

## 生体機能構築基盤としての上皮バリア学の新展開

Novel approach focusing on the tight junction-based paracellular barrier combined with the apical barrier toward understanding and manipulating epithelial barriers

課題番号：19H05468

月田 早智子 (TSUKITA Sachiko)

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任教授



### 研究の概要

「タイトジャンクション (TJ)」による上皮細胞間バリアと上皮細胞アピカル膜のアピカル面バリアで構成される上皮バリアについて、まず、TJの分子構築を生体内実態に即して解明する。また、「TJ-アピカル複合体」により統合された上皮バリアが、時々刻々変化する生体機能を構築・制御する機構を解明する。上皮バリア学の新展開、ひいては、新規操作法の開拓を目指す。

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮バリア、タイトジャンクション、アピカル膜、細胞接着、細胞骨格

### 1. 研究開始当初の背景

生体は大小様々の区画に分かれ、各区画は、上皮細胞シートによる「上皮バリア」により、内部環境を外部からの摂動に適応させ種々の生体機能を構築している。上皮バリアは、「タイトジャンクション (TJ)」による上皮細胞間バリアと上皮細胞アピカル膜によるアピカル面バリアとで形成され、物質移動の制限と選択的透過を行っている。これまで私共は、分子・細胞・個体レベルの TJ 研究を進め、加えて、TJ の接着分子クローディン(Cldn)の分子構造解析から TJ 細胞間バリアの分子構築仮説を提示するなど、細胞間バリア研究を牽引してきた。しかしながら、TJ 分子構築の生体内実態や 27 種類の Cldn の機能特異性などについての理解は不十分である。また、従来、細胞間バリアとアピカル面バリアは、別個に研究されてきたが、近年その相互作用が注目されている。私共では、両バリアを構造的・機能的に連携させるシステムとして、「TJ-アピカル複合体」を同定したが、その構築や機能、および、分子基盤には不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

TJ の分子構築の生体内実態を明らかにし、TJ 細胞間バリア操作法開発の基盤とする。また、「TJ-アピカル複合体」を分子・細胞・個体レベルで解析し、細胞間バリアがアピカル面バリアと連携した「上皮バリア」による生体機能の構築原理を統合的に解明する。この 2 つの解析結果を軸に、上皮バリア学の新展開、および、新規操作法の開拓を目指す。

### 3. 研究の方法

まず、発現する Cldn の種類を任意に制御し得る培養上皮細胞系を構築する。その細胞を用いて、クライオ電顕トモグラフィーにより、TJ 細胞間バリアの生体内実態を明らかにする。一方で、「TJ-アピカル複合体」について、「細胞」「組織」「個体」レベルで階層縦断的に解析する。「細胞」レベルでは、TJ とアピカル骨格を連携する TJMAPs (TJ Microtubule-associated Proteins) の局在や機能に、「組織」レベルでは、多繊毛上皮の多繊毛同調運動における TJ-アピカル複合体の役割に注目する。同時に、(PCP: Planar Cell Polarity) 関連因子の機能解析を行う。「個体」レベルでは、複数の Cldn や「TJ-アピカル複合体」関連因子のノックアウト(KO)マウスの解析を進める。

### 4. これまでの成果

#### (1) TJ 細胞間バリアの生体内での分子構築

クライオ電顕トモグラフィーは現在試行段階にある。その前段階として、通常の固定後エポキシ樹脂包埋した切片をアピカル面から観察した際に、トモグラフィーの再構築像で、TJ 細胞間に、分子構造モデルから予想される繰り返し構造をごく低い解像度で認めた。観察部位の特定ができたので、細胞を用いた *in vivo* でのクライオ電顕トモグラフィーを行うため、培養上皮細胞系の適用の試行段階にはいった。特に、分子構造が解かれた Cldn を発現する細胞系で、これまで仮説として提示している TJ 分子構築モデルの検証を行い、TJ 分子構築の生体内実態にアプローチする基盤を固めた。

## (2) TJ-アピカル複合体の階層縦断的な解析

### 2.1 細胞レベルでの解析

TJ および 微小管に結合するタンパク質として新規に同定された TJMAPs について、その解析を系統的に進めた。TJMAP4 (LUZP1) は、TJ や微小管に加え、リン酸化型ミオシン軽鎖にも強く結合し、フォスファターゼの機能を阻害して、ミオシン軽鎖のリン酸化レベルを維持する。このことにより、上皮細胞アピカル面を囲むアピカルアクトミオシンの収縮性を保ち、上皮形態と機能の制御を行う。TJMAP4 の役割は神経管形成などに重要であることを明らかにした。また TJMAP2 は、微小管と結合してアクチンフィラメント重合を促進し、上皮細胞シート表層において、TJ とアピカル面の機能的連携を促し、頑強な「上皮バリア」を構築することを明らかにした。

### 2.2 組織レベルでの解析

ウイルスや細菌など異物の感染問題で重要な気管多繊毛同調運動の確立過程の解析を進めている。「気管幹細胞から多繊毛上皮細胞が発生分化する過程で、どのように繊毛根元の基底小体の方向性と配列が揃い、秩序ある繊毛運動が確立するか、その際、TJ-アピカル複合体はどのような役割を果たすか」にアプローチするライブイメージングの系を確立した。また、組織中の上皮細胞の大きな特徴は、平面内細胞極性 (PCP) が見られることである。Core PCP タンパク質である Dishevelled や Frizzled に結合する Daple (Dishevelled-associating protein with a high frequency of leucine residues) が、上皮細胞アピカル平面の distal 側 TJ 付近で 2 量体を形成して微小管を束化し、PCP に依存して、distal 側にアピカル微小管を偏在させる機序を明らかにした。「TJ-アピカル複合体」関連因子の組織中の機能解析にも進展がみられた。

### 2.3 個体レベルでの解析

TJMAP2 の個体レベルでの解析では、細胞間バリアの機能不全が観察され、胃炎の症状が認められた。既存の CldnKO マウスの解析を進めた。Conditional KO マウスを含めて、5 種の Cldn の新規 KO マウスを作製した。

## 5. 今後の計画

### (1) TJ 細胞間バリアの生体内での分子構築

発現する Cldn の種類を任意に制御し得る培養上皮細胞系を確立する。この細胞系について、詳細な生理学的検討を行い、Cldn の種類による TJ 細胞間バリア機能の多様性を明らかにする。同時に、この細胞系に、クライオ電顕トモグラフィーを適用して、TJ 細胞間バリアの生体内実態を解明する。

### (2) TJ-アピカル複合体の階層縦断的な解析

「細胞」レベルの解析では、TJMAPs につい

て、特に複数の細胞骨格を統合する機能について、引き続き解析を進める。「組織」レベルの解析では、2色ライブイメージングで、幹細胞から多繊毛上皮細胞への発生分化過程を追うことができるようになり、繊毛の動かない遺伝子改変マウスや PCP 異常のマウスとの掛け合わせも完成しているため、多繊毛同調運動に対するそれらの影響について検討する。「個体」レベルの解析では、5 種の新規 CldnKO マウスの解析を進める。

以上、統合的上皮バリアについて、分子・細胞・個体レベルにおいて、分野融合的に総合的な理解を深める。上皮バリア機能の階層縦断的な機能を斬新な視点で明らかにし、新しい上皮バリア操作法開発の基盤を構築する。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1) Nakayama, S., Yano, T., Namba, T., Konishi, S., Takagishi, M., Herawati, E., Nishida, T., Imoto, Y., Ishihara, S., Takahashi, M., Furuta, K., Oiwa, K., Tamura, A., and Tsukita, S. Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating. *J. Cell Biol. in press.*

2) Yano, T., Tsukita, K., Kanoh, H., Nakayama, S., Kashihara, H., Mizuno, T., Tanaka, H., Matsui, T., Goto, Y., Komatsubara, A., Aoki, K., Takahashi, R., Tamura, A., and Tsukita, S. A microtubule-LUZP1 association around tight junction promotes epithelial cell apical constriction. *EMBO J.* 40 : e104712. 2021.

3) Matsuo, J., Douchi, D., Myint, K., Mon, NN., Yamamura, A., Kohu, K., Heng, DL., Chen, S., Mawan, NA., Nuttonmanit, N., Li, Y., Srivastava, S., Ho, SWT., Lee, NYS., Lee, HK., Adachi, M., Tamura, A., Chen, J., Yang, H., Teh, M., So, JB., Yong, WP., Tan, P., Yeoh, KG., Chuang, LSH., Tsukita, S., and Ito, Y. Iqgap3-Ras axis drives stem cell proliferation in the stomach corpus during homeostasis and repair. *Gut. gutjnl-2020-322779.* 2020.

4) Raju, P., Shashikanth, N., Tsai, PY., Pongkorpsakol, P., Chanez-Parades, S., Steinhagen, PR., Kuo, WT., Singh, G., Tsukita, S., and Turner, JR. Inactivation of paracellular cation-selective claudin-2 channels attenuates immune-mediated experimental colitis in mice. *J Clin Invest.* 130 : 5197-5208. 2020.

5) Konishi, S., Yano, T., Tanaka, H., Mizuno, T., Kanoh, H., Tsukita, K., Namba, T., Tamura, A., Yonemura, S., Gotoh, S., Matsumoto, H., Hirai, T., and Tsukita, S. Vinculin is critical for the robustness of the epithelial cell sheet paracellular barrier for ions. *Life Sci Alliance.* 2 : e201900414. 2019.

### 7. ホームページ等

<https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>