

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16126

研究課題名(和文)上皮細胞アピカル膜オーガナイザーとしてのタイトジャンクションの役割

研究課題名(英文)Tight junctions to organize apical membranes of epithelial cell sheets.

研究代表者

田中 啓雄(Tanaka, Hiroo)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：70795905

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)：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のアピカル面バリアで形成され、物質移動の制限と選択的透過を行う。近年、両バリアの機能的な連携が生体機能構築に必要な不可欠であることが明らかになりつつあり、また、アピカル面バリアに存在するトランスポーターによるTJ細胞間バリア制御を標的とした薬剤が臨床試験段階にある。しかしながら、両バリアの連携の分子基盤は不明である。本研究では、TJの裏打ちタンパク質を軸に両バリアの連携機序の分子基盤を明らかにし、上皮バリアシステムの新規構築原理の提示につながった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、両バリアの連携が生体に不可欠であり、その異常は病態に直結することが明らかになりつつある。創薬標的としても注目されている両バリアの連携についての研究は、特にその連携の分子基盤について未開拓領域であり類似研究は存在しない。分子、細胞、マウス個体レベルで両バリアの連携に着目した本研究は、上皮バリアシステムの構築原理に新局面を開き、多様な疾患に対する新規創薬基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial barrier consists of barrier functions of tight junctions (TJs) and apical membranes. Recently, it has been reported that these barriers co-operatively function to organize biological systems. Furthermore, an apical transporter, which regulate the barrier function of TJs, is a therapeutic target of hyperphosphatemia. However, molecular mechanisms underlying structural and functional connections between these barriers is unclear. In this study, we have revealed that a scaffold protein of TJs links barrier functions of TJs and apical membranes. This provides the novel mechanism of an organization of the epithelial barrier.

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 細胞間バリア アピカル トランスポーター、チャンネル チャンネル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

生体は大小様々な区画に分かれ、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対応させ、種々の生体機能を発揮する。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のアピカル面バリアで形成され、物質移動の制限と選択的透過を行う(図1)。近年、TJ細胞間バリアとアピカル面バリアの機能的な連携が生体機能構築に必要不可欠であることが明らかになりつつある(図2)。また、アピカル面バリアに存在するトランスポーターによるTJ細胞間バリア制御を標的とした薬剤が臨床試験段階にある(図2)。しかしながら、両バリアの連携の分子基盤は不明である。こうした状況の中、研究代表者はTJの裏打ちタンパク質の *cingulin* が、TJとアピカル膜トランスポーター NHE3 や CFTR を構造的・機能的にリンクすることを見出した。本研究ではTJの裏打ちタンパク質 *cingulin* を軸に両バリアの連携機序の分子基盤を明らかにし、上皮バリアシステムの新規構築原理を解明する。本研究は上皮バリアの統合的理解を促し、上皮バリアの新しい操作基盤の開拓を目指す。

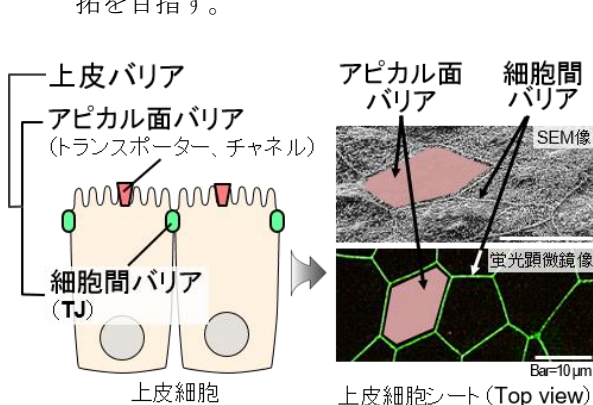


図1. 細胞間バリアとアピカル面バリアからなる上皮バリア

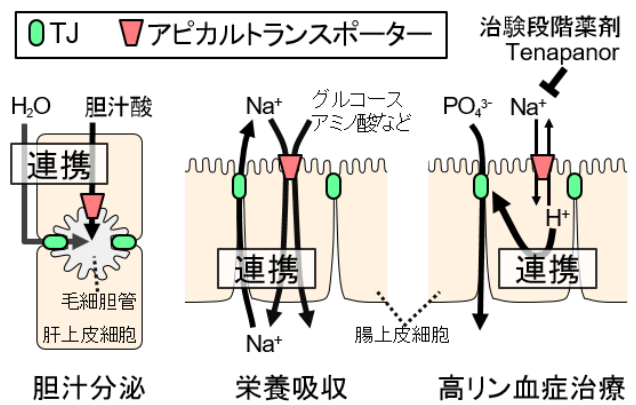


図2. 細胞間バリアとアピカル面バリアの機能的連携

### 2. 研究の目的

本研究では「TJ裏打ちタンパク質 *cingulin* による細胞間バリアとアピカル面バリアの連携機構の解明」を目的とする。細胞間バリアとアピカル面バリアにより形成される上皮バリアの重要性は認知されているが、その理解は十分ではない。理由の一つとして、両バリアは歴史的には別個独立に解析が進められてきており、連携という視点が欠如していたことが挙げられる。

### 3. 研究の方法

上皮細胞モデルにて、CrisprCas9システムを用い、TJ裏打ちタンパク質 *cingulin* 欠失細胞 (*cingulin* KO)や *cingulin* KOへ *cingulin* を再発現させた細胞(*cingulin* Revertant)を樹立する。これらの細胞株を用い、TJ裏打ちタンパク質 *cingulin* によるアピカル膜トランスポーターNHE3の局在化制御とその分子基盤、細胞間バリアとアピカル面バリアの機能制御を明らかにする。

#### 4. 研究成果

マウス乳腺由来培養上皮細胞株 Eph4 細胞にて、CrisprCas9 システムを用い、cingulin 欠失細胞(cingulin KO)や cingulin KO へ cingulin を再発現させた細胞(cingulin Revertant)の樹立に成功した。これらの細胞株にて、NHE3 の TJ 近傍やアピカル膜への局在が cingulin KO にて消失し、cingulin Revertant にて著しく増加することを見出した(図 3)。これらの結果から、TJ 裏打ちタンパク質 cingulin がアピカル膜トランスポーターNHE3

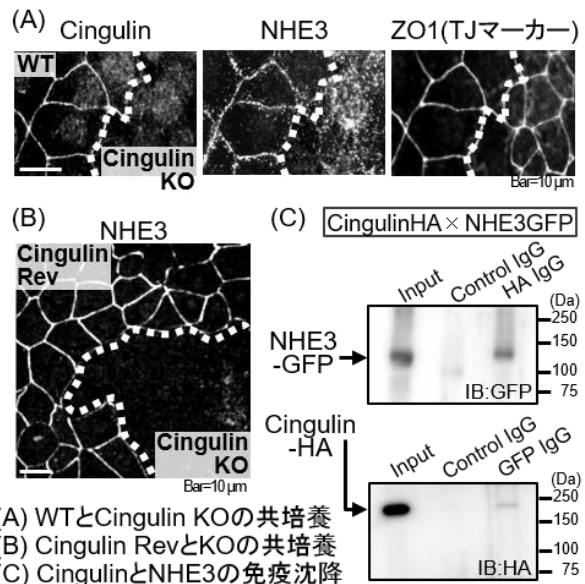


図3. TJ裏打ちタンパク質Cingulinによるアピカル膜トランスポーターNHE3の局在化制御に関する予備知見

TJ 細胞間バリアとアピカル面バリアの連携メカニズムに関する重要な所見が得られた。

cingulin による NHE3 の局在化制御に関する分子メカニズムを明らかにするため、NHE3 と cingulin との相互作用を調べた (図 3)。その結果 NHE3 が cingulin と相互作用し、特に NHE3 の C 末胞質ドメイン(約 400 アミノ酸)を介することが明らかになった。NHE3 の C 末側細胞質ドメインは、NHE3 のアピカル膜への局在化を制御し、その分子基盤に関する知見が蓄積している。重要な分子基盤として、本ドメインが Ezrin、NHERF、CHP などの scaffold 分子との結合を介し、アピカル膜脂質 PIP2 やアピカル膜直下の細胞骨格と相互作用することが知られており、これらの因子と NHE3 との相互作用を cingulin が制御する可能性が示された。

当初の研究計画では予定していなかったが、TJ の裏打ちタンパク質とアピカル膜トランスポーターの相互作用を解析する過程で、新規 TJ 相互作用因子として細胞骨格関連因子を同定し、これまで知られてこなかったメカニカルな TJ 構築/制御システムの提示にも貢献した(Yano T, ..., Tanaka H, ..., Tsukita S.EMBO J. 2021. 40(2):e104712.; Konishi S, ..., Tanaka H, ..., Tsukita S. Life Sci Alliance. 2019. 2(4):e201900414.)。さらに、TJ の細胞間バリアとアピカル面バリアが連携する事例の探索を進めた。その結果、生体が有する最も強固なバリアのひとつである血液脳関門において、TJ と水チャンネルが機能的・構造的に連携する可能性が得られた。in vitro 細胞系、in vivo マウス個体レベルでの検討を重ねたところ、特定の条件下で TJ 構築を誘導すると、水チャンネルが TJ 近傍に集積することを明らかにした。これらの成果から、両バリアの連携が神経病態を制御し、中枢神経系を保護する可能性が得られた。

近年、両バリアの連携が生体に不可欠であり、その異常は病態に直結することが明らかになりつつある。創薬標的としても注目されている両バリアの連携についての研究は、研究代表者を含むいくつかのグループにより行われているだけであり依然として不明な点が多い。特にその連携の分子基盤についての研究は未開拓領域であり類似研究は存在しない。分子、細胞、マウス個体レベルで両バリアの連携に着目した本研究は、上皮バリアシステムの構築原理に新局面を開き、多様な疾患に対する新規創薬基盤となることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yano Tomoki, Tsukita Kazuto, Kanoh Hatsuho, Nakayama Shogo, Kashihara Hiroka, Mizuno Tomoaki, Tanaka Hiroo, Matsui Takeshi, Goto Yuhei, Komatsubara Akira, Aoki Kazuhiro, Takahashi Ryosuke, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 40
2. 論文標題 A microtubule LUZP1 association around tight junction promotes epithelial cell apical constriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020104712	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 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 e201900414 2
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 Suzuki Koya, Sentani Kazuhiro, Tanaka Hiroo, Yano Tomoki, Suzuki Kazuo, Oshima Masanobu, Yasui Wataru, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Deficiency of Stomach-Type Claudin-18 in Mice Induces Gastric Tumor Formation Independent of H <sub>2</sub> pylori Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology	6. 最初と最後の頁 119 ~ 142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcmgh.2019.03.003	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 Nakamura Shun, Irie Katsumasa, Tanaka Hiroo, Nishikawa Kouki, Suzuki Hiroshi, Saitoh Yasunori, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko, Fujiyoshi Yoshinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Morphologic determinant of tight junctions revealed by claudin-3 structures	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 816
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08760-7	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 -

1. 著者名 Tsukita Sachiko, Tanaka Hiroo, Tamura Atsushi	4. 巻 44
2. 論文標題 The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Biochemical Sciences	6. 最初と最後の頁 141 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tibs.2018.09.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中啓雄
2. 発表標題 上皮細胞間接着装置タイトジャンクションによる外分泌制御と生体防衛
3. 学会等名 第92回米子大会日本動物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中啓雄
2. 発表標題 上皮細胞間接着装置タイトジャンクションによる外分泌システムの構築
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会、第98回 日本生理学会大会 合同大 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 田中啓雄、田村淳、矢野智樹、月田早智子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 10
3. 書名 膜タンパク質工学ハンドブック「クローデインを基盤とするタイトジャンクションと生体システム構築の多様性」	

1. 著者名 鈴木浩也、徳増玲太郎、田中啓雄、田村淳、月田早智子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 10
3. 書名 進化する皮膚研究最前線「上皮バリア構築とタイトジャンクション」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/">http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/</a> <a href="https://researchmap.jp/tanakahiroo">https://researchmap.jp/tanakahiroo</a>
--

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