

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04786

研究課題名(和文)タイトジャンクション形成の制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms involved in the regulation of tight junctions

研究代表者

池ノ内 順一 (Ikenouchi, Junichi)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：10500051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：タイトジャンクションは上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造である。バリア機能の破たんは慢性的な抗原や病原菌の体内への侵入を許し、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の原因となる。本研究では、タイトジャンクションの形成に関わる分子機構の解明を行い、細胞膜脂質のコレステロールがタイトジャンクション形成に必須であることを見出した。さらに、形質膜のコレステロール量の制御機構の解明にも取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タイトジャンクションは上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造である。バリア機能の破たんは慢性的な抗原や病原菌の体内への侵入を許し、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の原因となる。このため、タイトジャンクションのもつバリア機能を人為的に制御する方法論を開発することは医学的に重要な課題である。またタイトジャンクションは、体内の水やイオンが体外に漏出することを防ぐ上でも必須の構造であり、生体の恒常性維持に重要である。しかしながらタイトジャンクションの形成メカニズムは詳細に明らかになっていない。本研究課題において、コレステロールがタイトジャンクションの形成制御に関わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tight junctions are cell membrane structures responsible for the barrier function of epithelial cells. Breakdown of the barrier function causes chronic inflammation such as atopic dermatitis and ulcerative colitis. In this study, we elucidated the molecular mechanism involved in the formation of tight junctions and found that cholesterol is essential for tight junction formation. Furthermore, we revealed that plasma membrane cholesterol is up-regulated by the formation of adherens junctions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション コレステロール 上皮細胞 クローディン 形質膜 カテニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タイトジャンクション (TJ) は上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造である。バリア機能の破たんは慢性的な抗原や病原菌の体内への侵入を許し、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の原因となる。このため、TJ のもつバリア機能を人為的に制御する方法論を開発することは医学的に重要な課題である。また TJ は、体内の水やイオンが体外に漏出することを防ぐ上でも必須の構造であり、生体の恒常性維持に重要である。

TJ の主たる細胞接着分子は 4 回膜貫通タンパク質のクローディンである。マウスのゲノム上に存在する 27 種類のクローディンは、特定の器官の上皮組織に発現し、そのノックアウトマウスは、脳血管閉塞 (クローディン 5)、セルトリ細胞による精巣血管閉塞 (クローディン 11) など各器官の恒常性維持に重要な上皮組織のバリア機能の破たんによる表現型を示す。また逆に L 線維芽細胞にクローディンを強制的に発現させると TJ を異所的に形成することから、クローディンが形質膜に存在することが TJ の形成に必要なかつ十分であると理解されている。

しかし、発現ベクター等によってクローディンを過剰に上皮細胞に発現させても、TJ の形成が拡大したり、上皮細胞のバリア機能が亢進することはない。従って、バリア機能を担う細胞膜構造としての TJ の形成はクローディンの発現量の調節以外の方法で制御されていることが示唆されるが、そのような分子機構は殆ど明らかになっていない。

TJ はクローディン以外にも、クローディンを細胞質側から裏打ちする ZO-1 などの足場タンパク質、アクチン細胞骨格に加えて、細胞膜脂質など、多くの要素から構成される超分子複合体である。そこで、本研究提案では、クローディン以外の TJ 構成要素が TJ の形成において果たす役割を解明することを目的とした。

2. 研究の目的

細胞接着装置は、多細胞生物体制の根幹をなす重要なシステムである。この分野において、これまで細胞接着に関わるタンパク質複合体の同定に関する研究が中心であり、先行研究においてタイトジャンクション (TJ) の主たる細胞接着分子としてクローディンが同定された。しかしながら、細胞にクローディンが発現していることと、細胞膜構造としての TJ が形成されることの間には大きなギャップが存在する。本研究提案では、このギャップに着目して、細胞膜構造の解明を目指した。TJ は細胞膜構造であるが、TJ 領域の細胞膜脂質の組成や TJ 形成において細胞膜脂質が果たす役割に関する先行研究は殆ど為されていない。本研究では、TJ 形成における細胞膜脂質の関与について解明することを主たる目的とした。

上皮細胞の TJ によるバリア機能は感染性微生物や抗原となるタンパク質の体内への侵入を防ぎ、体内からのイオンや水の漏出を防ぐ生体の恒常性維持に必須である。本研究提案において TJ の形成制御機構を解明し、TJ の形成量を人為的に制御することができれば、感染症などの予防法や治療法の確立に有用な基礎的な知見を提供すると考えられる。

3. 研究の方法

上皮細胞において、タイトジャンクション (TJ) の形成はアピカル膜の直下の限局された細胞膜領域に限局されている。上皮細胞の細胞接着を一度破壊し、その再形成過程を詳しく観察すると、TJ の形成に先立って、まず E-カドヘリンを介したアドヘレンスジャンクション (AJ) が形成される。この際に、E-カドヘリンの阻害抗体を細胞に処理すると、AJ のみならず TJ の形成が阻害されることが報告されている。また別の先行研究において AJ の必須の構成要素である カテニンの発現が消失した PC-9 細胞では、AJ のみならず TJ が形成されないことが知られている。

上記の観察事実から、TJ 形成にはそれに先立つ AJ 形成が必要であることが明らかになった。その理由として、AJ を形成することによって細胞膜同士を物理的に近接させることによって、隣接細胞間のクローディン同士の結合が可能となり TJ の形成を可能にしているのではないかと考えられてきた。本研究課題では、カテニンの発現が消失させた培養上皮細胞を樹立し、AJ の消失が TJ 形成にどのような影響を及ぼすかという点に着目して、解析を行った。

4. 研究成果

(1) タイトジャンクション領域の細胞膜脂質の組成の解析

タイトジャンクション (TJ) はフリーズフラクチャー電子顕微鏡観察を行うと、形質膜の紐状の構造体 (TJ ストランド) として観察される。このため、TJ の形成メカニズムを理解する上で、申請者は TJ の特徴的な細胞膜構造の理解が重要であると考えて、TJ 領域の細胞膜脂質組成の解析を試みた。申請者は、先行研究において細胞膜を物理的に単離してその脂質組成の解析を行う方法論を確立した (Ikenouchi et al. J Biol. Chem 2012)。この方法論を用いて TJ を形成している細胞膜の脂質組成を明らかにする実験を行った。L 細胞にクローディンを発現すると、隣り合った細胞同士の形質膜全体に TJ が形成される。クローディンを発現した L 細胞と親株の L 細胞から細胞膜を単離しその脂質組成を比較したところ、極長鎖脂肪酸鎖を有する

スフィンゴミエリンが TJ 領域に増加していることを見出した (Shigetomi et al. J Cell Biol 2018)。さらに、極長鎖脂肪酸鎖を有するスフィンゴミエリンと相互作用することが知られているコレステロールも TJ 領域に豊富に存在することが明らかになった。

(2) アドヘレンスジャンクションによるタイトジャンクション形成制御機構

上述の通り、AJ 形成の障害が TJ の形成に与える影響を詳細に調べるために、マウス乳腺由来培養上皮細胞の EpH4 細胞において、AJ 形成に必須である裏打ちタンパク質 カテニンの発現を消失させた細胞株 (-カテニン K0 EpH4 細胞) を樹立した。この細胞では、AJ 及び TJ のいずれの細胞接着構造も消失しており、さらに興味深いことにクローディンはライソゾームに蓄積していた。このことから、AJ を消失した細胞ではクローディンが恒常的に分解されていることが示唆された。AJ を消失した細胞では、クローディンの細胞内の取り込みが亢進しているのではないかと考えて、様々な可能性を検討したところ、野生型の EpH4 細胞と -カテニン K0 EpH4 細胞の脂質組成を比較した際に、 -カテニン K0 EpH4 細胞では、極長鎖脂肪酸を脂肪酸鎖として持つスフィンゴミエリンが特異的に減少していることを見出した。また、極長鎖脂肪酸スフィンゴミエリンと相互作用することが知られているコレステロールの分布を調べたところ、野生型の EpH4 細胞では形質膜にコレステロールが集積しているのに対して、 -カテニン K0 EpH4 細胞では形質膜のコレステロールが減少していることが明らかになった。

-カテニンの発現を消失させる以外の方法で、AJ の形成を障害した場合も、同様にコレステロールの分布が変化するかについても検討した。培地中に含まれる細胞外 Ca²⁺イオンを除去した場合や E-カドヘリンに対する阻害抗体を添加することによって、AJ の形成を阻害した場合においても同様に、形質膜のコレステロールが減少する様子が観察された。このことから、AJ の形成は、上皮細胞の形質膜のコレステロールの量を増加させることが明らかになった。次に、このような AJ 形成に伴う形質膜コレステロールの増加が TJ の形成に必要なか否かを検討した。

-カテニン K0 EpH4 細胞に対して、メチル サイクロデキストリンにコレステロールを包摂させた化合物を作用させることで、強制的に形質膜のコレステロール量を増加させると、5 分程度の間にクローディンが細胞接着領域に集積し、TJ が形成される様子が観察された。 -カテニン K0 EpH4 細胞は、AJ の必須の構成タンパク質を欠いており、形質膜のコレステロールを増加させても AJ は形成されない。しかしながら、AJ が形成されていない状態においても、形質膜のコレステロールを増加させると、 -カテニン K0 EpH4 細胞においても TJ が形成された。また逆に、上皮細胞において、コレステロールを形質膜から除去すると、TJ は他の細胞間接着装置に比較して、コレステロールの減少に対して脆弱な構造であることが明らかになった。

以上のことから AJ の形成は形質膜のコレステロール量を増加させることによって、TJ の形成を可能にすることがわかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Roles of membrane lipids in the organization of epithelial cells: Old and new problems. Ikenouchi J.

Tissue Barriers. 2018;6(2):1-8.

doi: 10.1080/21688370.2018.1502531. 査読有

2. -Catenin Controls the Anisotropy of Force Distribution at Cell-Cell Junctions during Collective Cell Migration.

Matsuzawa K, Himoto T, Mochizuki Y, Ikenouchi J.

Cell Rep. 2018 Jun 19;23(12):3447-3456.

doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.070. 査読有

3. Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition.

Shigetomi K, Ono Y, Inai T, Ikenouchi J.

J Cell Biol. 2018 Jul 2;217(7):2373-2381.

doi: 10.1083/jcb.201711042. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 池ノ内順一

「上皮細胞に存在する細胞膜構造の形成メカニズム」

口頭、第 91 回日本生化学会 (京都)、2018 年 9 月 26 日

2. 池ノ内順一, 重富健太

「上皮細胞の細胞膜構造形成における細胞膜脂質の役割」

口頭、第 69 回日本細胞生物学会大会 (仙台) 2017 年 6 月 13 日

〔 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 :

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 :

国内外の別 :

〔 その他 〕

ホームページ等

九州大学理学部生物学科代謝生理学研究室ホームページ

<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/ikelab/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 重富 健太

ローマ字氏名 : Shigetomi Kenta

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。