

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15095

研究課題名（和文）細胞集団運動におけるタイトジャンクションを介した細胞メカニクスの統合的制御機構

研究課題名（英文）Roles of tight junctions in integrative control of cell mechanics in collective cell motility

研究代表者

藤原 佐知子 (Fujiwara, Sachiko)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：40771879

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）：上皮の生理機能には、上皮細胞の接着と細胞骨格の統合的かつ適切な再構築が重要である。本研究で、上皮細胞の細胞間接着であるタイトジャンクション（TJ）の形成と細胞骨格構築および細胞極性形成に相関があり、その分子機構としてTJがRhoAシグナル経路の活性を負に制御することが明らかになった。さらに細胞の集団運動について、TJが基質の硬さ依存的な集団運動の制御に関与することが分かった。これらの成果はTJが細胞の全体的な構造と機能を制御する役割をもち、その働きが上皮の生理機能に重要である可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮の恒常性維持には、上皮細胞の接着や細胞骨格の適切な制御が必須である。その機構において、上皮細胞の細胞間接着であるタイトジャンクション（TJ）が重要な役割を担うことが本研究で明らかとなった。さらにその分子機構を見出すとともに、生理機能として細胞のメカニクスと集団運動制御に関わることが分かった。これまでTJについては、細胞間隙のバリアとしての役割が広く研究されてきたが、それ以外の機能は不明な点が多かった。本研究成果は、TJを中心とした細胞の全体的な構造と機能の制御および生理機能制御という新しい観点を提案するものであり、分野の発展に貢献する意義のある成果である。

研究成果の概要（英文）：Integrated and proper reorganization of epithelial cell adhesion and cytoskeleton is important for the physiological function of the epithelium. In this study, I found that the formation of tight junctions (TJs), cell-cell adhesion structures of epithelial cells, correlates with cytoskeletal architecture and cell polarity formation, and that TJs negatively regulate the activity of the RhoA signaling pathway. Furthermore, TJs were involved in the regulation of collective cell migration in a substrate stiffness-dependent manner, indicating that TJs play critical roles in regulating overall cell structure and function, and that their function is important for the physiological function of the epithelium.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション 細胞接着 細胞骨格 細胞運動

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮の機能は、構成する細胞同士の細胞間接着や細胞を取り囲む基質との接着が適切に形成、再構築されることにより発揮される。研究代表者の所属する生理学研究所 細胞構造研究部門では、これまでに細胞間に形成され上皮のバリア機能に重要なタイトジャンクション (TJ) について、制御機構や生理機能を解明してきた。その中で近年、TJ の構成分子のノックアウトが上皮細胞のアクチン骨格に多様な影響を及ぼすことを新しく見出した。しかしその分子機構や生理的意義は不明で研究が進んでいなかった。研究代表者は所属の研究部門に着任して本研究を開始する前は、力学的環境に応じた上皮細胞の接着と細胞骨格の制御機構について精力的に研究を進めてきた。着任後に現所属のグループで取得された上皮細胞の TJ とアクチン骨格の染色画像データを詳細に見ていく中で、複数の TJ 構成分子が複数経路でアクチン再構築に関与する可能性に気がついた。細胞の力は細胞全体の接着構造と細胞骨格によりバランスがとられる。そこで TJ が細胞接着と細胞骨格のネットワーク制御に関与して細胞のメカニクスに影響し、これが上皮の極性維持や運動などの生理機能の制御および恒常性維持につながるのではないかと想着想に至り、本研究を開始した。

2. 研究の目的

上皮の生理機能には、上皮細胞の細胞間/細胞-基質間の接着と細胞骨格の統合的かつ適切な再構築が重要である。近年、研究代表者らはタイトジャンクション (TJ) が直接および間接的に上皮細胞のアクチン骨格再構築に関与する可能性を見出した。しかし TJ については、細胞間隙のバリアとしての役割が広く研究されている一方で、他の接着複合体や細胞骨格との相互作用については不明な点が多い。そこで本研究では、TJ を中心とした細胞接着と細胞骨格の相互依存的な制御機構を明らかにし、さらにその生理的意義を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) TJ と細胞骨格制御を理解するためのツール “Z0-1 点変異体” の作製

Z0-1 は TJ に局在する足場タンパク質で、TJ 形成のみならず細胞骨格や細胞極性にも影響することが知られている。そこで本研究では、TJ 形成と細胞骨格制御との関係を理解する上で、Z0-1 に着目し研究を推進した。Z0-1 は少なくとも 6 つのタンパク質間相互作用ドメインを保有し、特に N 末の 3 つの PDZ ドメインは TJ 分子との相互作用や、アクチン構造の制御、また Z0-1 自身の TJ への局在に必要と報告されている。従来の Z0-1 の機能解析では N 末端側からの各ドメインの段階的な欠失変異体が多く用いられてきたが、ドメイン欠失によるタンパク質構造変化による二次的影響が無視できないという問題があった。そこでまず、構造生物学の知見を利用して、立体構造予測に基づいた点変異導入により各 PDZ ドメインの標的タンパク質との結合機能を喪失するアミノ酸をピックアップした。予測は名古屋大学 天野剛志教員と廣明秀一教授との共同研究で実施した。ピックアップした候補アミノ酸について、置換するための変異を In-Fusion 法を利用して Z0-1 遺伝子に導入し、変異 Z0-1 発現プラスミドを作製した。変異体の各 PDZ ドメインのタンパク質結合能は免疫沈降法により生化学的に評価した。

(2) Z0-1 変異が細胞骨格および細胞極性に及ぼす影響

Z0-1/Z0-2 ダブルノックアウト細胞に野生型 Z0-1 を発現させた細胞株と、新しく作製した Z0-1 点変異体を発現する細胞株を CRISPR/Cas9 法を用いて樹立した。これらの細胞の TJ 形成能、アクチン骨格、細胞極性を共焦点顕微鏡を用いて詳細な解析を行い、Z0-1 の各 PDZ ドメインの機能がどこに影響するのか解析した。

(3) TJ による細胞骨格制御の分子機構解明

アクチン細胞骨格制御で中心的な役割を担う Rho シグナル経路について、TJ がその活性に関与するか検証した。所属研究室には TJ 分子であるクローディンファミリーを欠失し TJ 形成できない細胞が既に樹立されている。これを用いて、野生型細胞とクローディンノックアウト細胞の RhoA、Rac1、Cdc42 の活性を比較した。RhoA 活性は Rhotekin-RBD、Rac1 および Cdc42 は PAK-PBD によるプルダウンアッセイにより評価した。さらに RhoA の下流であるミオシン軽鎖のリン酸化について、リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットにより評価した。

(4) TJ が細胞のメカニクスと細胞運動に及ぼす影響

細胞の集団運動は膜の突出力と、細胞間および細胞-基質間の接着に発生する力で制御される。この制御系に対する TJ の影響を見るために、硬さの異なるシリコン基板上に野生型細胞と TJ 形成できないクローディンノックアウト細胞を限られた領域に培養し細胞集団を形成させた。シリコン基板は大阪大学 出口真次教授から提供を受ける。集団の動きのタイムラプス画像を位相差顕微鏡で撮影し、比較検証を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格および細胞極性に対する Z0-1 ドメイン機能の影響

構造生物学の知見を利用して、立体構造予測に基づいた点変異導入により各 PDZ ドメインの標

的タンパク質との結合機能を単独あるいは複数喪失した全長 ZO-1 変異体の作製を試みた (図 1A)。その結果、PDZ1 には 3 アミノ酸変異、PDZ2 では 4 アミノ酸変異、PDZ3 では 3 アミノ酸変異でそれぞれの結合タンパク質との結合能が低下もしくは喪失することを生化学的に明らかにした。さらにこれらの ZO-1 点変異体を、ZO-1 およびその相同分子である ZO-2 のダブルノックアウト細胞に導入して恒常発現株を樹立し、ZO-1 自身の局在や ZO-1 結合タンパク質の局在、またアクチン再構築や上皮極性形成に及ぼす影響を検証した (図 1 B, C)。それぞれの機能にどのドメインが関与するのか解析を行ったところ、TJ 形成能とアクチン構造変化および細胞極性構築には相関があることが分かった。これらの知見は、ZO-1 を中心とする TJ の構築が、アクチン細胞骨格制御および細胞極性の確立に重要であることを示す結果である。

(2) Rho シグナルに対する TJ の影響

Rho シグナル経路はアクチン細胞骨格制御で中心的な役割を持つ。TJ がアクチン骨格に影響を及ぼす分子機構として、Rho シグナル経路の関与の可能性を検証した。野生型細胞、TJ 形成できないクローディングノックアウト細胞 (qKO)、qKO にクローディング 2 を発現させて TJ 形成をレスキューした細胞 (qKO+CL2) について、RhoA 活性は Rhotekin-PBD、Rac1 および Cdc42 は PAK-PBD によるプルダウンアッセイにより解析した。Rac1 と Cdc42 については、各細胞で活性に差は見られなかったが、RhoA は野生型細胞 (MDCK II) と比較して qKO で有意に活性が高く、KO+CL2 では野生型と同等であった (図 2A)。さらに RhoA の下流であるミオシン軽鎖のリン酸化について、リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットにより評価したところ、野生型細胞と比較して qKO で有意にリン酸化レベルが高く、KO+CL2 では野生型と同等であった (図 2B)。これらの結果から、RhoA 活性は TJ で負に制御される可能性が高いと明らかになった。

(3) 基質の硬さ依存的な細胞運動に対する TJ の影響

細胞のメカニクスに対する TJ の影響と集団運動における意義を明らかにするために、硬さ依存的な集団運動を評価した。野生型細胞は今回用いた硬さの条件では運動速度に違いは見られなかったが、TJ 形成できないクローディングノックアウト細胞は、より柔らかい基板上での運動速度が低下した (図 3)。これらの結果から、TJ による細胞接着と細胞骨格制御が、細胞が発する力に影響し、その結果基質の硬さ依存的な集団運動が可能になると考えられる。

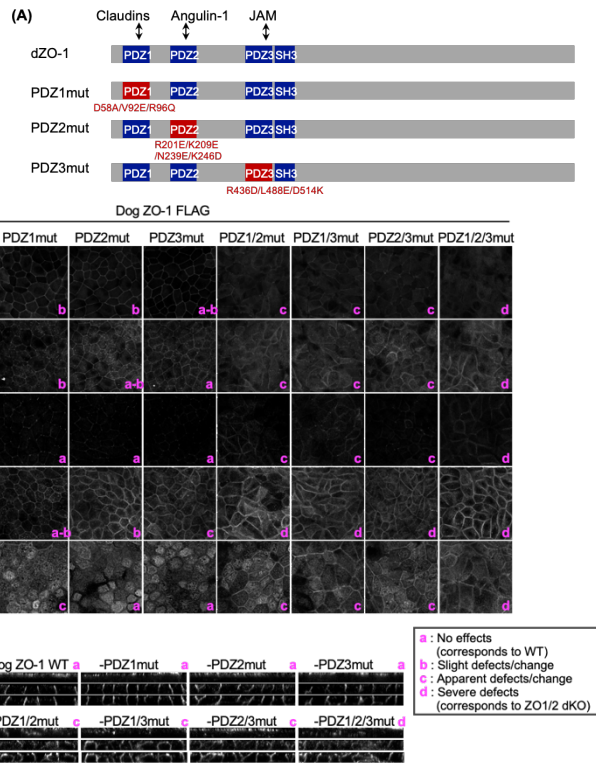


図1. 立体構造予測に基づいた点変異導入による各PDZドメインの標的タンパク質との結合機能を喪失した全長ZO-1変異体の作製とその生理機能への影響解析。(A)アミノ酸変異導入部位 (B)ZO-1およびZO-1結合タンパク質の局在とアクチン骨格解析 (C)細胞極性マーカーによる極性形成の解析

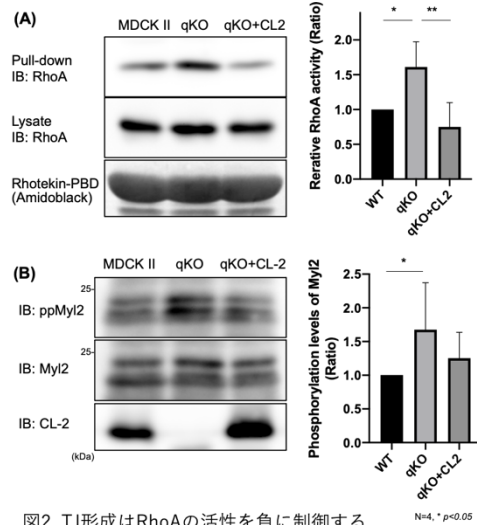


図2. TJ形成はRhoAの活性を負に制御する (A) RhoA活性 (B) ミオシン軽鎖リン酸化

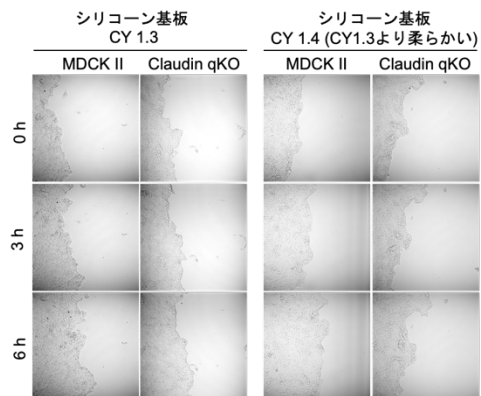


図3. TJが上皮細胞の硬さ依存的な集団運動に及ぼす影響異なる硬さの基板を用いて、集団運動を観察した。野生型細胞 (MDCK II) は2つの硬さで運動速度に差は見られなかったが、TJ形成できないクローディングノックアウト細胞 (Claudin qKO) では、より柔らかい基板上での運動速度が低下した。

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 Sachiko Fujiwara, Thanh Phuong Nguyen, Kyoko Furuse, Yugo Fukazawa, Tetsuhisa Otani, Mikio Furuse	4. 巻 1516
2. 論文標題 Tight junction formation by a claudin mutant lacking the COOH-terminal PDZ domain-binding motif	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 85-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nyas.14881	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原佐知子
2. 発表標題 Physiological roles and molecular mechanisms of keratin intermediate filament-mediated cellular mechanotransduction.
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 藤原佐知子
2. 発表標題 立体構造に基づく点変異導入を利用したタイトジャンクションタンパク質ZO-1の機能解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原佐知子
2. 発表標題 タイトジャンクション形成はクローディングとZOタンパク質の結合に依存しない
3. 学会等名 第12回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生理学研究所 細胞構造研究部門 ホームページ
<http://www.nips.ac.jp/dcs/>

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
---------	---------