

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 4 月 25 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07048

研究課題名(和文) ショウジョウバエをモデルとした細胞間接着装置の形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism involved in cell-cell junction formation using Drosophila as a model system

研究代表者

泉 裕士 (Izumi, Yasushi)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・准教授

研究者番号：10373268

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：スムーズセプテートジャンクション (sSJ) は、節足動物内胚葉上皮の細胞間隙バリアとして機能する。我々は、sSJ構成分子Ssk、Meshの同定に続き、sSJ形成に関わる分子の同定を目的とした、Meshの局在異常を指標としたショウジョウバエの遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、テトラスパニン Tsp2Aと一回膜貫通型タンパク質CG13704を同定した。Tsp2AとCG13704は共にsSJ構成分子であり、ショウジョウバエのsSJ形成と腸管上皮バリア機能に必要であることが分かった。さらに、Tsp2AとCG13704はSsk、Meshと協調してsSJ形成を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Smooth septate junctions (sSJs) are cell-cell junctions that regulate the paracellular pathway of the endodermally-derived epithelial cells in arthropods. Previously, we identified Ssk and Mesh as specific components of sSJs in Drosophila. To understand the molecular mechanisms involved in sSJ formation, we carried out a genetic screen of a Drosophila chromosomal deficiency stock and identified several strains defective in the localization of Mesh at sSJs. By analyzing these strains, we found that the genes encoding tetraspanin, Tsp2A and a novel single membrane-spanning protein, CG13704 were responsible for the phenotype. Both proteins specifically localized at sSJs and were required for sSJ formation as well as the barrier function of the midgut. Furthermore, we found that Tsp2A, CG13704, Ssk and Mesh form a complex and were interdependent for their sSJ localization. Therefore, we concluded that these sSJ-proteins act together to organize sSJs.

研究分野：細胞生物学

 キーワード：上皮細胞 細胞間接着装置 細胞間隙バリア ショウジョウバエ 閉塞結合 セプテートジャンクシ
ン

1. 研究開始当初の背景

動物の組織・器官の形態形成と恒常性の維持には細胞間の堅固な接着が必要不可欠である。細胞間接着の役割は、細胞接着分子が細胞膜の特定の領域で集合して形成される細胞間接着装置である。例えば、上皮は上皮細胞間の強固な接着に関わるアドヘレンスジャンクション、細胞間を介した物質の漏れを防ぐ閉塞結合（脊椎動物のタイトジャンクション、無脊椎動物のセプテートジャンクション(SJ)）等を備えることにより、密閉性の高いシートを形成し、身体の内部と外部環境を分け隔てるバリアとして働くことができる。これまでに多くの細胞間接着装置について分子基盤の基本形が解明されている。しかし、細胞接着分子を活性化させるプロセッシングの機構、細胞膜上の特定部位に運搬し集積を誘導する機構、裏打ちタンパク質や細胞骨格と繋げ装置を完成形にするための機構など、細胞間接着装置の形成を司る動的な制御機構については未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

私は、ショウジョウバエの腸管上皮に存在する閉塞結合、スムーズ SJ (以下 sSJ) の形成機構の解析を進めている。私は sSJ に特異的に局在する細胞接着分子複合体 Mesh-Ssk の同定に成功し、この複合体が sSJ 形成と腸管上皮バリア機能に必須であることを証明した (Izumi et al., *J. Cell Sci.* 125, 4923, 2012; Yanagihashi et al., *J. Cell Sci.* 125, 1980, 2012)。続いて、sSJ 形成を制御する遺伝子の同定を目的として、Mesh の sSJ 局在が失われることを指標としたショウジョウバエ染色体部分欠失系統の遺伝学的スクリーニングを行った結果、Mesh の局在異常を示す 4 種の染色体欠失系統を同定することに成功した。Mesh 局在異常を示す欠失系統の原因遺伝子の同定を試みた結果、様々な膜タンパク質の機能

促進に関わるテトラスパニンのファミリータンパク質 Tsp2A、ロイシンリッチリピート(LRR)タンパク質である CG4781、1 回膜貫通タンパク質である CG13704 を候補遺伝子として同定した。本研究では、Tsp2A, CG13704, CG4781 の機能解析を中心に進め、sSJ 形成機構を明らかにし、細胞間接着装置の新しい形成モデルの提唱を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、主に Tsp2A, CG13704 の解析を以下の方法により進めた。

(1) Tsp2A, CG13704 の抗体を作製し、腸管上皮細胞での発現及び細胞内局在を解析した。さらに、*mesh* あるいは *ssk* 変異系統における細胞内局在の変化を検討した。

(2) Tsp2A, CG13704 の sSJ 形成への関与を明確にするため、RNAi 系統又は CRISPR/Cas9 法を利用した変異系統作製を試み、Mesh-Ssk の局在に与える影響を解析した。

(3) Tsp2A 及び CG13704 変異系統に GAL4-UAS システムを利用して GFP-Tsp2A 又は 13704-GFP の発現を誘導し、sSJ の形成異常がレスキューされるか検討した。

(4) Tsp2A 及び CG13704 変異系統の詳細な解析を行った。特に腸管上皮細胞の sSJ の形態を、電子顕微鏡により解析した。さらに、ショウジョウバエ幼虫へのトレーサー浸透実験(摂食させたトレーサーの体腔(腸外)への漏れの有無で判断)を行う事により、腸管上皮バリア機能への影響を解析した。

(5) Tsp2A, CG13704 と Mesh-Ssk との相互作用の有無を検討するために、ショウジョウバエ胚及び幼虫を可溶化し、共免疫沈降実験を行った。

4. 研究成果

(研究の主な成果)

(1) sSJ 形成における Tsp2A の機能解析

Tsp2A はテトラスパニンファミリーに属する四回膜貫通型タンパク質である(図 1)。

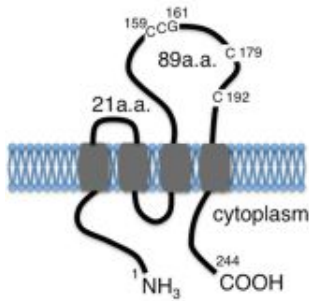


図1. Tsp2A構造模式図
テトラスパニンファミリー
に属する4階膜貫通型タンパク質

Tsp2A の細胞内局在を明らかにするために抗体を作製し、ショウジョウバエ腸管上皮細胞を蛍光免疫染色した結果、Tsp2A は sSJ に局在するタンパク質であることが分かった (図2)。

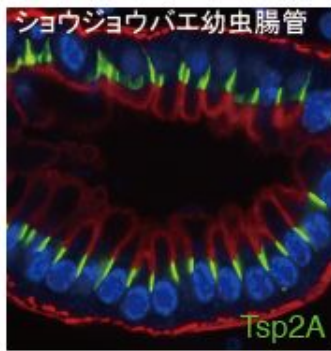


図2. 腸管におけるTsp2Aの
sSJ局在
緑:Tsp2A 赤:actin 青:
DNA

Tsp2A の機能を解析するために、CRISPR/Cas9 法により Tsp2A 変異系統の作製を試み、Tsp2A 遺伝子に塩基欠失がある変異系統を得ることに成功した。この変異系統を抗 Tsp2A 抗体で蛍光免疫染色したところ、Tsp2A の発現が失われていることが分かり、Tsp2A 機能欠損の変異体が獲得できたことを確認した。この変異系統は幼虫期に致死であることから、Tsp2A は生存に必須な分子であることが分かった。Tsp2A 変異系統における Mesh、Ssk の局在を調べたところ、これらの分子は sSJ に局在できなくなっていることが分かった。透過型電子顕微鏡により、腸管上皮細胞の sSJ 領域

を観察したところ、Tsp2A 変異系統では sSJ が正常に形成されていないことが分かった (図3)。

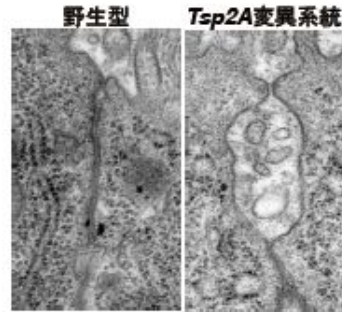
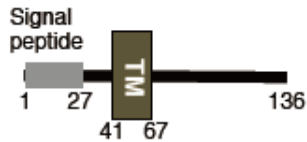


図3. 野生型及びTsp2A変異系統の腸管上皮細胞の透過型電子顕微鏡像
野生型では細胞間にラダー状の典型的なsSJが観察されたのに対して、Tsp2A変異系統では大きな隙間が観察された。

腸管バリア機能への影響を観察するために Tsp2A 欠損ショウジョウバエ幼虫への蛍光トレーサー浸透実験 (摂食させたトレーサーの体腔 (腸外) への漏れの有無で判断) を行ったところ、トレーサーが腸管から体腔へ漏れていることが分かり、腸管バリア機能の破綻を確認した。さらに、ショウジョウバエ幼虫を可溶化し、共免疫沈降実験を行ったところ、Tsp2A と Ssk、Mesh との複合体形成を確認することができた。また、Tsp2A は *ssk*、*mesh* の変異系統では sSJ に局在できないことから、sSJ 局在に関して Tsp2A は Mesh、Ssk と相互依存の関係にあることが分かった。以上の結果より、新規 sSJ 構成分子 Tsp2A は Mesh、Ssk と協調し sSJ 形成と腸管バリア機能を制御していることが明らかになった。また、テトラスパニンタンパク質はパートナーとなる膜タンパク質を集めることで、細胞膜にマイクロドメインを形成することが知られていることから、sSJ はテトラスパニン Tsp2A によってパートナーの sSJ 構成分子 (Mesh、Ssk) が集合して形成された特殊な細胞膜マイクロドメインであることが示唆された。

(2) sSJ形成におけるCG13704の機能解析

CG13704 は非常に短い細胞外ドメインを持つ新規の一回膜貫通型タンパク質である(図4)。



TM : transmembrane domain

図4. CG13704構造模式図
一回膜貫通型タンパク質で極めて短い細胞外ドメインをもつ。

CG13704 の細胞内局在を明らかにするために抗体を作製し、ショウジョウバエ腸管上皮細胞を蛍光免疫染色した結果、CG13704 も sSJ に局在するタンパク質であることが分かった。CG13704 の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法により CG13704 変異系統の作製を試み、CG13704 遺伝子に塩基欠失がある変異系統を得ることに成功した。この変異系統を抗 CG13704 抗体で免疫染色したところ、CG13704 の発現が失われていることが分かり、CG13704 機能欠損の変異体獲得に成功したことを確認した。この変異系統は幼虫期に致死であることから、CG13704 は生存に必須な分子であることが分かった。CG13704 変異系統の中腸バリア機能を解析するために、幼虫を利用した蛍光トレーサー浸透実験を行ったところ、トレーサーの腸管から体腔への漏れが観察され、腸管バリア機能が破綻していることが分かった。以上の結果より、CG13704 も sSJ 構成分子であると共に、sSJ 形成と腸管バリア機能を制御している分子であることが明らかになった。さらに、CG13704 は、*ssk*、*mesh*、*Tsp2A* の変異系統では sSJ に局在できないことが明らかになった。また、CG13704 変異系統における Mesh、Ssk、Tsp2A の局在を調べたところ、興味深いことに、これらの分子はラテラル膜全体にわたって

局在していることが分かった(図5)。



図5. 野生型及びCG13704変異系統の腸管上皮細胞におけるMeshの局在
野生型ではMeshのsSJ局在が観察されたのに対し、CG13704変異系統ではラテラル膜全体への局在が観察された。Ssk、Tsp2Aも同様の局在を示した。

これらの結果より、CG13704 は sSJ 形成の際、一旦ラテラル膜に集まった Mesh、Ssk、Tsp2A を、sSJ 領域に集合させるのに必要であることが示唆された。

(得られた成果の国内外における位置づけとインパクト)

テトラスパニンファミリータンパク質については、これまで細胞間隙バリア機能を担う接着装置の形成に関わるという報告は無かった。Tsp2A の解析により明らかになった sSJ 形成への直接的関与は、テトラスパニンファミリータンパク質のこれまで知られていなかった全く新しい機能を示したものであり、上皮細胞間隙バリアの研究者のみならず、テトラスパニンの研究者にも大きなインパクトを与えた。それは、本論文が *J. Cell Sci.* (2016) 129:1155-1164 に掲載されると同時に、注目論文として同号の "IN THIS ISSUE" でも紹介されたことから明らかである。また、抗 Tsp2A 抗体は腸上皮細胞接着領域の優れたマーカーとして、世界中の関連分野の研究者から

リクエストが来ている。

CG13704 の解析については、まだ論文として発表はしていないが、学会レベルでは発表している。その際、特に CG13704 の担う新たな sSJ 形成機構が注目された。

(今後の展望)

これまでに我々が発見した sSJ 構成分子 Ssk, Mesh, Tsp2A, CG13704 の機能解析に基づき、sSJ 形成機構の分子メカニズムについて、より詳細な解析が可能になったと考えている。つまり、単にこれらの分子が形成機構に関わっているということだけでなく、それぞれの分子がどのような制御を受けることが必要か(例えば、細胞内でのリン酸化、プロセッシング、細胞外領域の糖鎖付加、輸送経路の関与、等)、またそれぞれの分子がどのような分子機能を持つか、を解明することで、sSJ 形成の分子機構をさらに掘り下げることができると考えている。

また、本課題においては大きな進展を果たせなかった、sSJ 形成関連因子 CG4781 についても、今後解析を進めることで、sSJ 形成機構の興味深い知見を得ることができると考えている。

(新たな知見)

sSJ 構成分子 Ssk, Mesh, Tsp2A をショウジョウバエ成虫腸管で発現抑制し腸管バリア機能を破綻させた結果、腸管ホメオスタシス制御に sSJ 構成分子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後、この興味深い知見についても解析を進めていきたい。

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2件)

Furuse M. and Izumi Y., Molecular

dissection of smooth septate junctions: understanding their roles in arthropod physiology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (2017) 1397:17-24 査読有 DOI: 10.1111/nyas.13366.

Izumi Y., Motoishi M. Furuse K. Furuse M., A tetraspanin regulates septate junction formation in *Drosophila* midgut. *J. Cell Sci.* (2016) 129:1155-1164 査読有 DOI: 10.1242/jcs.180448.

[学会発表](計5件)

泉 裕士、古瀬幹夫、ショウジョウバエ腸管の恒常性における上皮バリア機能の役割 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸

Izumi Y. and Furuse M., Identification and characterization of novel membrane proteins required for septate junction formation in *Drosophila* midgut. 4thAsia-Pacific *Drosophila* Research Conference. 2017 年 大阪

Izumi Y., Identification and characterization of novel smooth septate junction proteins in *Drosophila*. International tight junction conference. Berlin 08-10, September (2016) (招待講演)

泉 裕士、ショウジョウバエ内胚葉上皮のセプテートジャンクションの形成機構 第 68 回細胞生物学会大会 シンポジウム 「セルジャンクションを介する細胞と場

の協調」2016年 京都（招待講演）

泉 裕士、元石美奈子、今川裕貴、古瀬
幹夫、ショウジョウバエ腸管上皮細胞のセ
プテートジャンクション形成に關与する分
子群の同定

第38回日本分子生物学会年会 第88回日
本生化学会大会 合同大会 2015年 神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/dcs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泉 裕士 (IZUMI, Yasushi)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・准教
授

研究者番号：10373268