

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18544

研究課題名(和文)上皮細胞における張力の適正化機構とその管腔形成における役割の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of tension homeostasis and its role in epithelial morphogenesis

研究代表者

大谷 哲久(Otani, Tetsuhisa)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：50415105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：密着結合は上皮バリアの実体であると共に、張力の制御や上皮極性の形成・維持にも重要だと考えられているが、その仕組みは十分理解されていない。本研究では、密着結合の裏打ちタンパク質であるZO-1とZO-2を欠損した細胞を作成した。その結果、ZO-1/ZO-2欠損細胞では密着結合が形成されず上皮バリアが破綻したのに加え、張力の異常な亢進および上皮極性の異常が認められた。また、3次元培養下ではシスト形成に異常が認められた。一方で、接着結合を攪乱した細胞においては、このような異常はほとんど認められなかった。これらの結果から、ZO-1/ZO-2は密着結合形成を介して上皮極性を制御していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Tight Junctions are essential for epithelial barrier formation. In addition to its roles in epithelial barrier, Tight Junctions are thought to regulate epithelial polarity and actomyosin organization, although the detailed molecular mechanisms remained unclear. We have generated ZO-1/ZO-2 double KO cells by genome editing. In ZO-1/ZO-2 double KO cells, Tight Junctions were not formed and epithelial barrier was disrupted. In addition, abnormal accumulation of myosin was observed. Unexpectedly, we found that epithelial polarity was disorganized in ZO-1/ZO-2 deficient cells. Furthermore, ZO-1/ZO-2 deficient cells failed to form polarized cysts when cultured in collagen gel. In contrast, when Adherens Junctions were perturbed, epithelial barrier formation and myosin assembly was not impaired, and epithelial polarity was well developed. These results suggest that ZO-1 and ZO-2 regulate epithelial polarization through Tight Junctions assembly.

研究分野：細胞生物学

キーワード：密着結合 上皮細胞 上皮バリア 上皮極性 ZO-1 上皮管腔構造 張力 接着結合

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は一般に細胞境界が直線的で細胞の大きさが均一な敷石状の形態をとる。このような形態を形成し保つためには、細胞表面のアクチン繊維および分子モーターであるミオシンによって生み出される表面張力が重要である (Thompson, 1917; Cavey and Lecuit, 2009)。また、形態形成過程においては、上皮組織内に一過的に張力の不均衡性が生じることにより、上皮組織の動的再編成が引き起こされる (Bertet et al., 2004; Paré et al., 2014)。一方で、上皮細胞における過剰な張力の発生は細胞間接着構造の破壊により上皮バリアの破綻を招くことが知られている (Shen et al., 2006)。したがって、上皮組織の恒常性の維持にはその表面張力を適正なレベルに保つことが重要だと考えられる。しかし、上皮細胞の細胞表面において張力の発生がどのように時空間的に制御され、上皮組織の恒常性維持や動的再編成が制御されているのかについてはまだ十分理解されていない。

研究代表者は、これまで上皮細胞において張力が生み出される仕組みを解析し、細胞間接着構造の一つである密着結合の裏打ちタンパク質 ZO-1 が張力の制御に重要であることを見出した。具体的には、ZO-1 が Cdc42 のグアニンヌクレオチド交換因子である Tuba を介して Cdc42/N-WASP 経路を活性化することにより、表層アクチンの生成を促進することを明らかにしてきた (Otani et al., 2006)。一方で、ZO-1 は Tuba とは独立に Rho/ROCK 経路を抑制することによりミオシンの活性を制御しているが、その分子メカニズムは明らかではない (Otani et al., 2006; Fanning et al., 2012; Tokuda et al., 2014)。また、密着結合や張力の適正化が上皮管腔構造の形成にどのような役割を果たしているのかも十分理解されていない。

密着結合は、上皮細胞の頂端部側に存在する細胞間接着構造の一つであり、上皮バリアの形成に中心的な役割を果たすことが知られている (Tsukita et al., 2001)。密着結合はバリア機能に加え、上皮細胞の頂端部側と側基底部側の境界に位置すること、頂端部側の細胞膜に蛍光ラベルした脂質を取り込ませると密着結合を超えて側基底部に拡散することができないこと、また細胞外の Ca^{2+} イオンをキレートすることによって密着結合を間接的に破壊すると上皮極性が破綻することから、上皮極性の形成・維持においても重要な役割を果たすと考えられてきた (De Camilli et al., 1974; Hoi Sang et al., 1979; van Meer and Simons, 1986; van Meer et al., 1986; Vega-Salas et al., 1987)。さらに、進化的に保存された極性シグナル伝達経路の構成因子である Par-3 や aPKC が密着結合に局在することが報告され、密着結合は上皮極性に重要な役割を果たすと考えられた (Izumi et al., 1998)。しかし、マウス乳腺

由来 EpH4 細胞において ZO-1 をノックアウト、ZO-2 をノックダウンしたところ、密着結合形成は抑制されたものの上皮極性は正常であることが報告され、密着結合の上皮極性における役割に疑問が呈された (Umeda et al., 2006)。一方で、マウス ES 細胞において ZO-1/ZO-2 の両者をノックアウトしたうえで embryoid body を形成させると上皮極性の異常と解釈することが可能な異常が観察されている (Phua et al., 2014)。現在に至るまで、密着結合が上皮極性にどのように関与するかについては結論が出ていない。

2. 研究の目的

本研究においては、密着結合の裏打ちタンパク質である ZO ファミリータンパク質群に着目し、ZO ファミリータンパク質群が上皮細胞における張力の適正化を制御する仕組み、およびその上皮管腔構造の形成における役割を解明することを主たる目的とした。

また、研究の過程で密着結合が上皮極性形成に重要な役割を果たすことを見出した。これまでの先行研究において密着結合と上皮極性の関係については相反する見解が呈されてきており、はっきりとした結論が得られていない状況であった。そこで、この問題の重要性に鑑みて、密着結合が上皮極性を制御する仕組みを明らかにすることを目指して研究を進めることにした。

3. 研究の方法

本研究においては、これまで多くの研究で用いられてきたイヌ腎臓由来 MDCK II 細胞をモデルとして、ゲノム編集を用いて ZO ファミリータンパク質群のうち、密着結合の形成に必須だと考えられている ZO-1 と ZO-2 を欠損する ZO-1/2 double KO 細胞 (ZO-1/ZO-2 dKO 細胞) を作成し、その表現型を解析した。また、ZO ファミリータンパク質は密着結合形成だけでなく接着結合の形成にも関与することがこれまでに報告されていることから、接着結合の構成因子である E-cadherin および Afadin も同様にゲノム編集を用いてノックアウトした。ノックアウト細胞が樹立できたかどうかは、蛍光抗体染色とウェスタン・ブロッティング、またゲノムのシーケンス解析を行うことにより確認した。

これらのノックアウト細胞における密着結合の形成の有無を、マーカータンパク質を用いた蛍光抗体染色、超薄切片および凍結割断レプリカ法を用いた微細構造観察、また経上皮電気抵抗とトレーサー分子の透過性を生理学的に測定することによって検討した。

また、これらのノックアウト細胞において上皮極性が正常に形成されているのかどうかを検討するために、細胞をトランスウェル・フィルター上で培養し、頂端部および側基底部に局在するマーカータンパク質の分布について蛍光抗体染色を行うことにより

検討した。

さらに、これらの細胞における上皮管腔構造の形成能を検討するために、これらの細胞をコラーゲン・ゲル中で3次元培養し、シスト構造の形成能を蛍光抗体染色および超薄切片を用いた微細構造の観察により検討した。

4. 研究成果

MDCK II 細胞において ZO-1/ZO-2 をノックアウトしたところ、蛍光抗体染色において密着結合のマーカータンパク質 (Occludin/Claudin/JAM-A) の細胞間接着部位への集積が著しく阻害され、ほとんどの細胞間接着部位から消失することが観察された。一部の細胞間接着部位へは密着結合タンパク質の不連続な集積が認められたが、これらの集積部位には ZO-3 が共局在した。また、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞の超薄切片を作成して微細構造を観察した結果、細胞膜が密着する部位が消失していた。さらに、凍結切断レプリカ法を用いて密着結合のストランド構造の形成について検討したところ、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては稀に断片的なストランド様構造が観察されるものの、細胞周囲を連続的に取り巻くようなストランド構造は完全に消失していた。これらの結果は、ZO-1/ZO-2 が密着結合の形成に必須であることを示している。また、これらの結果から、類縁分子の ZO-3 は単独では連続的な密着結合の形成には不十分なことが示唆された。さらに、生理学的に上皮バリアの形成能について検討した結果、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては経上皮電気抵抗が著しく低下しているとともに、トレーサー分子 (FITC および FITC-dextran 4~150kDa) の透過性が顕著に上昇していた。これらの結果は、ZO-1/ZO-2 が上皮バリアの形成に必須であることを示している。

ZO-1/ZO-2 dKO 細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、コロニーの形状がコンパクトであり、細胞形態が異常となっている様子が認められた。そこで、この細胞における細胞骨格系の状態を蛍光抗体染色によって検討したところ、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においてはミオシンの集積が著しく亢進していた。これらの結果は、ZO-1/ZO-2 が上皮細胞における張力の適正化に重要な役割を果たしていることを示している。

ZO-1/ZO-2 dKO 細胞の表現型を解析する過程で、この細胞において上皮極性の異常が認められることを見出した。ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては正常細胞において側基底部に限局して局在するタンパク質群 (Na-K ATPase, Scribble, Claudin など) が頂端部側にも漏れだす様子が認められた。また、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては正常細胞においては頂端部側に限局して局在する Ezrin が側基底面にも異所的に局在する様子が認められた。これらの表現型は ZO-1-GFP 遺

伝子を ZO-1/ZO-2 dKO 細胞に再発現させることにより救済することができた。これらの結果は、ZO-1/ZO-2 が上皮極性の形成・維持に必須であることを示している。これまでの先行研究においては、密着結合が上皮極性に関与するかどうかについては相反する見解が呈されていた (Umeda et al., 2006; Phua et al., 2014)。したがって、ZO-1/ZO-2 が上皮極性形成を制御する仕組みの解明は重要な問題だと考え、これに焦点を絞って研究を進めることとした。

これまでの研究から、ZO-1/ZO-2 は密着結合だけでなく、接着結合の形成にも関与する可能性が示唆されている (Ikenouchi et al., 2007; Yamazaki et al., 2008)。そこで、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞において接着結合の構成因子である Afadin の局在を検討したところ、連続的に細胞間接着部位に局在する部位も認められたものの、一部の細胞境界においては Afadin が断片化している様子が認められた。また、超薄切片を用いた微細構造の観察においても、一部の細胞間接着部位においてはアクチン繊維と思われる繊維束構造を裏打ちにもつ接着結合様の構造が認められたが、一部の細胞間接着部位においては接着構造が観察されず、細胞間隙に大きなギャップが認められた。これらの結果から、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては、密着結合の破綻ほどは顕著ではないものの、接着結合の形成にも異常が認められると考えられた。

そこで、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞における上皮極性の異常が接着結合の異常に起因するものなのかどうかを検討するために、接着結合の構成因子である E-cadherin および Afadin の KO 細胞をそれぞれ作成した。E-cadherin あるいは Afadin KO 細胞においては ZO-1/ZO-2 dKO 細胞とは異なり、上皮極性の異常は認められなかった。また、これらの細胞は正常な経上皮電気抵抗値を示すことから、上皮バリアは保たれていると考えられた。これらの結果から、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞において認められた上皮極性の表現型は、接着結合の形成異常によるものではないと考えられた。

上皮極性の形成には Par-3/6/aPKC をはじめとする極性シグナル伝達経路が重要な役割を果たすことが報告されており、またこれらの因子は密着結合付近に集積することが知られている (Izumi et al., 1998; Suzuki et al., 2001)。そこで、Par/aPKC 複合体の分布について検討したところ、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞においては Par-3 および aPKC の局在が不連続となることが明らかとなった。これまでに、aPKC の局在は密着結合だけでなく、接着結合に局在する Willin によっても制御されていることが知られている (Ishiuchi et al., 2011)。そこで、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞に Willin を過剰発現したところ、細胞間接着部位への aPKC の集積は完全に連続的にはならなかったものの、有意に回復することが観

察された。しかしながら、Willin を過剰発現しても ZO-1/ZO-2 dKO 細胞における上皮極性の異常は全く改善されなかった。これらの結果から、ZO-1/ZO-2 は Par/aPKC 複合体の局在を制御するが、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞における上皮極性形成の異常は Par/aPKC 複合体の局在制御だけに起因するものではないと考えられた。

密着結合は、極性シグナル伝達経路の足場として働くだけでなく、頂端部側と側基部側の膜ドメインの間における脂質や膜タンパク質の拡散障壁 = フェンスとして働くことにより極性化した分子局在を維持すると考えられてきた (van Meer and Simons, 1986; van Meer et al., 1986)。そこで、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞における膜脂質の分布について検討したところ、正常細胞においては頂端部側に限局して局在するフォルスマン抗原 (糖脂質) が側基部側に漏れ出ている様子が認められた。これらの結果は、ZO-1/ZO-2 が密着結合形成を介して膜フェンスを形成することによって上皮極性形成を制御する可能性を支持するものである。

ZO-1/ZO-2 が上皮管腔形成に果たす役割を検討するために、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞をコラーゲン・ゲルに包埋して 3 次元培養を行ったところ、シスト形成に異常が認められ、内腔の発達著しく阻害された。超薄切片を用いた微細構造の観察から、これらの細胞においては細胞間接着部位においても微絨毛様の構造が認められ、上皮極性の異常があると考えられた。一方で、E-cadherin KO 細胞においては正常なシスト形成が認められた。また、Afdin KO 細胞においては内腔が複数形成される multilumen の表現型が認められた。しかし、この Afdin KO において認められる multilumen の表現型は、内腔が形成されるものの複数の内腔構造が一つの細胞塊の中に認められるというものであり、内腔そのものの形成が著しく阻害される ZO-1/ZO-2 dKO 細胞の表現型とは異なっていた。したがって、ZO-1/ZO-2 dKO 細胞において認められるシスト形成の異常は接着結合の異常だけでは説明できないと考えられた。これらの結果を総合すると、ZO-1/ZO-2 は密着結合形成を介して上皮極性形成を制御することにより上皮管腔構造の形成を促進すると考えられた。

本研究においては、ZO-1/ZO-2 が密着結合形成に必須であることを確認したと共に、密着結合形成が上皮極性形成に必須であることを強く支持する結果を得た。これまで、密着結合と上皮極性の関係については相反する見解が呈されてきたが、本研究においてはロックアウト細胞を作成することによって密着結合形成が上皮極性形成に重要な役割を果たすことを示すことができたと考えている。密着結合が上皮極性形成を制御する仕組みについては、極性シグナル伝達経路の足場として働く可能性と共に、膜フェンスとし

て頂端部側と側基部側との間の物質の拡散障壁として働く可能性が考えられた。今後は本研究の成果を足掛かりとして、ZO-1/ZO-2 がどのような分子機構によって上皮極性形成を制御しているかを明らかにしたい。

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 1 件)

Tetsuhisa Otani, Yosuke Ogura, Kazuyo Misaki, Takuya Maeda, Akiyo Kimpara, Shigenobu Yonemura, and Shigeo Hayashi. IKK ϵ inhibits PKC to promote Fascin-dependent actin bundling. *Development*, 2016 143: 3806-3816 doi: 10.1242/dev.138495 (査読あり)

[学会発表](計 6 件)

大谷哲久、古瀬幹夫; 上皮バリアのホメオスタシスにおける細胞競合の役割 (第 7 回名古屋大学医学系研究科・生理学研究所合同シンポジウム、2017 年)

大谷哲久、徳田深作、古瀬幹夫; 上皮極性における密着結合の役割 (第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年)

大谷哲久、古瀬幹夫; 上皮バリアの恒常性の維持における細胞競合の役割 (第 50 回日本発生生物学会大会、2017 年)

Tetsuhisa Otani, Mikio Furuse; Epithelial barrier homeostasis by cell competition. (The 3rd International Symposium on Cell Competition, Cell Competition and Cancer, 2017 年)

Tetsuhisa Otani; ZO-1 and ZO-2 are required for epithelial polarity in MDCK II cells. (International Conference. Tight junctions and their proteins, 2016 年)

大谷哲久、徳田深作、渡邊美香、古瀬幹夫; 上皮極性における密着結合の役割 (第 68 回日本細胞生物学会大会、2016 年)

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔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

大谷 哲久 (OTANI, Tetsuhisa)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：50415105

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()