

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840068

研究課題名(和文) AMP活性化プロテインキナーゼによるタイトジャンクション機能制御の解析

研究課題名(英文) AMP-activated protein kinase regulates the function of tight junction.

研究代表者

矢野 智樹 (Tomoki, Yano)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20546121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：AMP活性化プロテインキナーゼ (AMPK)がTight Junction (TJ)に局在する幾つかのタンパク質をリン酸化制御していることを示した。その一つのタンパク質であるcingulinはAMPKによるリン酸化を受け分子形態を変化させていることを示した。このAMPKによる分子形態制御機構を利用し、将来的にはFRETプローブを開発することで、細胞内のAMPKの活性を可視化するツールになる。

研究成果の概要(英文)：I found that the AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylates several proteins of tight junction (TJ). I showed that when cingulin, it is tight junctional protein, was phosphorylated by AMPK, the molecular configurational change occurred. By exploiting this conformational alteration regulated by AMPK, I try to design a module that undergoes efficient fluorescence resonance energy transfer (FRET). FRET probe is possible to be a powerful tool to visualize the intracellular nutritional condition by observing the activity of AMPK.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞間接着 ション タイトジャンクション 細胞骨格 AMP活性化プロテインキナーゼ アドヘレンスジャンクション

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は細胞接着装置により隣り合う細胞と接着する事で上皮細胞シートを形成している。この上皮細胞シートが私たちの体を覆うように存在し、外界と体内を隔てる事により私たちの体は恒常性を維持している。この外界と体内を隔てるという重要な機能を上皮細胞にもたらしめているものこそ、細胞接着装置の一つであるタイトジャンクション (TJ) である。TJ の分子構造はクロードインやオクルディンと呼ばれる4回膜貫通タンパク質とその裏打ちタンパク質とよばれる細胞内骨格であるアクチン結合タンパク質である ZO-1、2 や cingulin が知られている。TJ とアクチンの関係については非常に多くの知見が得られているのに対し、もう一つの細胞骨格である微小管と TJ の関係は全く得られていなかった。そこで、申請者たちは微小管と TJ との相互作用を明らかにするために超解像顕微鏡 (SIM) を用いて上皮細胞の観察を行った。上皮細胞の微小管構造は中心体から伸びる微小管構造と細胞の頂低極性に沿って走る微小管構造が知られていたが、超解像顕微鏡を用いる事により、今まで見られていなかった細胞のアピカル面直下にアピカル面に平行に走る微小管構造を発見した(図2)。この新たな微小管構造は TJ の裏打ちタンパク質である cingulin と結合し TJ に繋がっていた。cingulin は N 末側に微小管結合ドメインを持ち、その結合は AMP 活性タンパク質化キナーゼ (AMPK) によってリン酸化されることにより調節されている事を示した。AMPK と cingulin は酵素-基質の関係であり、cingulin の配列にある 132 セリンと 150 セリンが AMPK によってリン酸化される事を見出した。以上の結果から TJ の機能に AMPK が深く関係している事が示唆された。AMPK は細胞の栄養状態によりその活性が変化し、代謝異常やガン化

のメカニズムに非常に大きな役割が示されている。今日まで AMPK による TJ の制御機構は示された事はなく、細胞の栄養状態によって活性の変化する AMPK が TJ の機能を制御している事は非常に興味深い。よって本申請では TJ と AMPK の関係により、AMPK による TJ の制御機構を解析し上皮細胞がどのように生体の恒常性を維持しているかを明らかにする事により、TJ の新たな機能の発見が期待された。

2. 研究の目的

上皮細胞シートは細胞接着装置であるタイトジャンクション (TJ) により外界と体内を隔てているだけでなく、TJ は生体内の恒常性するためにその機能をダイナミックに変化させている。今日まで TJ のダイナミックな機能制御機構の詳細は不明であったが、申請者 AMP 活性プロテインキナーゼ (AMPK) が TJ の機能制御において重要な働きをしている事を明らかにした。これにより AMPK が恒常性の維持の制御機能を担っていることが示唆され、この制御機能を明らかにする事は生体の恒常性維持のメカニズム解明に向けて非常に重要であると思われる。よって本申請では、TJ に局在する AMPK の基質タンパク質の機能を解析し、AMPK による TJ 制御機能を統合的に理解する事を目的とした。

3. 研究の方法

本申請は生化学、細胞生物学、分子生物学、電気生理学的手法を用いて遂行する。AMPK との結合が観られた TJP1 と TJP2 について解析を進めて行く。TJP1 と TJP2 の AMPK の標的配列を検索し、いくつかある候補の配列に変異を入れたリン酸化型、非リン酸化型変異タンパク質を精製する。このタンパク質を AMPK と反応させ、AMPK によるリン酸化部位を特定する。リン酸化されるアミノ酸をアラニンやグルタ

ミン酸に変異させたタンパク質を細胞に発現させ、その挙動を観察する。また、細胞内での AMPK 活性を可視化する FRET プローブを作成し、AMPK 活性の状態変化における TJP2 の機能変化を観察する。

4. 研究成果

第一に Gwinn らの論文で示された AMPK の標的配列予想をもとに TJ 構成タンパク質の配列を検索した。これにより AMPK の標的配列をもつタンパク質がいくつか発見された。第二に、発見されたタンパク質と AMPK との免疫沈降法を用いて結合実験を行った結果 2 つのタンパク質が示された (Tight Junction Protein: TJP1、TJP2 とする; 図 1)。第三に、このタンパク質の

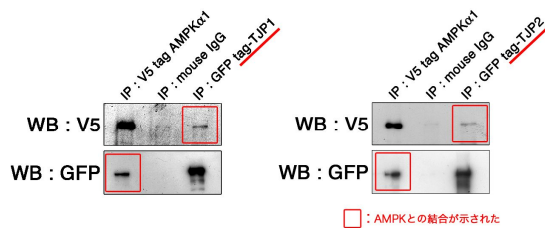


図 1. AMPK との結合が観られた 2 つのタイトジャンクションに局在するタンパク質 (TJP1、TJP2 とする)

AMPK によってリン酸化されると思われるセリンをアラニンに変換した変異タンパク質を作成し、AMPK との基質検定を行った。この結果より、TJP2 の AMPK によるリン酸部位が XY 番セリンである事が明らかになった (図 2)。

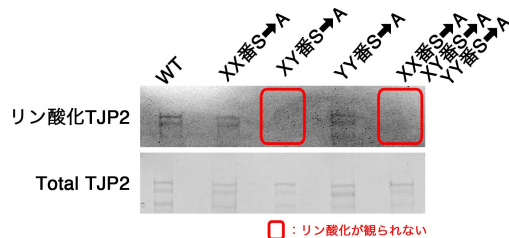


図 2. AMPK による TJP2 のリン酸化部位は XY 番目のセリン

次に CRISPR DNA editing 法を用いて TJP2 ノックアウト細胞 (KO 細胞) を作成した。細胞はマウス乳腺細胞由来の Eph4

細胞を用いた。これに加えて TJ に局在し AMPK の基質である cingulin の KO 細胞を作成した。Cingulin は AMPK によるリン酸化を受けると微小管と結合できるが非リン酸化の状態では微小管との結合が見られないことをこれまでの研究で明らかにした。これは AMPK のリン酸化制御による cingulin 分子の分子形態変化であると考え、野生型 cingulin や AMPK によるリン酸化型変異タンパク質及び非リン酸化型タンパク質を生成し、Low-angle shadowing 法を用いて電子顕微鏡により cingulin の分子形態を観察した。結果は野生型 cingulin の分子形態はひも状のものと球状の分子形態が見られた。野生型 cingulin と AMPK を in vitro で反応させ、その時の分子形態を観察すると、ひも状の分子形態が野生型 cingulin と GST を反応させた時に比べ多く見られた。加えて AMPK によるリン酸化される配列に変異を入れた非リン酸化型変異タンパク質と AMPK を反応させても分子形態に変化は見られなかった (図 3)。

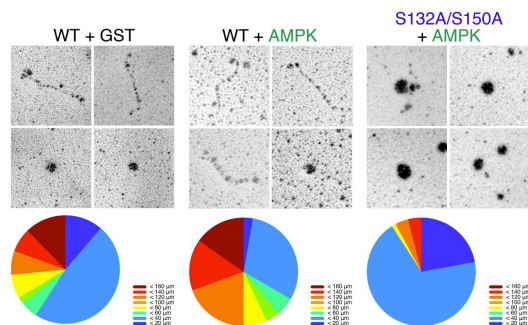


図 3. Cingulin と AMPK の in vitro での反応による cingulin 分子形態の変化

さらに、非リン酸化型変異タンパク質では球状の分子形態となり、リン酸化型変異タンパク質ではひも状の分子形態となることを示した (図 4)。これらの結果から cingulin の分子形態変化が AMPK により引き起こされていることが明らかとなった。この cingulin の分子形態変化を利用して蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた FRET プローブの作成を試みた。しかし、今日まで観察に用いることができるプロ-

ブの作成にまでは至っておらず、今後の継続したプローブの作成が必要である。

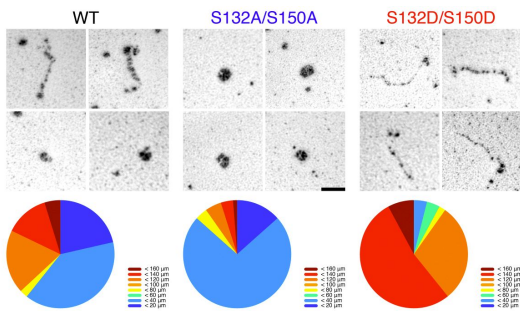


図4. Cingulinのリン酸化型変異タンパク質と非リン酸化型変異タンパク質cingulin分子形態の変化

以上のことから AMPK による TJ の制御機構が示唆され、さらに研究を進めていくための分子の発見や用具立てを進めることができた。今後、本研究が発展することで、細胞の栄養状態と細胞接着の機能の関係性を見出すことが期待される。

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)

[学会発表](計 7 件)

Yano T., Matsui T., Tamura A., Uji M., Tsukita S. Association of cinglin with microtubules in tight junctions and its regulation by AMPK. 第 66 回 細胞生物学会大会. 2014 年 6 月 12 日. 奈良新公会堂 (奈良)

Yano T., Yamazaki Y., Tsukita S. AJX-C, a new binding partner of β -catenin, regulate the maintenance of cell-cell adhesion. 第 37 回 分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日. パシフィコ横浜(神奈川県)

Yano T., Kanoh H., Tamura A., Tsukita S. Regulation of the tight junction (TJ)-based apical networks of microtubules by TJ-MAPs. 2014 Cell

Biology ASCB Annual Meeting. 2014 年 12 月 7 日. Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, Pennsylvania.

Yano T., Matsui T., Tamura A., Uji M., Kanoh H., Tsukita S. Tight Junction-based Building of apical microtubule network of epithelial cells. 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第 92 回 日本生理学会大会. 2015 年 3 月 22 日. 神戸国際会議場 (兵庫)

Yano T., Uji M., Tsukita S. Structural conversion between pill and thread forms of cingulin regulated by AMP-activated protein kinase. BMB2015. 2015 年 12 月 2 日. 神戸国際会議場 (兵庫)

Yano T., Yamazaki Y., Tsukita S. Calmin, a novel AJ components, crosslinks β -catenin to F-actin independently of α -catenin. 2015 Cell Biology ASCB Annual Meeting. 2015 年 12 月 14 日. San Diego Convention Center, California.

矢野智樹、氏昌未、田村淳、松井毅、月田早智子. TJ-アピカル複合体-その 1-cingulin による構築. 生体運動合同班会議プログラム. 2016 年 1 月 8 日. キャンパスプラザ京都 (京都)

[その他]

ホームページ等

大阪大学大学院生命機能研究科 / 医学系研究科 月田研 HP

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野智樹 (YANO TOMOKI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20546121