

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791868

研究課題名(和文) TACSTD2によるクローディンタンパク分解抑制メカニズムの分子病態解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism suppressing the degradation of claudin proteins by the TACSTD2 protein

研究代表者

中司 美奈 (NAKATSUKASA, MINA)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：70614022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：膠様滴状角膜ジストロフィ(GDLD)の責任遺伝子であるTACSTD2はクローディン1、7と直接結合するが、TACSTD2のどの細胞外ドメインを欠失させても結合が阻害され、膜貫通ドメイン内にあるAxxxGモチーフをアミノ酸置換させると結合が脆弱になった。さらにGDLD角膜では、やや発現量が低下しているものの角膜表層上皮にTJP1の発現を認め、またGDLD患者から樹立した不死化角膜、結膜上皮細胞についても、細胞境界にTJP1、occludinの発現を認め、低いバリア機能を持っていることがわかった。この結果から、GDLD角膜では低いレベルでタイトジャンクションが形成されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The TACSTD2 protein identified as a causative gene for Gelatinous Drop-Like Corneal Dystrophy (GDLD) was directly bound to CLDN1 and CLDN7 proteins, and we found that extracellular region of the TACSTD2 protein is essential for its binding to the CLDN7 protein. We also found that AxxxG motif in the transmembrane domain is important for the binding of the TACSTD2 protein to the CLDN7 protein. Although the TJP1 protein expression level was found to be somewhat more reduced in the GDLD cornea than in the normal human cornea, the TJP1 protein was observed at the apical surface of cornea epithelium. Moreover, in the immortalized corneal epithelial cells and conjunctival epithelial cells derived from the GDLD patient, the TJP1 and the occludin proteins were observed to be localized at the cell-to-cell borders, and the epithelial barrier function was found to be low.

The findings of this study indicate that in GDLD corneal epithelial cells, the tight junction is formed on the low level.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：膠様滴状角膜ジストロフィ TACSTD2 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

膠様滴状角膜ジストロフィ (Gelatinous drop-like dystrophy; GDL) は角膜上皮下のアミロイド沈着と角膜上皮透過性亢進を特徴とする常染色体劣性遺伝形式をとる疾患である。原因遺伝子は、1999年に連鎖解析と候補遺伝子解析によって Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 2 (TACSTD2) と同定されたが、長年にわたり、その機能は不明であった。

最近の我々の研究によって TACSTD2 タンパクは claudin (CLDN) 1 と CLDN7 タンパクに直接結合することが明らかとなり、TACSTD2 は CLDN1 と CLDN7 を ubiquitin-proteasome 系のタンパク分解から保護することでこれらのタンパクの安定性を高めるとともに細胞内局在を制御し、タイトジャンクションの形成に大きく寄与していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

これまでの研究結果から、TACSTD2 は CLDN1 と CLDN7 に結合して、ubiquitin-proteasome 系を介するタンパク分解からこれらを保護していることが示唆された。TACSTD2 と CLDN1、7 との結合部位については TACSTD2 遺伝子のパラロガス遺伝子である EpCAM にて膜貫通ドメインの AxxxG ドメインが結合に重要とする報告があるが、TACSTD2 については不明である。また CLDN1 および CLDN7 のユビキチン化についてはこれらのタンパクのどのリジン残基においてユビキチン化が起こっているのか、またユビキチン化は分解シグナルのものであるか、さらに TACSTD2 がどのような分子メカニズムによって CLDN1、7 のユビキチン化を防止するのかについては全く解明できておらず、本研究にて明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) TACSTD2 と CLDN1、CLDN7 との結合部位に関する検討

膜貫通ドメインを維持したまま TACSTD2 遺伝子の欠失変異体をいくつか作成し、発現ベクターに組み込む。これを不死化ヒト角膜上皮細胞に導入して、抗エプITOブタグ抗体にて免疫沈降させ、沈降物を CLDN1、CLDN7 に対する抗体でウエスタンブロットして結合状態を調べる。また TACSTD2 タンパクの膜貫通ドメインの AxxxG モチーフについて、部位特異的変異導入によってアラニンとグリシンを片方または両方アミノ酸置換して CLDN1、CLDN7 との結合がどうなるかを検討する。

(2) CLDN1、CLDN7 のユビキチン化についての検討

予備検討では CLDN1 にて MG-132 処理によってユビキチン化された CLDN1 が蓄積していることが認められたが、さらに詳細に検討する。またユビキチン化が確かに分解を目的とした修飾であるかについては、ユビキチンのリジン 48 を特異的に認識する抗体を用いて検討する。

(3) TACSTD2 遺伝子のノックアウト細胞の樹立

本研究は TACSTD2 遺伝子変異の GDL における分子病態の詳細な解明が目的であるが、同時に GDL の治療への応用についても考えている。その際には GDL のモデル細胞が必要となる。モデル細胞としては患者より得られた角膜ないし結膜上皮細胞を不死化することを予定している。予備検討では SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子の導入によって結膜上皮細胞を不死化することに成功しており、同様の方法で樹立することは十分可能と考えている。

(4) GDL 角膜、および GDL 患者由来の不死化角膜上皮細胞、不死化結膜上皮細胞におけるタイトジャンクション関連タンパクの発現についての検討

GDL、および GDL 患者由来の不死化角膜上皮細胞、不死化結膜上皮細胞について、タイトジャンクション関連タンパクである TJP1 や Occludin に対する抗体を用いてタンパク発現を調べる。

4. 研究成果

(1) TACSTD2とCLDN1、CLDN7との結合部位に関する検討

TACSTD2 の細胞外ドメインのどの機能ドメインを欠失させても CLDN7 タンパクとの結合が阻害された。また TACSTD2 の膜貫通ドメイン内にある AxxxG モチーフのアラニンとグリシンの両方をアミノ酸置換させると CLDN7 との結合が脆弱になった。

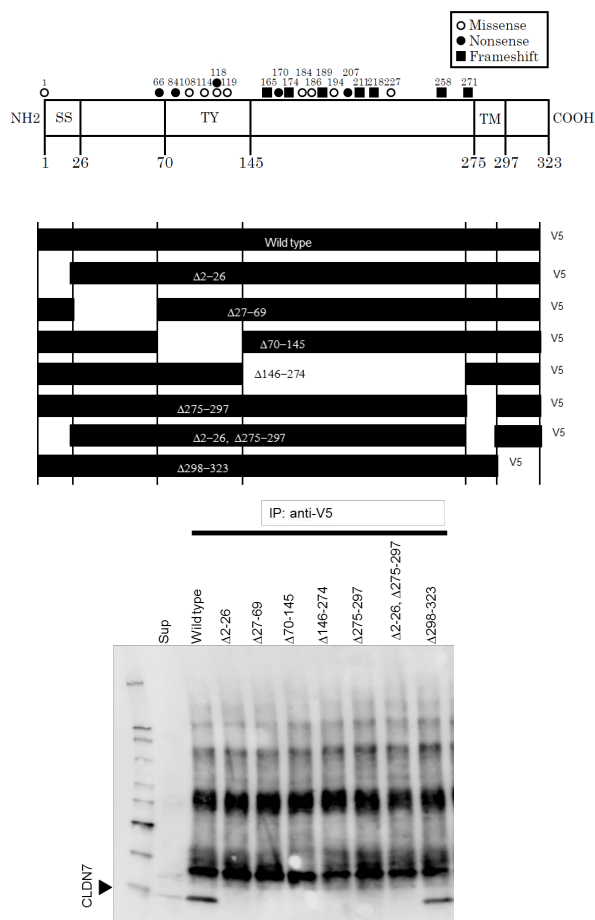


図1 TACSTD2 のいずれの細胞外ドメインを除いても、CLDN7 との結合が阻害された。

(2) CLDN1、CLDN7 のユビキチン化についての検討

免疫沈降実験にて、CLDN1、CLDN7 のユビキチン化を認めないことが明らかとなった。結果、当初予定していたプロテアーゼ阻害剤による GDLN の治療の可能性は否定的であると判断した。

(3) TACSTD2遺伝子のノックアウト細胞の樹立

GDLN 患者より得られた角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を用いて、SV40 large T 抗原遺伝子と hTERT 遺伝子の導入によって不死化角膜上皮細胞、結膜上皮細胞を作成することに成功した。

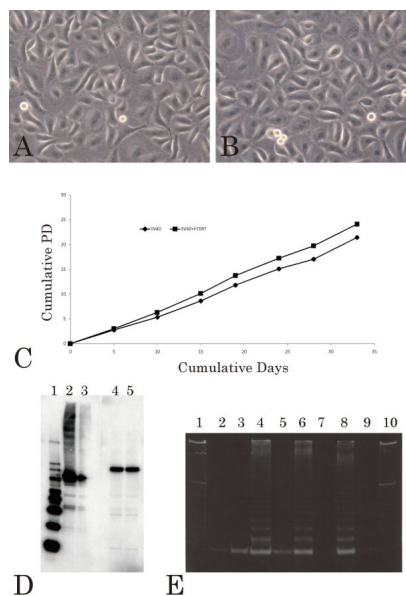


図2

A: 結膜上皮細胞に SV40 large T antigen 遺伝子を導入した。B: 結膜上皮細胞に SV40 large T antigen 遺伝子および hTERT 遺伝子を導入した。C: Population Doubling 解析。D: hTERT および SV40 large T antigen 遺伝子の発現をウエスタンブロットで確認した。E: テロメラーゼ活性を TRAP アッセイにて検出した。

(4) GDLN角膜、およびGDLN患者由来の不死化角膜上皮細胞、不死化結膜上皮細胞におけるタイトジャンクション関連タンパクの発現についての検討

GDLN 角膜では正常ヒト角膜組織と比べ、やや発現量が低下しているものの、角膜表層上皮の apical に TJN の発現を認めた。また、不死化角膜および結膜上皮細胞についても、細胞境界に TJN1、occludin の発現を認めた。上皮バリア機能は、正常角膜上皮細胞に比べて著明な低下を認めるものの、ゼロではなく

低いバリア機能を持っていることがわかった。

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1件)

1. Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, Aoi K, Matsuda A, Funaki T, Yamasaki K, Nakatsukasa M, Ebihara N, Murakami A, Hamuro J, Kinoshita S: Establishment of a human corneal epithelial cell line lacking the functional TACSTD2 gene as an in vitro model for gelatinous drop-like dystrophy. Investigative Ophthalmology & Visual Science 54(8); 5701-5711: 2013.
DOI:10.1167/iovs.12-11043

[学会発表](計8件)

1. Kawasaki S, Kitazawa K, Shinomiya K, Nakatsukasa M, Tsujikawa M, Matsuda A, Murakami A, Nishida K, Kinoshita S. Theoretical assessment for the gene therapy of gelatinous drop-like corneal dystrophy. ARVO 2014.5.5 Orlando USA
2. Kitazawa K, Kawasaki S, Ueno M, Tanaka H, Shinomiya K, Nakatsukasa M, Kinoshita S. Investigation of protein kinase C alpha in corneal epithelial cells derived from a gelatinous drop-like corneal dystrophy patient. ARVO 2014.5.8 Orlando USA
3. 北澤耕司、川崎諭、上野盛夫、田中寛、篠宮克彦、中司美奈、木下茂。GDLD患者由来の不死化角膜上皮細胞における PKC- 発現の検討。第118回日本眼科学会総会 2014.4.2~2014.4.6 東京 日本
4. 中司美奈、川崎諭、北澤耕司、篠宮克彦、木下茂。膠様滴状角膜ジストロフィにおけるタイトジャンクション構成機構。第38回日

本角膜学会総会 2014.1.30 沖縄 日本

5. Kitazawa K, Kawasaki S, Aoi K, Shinomiya K, Matsuda A, Hunaki T, Nakatsukasa M, Hamuro J, Murakami A, Kinoshita S. Investigation of gene therapy using immortalized cells derived from a gelatinous drop-like corneal dystrophy patient. ARVO 2013.5.5~2013.5.9 Seattle USA

6. 中司美奈 .TACSTD2 遺伝子による角膜上皮タイトジャンクション機能抑制機構の解明。第37回日本角膜学会総会 2013.2.15 和歌山 日本

7. 北澤耕司、川崎諭、篠宮克彦、松田彰、舟木俊成、山崎健太、中司美奈、海老原伸行、村上晶、木下茂。膠様滴状角膜ジストロフィ患者由来の不死化角膜および結膜上皮細胞の樹立。第116回日本眼科学会総会 2012.4.5 東京 日本

8. Kitazawa K, Kawasaki S, Shinomiya K, Matsuda A, Hunaki T, Nakatsukasa M, Yamasaki K, Ebihara N, Murakami A, Kinoshita S. Establishment of immortalized corneal and conjunctival epithelial cells lacking the functional TACSTD2 gene. ARVO 2012.5.7 Florida USA

6. 研究組織

(1)研究代表者

中司 美奈 (MINA NAKATSUKASA)

京都府立医科大学医学部附属病院・専攻医
研究者番号：70614022

(2)研究分担者

研究者番号：

(3)連携研究者

研究者番号：