

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590249

研究課題名(和文)タイト結合構成膜蛋白クローデインの対合形成と細胞間透過性の解析

研究課題名(英文) Investigation of trans-interaction between claudins, tight junction constitutive transmembrane proteins, and paracellular permeability.

研究代表者

稲井 哲一郎 (Inai, Tetsuichiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00264044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：cldn-1, cldn-10aまたはcldn-10bを発現するHEK293細胞を共培養した。cldn-10aとcldn-10bはtrans-interactionしたが、両者はcldn-1とはtrans-interactionできなかった。フリーズフラクチャーによる観察でcldn-10aはP面付着型、cldn-10bはE面付着型のタイト結合を形成した。MDCK I細胞でcldn-10aを発現すると細胞間電気抵抗値はほとんど変化しなかったが、cldn-10bの発現では顕著に減少した。

研究成果の概要(英文)：We established HEK293 cells, which does not form tight junctions (TJs), expressing RFP-cldn-1, RFP-cldn-10b, EGFP-cldn-10a or EGFP-cldn-10b. EGFP-cldn-10a- and RFP-cldn-1-expressing cells, EGFP-cldn-10b- and RFP-cldn-1-expressing cells, or EGFP-cldn-10a- and RFP-cldn-10b-expressing cells were co-cultured and examined by confocal laser scanning microscopy. Both EGFP-cldn-10a and EGFP-cldn-10b were not co-localized with RFP-cldn-1 in cell-cell contacts between heterotypic cells. In contrast, EGFP-cldn-10a was co-localized with RFP-cldn-10b. Using freeze-fracture electron microscopy, P-face-associated or E-face-associated TJ particles were observed in EGFP-cldn-10a- or EGFP-cldn-10b-expressing cells, respectively. When cldn-10a or cldn-10b was expressed in TJ-bearing MDCK I cells, cldn-10a did not alter trans-epithelial electrical resistance (TER), but cldn-10b markedly reduced TER.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：tight junction claudin trans-interaction permeability

1. 研究開始当初の背景

タイト結合構成膜蛋白 claudin (cln) は 4 回膜貫通蛋白で 2 つの細胞外ループ ECL1 と ECL2 を持ち、trans-interaction により対合する。約 30 種ある cln 蛋白ファミリーには、対合できない cln の組み合わせがあり、細胞の癌化で cln の発現パターンが変化し、癌の予後と関連すると言われている。癌化によって対合できない cln の比率が増加して、タイト結合の細胞間透過性が亢進することが原因として考えられる。したがって、ECL1 と ECL2 の機能の解明は重要である。cln はタイト結合の基本骨格を形成する主要な膜蛋白であり、30 以上の分子種はタイト結合の形態形成と機能において、それぞれ特異的な働きがあると考えられている。本研究では cln-10a と cln-10b に注目して ECL1 の機能を調べる。

2. 研究の目的

cln-10 には 10a と 10b という 2 種の isoform がある。両者のアミノ酸を比較すると、ECL1 が第二膜貫通領域に移行する直前までは両者のアミノ酸配列は異なるが、それ以後のアミノ酸配列は全く同じである。そこで、cln-10a と-10b を使ってタイト結合の形態、機能、cln 分子間の相互作用の違いを解析して、ECL1 のアミノ酸配列の違いによるタイト結合の形態と機能に対する影響を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

緑色蛍光蛋白(EGFP)または赤色蛍光蛋白(RFP)を N 末端に付与した融合蛋白 RFP-cln-1, RFP-cln-10b, EGFP-cln-10a または EGFP-cln-10b を安定に発現する HEK293 細胞 (タイト結合を持たない細胞) を作成する。これらを発現する細胞を以下の 3 つの組み合わせで共培養し、局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べて、cln 分子同士の

trans-interaction の有無を調べる :

EGFP-cln-10a と RFP-cln-1、EGFP-cln-10b と RFP-cln-1、EGFP-cln-10a と RFP-cln-10b。次に、EGFP-cln-10a または EGFP-cln-10b を発現する HEK293 細胞をフリーズフラクチャー法で観察して、タイト結合の膜内粒子の付着が P 面型か E 面型かを調べる。最後に、EGFP-cln-10a または RFP-cln-10b を、タイト結合を形成する MDCK I 細胞で発現して、細胞間透過性(TER)を調べる。

4. 研究成果

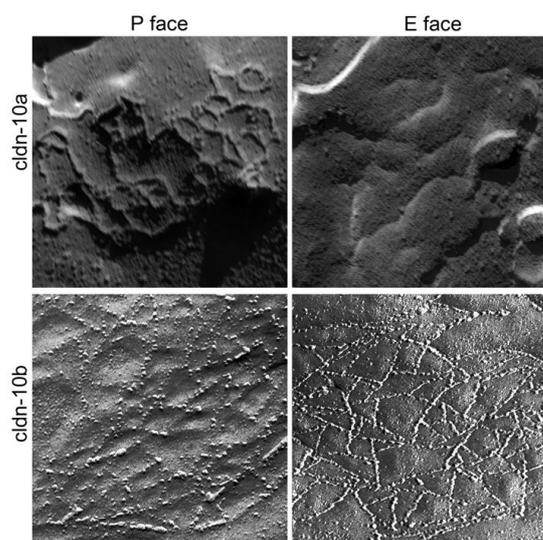
1) trans-interaction の解析結果

タイト結合を形成しない HEK293 細胞で以下の cln を発現する細胞を共培養して、異種細胞間での接着部位におけるそれぞれの局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。共培養の組み合わせ : EGFP-cln-10a と RFP-cln-1、EGFP-cln-10b と RFP-cln-1、EGFP-cln-10a と RFP-cln-10b。その結果、
EGFP-cln-10a と RFP-cln-1 では、同種細胞間にはそれぞれの cln の局在が見られたが、異種細胞間にはいずれの cln も存在しなかった。しかし、EGFP-cln-10b と RFP-cln-1 では同種細胞間にはそれぞれの cln の局在が見られ、なおかつ、異種細胞間にもそれぞれの cln が局在した。以上の結果から、少なくとも同じアミノ酸配列を持つ ECL2 同士は trans-interaction できることが示唆された。

2) フリーズフラクチャー法によるタイト結合の形態の解析結果

タイト結合を形成しない HEK293 細胞で cln-10a または cln-10b を発現して、タイト結合ストランドの形態をフリーズフラクチャーで観察した。cln-10a は、膜内粒子が

P面に付着するP面付着型のストランドを形成し、E面にはそれに対応する浅い溝が観察された。一方、cldn-10bは、膜内粒子の大部分がE面の溝に付着し、P面にも疎に点在した。以上の結果から、ECL2のアミノ酸配列が同一でも、ECL1のアミノ酸配列が違っていると、タイト結合の膜内粒子の付着パターンに影響することがわかった。



3) 細胞間透過性(TER)の解析結果

cldn-1, -3, -4, -7を発現し、タイト結合を形成するMDCK I細胞でcldn-10aまたはcldn-10bを発現して細胞間透過性(TER)を調べた。その結果、cldn-10aを発現するとTERに大きな変化は認められなかった。しかし、cldn-10bを発現するとTERが劇的に低下した。細胞間のイオン透過性はECL1にある酸性および塩基性アミノ酸が影響することがわかっており、今回の結果はcldn-10aとcldn-10bのECL1のアミノ酸配列の違いを反映していると考えられる。

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 8件)

1. Wang D, Beppu K, Yamamoto K, Inai T, Kido H. Effects of bisphosphonate administration on peri-implant bone in vitamin D-deficient rats. *Journal of Hard Tissue Biology* 22(1):79-88, 2013.
2. Inai T, Kitagawa N, Hatakeyama Y, Ikebe T, Iida H, Fujita M. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase downregulates claudin-2 expression and alters paracellular permeability in mouse rectum CMT93-II cells. *Tissue Cell* 2013. doi: 10.1016/j.tice.2012.11.001.
3. Teramoto N, Zhu HL, Yotsu-Yamashita M, Inai T, Cunnane TC. Resurgent-like currents in mouse vas deferens myocytes are mediated by NaV1.6 voltage-gated sodium channels. *Pflugers Arch*. 464(5):493-502, 2012. doi: 10.1007/s00424-012-1153-4.
4. Yahiro J, Inai T, Tsutsui A, Sato A, Nagato T, Taniguchi K, Tsuruga E, Sawa Y. Immunohistochemical and Immunocytochemical Localization of Amylase in Rat Parotid Glands and von Ebner's Glands by Ion Etching-Immunoscanning Electron Microscopy. *Acta Histochem Cytochem*. 26;44(5):201-12, 2011. doi: 10.1267/ahc.10039.
5. Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Maruya Y, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. Growth differentiation factor 5 (GDF-5) induces matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in periodontal ligament cells and modulates MMP-2 and

MMP-13 activity in osteoblasts. Bone and Tissue Regeneration Insights. 4:1-10, 2011.

6. Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Takahashi A, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Sawa Y. The effect of valproic Acid on mesenchymal pluripotent cell proliferation and differentiation in extracellular matrices. Drug Target Insights 5:1-9, 2011. doi: 10.4137/DTI.S6534.

7. Inai T. The coculture method to examine interactions between claudin isoforms in tight junction-free HEK293 cells and tight junction-bearing MDCK II cells. Methods Mol Biol. 762:101-14, 2011 doi: 10.1007/978-1-61779-185-7_8.

8. Kaneko T, Iwamoto S, Murayama E, Kurio H, Inai T, Oda S, Iida H. Immunolocalization of spetex-1 at the connecting piece in spermatozoa of the musk shrew (*Suncus murinus*). Zoolog Sci. 28(6):444-52, 2011. doi: 10.2108/zsj.28.444.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 稲井哲一朗

細胞間接着装置 - 膜蛋白の解析から見えるもの - タイト結合膜蛋白 claudin の相互作用とタイト結合の形態形成

日本顕微鏡学会第 67 回学術講演会
2011 年 5 月 16 日 ~ 18 日
福岡国際会議場

2. 稲井哲一朗、北河憲雄、畠山雄次

タイト結合構成膜蛋白 claudin-1 の細胞外第 2 ループの機能解析
第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2012 年 3 月 28 日 ~ 30 日

サンポートホール高松・かがわ国際会議場

3. 北河憲雄、畠山雄次、稲井哲一朗
JNK 阻害剤による表皮角化細胞由来 HaCaT 細胞の分化誘導と分化マーカーの解析
第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2014 年 3 月 27 日 ~ 29 日
自治医科大学キャンパス

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
稲井 哲一朗 (福岡歯科大学・口腔歯学部・教授)

研究者番号：00264044

(2)研究分担者
廣瀬 英司 (明治国際医療大学・公私立大学の部局等・准教授)

研究者番号：40380620

(3)連携研究者 ()

研究者番号：