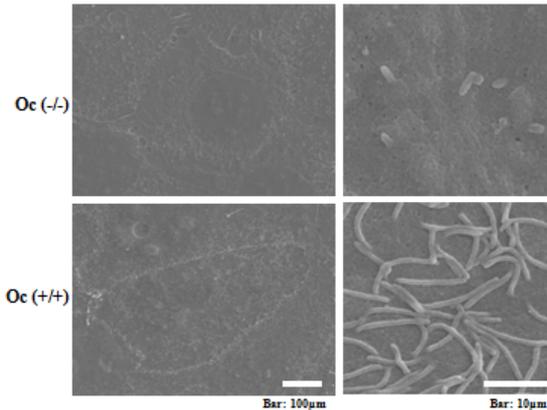
②免疫染色および Western blot 法、RT-PCR 法などにより、微絨毛関連分子 (ezrin, radixin, moesin, EBP-50 など) の発現変化に関して検討した。

(4) 上記変化にかかわる領域を特定する目的で、野生型 occludin 発現ベクターとともに、occludin の機能を実行する上で必須の領域と推定される C 末側の細胞質ドメインを様々な程度に欠いた欠損型 occludin 発現ベクター

一を導入した細胞株を用い、occludin における微絨毛形成にかかわる責任領域の同定を試みた。

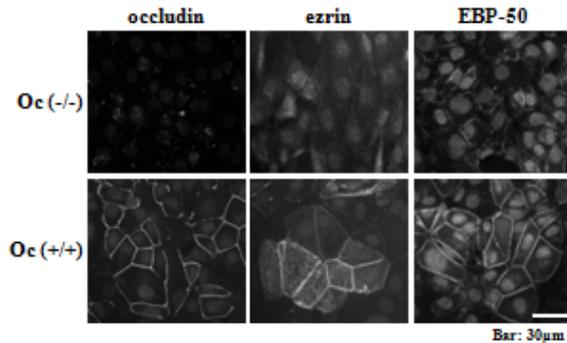
4. 研究成果

Occludin の発現による微絨毛形成の変化を occludin 欠損マウス肝細胞株 Oc(-/-) と野生型マウス肝細胞株 Oc(+/-) を用いて比較検討した。走査電子顕微鏡による観察上、occludin 欠損マウス肝細胞株では微絨毛の発現している細胞数、微絨毛の数および長さの減少が認められた(図 1)。



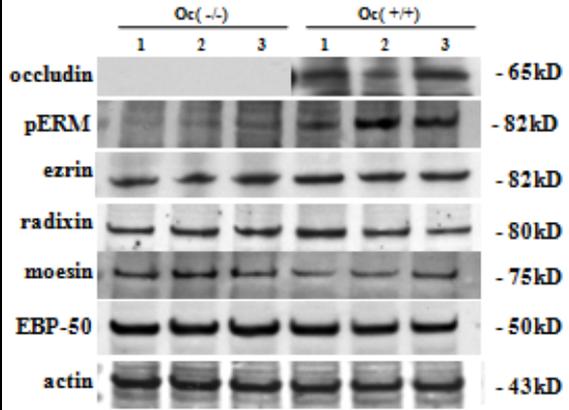
(図 1) 走査電子顕微鏡像の比較

また、免疫染色上、occludin 欠損マウス肝細胞株では微絨毛関連分子 (ezrin、radixin、moesin、EBP-50) の発現している細胞数の減少が認められた (図 2)。



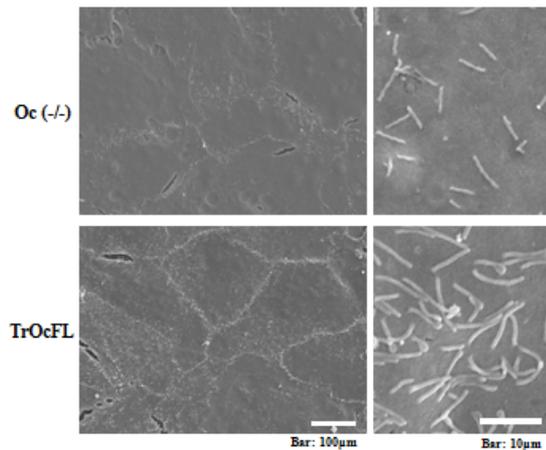
(図 2) 免疫染色による比較

しかし、Western blot および RT-PCR 上、微絨毛関連分子 (ezrin、radixin、moesin、EBP-50) の蛋白量および mRNA 量に変化は認められなかった。微絨毛関連分子のリン酸化状態に関して Western blot 法を用いて検討したところ、occludin 欠損マウス肝細胞株では微絨毛関連分子のリン酸化低下が認められた (図 3)。



(図 3) Western blot 法による比較

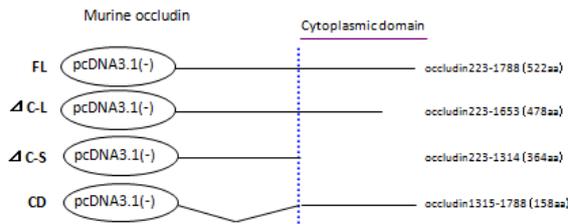
Occludin 欠損マウス肝細胞株に occludin を一過性に過剰発現させる (TrOcFL) と、走査電子顕微鏡による観察上、微絨毛の発現している細胞数、微絨毛の数および長さの増加が認められた(図 4)。しかし、Western blot 上、微絨毛関連分子 (ezrin、radixin、moesin、EBP-50) の蛋白量に変化は認められなかった。



(図 4) 遺伝子導入による走査電子顕微鏡像の変化

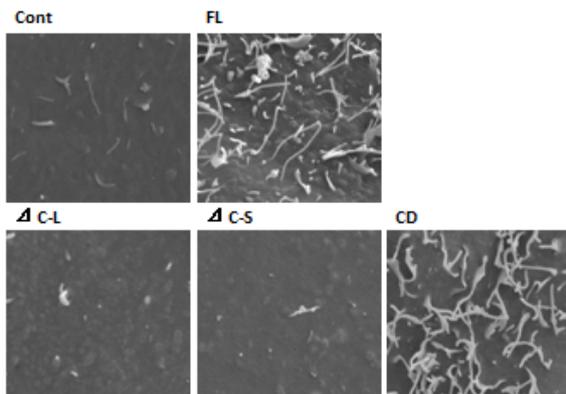
以上より、occludin は微絨毛関連分子のリン酸化を制御することにより、その局在を変化させることで微絨毛形成に関与している可能性があると考えられた。

このリン酸化にかかわる領域を特定する目的で、野生型 occludin 発現ベクターとともに、occludin の機能を実行する上で必須の領域と推定される C 末側の細胞質ドメインを様々な程度に欠いた欠損型 occludin 発現ベクター (図 5) を導入した細胞株を用い、occludin における微絨毛形成にかかわる責任領域の同定を試みた。



(図5) 使用した発現ベクター

走査電子顕微鏡による観察上、本来微絨毛形成の弱いマウス悪性黒色腫細胞株に、C末側の細胞質ドメインを様々な程度に欠いた欠損型 occludin 発現ベクターを導入しても微絨毛の形成は変化しないが、C末側の細胞質ドメインのみを導入した場合、野生型 occludin 発現ベクターと同様に微絨毛の形成が増加した(図6)。このとき微絨毛関連分子の発現量に変化はなく、C末側の細胞質ドメインのみを導入した場合、リン酸化の増加傾向が見られた。



(図6) 遺伝子導入による走査電子顕微鏡像の変化

以上から、上皮における微絨毛形成には occludin のC末側の細胞質ドメインを介した微絨毛関連分子のリン酸化が関与していると考えられた。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0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

村田 雅樹 (MURATA MASAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：10404592