

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770210

研究課題名 (和文) 上皮バリア機能に関する新規蛋白質の同定と機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of novel proteins regulating epithelial barrier functions

研究代表者 泉 裕士 (IZUMI YASUSHI)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：10373268

研究成果の概要 (和文)：無脊椎動物の上皮では、セプテートジャンクション(SJ)と呼ばれる細胞間接着構造が上皮細胞間の水溶性分子の自由拡散を防ぎ、バリア機能の重要な一端を担う。本研究では、節足動物の内胚葉由来上皮に存在するスムーズ SJ (sSJ)に特異的に局在する新規の細胞間接着分子 Mesh を同定し、この分子が sSJ の構造と腸上皮細胞のバリア機能に必須である事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Septate junctions (SJs) are specialized intercellular junctions, which restrict the free diffusion of solutes through the paracellular route in invertebrate epithelia. Here, we identified a novel cell adhesion protein Mesh and found that this protein is essential for the formation of endoderm-specific SJs, smooth SJs and the intestinal barrier function in *Drosophila* midgut.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：基礎生物

科研費の分科・細目：細胞生物

キーワード：遺伝学、遺伝子、昆虫、細胞・組織、発生・分化

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体は、細胞が相互に密接する事により二次元に並んでシートを形成した上皮によって成り立っている。様々な器官を形作る上皮の本質的な役割の一つが、器官の恒常性を保つ為にその中側と外側を分け隔てる機能であり、いわゆるバリア機能と呼ば

れている。上皮がバリアとして十分に機能するには、上皮細胞間の隙間を介した物質の自由拡散を防ぐ必要がある。そのために、上皮細胞は閉塞結合 (occluding junction) と総称される細胞間接着装置を持ち、細胞間を密閉している。バリア機能の破綻は組織の不全や癌化の原因ともなるため、閉塞結合に関わる

機構の解明は医学的にも重要である。動物界には閉塞結合が2種類存在するが、一つは脊椎動物の上皮細胞が持つタイトジャンクション(TJ)であり、もう一つは昆虫をはじめとする無脊椎動物の上皮細胞の持つセプテートジャンクション(SJ)である。機能的には同じバリア機能を司る閉塞結合とはいえ、TJとSJでは形態が大きく異なるため、それぞれを構成する蛋白質群も異なると思われていた。しかし、共通の膜蛋白質の存在が明らかとなり、TJとSJに共通した閉塞結合形成、維持システムの存在が示唆された。この事は、それまで独立した機構として解析が進められていた2つの閉塞結合の研究を融合させ、形態の多様性の中に潜む閉塞結合の形成、維持に関わる普遍的なメカニズムについて、新たな展開が可能である事を示している。また、共通性以外の部分もより明確になる事により、動物界における閉塞結合の多様性の意義についても新たな進展が期待される。

2. 研究の目的

本研究では普遍的な上皮細胞接着機構の分子レベルでの解析が盛んに行われているショウジョウバエの遺伝学的手法を利用し、その上皮細胞の中でも、表皮などの外胚葉上皮と比べ解析が遅れている内胚葉上皮のスームスSJ(sSJ)をモデルに、その構成蛋白質の同定を試みる事で、閉塞結合形成の普遍的分子機構の解析への発展を目指した。

3. 研究の方法

当研究の最初の目標は、節足動物門の閉塞結合セプテートジャンクション(SJ)の分子構築を明らかにするとともに、そのバリア機能における役割を検討する事である。分子構築を解明するためには、未知の閉塞結合構成分子の同定が必要である。その第1段階として、本研究では、節足動物内胚葉由来上皮(中腸)がもつsSJの構成分子を、カイコの中腸を用いて同定を試みた。カイコを用いるのは、生

化学的手法による分子同定のための材料を安価で大量に確保でき、かつゲノム情報も利用可能だからである。次に、同じ節足動物であり、遺伝学的操作の容易なショウジョウバエの相同分子を同定し、その変異体の解析に進んだ。

(1) カイコ中腸細胞膜分画に対するモノクローナル抗体の作製

①カイコ5齢幼虫(内部の大部分を中腸が占める)の中腸を単離し、ホモジナイズによって細胞を破碎し、ショ糖密度勾配遠心によって細胞膜分画を得た。このsSJを含む膜分画をラットに免疫し、P3ミエローマと細胞融合させてモノクローナル抗体を作製した。

②それぞれのハイブリドーマの培養上清を用いてカイコ中腸の凍結切片を蛍光免疫染色し、sSJの部位に反応するものをスクリーニングした。スクリーニング陽性のハイブリドーマは細胞を単一クローン化したのち、その抗体を含む培養上清を得た(Clone 75/77)。

(2) 免疫沈降法によるカイコsSJ局在蛋白質の同定

カイコ中腸細胞膜分画より可溶化した蛋白質を、sSJを認識するモノクローナル抗体(Clone 75/77)により免疫沈降し、SDS-PAGE後のクマシーブルー染色により分子量約80kの抗原タンパク質と思われるバンドを検出した。このバンドを含むゲルを切り出して、質量分析装置によるアミノ酸配列予測を経て、データベースを利用し蛋白質を同定した。これをMeshと名付けた。

(3) ショウジョウバエ相同分子のクローニング

同定したカイコの蛋白質のアミノ酸配列情報を元に、ショウジョウバエのデータベースを検索し、ショウジョウバエ相同分子のcDNAを得た。ショウジョウバエmesh cDNAは、トランスジェニックフライ作製用にpUASTベクターに、さらにショウジョウバエ培養細胞への発現用にpMT-V5His

(Invitrogen)に組み込んだ。

(4) Mesh の抗体作製

Mesh の抗体を作製するために、pGEX ベクターに Mesh の C 末部位をコードする DNA を組み込み、GST 融合タンパク質を大腸菌で発現誘導し精製した。これを抗原としてウサギ及びラットに免疫し、ポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体を用い、蛍光免疫染色法及び免疫電子顕微鏡法により、細胞内局在部位の解析を行った。

(5) mesh の変異系統及び発現抑制系統の作製

① mesh のショウジョウバエのトランスポゾン挿入変異系統がストックセンター (Bloomington stock center) に存在したため、それを取り寄せ、抗体によって Mesh 蛋白質の発現が抑制されている事を確認し、解析に用いた。

② GAL4-UAS システムで発現誘導するトランスジェニックフライ系統を作成するために、pUAST-mesh をショウジョウバエ胚に注入し系統を作製した。

(6) mesh の変異体及び発現抑制系統を用いた機能解析

上記ショウジョウバエ系統の表現型を、中腸の発生、機能の観点から、胚及び幼虫の中腸に焦点を当て解析した。特に sSJ の状態を DLG、LGL の挙動を観察する事により確認した。また、sSJ の形態を電子顕微鏡によって観察した。さらに、バリア機能に影響しているかを調べる為に、エサと同時に加えたトレーサー (ローダミン-デキストラン) が中腸から体くうに漏れるかを観察した。

(7) Mesh 蛋白質の細胞接着誘導能の検討

ショウジョウバエ培養細胞 S2 細胞に Mesh を発現させ、細胞接着誘導能の指標となるアグリゲーション形成能を検討した。

4. 研究成果

無脊椎動物である節足動物の内胚葉由来

上皮としてカイコ中腸を材料に、スムーズセブテートジャンクション (sSJ) が多く含まれる細胞膜分画を単離し、これに対するモノクローナル抗体を作製した。その結果、sSJ 部位を認識する抗体の獲得に成功し (Clone 75/77)、続いて免疫沈降と質量分析により抗原蛋白質の同定を試みた所、1 回膜貫通型で多くの細胞間接着蛋白質に見られるイムノグロブリン様構造 (Ig 様構造) を持つ蛋白質を同定した。Mesh と名付けたこの蛋白質は、同じ節足動物であるショウジョウバエのみならず、線虫や哺乳類など進化的に保存されている蛋白質である事が判明し、多細胞生物の上皮バリアに普遍的に関与する蛋白質である事が期待された。ショウジョウバエの Mesh に対する抗体を作成しその発現パターンを調べた所、内胚葉系の上皮に特異的に発現する事 (図 1)、さらに免疫電子顕微鏡法により sSJ に特異的に局在する事が判明した (図 2)。

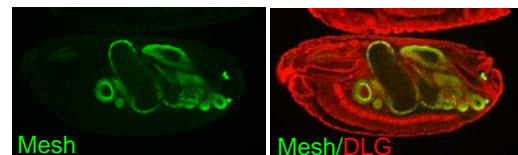


図 1. ショウジョウバエ胚の中腸に特異的に発現する Mesh

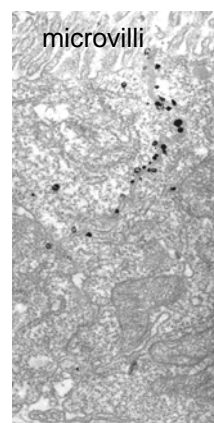


図 2. 抗 Mesh 抗体による 1 齢幼虫中腸上皮細胞の免疫電顕像

次に、ショウジョウバエ mesh 遺伝子のトランスポゾン挿入による遺伝子変異系統をストックセンターから取り寄せて解析を進めた。その結果、次の事が明らかになった。

(1) この変異系統は 1 齢幼虫期に致死に至る事より、mesh は生存に必須の遺伝子である。

(2) 変異系統の中腸 sSJ において、SJ のマーカーである LGL の局在が異常になる。一方、別の SJ マーカーである DLG は正常に局在する。

(3) 電子顕微鏡による観察により、中腸上皮細胞の sSJ に異常が認められた (図 3)。

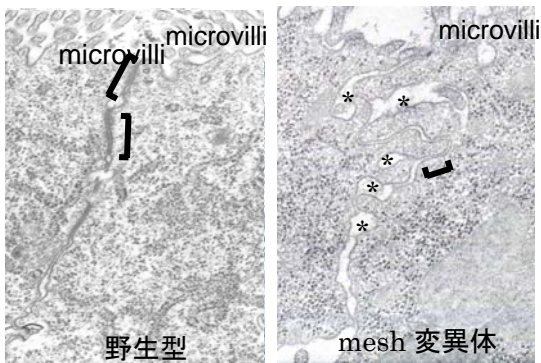


図 3. 野生型、mesh 変異体の 1 齢幼虫中腸上皮細胞の電子顕微鏡観察像

(4) 上記の表現型は、GAL4-UAS システムによる Mesh の中腸部位への特異的な発現によりレスキューされる。

このように、Mesh は節足動物内胚葉の sSJ の重要な構成分子であり、その形成に深く関与する因子である事が分かった。また、RNAi により Mesh の発現を抑制した 1 齢幼虫は、エサと同時に加えたトレーサー (ローダミン-デキストラン) の中腸からの漏れが観察された事より、Mesh が中腸バリア機能に関与する事も明らかになった。さらに、ショウジョウバエの培養細胞である S2 細胞に Mesh を強制発現させると細胞間接着が誘導される事から、Mesh は新規の細胞接着蛋白質である事も分かった。内胚葉系上皮の sSJ に特異的に局在し機能する蛋白質として、我々は

以前に Ssk という 4 回膜貫通型蛋白質を同定しているが、Mesh の sSJ 局在は Ssk と相互依存的であり、共沈実験において両者は複合体を形成することも分かった。以上の結果より、Mesh は細胞間接着分子として Ssk と協調し、中腸 sSJ の形成に中心的な役割を果たすことで、節足動物の内胚葉系上皮のバリア機能に関与していることが分かった。

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 Yoshihara K, Ikenouchi J, Izumi Y, Akashi M, Tsukita S, Furuse M. Phosphorylation state regulates the localization of Scribble at adherens junctions and its association with E-cadherin-catenin complexes. *Exp Cell Res.* 2011 Feb 15;317(4):413-22. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

① 泉 裕士、柳橋祐一、古瀬幹夫
Identification and characterization of a novel smooth septate junction component
The 9th Japanese Drosophila Research Conference 2009 年 7 月 6 日 ヤマハリゾートつま恋 (静岡県)
② 泉 裕士、柳橋祐一、古瀬幹夫
ショウジョウバエのスムーズセプテートジャンクションに局在する新規細胞接着タンパク質の同定と機能解析
第 33 回 日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7 日 ポートピアホテル (神戸市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/cell1b/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 裕士 (IZUMI YASUSHI)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号: 10373268