

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~2010

課題番号：21770213

研究課題名 (和文) トリセルラージャンクションの形成機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular organization of tricellular junction

研究代表者

小田 裕香子 (ODA YUKAKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70452498

研究成果の概要 (和文)：

体の外側を覆い器官を形成する上皮細胞は、細胞間接着部位において均一な多角形を基本とした形態をとる。この多角形の頂点における細胞間接着構造 (トリセルラージャンクション) に関する知見はこれまで乏しかった。本研究により、トリセルラージャンクションにおける分子構築及び細胞骨格の制御機構が明らかになり、さらにトリセルラージャンクションが細胞の形態形成を制御することが新たに見出された。

研究成果の概要 (英文)：

In an epithelial layer, each cell forms polygonal structure to establish cell-cell adhesions with neighboring cells. We show that tricellular junctional protein shapes epithelial cell morphology at the tricellular corner, which leads to activation of the actin reorganization, thereby shaping the polygonal cell morphology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮細胞、細胞間接着、タイトジャンクション、トリセルラージャンクション、細胞骨格、アクチン

1. 研究開始当初の背景

これまでトリセルラージャンクションに関する知見は乏しく、その重要性はほとんど認

識されていなかった。しかしながら、近年トリセルラーコンタクトが白血球細胞や血行性転移癌細胞の通り道として利用されるこ

とが報告され、トリセルラージャクションが重要な機能を担う可能性が出て来た。また、発生時の形態形成における上皮細胞のダイナミックな変化過程での制御単位として、トリセルラージャクションが注目されつつあった。一方でトリセルラージャクションを形成する分子として、研究開始時においてはトリセルリンのみが報告されていた (Ikenouchi *et al.*, 2005)。また、当研究室より最近報告した LSR は、当研究開始時においてはトリセルラージャクションに局在することのみわかっており、トリセルラージャクションにおける分子構築や分子機能はほとんど明らかにされていなかった (Masuda *et al.*, 2011)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、トリセルラージャクションを構成するトリセルリン以外の分子の探索およびその機能解析を行うことによって、トリセルラージャクションの分子基盤の解明を目的とした。

(2) 本研究では、LSR の分子機能及びトリセルラージャクション局在化機構を明らかにするとともに、トリセルラージャクションに局在する唯一の既知分子として報告されていたトリセルリンとの関係を明らかにすることを目指した。

(3) トリセルリンはトリセルラージャクションにおいてバリア機能を有することが報告されたが、その詳細な機能は不明であった。本研究では、トリセルリンの詳細な分子機能の解明を目指した。また、トリセルリンのトリセルラージャクションへの局在化機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) LSR とともにトリセルラージャクション形成に働く因子を探索するため、LSR の細胞質領域を bait とした酵母 two-hybrid screening を行った。

(2) Tricellulin のトリセルラーコンタクト形成における役割を解明するため、トリセルリンの N 末細胞骨格制御領域を bait とした酵母 two-hybrid screening を行った。

(3) (1)、(2) の方法で同定した分子を細胞生物学的手法、分子生物学的手法を駆使し、局在機構や機能を明らかにした。

4. 研究成果

(1) LSR の細胞質領域を bait として酵母 two-hybrid を行った結果、新規トリセルラージャクション局在タンパク質の同定に成功した。現在、詳細な機能を解析中である。

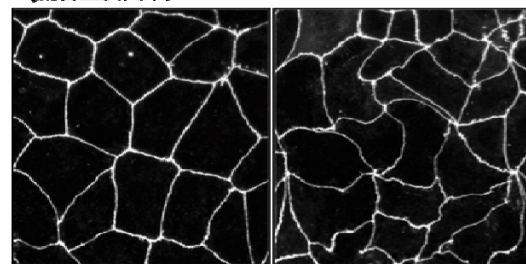
(2) LSR の細胞質領域を bait として酵母 two-hybrid を行った結果、LSR の局在化機構に関わる酵素の同定に成功し、その局在化メカニズムに迫った。また、LSR のトリセルラージャクション局在化機構に関して、その細胞質領域を欠失させた変異体を作製し、局在化責任領域の同定に成功した。現在、論文投稿準備中である。

(3) 各種上皮細胞において、トリセルリンのノックダウンを行ったところ、細胞形態の異常を見出した (図 1)。

図 1

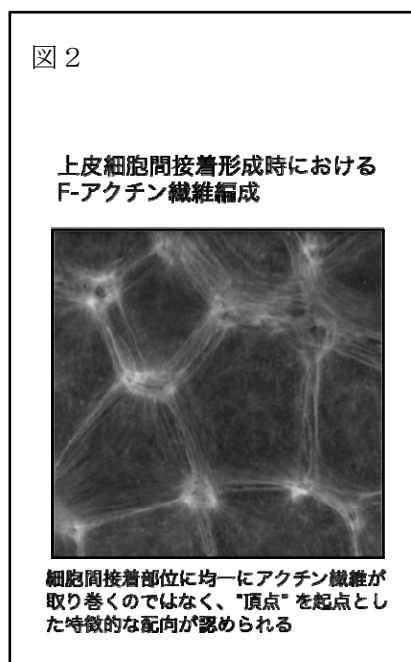
野生型
Caco-2 cell
(腸管上皮由来)

Tricellulin
Knockdown
Caco-2 cell



トリセルリンノックダウン細胞(右図)において
細胞間接着部位が綻行する

さらに、トリセルラーコンタクトにおいて、細胞骨格編成に特徴的な配向性が存在することを見出し、それが細胞間接着領域における張力の発生源となることが明らかになった(図2)。現在論文投稿準備中である。



(4) トリセルリンのN末細胞骨格制御領域を bait とした酵母 two-hybrid screening を行ったところ、アクチン制御因子の同定に成功した。詳細な解析の結果、トリセルリンとの *in vitro* での結合や細胞内在性結合を確認し、結合領域の絞り込みを行った。また、これらの因子群のトリセルラージャンクションにおける細胞骨格形成における役割を明らかにした。さらに、アクチン制御因子に備わる活性化機構を見出すことができた。

(3) の成果とあわせて、現在論文投稿準備中である。

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 2 件)

1. Masuda S, Oda Y, Sasaki H, Ikenouchi J, Higashi T, Akashi M, Nishi E, Furuse M. Angulin/LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell. Sci.*, 査読有, 122, 985-94. 2009

2. Takahashi 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.*, 査読有, 122, 985-94. 2009

[学会発表] (計 4 件)

1. Yukako Oda, Junichi Ikuenouchi, Mikio Furuse
Actin-Myosin Organization at Tricellular Contacts
ASCB/JSCB/RIKEN CDB Summer Meeting 2009, 9. 21-23. Kyoto (Japan)

2. 小田裕香子, 池ノ内順一, 増田小百合, 古瀬幹夫
3 細胞接着部位における細胞骨格制御
第 82 回日本生化学会大会, シンポジウム招待講演 2009, 10. 24.

3. Tricellulin regulates actin-myosin organization at tricellular contacts
小田裕香子, 池ノ内順一, 古瀬幹夫
第 32 回日本分子生物学会年会 2009, 12. 10. 横浜

4. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会
2010 年 12 月 8 日
トリセルラータイトジャンクションの分子

構築

Molecular organization of tricellular
tight junctions

古瀬幹夫, 増田小百合, 小田裕香子

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/cellb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田裕香子 (ODA YUKAKO)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70452498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし