

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15089

研究課題名（和文）タイトジャンクションのターンオーバー機構の解明

研究課題名（英文）Study of turn over mechanisms of tight junction

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：タイトジャンクションの形成には、claudinを裏打ちするZOタンパク質が必要であるとこれまで、広く受け入れられてきた。しかし、私はZOタンパク質の欠損により、タイトジャンクションを消失した細胞においても、プロテアソーム阻害剤を作用させることで、タイトジャンクションの形成が誘導されることを見出した。これは、タイトジャンクションの形成には、ZOタンパク質以外の要素が存在することを示唆している。さらなる解析を行ったところ、ZOタンパク質はコレステロールを集積させ、そのコレステロールに富んだ膜領域にclaudinが集積し、タイトジャンクションを形成するという機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイトジャンクションの形成には、他の細胞接着構造での解析を基にした類推から、裏打ちタンパク質であるZOタンパク質とclaudinの結合が必須であると考えられてきた。しかし、本研究によって、ZOタンパク質との結合は必須ではなく、ZOタンパク質がコレステロールを集積させ、コレステロールに富んだ膜領域にclaudinが集積し、タイトジャンクションの形成に至るといふ、他の細胞接着構造とは異なる形成機構を有していることを明らかにした点は学術的に大きな意義があると考えられる。

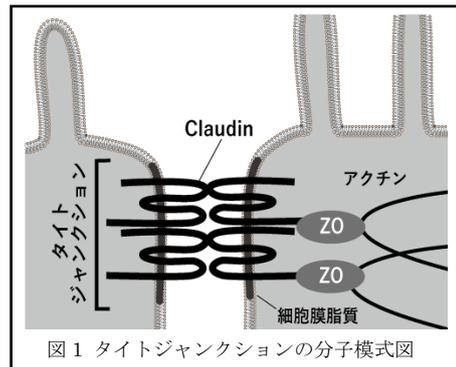
研究成果の概要（英文）：It has been widely accepted that the formation of tight junctions (TJ) requires ZO proteins, a scaffold protein. However, I found that proteasome inhibitors can induce TJ formation even in cell loss of ZO proteins. This result indicated that factors other than ZO proteins exist in TJ formation. Further analysis revealed a mechanism of TJ formation in which ZO proteins accumulate cholesterol and claudin accumulates in the cholesterol-rich membrane regions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：tight junction cholesterol ZO claudin

1. 研究開始当初の背景

我々の体表面を覆う上皮組織は、体内と外環境を隔てる境界（バリア）として機能する。上皮細胞には形態の異なる複数の細胞接着構造が存在し、隣接する細胞同士を物理的に連結している。細胞接着構造の中でも、タイトジャンクションは上皮細胞の最も頂端側に存在する構造であり、上皮組織のバリア機能を担う実体である。タイトジャンクションは、膜タンパク質である claudin、裏打ちタンパク質である zonula occludens (ZO) タンパク質、アクチン細胞骨格、そして細胞膜脂質から構成される超分子複合体である（図1）。隣接する細胞膜の claudin 同士が結合することにより、タイトジャンクションを形成している。タイトジャンクションは強固なバリア機能を有する一方、極めて動的な構造である。例えば、新規に合成された claudin はタイトジャンクションの基底側より取り込まれ、古い claudin は頂端側より取り除かれる様子が観察されており、claudin は上皮極性に沿った方向性を有するターンオーバーを行っていることが報告されている（Van Itallie et al. *Mol. Biol. Cell* 2019）。



一般的にタンパク質のターンオーバーには、リン酸化やユビキチン化などの複数の翻訳後修飾が関与しており、claudin においても多数の翻訳後修飾を受ける部位が存在する（Shigetomi and Ikenouchi *J. Biochem* 2018）。申請者は、これらの翻訳後修飾はタイトジャンクションの形成領域に関与することを明らかにした。申請者はこれまでに、上皮細胞が栄養飢餓状態時や、高浸透圧刺激を受けた際に、claudin がリン酸化を受け、ユビキチン化が抑制され、タイトジャンクション領域が拡大することを見出した（Shiomi and Shigetomi et al. *Sci. Rep* 2015）。その一方で、claudin を発現ベクター等を用いて過剰に発現しても、タイトジャンクションの形成領域は拡大しない。すなわち、余剰な claudin は排除され、タイトジャンクション領域を一定に保つ機構が存在することを示唆している。

これまで、タイトジャンクションの形成には、他の細胞接着構造での知見をもとに、前述した裏打ちタンパク質である ZO タンパク質が必要であると考えられてきた。実際に、ZO タンパク質を欠損した上皮細胞（ZO KO 細胞）では、タイトジャンクションは消失する。しかしながら、この細胞にプロテアソーム阻害剤を作用させると、claudin が集積し、タイトジャンクションを形成することを見出した。この結果は、ZO 非依存的なタイトジャンクション形成機構の存在とタイトジャンクション形成にユビキチン化修飾が関与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

当初の本研究の目的は、タイトジャンクションの形成機構を解明することを目的とし、claudin のターンオーバーの制御に着目し、ZO タンパク質などの関与を明らかにすることを目標として行った。

3. 研究の方法

1) タイトジャンクション領域における claudin のユビキチン化酵素の同定と局在解析

先行研究により claudin に対する E3 ユビキチンリガーゼとして、LNX1p80、NEDD4、ITCH などが報告されている。また申請者もこれまでの研究において、タイトジャンクションに集積する E3 ユビキチンリガーゼを複数同定した。これらの E3 ユビキチンリガーゼについて、CRISPR 法によりノックアウトした培養上皮細胞株を樹立し、その表現型を解析することによって、claudin のユビキチン化の責任酵素を同定する。

2) ZO タンパク質非依存的なタイトジャンクション形成機構の解明

本研究の先行研究により、前述したタイトジャンクションを有していない ZO KO 細胞においても、プロテアソーム阻害剤を作用させることで、タイトジャンクションの形成が誘導されることを見出した。これは、タイトジャンクション形成に ZO タンパク質が必ずしも必要では無いことを示唆している。しかしながら、ZO タンパク質は裏打ちタンパク質として、タイトジャンクションに局在する多くのタンパク質と相互作用することが知られており、ZO KO 細胞を用いた解析では、Claudin との直接的な関係を見出すことは困難であった。そこで、これまでの自身の先行研究で樹立した発現しているすべての claudin を欠損した細胞（claudin-null）や、ZO タンパク質との結合領域を欠損した claudin (delYV 変異体) を発現した claudin-null 細胞を用いて、claudin が ZO 非依存的にどの様にして集積できるのか、また、ZO KO 細胞では、なぜ、claudin の集積が生じないのかを解析する。

4. 研究成果

1) タイトジャンクション領域における claudin のユビキチン化酵素の同定と局在解析

ZO KO 細胞において、プロテアソーム阻害剤を作用させると、claudin が集積し、タイトジャンクションを形成するが、このときに実際に、ユビキチン (Ub) 修飾がタイトジャンクション領域で生じているのかを検証した。ZO KO 細胞に HA Ub を発現した細胞を樹立し、この細胞にプロテアソーム阻害剤を作用させることで、HA Ub の局在を観察した。その結果、コントロールでは、細胞質に局在していた Ub は、プロテアソーム阻害剤を処理した細胞では、タイトジャンクション領域で、Ub が観察され、集積した claudin と共局在している様子が観察された (図2)。

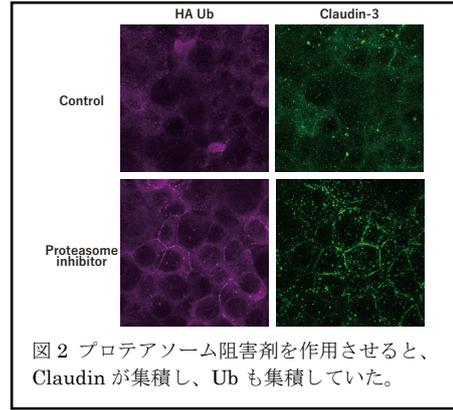


図2 プロテアソーム阻害剤を作用させると、Claudin が集積し、Ub も集積していた。

次に、claudin のユビキチンリガーゼを特定することにした。これまでの claudin のユビキチンリガーゼの研究は、ユビキチンリガーゼの過剰発現実験をもとにしたものがほとんどであり、過剰発現によって、非特異的に分解されている可能性がある。そこで、claudin のユビキチンリガーゼを特定するために、ユビキチンリガーゼを CRISPR-Cas9 法を用いて欠損し、その時の claudin の挙動を観察することにした。しかしながら、ユビキチンリガーゼ KO 細胞の樹立が困難であった。KO の確認には、抗体を用いた western blot または免疫蛍光染色による確認が必要不可欠であるが、これらに使用可能な抗体が市販されておらず、また、ポリクローナル抗体の作成のために抗原タンパク質の精製も行ったが、有効な抗体を得ることはできなかった。そのため、claudin 特異的なユビキチンリガーゼの特定には至らず、ターンオーバー機構の解明にはいたらなかった。

2) ZO タンパク質非依存的なタイトジャンクション形成機構の解明

これまでに、claudin delYV 変異体は ZO タンパク質に結合できないが、タイトジャンクション領域に集積することを観察していた。そこで、claudin の局在に必要なもう一つの要素であるパルミトイル化修飾に着目した。Claudin には、isoform 間で高度に保存された4つのパルミトイル化修飾部位が存在しており、これらは、コレステロールやスフィンゴミエリンといった形質膜に豊富に存在する脂質分子との相互作用に重要である。この4つのシステインをセリンに置換した (4S) 変異体を作成した。4S 変異体は、ZO タンパク質との結合能は有している。しかしながら、タイトジャンクション領域には集積できず、タイトジャンクションは形成できなかった。これは、claudin は ZO タンパク質だけでなく、脂質との相互作用がその局在に重要であることを示唆している。

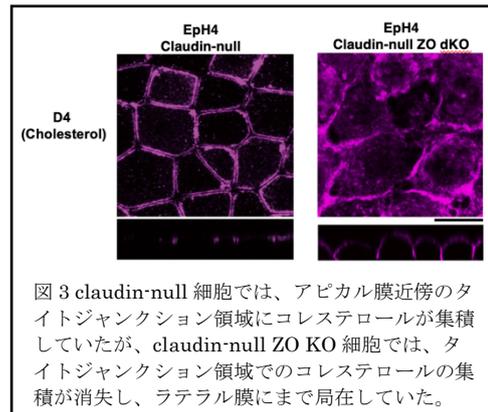


図3 claudin-null 細胞では、アピカル膜近傍のタイトジャンクション領域にコレステロールが集積していたが、claudin-null ZO KO 細胞では、タイトジャンクション領域でのコレステロールの集積が消失し、ラテラル膜にまで局在していた。

これまでの先行研究によって、タイトジャンクション領域は、コレステロールやスフィンゴミエリンに富んだ膜領域であることを明らかにしている (Shigetomi et al. *J. Cell Biol.* 2018)。claudin-null 細胞でも、タイトジャンクションは消失しているが、タイトジャンクション領域にコレステロールが集積していることを明らかにした。これは、claudin の集積に先立って、コレステロールの集積が生じていることを示している。Claudin delYV 変異体は、パルミトイル化修飾を介して、コレステロールに富んだ膜領域に集積し、ZO タンパク質非依存的にタイトジャンクションの形成に至ることができたと考える。では、このようなコレステロールに富んだ膜領域はどのようにして形成されるのであろうか？さらに解析を進めた結果、ZO タンパク質がコレステロールの集積に関与していることを明らかにした。Claudin-null 細胞において、さらに ZO タンパク質を欠損した claudin-null ZO KO 細胞では、コレステロールのタイトジャンクション領域での集積が消失していた (図3)。これは、ZO タンパク質を欠損したことによる、MyosinIIB の集積の消失に起因していることも同時に明らかにできた。これらの発見は、これまで、他の細胞接着構造からの類推により、claudin と ZO タンパク質の結合が、タイトジャンクションの形成には必要であると考えられてきたが、ZO タンパク質がコレステロールに富んだ膜領域を形成し、そこに claudin が集積することで、タイトジャンクションを形成するという新しい知見を得ることができた。これらの研究成果は、PNAS 誌に報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Shigetomi Kenta, Ono Yumiko, Matsuzawa Kenji, Ikenouchi Junichi | 4. 巻 120 |
| 2. 論文標題 Cholesterol-rich domain formation mediated by ZO proteins is essential for tight junction formation | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2217561120 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 重富健太、池ノ内順一 |
| 2. 発表標題 Role of the cholesterol in tight junction formation |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会 |
| 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 令和4年度日本生化学会九州支部例会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|