

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07402

研究課題名(和文) タイト結合のジスルフィド結合を介した機能調節：酸化還元シグナルの入り口として

研究課題名(英文) The regulation of tight junction function via disulfide bond formation as a redox signaling

研究代表者

田中 敏 (Tanaka, Satoshi)

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間接着装置タイト結合を構成する蛋白、オクルディンのジスルフィド結合は細胞外ループ部分と膜貫通部分に存在し、細胞内部分にはないことを確認した。ジスルフィド結合を変化させると塩化コバルト処理などのストレスによりオクルディンの安定性が変化し、それらはオクルディンのユビキチン化により調節されていた。ジスルフィド結合を変化させても細胞内の分布には大きな違いは見られなかった。オクルディンをロックアウトさせた細胞株はわずかに増殖性が高まった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイト結合は細胞間接着装置のうち最も外界に接して存在しており、周囲の酸化還元環境に影響されている。今回の研究ではオクルディンのジスルフィド結合を介した酸化還元とタイト結合機能変化やユビキチン化の関与を示している。このような報告は他に類を見ないものであるとともに、これらのメカニズムの解明により、皮膚や腸管、血管などのバリア機能の調節や破綻による疾患の理解、治療戦略の解明が進む。また、癌と酸化ストレスは深い関係にあり、発癌メカニズムの理解や癌進行のメカニズム解明だけでなく、癌治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Occludin, a tight junction protein, has disulfide bond at its transmembrane region and extracellular loop, but not at cytoplasmic tail. CoCl₂ treatment changed occludin stability, and it is regulated by the ubiquitination of occludin. Changes of disulfide bond of occludin did not show its subcellular distribution. Cultured cells lacking occludin showed slightly higher proliferation.

研究分野：細胞病理学

キーワード：タイト結合 オクルディン ジスルフィド結合 redox thioredoxin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タイト結合とは、上皮や血管内皮の細胞間に存在する微小構造である。細胞間の隙間を埋めるバリア機能のみでなく、細胞極性形成やシグナル伝達、輸送機能など様々な機能を持ち、発生や臓器形成に深くかかわっている。タイト結合は occludin、tricellulin、claudin、JAM などの膜貫通蛋白と ZO-1、ZO-2、ZO-3 などの膜裏打ち蛋白から構成されている。上皮組織では、外界と近接した部位にあり、タイト結合は外部環境の影響を受けやすいと考えられる。しかし従来のタイト結合研究は各々の蛋白発現調節の解析が主で、各分子の蛋白発現後の蛋白修飾、二次構造形成、細胞膜への輸送、タイト結合の構造形成に関する研究は全く進んでいない。特に外部の酸化還元状態に大きく影響されると思われる、タイト結合蛋白のジスルフィド結合に関してはほとんど検索されてなく、これまでは JAM のみが安定したジスルフィド結合を持つことが分かっているのみである。

これらの知見を踏まえて申請者は特に occludin (オクルディン) に着目し、予備的な実験を行い、以下の結果を得ていた。

- (1) Occludin と FLAG や GFP 融合蛋白の発現ベクター、システイン (Cys) アラニン (Ala) 変異株ベクターを作成し、培養細胞に発現させ occludin が少なくとも一過性にジスルフィド結合を持つことを確認した。
- (2) Occludin のジスルフィド結合は細胞株に関わらず、細胞膜上に多い傾向がある。
- (3) Occludin のジスルフィド結合は occludin の安定性、低酸素の反応性に関連する。
- (4) Occludin の分解はユビキチン化により調節され、細胞増殖にも関連がある。
- (5) 他のタイト結合蛋白、特に tricellulin にもジスルフィド結合が存在する可能性がある。

ここで申請者は occludin や tricellulin を始めとしたタイト結合膜蛋白について、ジスルフィド結合を介した蛋白二次修飾調節機構とそのシグナル伝達物質としての機能解析、翻訳後、細胞膜へ移動するまでの動態の追跡がタイト結合の機能解明、occludin の機能解明に重要であると感じた。特にジスルフィド結合については細胞外の酸化還元作用のみでなく、細胞内の thioredoxin の酸化還元作用を介した蛋白の redox 調節、ジスルフィド結合調節を考慮する必要性を考えた。

しかし、タイト結合膜貫通蛋白のジスルフィド結合に着目した報告はごくわずかであった。また、occludin はタイト結合に必ず存在するにもかかわらず、occludin の機能については不明な点が多く、存在意義も含めて研究が進んでいない状態であった。

2. 研究の目的

本研究では、

- (1) occludin を始めとしたタイト結合膜蛋白のジスルフィド結合形成はどのように調節されているか、特に合成されてから小胞体での折り畳み、細胞膜への移動に参与するか、
- (2) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合は周囲酸化還元環境に影響されるか、
- (3) タイト結合膜蛋白 (特に occludin) のジスルフィド結合はユビキチン化等の二次修飾に影響を与えるか、
- (4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合は、細胞増殖などのシグナル伝達に何らかの役割があるか、

を解明することにより、タイト結合の周囲酸化還元環境に対する上皮系細胞の反応のメカニズムを解明し、タイト結合のジスルフィド結合を介した機能解明を目指した。

3. 研究の方法

概要: occludin と FLAG もしくは GFP を融合させた蛋白 (occludin-FLAG もしくは GFP-occludin) を発現するプラスミドベクターを作成し、培養細胞上に発現させ、FLAG や GFP の検出を利用して、occludin の安定性や、細胞内分布を測定した。さらにプラスミドベクターに変異 (今回は膜貫通領域のシステインや occludin の C' 末細胞質内領域) を導入することにより、ジスルフィド結合やユビキチン E3 リガーゼ結合部位が改変された occludin-FLAG や GFP-occludin を作成し、培養細胞上での振る舞いや occludin 同士の結合性などを野生型と比較して、検討した。また、occludin ノックアウト細胞株に上記の occludin-FLAG 蛋白を安定発現させ、細胞増殖性などの細胞機能も検討した。さらに、仮想的な酸化還元ストレスとして、培養細胞に塩化コバルト処理をして、occludin の量や分布の変化を観察した。

- (1) Occludin-FLAG および GFP-occludin の野生型および変異型蛋白発現プラスミドベクターの作成: 以前の研究で作成済みであった Occludin-FLAG および GFP-occludin 発現ベクターをさらに、PCR を用いて、occludin の膜貫通領域にある 3 か所のシステインをアラニンに変異させたベクターを作成した。変異導入は 3 か所すべての他、2 か所、1 か所も作成し、比較した。また、C' 側細胞質内領域にある 2 か所のシステインをアラニン置換したベクター、C' 側細胞質内領域を欠失させた変異ベクターも作成した。
- (2) occludin を細胞膜上に高発現しているヒト卵巣癌細胞株 AMOC2 の occludin ノックアウト

細胞株を CRISPR-Cas9 を用いて作成した。

- (3) (2) で作成した occludin ノックアウト細胞株に Occludin-FLAG の野生型および変異型を導入し、安定発現株を得た。
- (4) ジスルフィド結合を形成していない-SH 基を標識することにより、occludin のジスルフィド結合状態がシステイン変異により変化するか検討した。標識の検出にはウェスタン解析を用いた。
- (5) Occludin-FLAG の野生型および変異型安定発現株を培養し、細胞の増殖性を比較した。増殖性は MTT アッセイで測定した。同様に、occludin ノックアウト細胞株についても比較、検討した。
- (6) Occludin-FLAG と GFP-occludin の相互作用は抗 GFP 抗体を用いた共免疫沈降で測定した。野生型 occludin、変異型 occludin の種々の組み合わせで検討した。測定はウェスタン解析により行った。
- (7) 細胞内分布の測定は、細胞表面蛋白のビオチン標識およびストレプトアビジン沈降を用いて、ウェスタン解析により量的検討を行った。また、GFP-occludin を培養細胞に発現させ、蛍光顕微鏡で観察した。
- (8) Occludin の安定性は培養細胞にタンパク合成阻害剤シクロヘキシミドを添加することにより測定した。また、プロテアソーム阻害剤 MG132 を培養細胞に添加して、occludin の安定性が変化するか検討した。
- (9) 酸化ストレスとして塩化コバルトを培養細胞に添加し、occludin の量的変化を測定した。また同時に塩化コバルト処理時の occludin 細胞内分布の変化も測定した。

4. 研究成果

以下、上記の研究方法によって得られた結果を列挙する。

- (1) Occludin-FLAG および GFP-occludin について、膜貫通領域のシステイン (Cys76, Cys82, Cys148) について、アラニン変異型を得た。また、2 か所、3 か所を変異させたベクターも作成した。C' 側細胞質内領域のシステイン変異型、C' 側細胞質内領域欠失型 occludin 発現ベクターも作成した。
- (2) CRISPR-Cas9 を用いて、AMOC2 細胞の occludin ノックアウト細胞株を樹立した。Occludin の発現はウェスタン解析で検出できない程度に消失しており、遺伝子の不活化が得られたと判断された。
- (3) Occludin-FLAG および GFP-occludin についてそれらはいずれも AMOC2 細胞株で発現できた。occludin-FLAG については安定発現株を樹立できた。しかし、GFP-occludin については十分な発現を安定して得ることは出来なかった。
- (4) システイン変異による occludin のジスルフィド結合の変化は、膜貫通領域の 3 か所のシステイン (Cys76, Cys82, Cys148) で認められ、膜貫通領域には安定したジスルフィド結合が存在することが確認された。また、以前の研究より細胞外ループの 2 か所のシステイン (Cys216, Cys237) にもジスルフィド結合が存在することが分かっていた。C' 側細胞内領域のシステイン (Cys409, Cys500) には安定したジスルフィド結合が認められなかった。
- (5) 細胞株 AMOC2 について occludin 発現株 (野生型) および occludin ノックアウト細胞株 (2 種類) について細胞増殖性を比較検討したところ、ノックアウト細胞株は培養時の細胞密度が高い状態で増殖性が野生型に比べて高い傾向があった。また、occludin-FLAG の膜貫通領域の 3 か所のシステインを変異させた細胞は、野生型 occludin-FLAG を発現する細胞に比べて増殖性がやや高まる傾向が見られた。
- (6) Occludin-occludin の相互作用を、野生型、変異型の各種の組み合わせで行ったところ、野生型 occludin と膜貫通領域のシステイン変異型 occludin との相互作用が、野生型同士より増強する傾向を見出した。ただし、実験によりばらつきが見られ、条件のさらなる検討を要すると思われた。
- (7) 細胞表面蛋白のビオチン標識およびストレプトアビジン沈降を利用した検討では、野生型 occludin-FLAG および膜貫通領域システイン変異型 occludin-FLAG いずれも細胞膜表面に存在することが確認された。存在する量は野生型、変異型で大きな差はなかった。蛍光顕微鏡を用いた検討でも、GFP-occludin の野生型および膜貫通領域のシステインを変異させた変異型いずれも細胞膜上に存在し、さらに細胞間接着部位では GFP-occludin が集積して見られる傾向があった。また、GFP-occludin は細胞質内に凝集する傾向があり、特にゴルジ装置に集積していると推測された。これは、GFP の付加による影響が考えられた。また、C' 側細胞質内領域を欠損させた occludin-FLAG は細胞膜上の量が著しく低下した。これは、AMOC2 の野生株、occludin ノックアウト株いずれも同様の結果であり、occludin の C' 側細胞質内領域が細胞膜上への移動に影響することを示している。
- (8) シクロヘキシミド処理をした培養細胞では occludin の分解が進む。これについて、Occludin-FLAG の野生型および膜貫通領域のシステインを変異型について比較したが、大きな差は認められなかった。なお、ユビキチン E 3 リガーゼ結合部位が改変された occludin-FLAG は分解が明らかに少なくなっており、occludin-FLAG の分解にはユビキチン化が関わっていることが示された。
- (9) 塩化コバルト処理状態での Occludin-FLAG の野生型および膜貫通領域のシステイン変異型

を比較検討したところ、システイン変異型の方が、野生型に比べて分解が少ない傾向があった。また、塩化コバルトによる野生型 occludin-FLAG の分解は、ユビキチン E 3 リガーゼ結合部位が改変されると分解なくなり、塩化コバルト処理による occludin の分解にはユビキチン化が関わっていることが示された。

以上の結果から occludin にはジスルフィド結合が存在し、特に膜貫通部分のジスルフィド結合はストレス環境下での occludin の安定性に関与していることが示唆された。近年、Occludin が通常の状態ではタイト結合機能(バリア機能など)に必須ではないが、ストレス環境下でのタイト結合の保護に働く可能性が指摘されており、今回の研究結果はこの仮説を支持するものとなっている。しかしながら、occludin とジスルフィド結合の関連について十分に示した報告はなく、本研究は独創性の高いものとなっている。

今後の展望としては、C' 側細胞内領域のシステイン (Cys409, Cys500) の機能と、occludin の C' 側細胞内領域と細胞内分布の制御機構を追及するとともに、本研究などで示されたジスルフィド結合の形成機構の解明、特に thioredoxin family との関連を探ることにより、タイト結合形成のメカニズムを解明したい。これらの研究結果が、炎症や腫瘍でのタイト結合の変化のメカニズムの解明につながり、これらの疾患の治療戦略に大きな影響を与える可能性を秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 敏
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinは膜貫通領域にジスルフィド結合をもつが、細胞内分布には大きな変化を与えない
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 敏
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinの膜貫通領域のジスルフィド結合はoccludin同士の相互作用を調節し、HIF-1を介した安定性に関与する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 敏
2. 発表標題 HIF-1はタイト結合膜蛋白occludinの膜貫通領域のジスルフィド結合を介してその安定性に関与する、
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 敏
2. 発表標題 タイト結合膜蛋白occludinの膜貫通領域のジスルフィド結合はHIF-1存在下での安定性に寄与する
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023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
---------	---------