

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590336

研究課題名（和文） ジスルフィド結合を介したタイト結合形成メカニズムの解明

研究課題名（英文） The analyses of tight junction formation via disulfide bond

研究代表者

田中 敏 (TANAKA SATOSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：30374250

研究成果の概要（和文）：タイト結合蛋白のうち膜貫通蛋白オクルディンには、C-末側に分子内ジスルフィド結合(s-s 結合)があり、細胞膜上ではより s-s 結合形成の割合が多くなる事を見出した。さらにオクルディンの細胞外ループのシステインを変異させると蛋白発現量が減少し、この部位での s-s 結合がオクルディンの安定性に重要と考えられた。またシステイン変異オクルディンの共免疫沈降で、野生型には沈降されない蛋白が検出され、今後の解析が期待される。その他、膜裏打ち蛋白 Zo-1 の s-s 結合を介した二量体形成性の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We found that occludin, a transmembrane protein found in tight junctions, had an intra-molecular disulfide bond in its cytoplasmic tail of the c-terminus and that the ratio of disulfide bond formation depended on its sub-cellular location. In addition, we discovered that a disulfide bond in the extracellular loop of occludin might affect its stability. Co-immunoprecipitation with occludin containing a cysteine mutation revealed an associated with some kinds of protein that might regulate disulfide bond formation. We also found that zo-1, another tight junction protein, might have dimerized via a disulfide bond.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：分子病理・タイト結合・ジスルフィド結合

## 1. 研究開始当初の背景

タイト結合は上皮組織や血管内皮に存在する細胞間構造であり、バリア機能やシグナル伝達、細胞極性形成などの機能を持つ。従来までタイト結合の機能は、その構成蛋白の組み合わせや、蛋白リン酸化経路についての

機能解析が主であった。またタイト結合蛋白のうち、オクルディン(Occludin)やトリセルリン(Tricellulin)の機能は不明であった。申請者は実験の中で Occludin にジスルフィド結合(s-s 結合)が存在する可能性を見出し、Occludin やタイト結合の機能、形成メカニズ

ムに何らかの関連があると仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究ではタイト結合蛋白、特に Occludin や Tricellulin などの MARVEL ファミリー膜貫通蛋白に着目して、タイト結合にあるジスルフィド結合の存在意義を解明する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

概要：本研究では培養細胞を用いて、タグを付加したタイト結合蛋白を発現させ、その性質を検討した。また、それぞれの蛋白についてシステイン変異を導入して、野生型との性質の違いを検討した。

### (1) タグ (eGFP, FLAG など) を付加したタイト結合膜蛋白を発現するベクターの構築

① タイト結合膜蛋白 (特に Occludin, Tricellulin) と eGFP や FLAG, HA との融合蛋白を発現するプラスミドベクターを作成した。eGFP や FLAG の付加部位については C-末, N-末を選択した。

② タイト結合蛋白のシステイン部位 (例えば, Occludin では 7 か所) を各々アラニンに変換した発現ベクターを作成した。

### (2) タグ付加タイト結合膜蛋白の発現、細胞内分布の観察

① (1) で作製した遺伝子を、ヒト培養細胞 (SiHa, AMOC2, MCAS, HuCCT1, HEK293T などの上皮系細胞) に導入し、一過性発現や安定発現株を作成した。

② 蛍光免疫染色、蛍光顕微鏡により観察し、タグ標識抗体で発現蛋白の細胞内分布を確認した

③ 細胞表面のビオチン化を利用し、細胞膜上の蛋白発現量を測定した。

### (3) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の検討

① 融合蛋白を還元条件、非還元条件でウェスタン解析し、ジスルフィド結合を検討する。

② 細胞膜分画、細胞質分画に分けて、量的比較をする。

③ タイト結合蛋白のシステイン部位変異ベクターを上皮細胞に導入、ウェスタン解析でジスルフィド結合形成の有無を検討した。

### (4) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出

① ジスルフィド結合形成の見られる蛋白について、システイン変異型と野生型それぞれについて共免疫沈降を

行った。

② 得られた蛋白を電気泳動や MALDI-TOF MS 解析を行い、Occludin と相互作用を持つ蛋白、特に thioredoxin family 蛋白の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) タグ (eGFP, FLAG など) を付加したタイト結合膜蛋白を発現するベクターの構築

① タイト結合蛋白のうち、Occludin, Tricellulin, MARVELD3, Zo-1, claudin-1, claudin-4 について、eGFP や FLAG, HA などのタグを付加した蛋白を発現するベクターを作成した。

② Occludin については、全てのシステインについて、アラニン変異ベクターを作成した。Tricellulin, Zo-1 についてもいくつかのシステイン-アラニン変異ベクターを作成した。

### (2) タグ付加タイト結合膜蛋白の発現、細胞内分布の観察

① ウェスタン解析で、Occludin や Zo-1, claudin については、上記の上皮系細胞いずれにも良好な発現が得られた。Tricellulin や MARVELD3 などは MCAS, HuCCT1, SiHa などで解析に十分な発現を示したが、AMOC2 では弱い発現が見られるのみであった。

② 蛍光顕微鏡での観察では、タグのうち、C-末に FLAG を付加した Occludin や Tricellulin, claudin-4 は細胞膜上への発現が確認できた。N-末に eGFP を付加した occludin や Tricellulin は細胞質の一部に集積が見られ、野生型とは異なる分布である。

③ Occludin のうち、細胞膜上に存在するのは、総量の約 10% 程度である。また、claudin-4 は 1% 程度、claudin-3 は 5% 程度である。Occludin と claudin-4 については、FLAG タグ付きと野生型で、細胞表面での蛋白量に有意差が明らかでない。

### (3) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の検討

① N 末 eGFP タグ、C 末 FLAG タグを付加したタイト結合蛋白のうち、Occludin には明らかな、分子内ジスルフィド結合が見られた。また、Zo-1 の一部ではジスルフィド結合

- を介した二量体形成性を認めた。Tricellulin、MARVELD3、claudin-4、claudin-1については、明瞭なジスルフィド結合を確認できなかった。
- ② Occludin に存在するシステインの全ての部位について、アラニン変異型と比較した。うち、216番目と237番目のアミノ酸を変異させたOccludin は蛋白発現が他に比べて極端に低下した。また、アラニンに変異させたアミノ酸の近傍に新たにシステインを加え、ジスルフィド結合を回復させると、Occludin 蛋白発現が回復する。これは蛋白翻訳後の分解作用を受けていることを示唆している。
- ③ Occludin のうち、409番目と500番目のシステインを変異させると、(3)①で見られたような酸化型Occludin が見られなくなり、この部位でジスルフィド結合を形成する事が示された。他のシステインの変異では酸化型Occludin 形成は阻害されない。
- (4) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出
- ① Occludin-FLAG のうち分子内ジスルフィド結合が見られる野生型とジスルフィド結合が欠損した409番目と500番目のシステイン-アラニン変異型について、抗FLAG抗体を用いて共免疫沈降、SDS-PAGEをした。うち、409番目システイン変異型にのみ、45kDa~70kDaの範囲で、他には見られないバンドを確認できた。
- ② 現在解析中である。

#### 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13件)

- ① Takasawa A, Kojima T, Ninomiya T, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S, Sawada N. Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res*, 351(1): 73-84, 2013. doi: 10.1007/s00441-012-1512-7. 査読あり
- ② Kyuno D, Kojima T, Yamaguchi H, Ito T,

Kimura Y, Imamura M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Protein kinase Calpha inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, in press. 査読あり

- ③ Tanaka S\*, Takasawa A, Fukasawa Y, Hasegawa T, Sawada N. An undifferentiated embryonal sarcoma of the liver containing adipophilin-positive vesicles in an adult with massive sinusoidal invasion. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):824-829. (\*corresponding author)  
<http://www.ijcep.com/files/ijcep1207003.pdf> 査読あり
- ④ Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol*, 138(2): 323-338, 2012. doi: 10.1007/s00418-012-0956-x. 査読あり
- ⑤ Soini Y, Takasawa A, Eskelinen M, Juvonen P, Kärjä V, Hasegawa T, Murata M, Tanaka S, Kojima T, Sawada N. Expression of claudins 7 and 18 in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with features of differentiation. *J Clin Pathol*, 65(5): 431-436, 2012. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200400. 査読あり
- ⑥ Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using Clostridium perfringens enterotoxin for prostate cancer. *Prostate*, 72(4): 351-360, 2012. doi: 10.1002/pros.21436. 査読あり
- ⑦ Kyuno D, Kojima T, Ito T, Yamaguchi H, Tsujiwaki M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Protein kinase Calpha inhibitor enhances the sensitivity of human pancreatic cancer HPAC cells to Clostridium perfringens enterotoxin via claudin-4.

*Cell Tissue Res.* 2011, 346(3):369-81. doi: 10.1007/s00441-011-1287-2. 査読あり

- ⑧ Kojima T, Takasawa A, Kyuno D, Ito T, Yamaguchi H, Hirata K, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S, Sawada N. Downregulation of tight junction-associated MARVEL protein marvelD3 during epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Exp Cell Res*, 317(16): 2288-2298, 2011. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.06.020. 査読あり
- ⑨ Masaki T, Kojima T, Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirakawa S, Fuchimoto J, Ninomiya T, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. An NF- $\kappa$ B signaling pathway via PKC $\delta$  regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 22(13): 2144-2156, 2011. doi: 10.1091/mbc.E10-11-0875. 査読あり
- ⑩ Ito T, Kojima T, Yamaguchi H, Kyuno D, Kimura Y, Imamura M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Transcriptional regulation of claudin-18 via specific protein kinase C signaling pathways and modification of DNA methylation in human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem*, 2011, 112(7):1761-72. doi: 10.1002/jcb.23095. 査読あり
- ⑪ Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi J, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N. Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF- $\alpha$  via distinct NF- $\kappa$ B pathways in human nasal epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250: 29-38, 2011. doi: 10.1016/j.taap.2010.09.023. 査読あり
- ⑫ Yamaguchi H, Kojima T, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Son S, Koizumi J, Murata M, Nagayama M, Nobuoka T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Transcriptional control of tight junction proteins via

a protein kinase C signal pathway in human telomerase reverse transcriptase-transfected human pancreatic duct epithelial cells. *Am J Pathol*, 177: 698-712, 2010. doi: 10.2353/ajpath.2010.091226. 査読あり

- ⑬ Ogasawara N, Kojima T, Go M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Masaki T, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Himi T, Sawada N. PPAR $\gamma$  agonists upregulate the barrier function of tight junctions via a PKC pathway in human nasal epithelial cells. *Pharmacol Res*, 61: 489-498, 2010. doi: 10.1016/j.phrs.2010.03.002. 査読あり

[学会発表] (計 8 件)

- ① 高澤啓、計良淑子、村田雅樹、荻野次郎、及能大輔、田中敏、小島隆、長谷川匡、澤田典均、胆道癌における claudin-18、maspin の免疫組織化学的検討。第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 28 日、東京
- ② 杉本幸太郎、富川直樹、金居李紗、田中敏、杉野隆、澤田典均、千葉英樹、クロロディン-6 による細胞間接着は幹細胞の上皮分化を誘導する。第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 28 日、東京
- ③ 村田雅樹、小野佑輔、高澤啓、田中敏、小島隆、澤田典均、膵癌組織および膵癌細胞株におけるタイト結合分子 tricellulin の核への局在。第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京
- ④ 辻脇光洋、村田雅樹、高澤啓、平塚佑太郎、福田利英子、田中敏、小島隆、澤田典均、肝炎および肝臓におけるタイト結合分子の発現変化。第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日、東京
- ⑤ 井上万梨絵、田中敏、染谷真行、高澤啓、村田雅樹、小島隆、齋藤豪、澤田典均、卵巣癌細胞株におけるタイト結合分子 claudin-4 に対する CPE 作用条件についての検討、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 30 日、横浜
- ⑥ 杉本幸太郎、富川直樹、田中敏、杉野隆、澤田典均、千葉英樹、タイト結合分子クロロディンによる幹細胞の上皮分化誘導機構、第 100 回日本病理学会総会、2011

年 4 月 28 日、横浜

- ⑦ 高澤啓、小島隆、及能大輔、辻脇光洋、村田雅樹、田中敏、澤田典均、培養ヒト膵管上皮細胞における tricellulin 発現調節機構の解明 -Ca スイッチによる発現・局在変化を中心に、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、横浜
- ⑧ 及能大輔、小島隆、伊東竜哉、山口洋志、辻脇光洋、高澤啓、村田雅樹、田中敏、澤田典均、膵癌細胞株及び正常膵管上皮細胞におけるタイト結合と PKCa との関係、第 100 回日本病理学会総会、2011 年 4 月 28 日、横浜

〔図書〕（計 1 件）

- ① 小島隆、村田雅樹、高澤啓、田中敏、澤田典均、細胞間結合装置、日本臨床分子形態学会編、病気の分子形態学、学際企画、54-57、2011.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 敏 (TANAKA SATOSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30374250

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし