

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22632

研究課題名（和文）タイトジャンクション形成における細胞膜脂質の機能解析

研究課題名（英文）The role of membrane lipids for formation of tight junctions

研究代表者

重富 健太（Shigetomi, Kenta）

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：90878240

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、上皮細胞のバリア機能を担う細胞接着構造であるタイトジャンクションに集積するコレステロールがタイトジャンクションを構成するタンパク質であるクローディン依存的に集積しているのか、または、コレステロールがクローディンを集積しているのか、調べた。クローディンを欠損した上皮細胞でも、コレステロールの集積が認められることから、コレステロールの集積は、クローディンの集積に先立って、生じ、タイトジャンクションの形成を誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、タイトジャンクション領域のコレステロールがタイトジャンクションの形成に先立って、集積し、タイトジャンクションの形成を誘導することを示唆する結果である。これは、これまで、タンパク質に関する研究が主であった細胞接着構造の研究において、新たな知見を与え、タイトジャンクションの形成機構を明らかにする上でも重要な知見となると考える。

研究成果の概要（英文）：In this research, I investigated whether cholesterol accumulates at tight junctions, which are cell adhesion structures that work as a barrier of epithelial cells, in a claudin-dependent manner, or whether cholesterol accumulates claudin. The accumulation of cholesterol was observed even in epithelial cells lacking claudin. This result indicated that the accumulation of cholesterol occurs before claudin accumulation and induces the formation of tight junctions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：コレステロール タイトジャンクション クローディン 脂質

### 1. 研究開始当初の背景

我々の体表面を覆う上皮細胞は、体内外の物質の流出入を制限する細胞接着構造であるタイトジャンクションを有することで、体内と外環境を隔て、体内の恒常性を維持している。タイトジャンクションは膜タンパク質の Claudin および、それを裏打ちする ZO (Zonula Occludens) タンパク質等の細胞質タンパク質・細胞質タンパク質と結合するアクチン細胞骨格・細胞膜脂質からなる超分子複合体を形成している(図1)。申請者は、タイトジャンクション領域に、コレステロールや炭素数20以上の極長鎖脂肪酸鎖スフィンゴミエリンといった特定の脂質が他の細胞膜領域に比べて豊富に存在することを明らかにした。また、コレステロールを形質膜より除去すると、タイトジャンクションが消失することから、これらの膜脂質がタイトジャンクションの形成には必要であることを見出した(Shigetomi et al., 2018, J. Cell Biol.)。また、プラズマローゲン型ホスファチジルエタノールアミンもタイトジャンクションに濃縮していることを見出している。しかし、これらの脂質がタイトジャンクション形成のどの過程に重要であるかは、依然として不明なままである。脂質は脂質代謝酵素の代謝産物であり、遺伝子編集技術で特定の脂肪酸鎖の脂質分子種のみを消失させることは困難であり、脂質の細胞内分布を可視化することもまた困難である。このため脂質の機能解析は進んでいないのが現状であった。

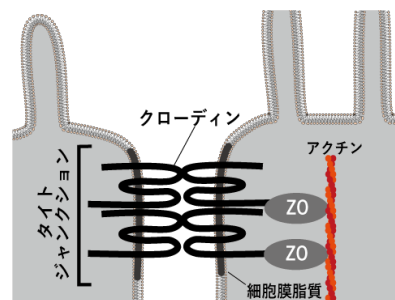


図1  
タイトジャンクションの模式図。

### 2. 研究の目的

本研究は、タイトジャンクションを構成する特定の膜脂質のタイトジャンクション形成における機能を解明し、タイトジャンクション形成機構を理解することを目的として行った。

### 3. 研究の方法

本研究ではタイトジャンクションの試験管内再構成に取り組み、特定の脂質分子種がタイトジャンクション構造形成のどのプロセスにおいて重要であるかを明らかにする。これにより、細胞生物学においてブラックボックスになっている細胞膜脂質の機能を明らかにする。

#### (1) タイトジャンクションを消失させた上皮細胞における細胞膜脂質の局在変化の検討

超分子複合体の形成過程を考える上で、「細胞膜脂質が膜タンパク質の集積を促すのか」あるいは、「膜タンパク質が集合することで特定の脂質の集積を誘導するのか」を明らかにすることは重要な問題である。申請者は現在、培養上皮細胞を用いて、この細胞に発現している全ての Claudin アイソフォームを CRISPR 法によってノックアウトした細胞株の樹立を行う。申請者は、以前の研究において、コレステロールに対するプローブを用いて、タイトジャンクションにコレステロールが集積していることを見出した(Shigetomi et al., 2018, J. Cell Biol.)。そこで、本研究によってタイトジャンクションを消失させた細胞を樹立し、コレステロールの細胞内局在にどのような変化が生じるかを明らかにする。

#### (2) 人工脂質二重膜を用いたタイトジャンクションの再構成

申請者が先行研究で明らかにしたタイトジャンクションの脂質組成を反映させた人工脂質二重膜中に、精製した Claudin を埋め込み、特定の脂質分子種の存在条件下で、Claudin が集積し、タイトジャンクションを形成するか検証する。また、生体膜の脂質二重層の内層と外層の脂質組成は非対称である。そこで、脂質の非対称性を再現した人工脂質二重膜を作成し、非対称性の必要性についても検討する。タイトジャンクションが試験管内で再構築されない場合は、人工脂質二重膜内部に Claudin の裏打ちタンパク質 (ZO タンパク質) を導入し、裏打ちタンパク質の必要性についても検討する。これらの人工脂質二重膜を凍結切断電子顕微鏡で解析することにより、脂質分子種の有無が Claudin の集積やタイトジャンクションの形態に与える影響を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 本研究では、マウス乳腺由来上皮細胞の Eph4 細胞において、発現している6種類のクロードインのアイソフォームをすべてノックアウトした claudin-null 細胞を樹立し、タイトジャンクションの消失が、コレステロールの集積に与える影響を解析した。まず、claudin-null 細胞において、タイトジャンクション構造が消失し、バリア機能が失われていることを確認した。次にコレステロールの局在の変化を調べたところ、claudin-null 細胞においてもコレステロールは AJC 近傍に濃縮していた(図2)。先行研究において、クロードインを裏打ちする足場タンパク質

である Zonula Occludens (ZO) タンパク質を欠損した上皮細胞株では、タイトジャンクションが消失することが示されており、クローディンの AJC への集積には、ZO タンパク質による足場形成が必要であると考えられてきた。Claudin-null 細胞において、ZO タンパク質と結合できないクローディンの変異体を発現したところ、驚くべきことに、この変異体は依然としてタイトジャンクション構造を形成し得ることを見出した。この結果は、クローディンが、ZO タンパク質による足場構造に依存せずに、AJC に集積できることを示唆している。このような ZO タンパク質との相互作用に依存せずにクローディンを AJC に集積させるメカニズムとして、AJC 近傍に形成されるコレステロールに富む膜ドメインが重要な役割を果たしていることを見出した。クローディンは 4 つのシステイン残基がパルミトイル化修飾を受けることが報告されている。これらのパルミトイル化されるシステイン残基をセリン残基に変異させたクローディン変異体は、AJC に集積できず、Claudin-null 細胞において、タイトジャンクションを形成できない。この結果は、パルミトイル化修飾を介したクローディンのコレステロールに富む膜ドメインへの親和性が AJC への集積に必須であることを示唆している。上述の通り、ZO タンパク質を欠損した上皮細胞株においてもタイトジャンクションの消失が観察されるが、興味深いことに、この細胞では、AJC におけるコレステロールの集積は失われていることを見出した。これらの結果は、ZO タンパク質が、クローディンの足場として機能するだけでなく、AJC にコレステロールに富む膜ドメインの形成を誘導し、クローディンの AJC の集積を促進する役割を担うことを示唆している。細胞接着装置の研究は、カドヘリンによるアドヘレンスジャンクションをモデルに研究が進められてきた。タイトジャンクションの形成においても、その類推から足場タンパク質が形成制御機構の中心的役割を果たしていると考えられてきた。一連の研究は、膜脂質がタイトジャンクションの形成において中心的な役割を果たすことを示唆している。

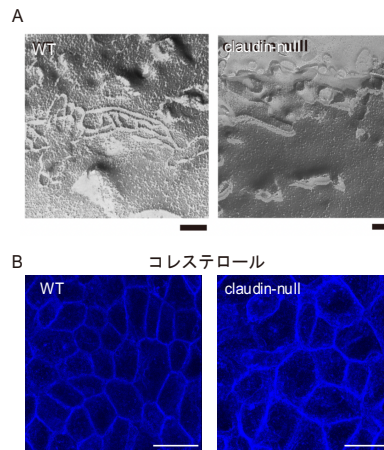


図 2 (A) claudin-null 細胞では、タイトジャンクションの構造が消失している (B) タイトジャンクションを消失した claudin-null 細胞においても、コレステロールは AJC 付近に集積していた。

(2) 本研究では、GFP-claudin4 を細胞大の大きさの人工脂質二重膜である GUV (Giant Unilamellar Vesicle) に導入する系の樹立を行った。まず、GFP-claudin4 を大腸菌由来無細胞系を用いて、100nm 以下の人工脂質二重膜である SUV (Small Unilamellar Vesicle) に導入した。その後、GFP-claudin4-SUV より、GUV を作成するために、アガロースを塗布したプラスチック上に GFP-claudin4-SUV を塗布し、乾燥させた。その後、水和することで、SUV の融合を誘導し、GFP-claudin4-GUV を作成した。作成した GFP-claudin4-GUV を、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、GFP-claudin4 は、GUV の脂質二重膜に、集積していた。また、細胞質領域を抗原とした抗 claudin 4 抗体と Cy3 を付与した 2 次抗体を用いて蛍光抗体法を行い、今回作成した GFP-claudin4 の GUV への挿入方向を検討した。

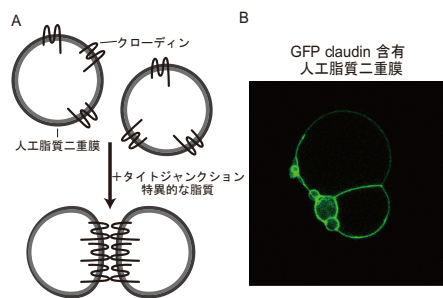


図 3 (A) 人工脂質二重膜を用いたタイトジャンクションの再構成実験の模式図。 (B) GFP claudin を phosphatidylcholine のみで作成した人工脂質二重膜に埋め込んだ。

GFP の蛍光と抗 claudin4 抗体は Merge している様子が観察され、挿入された GFP-claudin-4 の一部は、細胞質領域を GUV 外の溶液側に向けた状態で膜に挿入されていることが明らかになった。今後は、タイトジャンクションの脂質組成を模した GUV を作成し、claudin と脂質の関係性を明らかにし、タイトジャンクションの形成機構を解明したい。

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 1件）

1. 発表者名 重富健太
2. 発表標題 タイトジャンクション領域における膜脂質の集積機構の解明
3. 学会等名 細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重富健太
2. 発表標題 Roles of the cytoskeleton in the accumulation of cholesterol at tight junction regions
3. 学会等名 The 51st NIPS International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 重富健太
2. 発表標題 タイトジャンクション形成における脂質の機能解析
3. 学会等名 生化学会九州支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 重富健太
2. 発表標題 タイトジャンクション形成における脂質の機能解析
3. 学会等名 細胞生物学会
4. 発表年 2022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
---------	---------