

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790216

研究課題名（和文）

タイトジャンクションの形成機構

研究課題名（英文）

Mechanisms of tight junction formation

研究代表者

梅田 一彰 (UMEDA KAZUAKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：80444876

研究成果の概要：上皮細胞の細胞間接着装置は、隣り合う細胞膜の最も頂端側に位置するタイトジャンクション（TJ）と、その基底側に位置するアドヘレンスジャンクション（AJ）から主に構成されている。TJの細胞膜裏打ちタンパク質であるZO-1/2/3のTJおよびAJにおける役割を、マウスと細胞を使って、調べた。その結果、ZO-1は、胚発生の初期段階で組織形成に、またAJの形成にも重要な働きをしていることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：タイトジャンクション，微小管

## 1. 研究開始当初の背景

TJは、接着分子クローディングが重合することによって形成され、上皮細胞間の間隙を物質が自由に通り抜けられないようにするバリア機能を司っている。クローディングの細胞内領域は足場蛋白質であるZO-1とZO-2と結合し、これらの分子を介してアクチン細胞骨格と連結している。また、TJには細胞極性因子が集積しており、TJは細胞極性に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、TJがどのような機構でAJのアピカル側に形成されるかは不明であり、細胞極性因子のTJ局在化機構も明らかにな

っていない。

## 2. 研究の目的

私共は、これまでに、相同組み換え法でZO-1をノックアウトし、さらにRNA interference (RNAi)法でZO-2をノックダウンした上皮細胞(ZO-1(ko)/2(kd))を作製し、ZO-1/ZO-2の機能解析を行ってきた。その結果、クローディングの重合によるTJの形成は、ZO-1/ZO-2が司り、かつ、その重合が行われる位置をも決定していることを見出した。また、TJが形成されないにもかかわらず、上皮細胞の極性は維持される一方、一

群の細胞極性因子はラテラル膜に一様に分布することも見出した。つまり、ZO-1/ZO-2分子が細胞極性因子の局在化にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、ZO-1/ZO-2分子がAJのアピカル部(本来のTJの場所)に局在するメカニズムやZO-1/ZO-2分子と細胞極性因子との連結機構は未解明のままである。これらの点を明らかにし、上皮細胞の細胞極性形成機構を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 前述のとおり、私共が作製したZO-1(ko)/2(kd)上皮細胞を利用して、分子生物学的、細胞生物学的解析を行った。

(2) 個体レベルでZO-1/ZO-2の機能を明らかにするため、ZO-1ノックアウトマウスの表現型を解析した。

(3) 微小管は、細胞の極性形成に重要な働きをしていることが知られている。そこで、微小管の観点から極性機構を理解するために、質量分析装置を用いた微小管結合蛋白質の解析を行った。具体的には、ラットの脳から微小管と共沈する蛋白質を調製し、イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて分画化し、引き続き質量分析を行うことによって解析した。

### 4. 研究成果

(1) ZO-1/ZO-2依存的ミオシン-2のAJへの局在

TJはAJに依存して形成されることが知られており、ZO-1/ZO-2はまずAJのコンポーネントとの結合を介してAJにリクルートされ、その後AJから離れてTJの場所を決定すると考えられる。そこで、AJに局在する分子であるE-カドヘリン、アクチン、およびミオシン-2の局在を、ZO-1(ko)/2(kd)細胞において調べるため、免疫染色を行った。その結果、ZO-1(ko)/2(kd)細胞においては、本来AJに組み込まれるべきミオシン-2が、AJから分離していた(図1)。

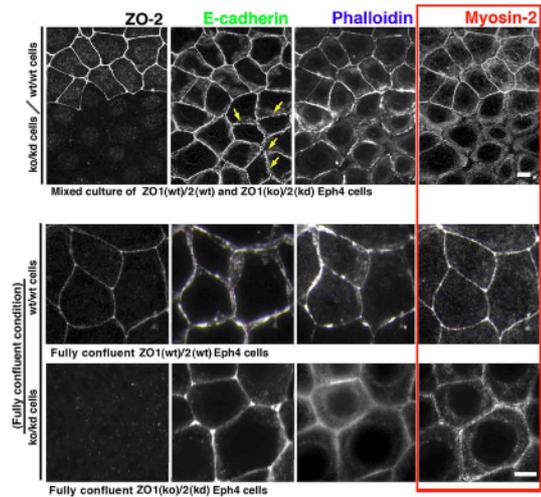


図1 上皮細胞におけるE-カドヘリン、アクチン、およびミオシン-2の局在

ZO-1(ko)/2(kd)細胞において、ミオシン-2がAJから分離していたが、RhoA, Rac1 およびCdc42のドミナントアクティブを強制発現させると、RhoAのドミナントアクティブを発現させた細胞では、ミオシン-2がAJに組み込まれた(図2)。よって、ZO-1/ZO-2は、膜タンパク質と細胞骨格を連結する膜裏打ち蛋白質としてだけでなく、RhoAを介したシグナル伝達蛋白質としての役割をも有し、上皮細胞間接着装置の高次構造の形成を制御することが示唆された。

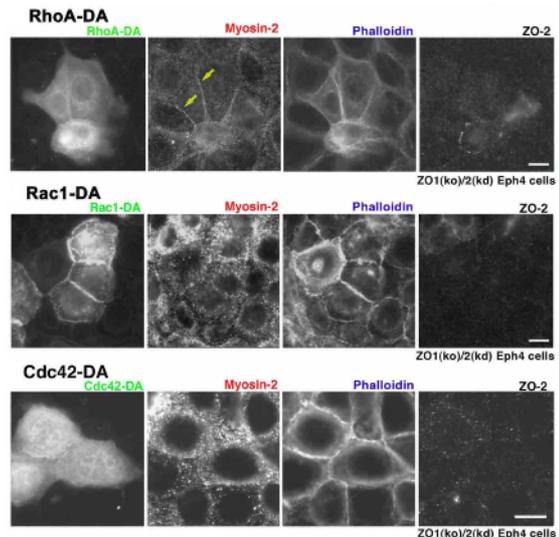


図2 ZO-1(ko)/2(kd)細胞におけるRhoA, Rac1およびCdc42のドミナントアクティブの強制発現

(2) Z0-1/Z0-2 ノックアウトマウスの解析

これまで、細胞レベルで Z0-1/Z0-2 の解析を行ってきたが、個体レベルでの解析を行うため、Z0-1 ノックアウトマウスを作製し表現型を解析した。

その結果、Z0-1 ノックアウトマウスは、

- ・ 受精後 8.5 日 (E8.5) から発育成長が遅れ始め、E11.5 までには、すべての胚で致死であった (図 3, 4)
- ・ 絨毛膜と尿膜の癒合に異常が認められた。
- ・ E9.5 において、脊索、神経管および尿膜においてアポトーシスが顕著に認められた。
- ・ ファミリー蛋白質である Z0-2 または Z0-3 の発現パターンには、なんら異常は認められなかった。
- ・ 卵黄嚢において、血管新生に異常が認められた。

以上の結果から、胚発生の初期段階で、Z0-1 は組織形成に重要な働きをしていることが示唆された。

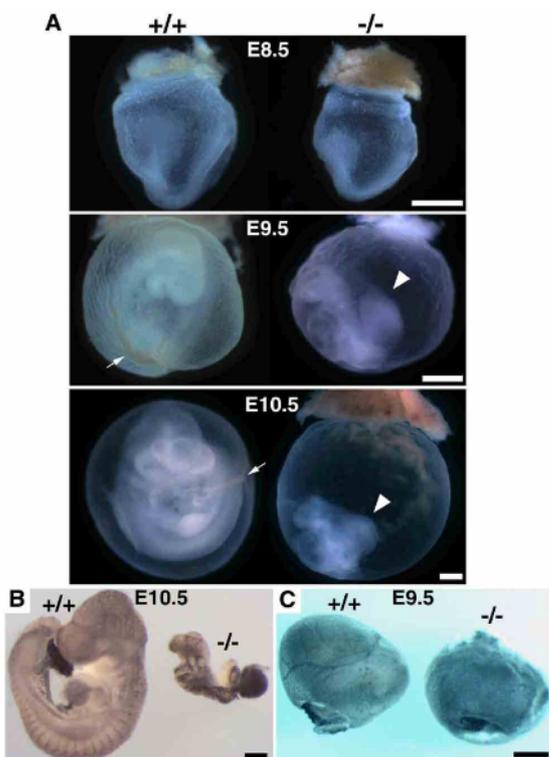


図 3 8.5-10.5 日胚の形態

Table 1. Genotype analysis of offspring from Tjp<sup>+/-</sup> intercross

Stage	No. of progeny			Total
	+/+	+/-	-/-	
E8.5	16	29	15	60
E9.5	38	62	37	137
E10.5	16	26	13	55
E11.5	9	17	0 (12 <sup>a</sup> )	26
E12.5	5	14	0 (5 <sup>a</sup> )	19
Postnatal	79	140	0	219

<sup>a</sup> Resorbent.

図 4 胚のジェノタイプ解析

(3) 微小管結合蛋白質の探索

微小管は、細胞極性、分裂、運動、小胞体輸送のような様々な細胞の機能に重要な役割を果たしていることが知られている。上皮細胞においては、微小管はマイナス端とプラス端の極性を保ちながらアピカル-基底軸に沿って走行している。また、Z0-1(ko)/2(kd)細胞においては、TJ が形成されないにもかかわらず、細胞極性が維持されることを以前に明らかにした。そこで、微小管側から極性形成の機構を理解することを目的とし、微小管に結合する分子を、質量分析装置を用いて探索した。391 種の蛋白質を同定し、これらの蛋白質を 12 のカテゴリーに分類した (図 5)。微小管結合蛋白質 (MAPs) やモーター蛋白質を含む微小管細胞骨格蛋白質 57 種、他の細胞骨格蛋白質 66 種、中心体蛋白質 4 種、シヤペロン 10 種、ゴルジ体蛋白質 5 種、ミトコンドリア蛋白質 7 種、核酸結合蛋白質 62 種、核蛋白質 14 種、リボゾーム蛋白質 13 種、小胞体輸送蛋白質 28 種、別の機能あるいは局在を示す蛋白質 83 種、新しい蛋白質 42 種であった。これら蛋白質のうち、6 つの蛋白質を培養細胞に発現させたところ、3 つは中心体や線毛の新しいコンポーネントであることが明らかになった (図 6)。今回用いた方法は、微小管に直接あるいは間接的に結合する蛋白質を同定するのに適している。今回の解析結果は、微小管を基盤とした機能と構造の解析に役立つものと考えられる。今後、本方法を用いて、極性形成機構の解明へと発展させていきたい。

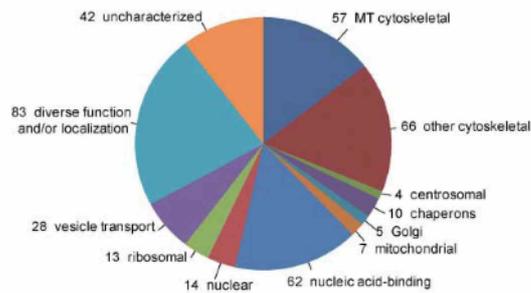


図 5 同定した蛋白質の局在や機能をもとにした分類

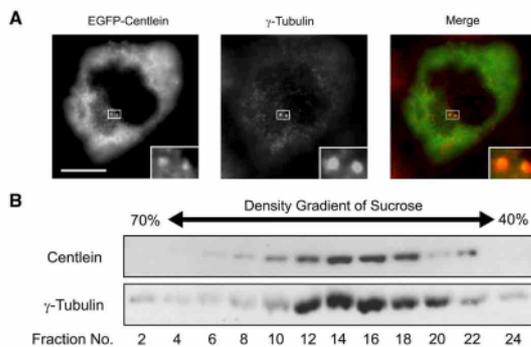


図 6 新規微小管結合蛋白質 centlein の中心体局在

### 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 5 件)

- Yamazaki Y, Umeda K, Wada M, Nada S, Okada M, Tsukita S, Tsukita S: ZO-1- and ZO-2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. *Mol Biol Cell* 19:3801-3811,2008 査読有
- Sakamoto T, Uezu A, Kawauchi S, Kuramoto T, Makino K, Umeda K, Araki N, Baba H, Nakanishi H: Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain. *Genes Cells* 13:295-312,2008 査読有
- Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S, Tsukita S: Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal

phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19:2465-2475,2008 査読有

Makino K, Umeda K, Uezu A, Hiragami Y, Sakamoto T, Ihn H, Nakanishi H: Identification and characterization of the novel centrosomal protein centlein. *Biochem Biophys Res Commun* 366:958-962,2008 査読有

Uezu A, Horiuchi A, Kanda K, Kikuchi N, Umeda K, Tsujita K, Suetsugu S, Araki N, Yamamoto H, Takenawa T, Nakanishi H: SGIP1alpha is an endocytic protein that directly interacts with phospholipids and Eps15. *J Biol Chem* 282:26481-26489,2007 査読有

#### [学会発表](計 8 件)

上江洲 章吉, 新しいリン脂質結合タンパク質SGIP1 による初期エンドソームでのEGF受容体のソーティング機構, 第31回日本分子生物学会, 2008年12月12日, 神戸

山崎 裕自, 上皮細胞間接着装置の高次構築形成におけるミオシン-2とRho-Aの役割, 第31回日本分子生物学, 2008年12月11日, 神戸

勝野 達也, 細胞間接着における細胞膜 細胞骨格のインターフェースとしてのZO-1, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月14日, 横浜

勝野 達也, ZO-1ノックアウトマウスにおける形態形成異常, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月12日, 横浜

上江洲 章吉, SGIP1 ;リン脂質とEps15に結合し、エンドサイトーシスを制御する新しい分子, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月12日, 横浜

菊池 直也, Brelin;神経突起の形成に関わる新しい微小管結合たんぱく質, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月12日, 横浜

牧野 公治, 新しい中心体蛋白質の同定と機能解析, 第30回日本分子生物学会, 2007年12月11日, 横浜

池ノ内 順一, 上皮細胞の細胞接着形成過程におけるZO-1の役割, 第59回日本細胞生物学会, 2007年5月28日, 福岡

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

梅田 一彰 (UMEDA KAZUAKI)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号: 80444876

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：