

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間：2007～2011

課題番号：19GS0313

研究課題名（和文） 上皮細胞系の統合的理解を目指した細胞接着・細胞骨格研究の新展開

研究課題名（英文） A novel approach to cell adhesion/cytoskeleton research for exploring the epithelial cell system

研究代表者

月田 早智子 (TSUKITA SACHIKO)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：00188517

研究代表者の専門分野：細胞生物

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮細胞、細胞接着、細胞骨格、細胞間バリアー、タイトジャンクション

## 1. 研究計画の概要

生体内の上皮細胞シートの多様性という視点からの上皮細胞系の統合的理解を目指し、新規細胞接着装置・細胞骨格複合体構成因子に注目して、上皮細胞のシステム解析を新しい切り口から進めている。独自の方法により単離した細胞間接着装置画分より同定された新規構成因子が中心になっている。1) 先進的プロテオミクスにより同定した新規細胞間接着装置構成蛋白質を含む多様な分子群による上皮細胞シートの形成とシートの特性の制御機構の解析、2) 上皮細胞間バリアーによる上皮細胞シートの物質透過性および物性の制御機構の解析、3) 細胞間接着装置・アピカル膜を裏打ちする細胞骨格との関連からの、上皮細胞シートの特性の制御機構の解析、4) 上皮細胞アピカル膜の繊毛による上皮細胞の特性の制御機構の解析、を行う。

## 2. 研究の進捗状況

上記各 4 課題について、以下のように研究を進めることができた。これらの結果は相互に統合されることにより、上皮細胞系の統合的理解を目指した新展開の基盤となると思われる。

1) プロテオミクスにより同定した細胞間接着装置構成膜蛋白質のうち、新規の膜蛋白質 4 種および裏打ち細胞骨格蛋白質 10 種について、培養細胞およびマウス個体レベルでの解析を行なった。膜蛋白質については、細胞あるいは生体での解析の結果、機能解析へは進めず方法論を報告したが、裏打ち細胞骨格蛋白質 2 種は細胞や生体組織の形態形成などに影響を示しており、細胞レベル、個体レベルでの解析を進行中である。

2) 細胞間接着に関わるタイトジャンクション構築蛋白質クローディンは大きなファミリーを形成するが、チャンネルとバリアーを形成する 2 つのタイプのクローディンの組み合わせで、全身的生体機能の制御に関わると思われ、細胞・個体レベルで解析中である。細胞レベルではイメージングの結果、各々のクローディンで安定性に差があることが明らかとなった。また、クローディンの発現制御に関連したシグナル因子について解析中である。個体レベルの解析では、小腸腸管内のナトリウムイオンのホメオスターシスがクローディン 15 で制御され、その結果、腸管の栄養吸収が制御されることも明らかとなった。クローディン 15 のノックアウトマウスは栄養吸収障害の症状を示す。クローディン 2 のノックアウトマウスの解析もすすめているが、クローディン 15 と同じような生理学的な性質をもちながら、その生体内機能は異なるように思われる。さらに、小腸腸管に発現するクローディンのノックアウトマウスの作製をすすめている。

3) 細胞骨格性の ERM/マーリン蛋白質研究の延長線上で、細胞間接着装置局在蛋白質として IQGAP3 を同定したが、IQGAP3 は、細胞増殖時に細胞間接着部位に局在する。静止期の細胞に IQGAP3 を過剰発現すると、細胞増殖の開始がみられる。分子細胞生物学的な解析から、IQGAP3 は Ras に結合し、活性化型 Ras を安定化することで Ras-ERK 経路を介して細胞増殖を導くことが分かった。IQGAP3 は、特に組織染色で幹細胞から派生した増殖細胞に局在することに大きな特徴がある。現在、ノックアウトマウスを用いた解析をはじめており、再生の際の増殖能力に

差がある可能性を見いだしている。

4) 細胞間接着に規定される細胞極性関連因子として同定された *Odf2* は、体細胞では中心体や基底小体に存在する。*Odf2* のコンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。現在、全身ノックアウトのマウスが得られ、解析を進めている。細胞での解析では予想されなかった表現型が得られており、繊毛の疾患関連解析を含む機能解析の発展が期待される。

### 3. 現在までの達成度

#### ②おおむね順調に進展している

(理由) 本申請は、上皮細胞系の統合的理解を目指し、細胞接着・細胞骨格系の新規分子を標的とした研究を基盤として進んでいる。上皮細胞リモデリングの新規制御因子や細胞増殖に関連した *IQGAP3*、上皮細胞と繊毛の形成因子としての *Odf2* など、生体機能との関連を含む幾つかの大きな進展が得られている。上皮細胞と微小環境ならびに細胞増殖の観点からクローデインの細胞生物学的、個体生物学的解析が進行中である。クローデインの細胞間バリアーは、いろいろな生体システムの維持機構として大きな役割を演じていると思われる。期間の終了を目指して、これまでに得られたデータを論文発表する段階にあり、研究の目標を達成していく予定である。再生医療分野、がんの病態解析や治療方法の創出、組織幹細胞生物学への応用など、さらに挑戦的な方向性の試行も行っていく予定である。

### 4. 今後の研究の推進方策

前半で得られた広範囲に及ぶ知見や獲得された技術、整った設備、一緒に研究を育てて来た研究者の共通認識を基盤に、上皮細胞統合的な理解の新展開に向けた収束を目指す。学術創成研究開始時には予想できず、前半の研究の結果見えて来た事項をさらに深めるために、共同研究も含めた、方針の見直しも適宜行う。主には以下の点について、成果発表や新たな進展をこころざす。

- (1) 細胞間接着装置裏打ち細胞骨格性新規蛋白質 2 種について、細胞や生体組織の形態形成などへの影響を解析する。これにより、細胞間接着関連因子の機能についての、細胞内シグナルによる転写、あるいは、転写後制御に関して、新たな知見が広がるものと思われる。
- (2) 上皮細胞間バリアーの形成と機能に本質的な 4 回膜貫通蛋白質クローデインについての細胞生物学的、個体生物学的解析について、細胞生物学的には、クローデインの動態の制御機構や、クローデインの発現および構造形成制御機構について、さらに進めた解析を行っていく。また、個体レベルの解析では、細胞間バリアー

の透過性とその生体機能について、小腸のみならず、いくつかでの臓器において、複数のクローデインのノックアウトマウス解析をすすめていく。予備的には病態の確認されているものがあるので、その病態解析が大きな鍵になると思われる。

- (3) 細胞間接着を起点とした、細胞増殖制御機構の解析として、*IQGAP3* を中心に細胞生物学的、個体生物学的な解析を進める。癌研究との接点も模索しながら、*IQGAP3* の機能的な位置付けをはっきりさせることを行っていく。
- (4) *Odf2* のノックアウトマウスの解析から、生体内で気管繊毛の形態形成、機能解析に新たな視点を見いだすことができ、また、他の臓器の形態形成への影響もみいだせているので、そのメカニズムの解明に全力を注ぐ。

以上の展開から、上皮細胞系の統合的理解をめざした細胞接着、細胞骨格研究に新機軸を築くことができるとと思われる。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Tsukita, Sa, Yamazaki, Y., Katsuno, T., and Tamura, A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene* 27:6930-6938. (2008) 査読有
2. Yamazaki, Y., Umeda, K., Wada, M., Nada, S., Okada, M., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. ZO-1- and ZO-2- dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. *Mol. Biol. Cell.* 19:3801-3811. (2008) 査読有
3. Nojima, H., Adachi, M., Matsui, T., Okawa, K., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biol.* 10:971-978. (2008) 査読有
4. Yamazaki, Y., Okawa, K., Yano, T., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins. *Biochemistry* 47:5378-5386. (2008) 査読有
5. Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. Megaintestine in claudin-15- deficient mice. *Gastroenterology* 134:523-534. (2008) 査読有

[学会発表] (計 33 件)

[その他] 朝日新聞 2008 年 7 月 21 日朝刊  
「腸のたんぱく質細胞分裂を促進」  
(IQGAP3 に関する報道)