

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02617

研究課題名(和文) 上皮バリア機能を担うタイトジャンクションにおける隣接する細胞の死の感知

研究課題名(英文) Sensing of neighboring cell's death at tight junctions

研究代表者

米村 重信 (YONEMURA, Shigenobu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：60192811

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)：本課題は、隣接する細胞の死の感知にタイトジャンクションが関与するという仮説の検証を行い、その機構について掘り下げることを目標とした。タイトジャンクションを持つ上皮細胞では、隣接する細胞が死ぬとその細胞に接する面にアクトミオシンが集積し、その収縮が上皮シートの修復を助けるが、そのアクトミオシンの集積は、その上皮細胞が隣接する細胞とタイトジャンクションを形成できないと促進することを見出した。アクトミオシンが集積する際に、ミオシンのリン酸化、すなわち活性化を行うキナーゼであるRock2の集積、またRock2を呼び寄せるShroom3が集積することも見出し、分子機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果はアクトミオシンの収縮による損傷修復がタイトジャンクションを持つ上皮細胞に限られることをよく説明するばかりでなく、修復が完了すると不要となったアクトミオシンの集積が自動的に解消されることも説明できる。さらに、生体内と生体外を分けるバリア機能、すなわちタイトジャンクションを持つ上皮シートが常に欠落なく維持される機構の存在を示すもので、学術的には基盤的な理解に大いに貢献する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to test our hypothesis that sensing of the death of adjacent cells in polarized epithelial cell sheets involves tight junction formation and to examine the molecular mechanism. When adjacent cells are dead, actomyosin accumulates near the plasma membrane facing the dead cells and helps both wound closure and extrusion of dead cells. First, we found that this actomyosin accumulation is enhanced when tight junctions are not formed. We further tried understanding the molecular mechanism. At the wound closure of epithelial sheets, Rock2, a kinase for myosin regulatory light chain was found to be recruited to the dead/live cell border. Also, Shroom3 that recruits Rock2 became localized to the border. This would facilitate myosin activation at the border and accumulation of activated myosin filaments and interacting actin filaments.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション 損傷修復 ミオシン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

上皮シートはわれわれの体表、体内を覆い、生物外の環境から生物的環境を守るバリア機能を持っている。皮膚、消化管、泌尿器系、脳血管関門などバリア機能の破綻は感染、炎症を始め様々な疾患につながる。タイトジャンクション(TJ)は細胞間接着装置の一種で、アドヘレンスジャンクション(AJ)に近接して形成され、上皮シートの細胞間の物質の移動を制御しバリア機能を担う構造である。上皮シート内の細胞が死ぬと、死細胞はその周辺の細胞によってシートから押しのけられ、同時に死細胞のあった領域は生細胞で埋まり、上皮シートの破綻は自律的に速やかに上皮シート内の細胞の働きによって解消する(一細胞の死であれば、1時間以内の現象)。周辺の生細胞における、死細胞と接する細胞膜直下にはアクトミオシンが集積し、死細胞を取り巻き、生細胞間のAJを介して連結して大きなリングを作る。このリングの収縮が修復運動を助け、修復終了後には速やかにリングは消失する。しかし、もし生きた細胞を間違えて追い出せば、上皮シートの維持はできず、組織の機能は損なわれ、それはがんの浸潤を想起させる。このように、上皮細胞が隣接する細胞の生と死を峻別することは、上皮シートやそのバリア機能の維持のために本質的なことと言える。以上のように、細胞の死以降の目に見える現象はよく観察されており、アクトミオシンの収縮の重要性も理解されている。しかし、以下の問いについて、分子機構は全くわかっていない。「細胞は隣の細胞の死がどうしてわかるのか? 隣の細胞が生きていることはどうしてわかるのか?」

### 2. 研究の目的

研究代表者はTJを形成しているバリア機能を持つ上皮シートにのみ上記のリングが形成されることをすでに確認しており、生細胞と死細胞の間のTJはやがて消滅することから、隣接する細胞の死は生細胞側のTJを構成する分子にも影響を与え、それが死細胞の存在を示すシグナルとなるという発想を得た。実際にTJの主要な膜タンパクであるクローデインの側方の架橋を行うことでTJの形成に必須な細胞質タンパク、ZO-1とZO-2の発現を抑制した細胞ではTJは形成されず、アクトミオシンの強い集積が見られる(ただし、どの細胞もアクトミオシンの集積が多いため、バランスが取れ、細胞の排除は起こらない)(Umeda et al., Cell, 2006; Fanning et al., Mol. Biol. Cell. 2012)。また、その細胞では死細胞の周辺の細胞にアクトミオシンのさらなる集積が起こらないことを研究代表者は見出している。本研究ではこの仮説を検証し、分子のレベルで理解することを目的とする。一般的な死を知らせるシグナルとしてこれまで、細胞死に伴って表面に出現、放出する因子や死細胞の張力低下などが注目されてきたが(Gu et al. J. Cell Biol. 2011)、再現性に問題があるなど一般性のある結論は得られていない。TJの形成、崩壊、すなわち局所的なバリア構造そのものが生と死のシグナルという考えは上皮シート構築の基本原則だけで自律的修復機構も含まれている非常に巧妙で合理的なものと考えられる。

### 3. 研究の方法

顕微鏡下で上皮シート中の任意の細胞をレーザー光により殺傷する系をイメージングに利用する。これにより、実験に応じた特定の細胞を殺傷したり、殺傷直後からの変化をライブイメージングによって記録することができる。具体的に以下の項目について明らかにする。また、死のシグナルが伝わったことを示す現象としてアクトミオシンの集積に注目する。TJ形成の重要性を実験的に示すために、マウス乳腺由来の上皮細胞株EpH4とそれを元にZO-1/-2のダブルノックアウトを行った、DKO細胞(共同研究を行っている九州大学、池ノ内准教授が作成)を比較する系を多く用いる。

(1) TJ形成の異常が死のシグナルとして伝わることの検証: DKO細胞は隣接する細胞とTJを形成することができないため、仮説が正しければDKO細胞と隣接する上皮細胞にはアクトミオシンが集積するはずである。DKO由来のアクトミオシンでないことを明確にするためにGFPミオシンを発現しているMDCK細胞(TJを形成する上皮細胞)について、GFPミオシンの集積の程度を画像から定量化する。こうしてGFPミオシン発現MDCK細胞とDKO細胞、EpH4細胞、MDCK細胞、TJをそもそも作らないHeLa細胞や線維芽細胞など多種類の細胞と混合培養する。この系で実際に細胞を殺傷した場合と同様なアクトミオシンの集積が見られれば、細胞が実際に死ぬ時に放出されるなんらかのシグナルでなく、TJの形成そのものが生死のシグナルであることを示すよい証拠となる。それを示す予備的結果が出ており、十分な定量性、再現性を満たすかを検証する。同様に修復の終了のシグナルは新しいTJの形成であるのか、あるいはリングの収縮の完了なのか、リング収縮の途中で局所的にTJを形成させるなどの実験を行うことで、明白にする。

(2) 隣接する細胞が死んだ場合のTJの構造、構成分子の経時的な変化とアクトミオシンの集積の光学、電子顕微鏡による解析: 死んだ細胞との間に形成されていたTJの消滅の経緯については知る限りにおいて報告がない。TJマーカーとして、本研究で特に注目しているZO-1について

蛍光タグ付きタンパクをノックインした EpH4 細胞をすでに作成しており、隣接する細胞を蛍光を発しない親株にすることにより、生細胞、あるいは死細胞における ZO-1 の挙動を正確にライブイメージングによって捉える。また ZO-1 以外の TJ 構成タンパクについても免疫蛍光法によって、量や局在変化を検討する。TJ の超微形態の変化は電子顕微鏡レベルでも明らかにする。

(3) アクトミオシン集積につながるシグナル系の理解：決定された領域に結合する分子を生化学的に探索し、アクトミオシン集積につながる分子機構を明らかにする。その領域の機能不全でミオシンの活性化、集積につながるため、この領域は本来ミオシンの不活性化に関わることが予想される。候補分子は過剰発現、ノックダウンなどによってアクトミオシン集積における役割を検証する。アクトミオシンの集積に注目していないものの、文献上候補分子は幾つかあり、それらを一つずつ解析するやり方も可能である。

#### 4. 研究成果

##### (1) TJ 形成の異常が死のシグナルとして伝わることの検証：

生細胞と死細胞の境界、また生細胞と生細胞の境界にミオシン II がどれほど濃縮するか（同じ生細胞間への濃縮に対して何倍濃縮するか）に関して、蛍光画像をラインスキャンし、輝度を計測することによって算出した。

まず、上皮でない線維芽細胞 NRK49F, 3Y1 また、TJ を持たない上皮由来の HeLa 細胞では生細胞と死細胞の境界でのミオシン II 濃縮度は 0.86-1.28 であり、ほとんど濃縮しなかった。それに対し TJ を持つ MDCKII 細胞では濃縮度は 4.32 と強く濃縮した。

細胞種	生/死境界のミオシン濃縮度	標準誤差	N (Line scanの本数)
NRK49F	0.90	0.03	332
3Y1	0.86	0.94	98
HeLa	1.28	0.06	100
MDCKII	4.32	0.14	86

表 1 TJ を作る細胞と作らない細胞での傷口へのミオシンの濃縮度の違い

次に、GFP ミオシン II を発現している MDCKII 細胞に対し、他の細胞を接触させ、境界への GFP の濃縮度を計測した。相手の細胞は TJ を構成しうる、MDCKII 親株、Eph4 (種が異なるが、TJ は形成しうる)、また、ZO-1/-2 がノックアウトされているため TJ を形成できない DKO 細胞、カドヘリンは発現しているが TJ は形成できない線維芽細胞である EL 細胞、同じくカドヘリンは発現しているが TJ は形成できない上皮由来の HeLa 細胞、 $\alpha$  カテニンの発現がないため AJ も TJ の形成できない上皮細胞由来の R2/7 細胞、カドヘリンの発現がなく接着能力を持たない線維芽細胞 L 細胞、さらに接触する細胞がない場合も計測した。その結果、TJ を形成する細胞のペアの境界にはミオシン II は濃縮せず（濃縮度は 1.03-1.06）、TJ を形成し得ないペアでの境界へは強く濃縮した（濃縮度 1.25-3.60）。

MDCKII-ミオシン GFP の細胞と DKO とを接触させると、DKO との境界にミオシン GFP が集積することを既に述べたが、この状態で DKO を殺傷するともはや追加のミオシンの集積は見られなかった。

これらの結果は、TJ を作る上皮細胞は、TJ ができない細胞側面の膜にミオシン II を集積させるということを示している。TJ を作らない細胞ではこのような反応は起こらず、また TJ を作るとミオシンの濃縮はなくなる。さらにこれらの結果は隣接する細胞間に TJ ができないことが重要であり、細胞の死は直接の関係はないということを示している。

隣接させた細胞	ミオシン濃縮 (境界/中央部)	SE
MDCK II	1.03	0.40
Eph4	1.04	0.21
DKO	3.60	0.23
EL	3.60	0.34
HeLa	1.25	0.05
R2/7	1.49	0.12
L	2.06	0.19
なし (MDCKII の島)	2.14	0.32

表 2 様々な細胞を隣接させた場合のミオシン GFP の濃縮度

(2) 隣接する細胞が死んだ場合の TJ の構造、構成分子の経時的な変化とアクトミオシンの集積の光学、電子顕微鏡による解析：

上の結果から、生細胞と死細胞との間には正常な TJ は形成されていないはずと考えられる。長期的には死細胞は除去され、死細胞との間にもともと形成されていた TJ は見えなくなるから、死細胞が作っていた TJ は分解、処理されるのだろう。しかし、ミオシン II 集積の原因となるのであれば、もっと早い段階で TJ の変化があるはずである。すなわち、生細胞側が TJ はできていないと判断するほどの違いが生じなければいけない。図 1 は死細胞の周囲に集積したミオシン（緑）と TJ を示す ZO-1 の局在である。ミオシンのリングが収縮するにつれて死細胞周囲の生細胞間の TJ は延長していくが、死細胞と生細胞との間の TJ は本来の綺麗な線状ではなくドットが分散したような形になっており、ミオシンはそれよりも先に進んでいる。このことから、死細胞／生細胞間の TJ はその構成因子が消失するわけではないが、構造の構築は異常になっていることがわかる。ZO-1/-2 を失った細胞は常に細胞境界にミオシンを集積させているため、TJ の構成因子のうち、特に ZO-1/-2 がミオシンの活性化、集中に関与していると思われた。電子顕微鏡的には死細胞と生細胞との間に、細胞膜が距離ゼロで接している、TJ の特徴である Kissing points は観察されるので、部分的に接着分子であるクローディンなどはそのまま TJ の構造を維持していると考えられるが、それが隙間なく連続した線状にはなっていないようである。

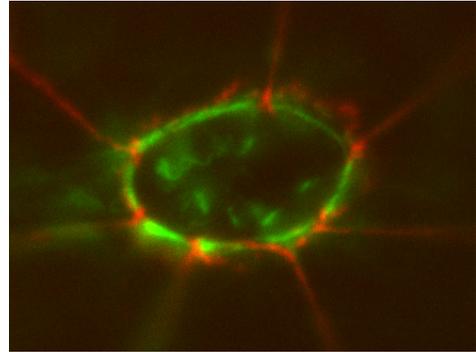


図 1 傷口面へのミオシン（緑）の集積と TJ の構成因子 ZO-1 の局在変化（赤）

(3) アクトミオシン集積につながるシグナル系の理解：

アクトミオシンの集積につながるのはミオシンの活性化だと考えるのが自然であり、細胞内では RhoGTPase の下流でミオシンのリン酸化が起こるのが主な経路と考えられている。TJ 付近に局在する RhoGAP (Rho を不活性化し、ミオシンの脱リン酸化すなわち、不活性化につながる) として ARHGAP12 が既に報告されていたが、ARHGAP12 が ZO-1 と結合することを免疫沈降法によって見出した。また、ARHGAP12 の発現抑制がミオシンの活性化を引き起こすことも見ている。ただし、その程度は死細胞に面した時と比較すると低いので、ARHGAP12 が主要な調節因子とは思えなかった。

一方、ZO-1 と結合する因子を TurboID 法によって探索したところ、TJ に局在することが知られている ARHGEF11 (Rho の活性化因子) が TJ の崩壊時に ZO-1 とより強く結合するということも見出した。ただし、これもミオシン集積時における濃縮がうまく確認できていない。

よりミオシンに近い調節因子として Rho の下流のキナーゼである Rock1 と Rock2 が存在するが、このうち、Rock2 は集積したミオシンと共局在していることを見出した。Rock の局在は Rock に結合するアクチン結合タンパクである Shroom3 が制御していることが報告されており、実際に Shroom3 の濃縮も確認された。ただし、Shroom3 の局在を制御している分子はわかっておらず、本研究においては ZO-1/-2 の存在状態がおかしくなることが Shroom3 を呼び寄せることにつながるのか、つながるとすればその分子機構が今後の課題となる。

引用文献

- ① Umeda et al., Cell, 2006, 126:741-754.
- ② Fanning et al., Mol. Biol. Cell. 2012, 23:577-590.
- ③ Gu et al., J. Cell Biol. 2011, 193:667-676.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Konishi Satoshi, Yano Tomoki, Tanaka Hiroo, Mizuno Tomoaki, Kanoh Hatsuho, Tsukita Kazuto, Namba Toshinori, Tamura Atsushi, Yonemura Shigenobu, Gotoh Shimpei, Matsumoto Hisako, Hirai Toyohiro, Tsukita Sachiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Vinculin is critical for the robustness of the epithelial cell sheet paracellular barrier for ions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ando Toshiya, Sekine Sayaka, Inagaki Sachi, Misaki Kazuyo, Badel Laurent, Moriya Hiroyuki, Sami Mustafa M., Itakura Yuki, Chihara Takahiro, Kazama Hokto, Yonemura Shigenobu, Hayashi Shigeo	4. 巻 29
2. 論文標題 Nanopore Formation in the Cuticle of an Insect Olfactory Sensillum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1512 ~ 1520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2019.03.043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakayama Sayaka, Ito Daiyu, Kamada Yuko, Yonemura Shigenobu, Ooga Masatoshi, Kishigami Satoshi, Wakayama Teruhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Tolerance of the freeze-dried mouse sperm nucleus to temperatures ranging from -196 °C to 150 °C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-42062-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsujioka Masatsune, Uyeda Taro Q. P., Iwadate Yoshiaki, Patel Hitesh, Shibata Keitaro, Yumoto Tenji, Yonemura Shigenobu	4. 巻 14
2. 論文標題 Actin-binding domains mediate the distinct distribution of two Dictyostelium Talins through different affinities to specific subsets of actin filaments during directed cell migration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0214736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinozuka Takuma, Takada Ritsuko, Yoshida Shosei, Yonemura Shigenobu, Takada Shinji	4. 巻 146
2. 論文標題 Wnt produced by stretched roof-plate cells is required for the promotion of cell proliferation around the central canal of the spinal cord	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 159343-159343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.159343	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishiyama Noboru, Sarpal Ritu, Wood Megan N., Barrick Samantha K., Nishikawa Tadateru, Hayashi Hanako, Kobb Anna B., Flozak Annette S., Yemelyanov Alex, Fernandez-Gonzalez Rodrigo, Yonemura Shigenobu, Leckband Deborah E., Gottardi Cara J., Tepass Ulrich, Ikura Mitsuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Force-dependent allostery of the $\beta$ -catenin actin-binding domain controls adherens junction dynamics and functions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5121-5121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07481-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Cheng Chun-Chun, Tsutsui Ko, Taguchi Toru, Sanzen Noriko, Nakagawa Asako, Kakiguchi Kisa, Yonemura Shigenobu, Tanegashima Chiharu, Keeley Sean D, Kiyonari Hiroshi, Furuta Yasuhide, Tomono Yasuko, Watt Fiona M, Fujiwara Hironobu	4. 巻 7
2. 論文標題 Hair follicle epidermal stem cells define a niche for tactile sensation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 38883-38883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.38883	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Honda Akira, Kita Tomoko, Seshadri Shri Vidhya, Misaki Kazuyo, Ahmed Zama, Ladbury John E., Richardson Guy P., Yonemura Shigenobu, Ladher Raj K.	4. 巻 115
2. 論文標題 FGFR1-mediated protocadherin-15 loading mediates cargo specificity during intraflagellar transport in inner ear hair-cell kinocilia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 8388 ~ 8393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1719861115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ryosuke Nishimura, Masahiro Takeda, Hiromi Miyoshi, Yutaka Yamagata, Shigenobu Yonemura.
2. 発表標題 Functional analysis of alpha-catenin on coordinated epithelial morphogenesis.
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生物学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshinori Hirano, Yu Amano, Shigenobu Yonemura, Toshio Hakoshima
2. 発表標題 Molecular Mechanism of the a-catenin force-sensitivity
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 本田 尚三、米村 重信
2. 発表標題 上皮極性因子のゲノムワイドRNAiスクリーニングによって見出された新規候補遺伝子の解析
3. 学会等名 第4回 メカノバイオロジー学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗栖 修作、米村 重信
2. 発表標題 蛍光タンパク質ノックインによる細胞間接着タンパク質の定量
3. 学会等名 第4回 メカノバイオロジー学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	University Health Network	University of Toronto		
英国	University of Leeds	University of Sussex	Edinburgh Cancer Research Centre	
米国	University of Texas	Northwestern University	University of Illinois	
インド	National Centre for Biological Sciences			