

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770209

研究課題名 (和文) 細胞間接着装置形成過程における膜インターフェースの解析

研究課題名 (英文) The analysis of membrane interface in the formation of the cell-cell adhesion complex

研究代表者

山崎 裕自 (YAMAZAKI YUJI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：80527664

研究成果の概要 (和文)： 上皮細胞間接着装置 アドヘレンスジャンクション (AJ) とタイトジャンクション (TJ) の構築では、まず AJ がベルト状に形成され、その直上に近接して TJ が形成されると考えられている。この段階的なステップの時空間的メカニズムは必ずしも明らかではない。本研究課題では、まず、AJ-TJ 形成を時空間的に制御するシグナル関連分子としての細胞膜裏打ち蛋白質 ZO-1/2 について、TJ を構成するクローデインストランド形成の動的制御における役割を FRAP 解析により検討し、AJ/TJ 構築の動的制御基盤を明らかにした。次に、ZO-1/2 に関連するシグナル分子として、特に RhoGEF に関連した新規 AJ/TJ 構成シグナルを見だし、その機能解析から、AJ/TJ 構築の動的制御基盤について新しい視点から検討を加えた。

(英文)： The epithelial cell-cell adhesion complex, which consists of belt-like adherens junctions (AJ) and tight junctions (TJ), is thought to be an important factor in many molecular events. The role of this complex comes from spatio-temporal regulation that leads to AJ and TJ formation, a process that is poorly understood. In this project, we analyzed the FRAP dynamics of claudins and ZO-1 to reveal their spatiotemporal behaviors and interactions in epithelial cells, and use these observations as the basis for a new scheme to describe their molecular interactions. We examined the spatiotemporal regulation of AJ/TJ formation and modulation, finding new spatiotemporal signaling for AJ regulation that includes the identification of Tara, a GEF binding protein, as an AJ protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：細胞生物

キーワード：タイトジャンクション、シグナル、ZO-1、アドヘレンスジャンクション、アクトミオシンリング

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、上皮細胞シートは上皮組織の構築と生体内ホメオスタシスの形成に不可欠な役割を担っている。上皮細胞シートは、上皮細胞同士が細胞間接着装置によって二次元的に接着することにより構築される。細胞間接着形成過程の詳細な検討から、① AJとTJの形成が、これまで考えられていた以上に段階的ステップを踏んだプロセスからなること、② AJとTJの形成は、時空間的に相関しており、その制御にAJとTJの細胞膜を裏打ちする細胞骨格因子が重要であること、を示唆する実験結果がいろいろな角度から得られてきた。特に、ZO-1/2分子の機能解析から上皮性AJ、TJ形成には、ZO-1/2依存的なカドヘリン接着の2次元ベルト状配置とZO-1/2を基盤としたクローディン分子の重合が上皮シート形成と上皮細胞間バリアーの確立における主要なプロセスであると考えられている。ZO-1/2欠損培養上皮Eph4細胞の詳細な解析により、ベルト状AJ形成には、ZO-1/2依存的なRhoAシグナルの時空間的活性化が重要な働きを担っていることを明らかにされ、AJ/TJの構築にシグナル伝達が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

上皮細胞間接着装置AJ/TJの主な役割にはそれぞれ、上皮細胞シート形成と上皮細胞間バリアー形成が挙げられる。AJとTJはこれまでに分子レベルで様々な相関が報告されてきたが、このAJ-TJインターアクションについての理解はまだ十分ではない。本研究課題において、AJ/TJ形成において重要な二つのZO-1/2依存的なプロセス(ベルト状カドヘリン接着形成とクローディンの重合)を分子レベルで理解することを目的とした。

(1) まず、AJ/TJ形成時、ZO-1/2によるクローディン分子の重合制御について、分子動態の観点から膜インターフェイスにおける複合体の安定化について解析した。

(2) AJ形成過程において重要なZO依存的なRhoA活性化制御に着目してAJ局在スクリーニングからいくつかの新規AJ関連RhoGEF関連因子の解析を進め、AJ形成過程に働く時空間的シグナルを理解することを目指した。

3. 研究の方法

以下のような方法で本研究を進めた。

(1) AJ/TJ形成におけるZO-1/2によるクローディン分子の重合制御を分子動態レベルで理解するために、FRAP解析を行った。内在性のタイトジャンクションストランドが観察されない上皮様SF7細胞を用いて、Venus融合型クローディンを導入し、発現安定株を樹立した。発現安定株を樹立できた4種類のクローディン分子claudin-7, -10, -14, -19について、それぞれFRAP解析により分子動態を観察した。さらに、裏打ちタンパク質ZO-1の動態がクローディン発現下と非発現下で変化するかを調べるために、それぞれの発現株にmcherry融合ZO-1を導入してFRAP解析を行った。

(2) AJ/TJ形成のシグナル経路検索のため、AJ局在スクリーニングから得られたRhoGEFタンパク質のうち、特に二つのRhoGEF(新規RhoGEF-XとTrio RhoGEF)に着目して、細胞生物学的解析を進めた。

① RhoGEF-Xについて、ZO1/2依存的な局在パターンを示したことから、ZO1/2との共沈実験を行ったところ、ZO1/2と結合することが示された。この分子について、ZO1/2DKO上皮細胞に強制発現によりアクトミオシンリングのAJへの挿入が促進されるかについて検討を行った。また、Eph4細胞を用いてノックダウン細胞の樹立を試み、表現系解析を細胞生物学的解析により行った。特に、AJ形成過程におけるミオシンのAJへのインテグレーションについて検討を行った。さらに、ミオシンのリン酸化状態やシグナルを分子レベルで解析を進めている。

② Trio RhoGEFについては、ZO1/2との結合はなかったが、AJ局在を示すことから詳細な検討を行った。第一に、内在性のタンパクを認識する抗体の作製を試みたが、抗原性が低く良い抗体を得ることができなかった。しかしながら、AJ局在スクリーニングの中から、Trio RhoGEFに特異的に結合するGEF結合タンパクTaraを見いだしたため、TaraによるTrio RhoGEFの機能解析を進めた。Taraに対する特異的抗体を作製し、免疫沈降によるドメイン解析から、Trioに対する結合ドメインの同定と細胞レベルでTaraノックダウン上皮細胞の樹立をもとに細胞レベルでTaraの機能解析とRhoシグナルの解析を中心に行っ

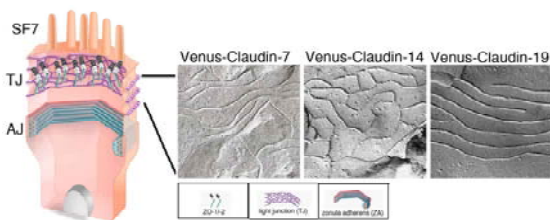
た。

4. 研究成果

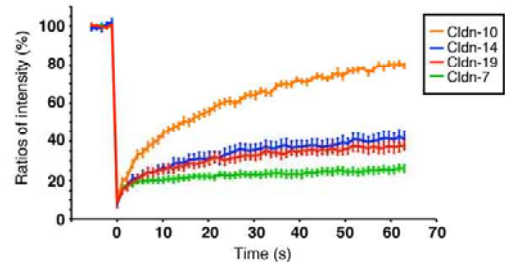
(1) 単一クローディングによるストランド再構築とクローディング分子及びZO-1のFRAP解析

① TJ形成におけるZOタンパク質とクローディング分子結合状態とクローディングポリメリゼーションの関係を分子動態の観点で調べるためにFRAP解析を行うために用いる細胞の選定を行った。SF7細胞という精巣由来の上皮様シート形成を行う細胞を調べた結果、フリーズフラクチャー法によりタイトジャンクションストランドが観察されなかった。RT-PCRによる発現解析、蛍光染色により、N-cadherinを基盤とした上皮様アドヘレンスジャンクションを形成するが、クローディングストランドを持たない細胞であることがわかった。

② これまでの一般的な上皮細胞では、クローディングが複数種発現しており、単一種のクローディング動態を調べることができなかつたため、今回、SF7細胞を用いて、単一クローディング種の分子動態と共に、TJ存在、非存在下における裏打ちZO-1の動態変化も調べた。Venus融合型クローディングを細胞に導入した結果、4種類の発現安定株しか樹立することはできなかったが、いずれもZO-1/2依存的に細胞間接着部位に濃縮することがわかった。それぞれについてフリーズフラクチャー法により、クローディングストランドを観察したところ、クローディングごとに異なった特徴のストランド構造が観察できた(右上図)。さらに、claudin-10については、ZO依存的に細胞間に濃縮することはできるが、ストランドは形成されなかった。



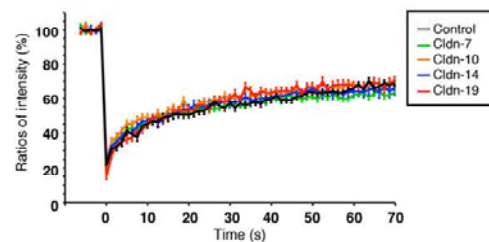
③ これら4種類について、FRAP解析を行った結果、下図に見られるようにクローディングごとに異なる分子動態を示すことがわかった。また、claudin-10のようにストランドを形成しないクローディングは分子動態が速いことがわかった。したがって、クローディングのストランド形成においては、分子動態レベルでの安定化が必要であることが示唆された。このように、クローディングの種類によって、分



子動態が異なることを初めて示した。

④ この時、裏打ちZO-1の分子動態はどのような変化を示すか調べた。結果、クローディングを発現しない親株と安定発現株4種類において、変化はなかった(下図)。したがって、我々は、クローディングストランド形成時にクローディング分子が安定化することに、ZO-1

FRAP analysis for cherry-ZO-1 in SF 7 cells

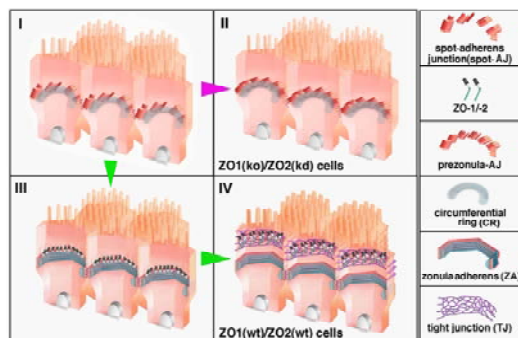


タンパク質とのインターラクシオンが重要であることを見いだした上で、その結合ではルースな結合(ルースカップル)状態が維持されると考えた。今後、この結合状態がZO-1タンパク質とclaudin分子の対一結合で説明できるのかあるいは、さらに分子動態を制御する機構が存在するのかについて明らかにしていく方針である。

(2) AJ 局在スクリーニングから得られた新規 RhoGEF タンパク質の解析

① RhoGEF-X の機能解析

【①-I】 AJ 形成過程で重要なステップであるミオシンのインテグレーション(下図 I→II)に関わるかどうかを調べるために、ZO-1/2 欠損上皮細胞に RhoGEF-X を強制発現して AJ へのアクトミオシンの挿入が促進されるかを調べた。結果として、発現導入細胞において、有意にミオシンのインテグレーションが促進されることを見いだした。

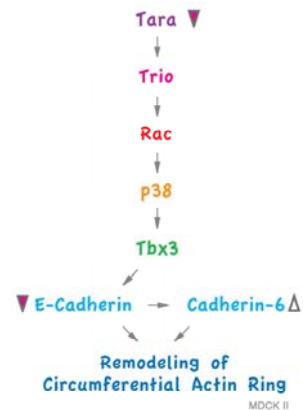


【①-II】 Eph4 細胞におけるノックダウン解析樹立した。現在、Eph4 細胞において、AJ に対するミオシンのインテグレーションされないことがわかっており、今後、ミオシンのリン酸化状態やシグナルカスケードの詳細な解析を進める予定である。

②新規 AJ 構成分子 Trio RhoGEF 結合タンパク質 Tara の機能解析

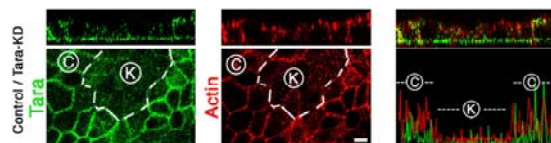
【②-I】 ZO1/2 との結合性は見いだせなかったが、AJ における機能を明らかにするために詳細な検討を行った。Trio RhoGEF に対する特異的認識抗体の作製が困難であったが、AJ 局在スクリーニングにおいて、Trio RhoGEF に結合する GEF 結合タンパク質 Tara も見いだしていたため、Tara ノックダウン MDCK 細胞を樹立して Tara による Trio RhoGEF の制御メカニズム解析を行った。結果、Tara ノックダウン細胞において、Trio RhoGEF の活性制御異常から上皮シート形成後期に抑制さ

れるべき Rac 活性が恒常的に活性化するために、E-cadherin が転写レベルで発現抑制を受けることがわかった(左図)。



【② -II】

MDCK 細胞では、E-cadherin の他に cadherin-6 というクラシカルカドヘリンを発現しているため、上皮シート構造は保たれることがわかったが、さらに細胞骨格系の詳細な検討から、Tara ノックダウンによりアクトミオシンリングが脆弱になっていることがわかった(下図)。したがって、Tara/ Trio RhoGEF シグナルは AJ 発のカドヘリン制御シグナルであり、さらに、上皮アクトミオシン骨格も制御すると考えている。今後、さらにアクトミオシン骨格制御の詳細なメカニズムの理解に取り組む方針である。



以上、本研究によりベルト状 AJ の確立と同時にクローディン重合の重合による TJ 形成と細胞間バリアーの成立という時空間的な細胞間接着装置 (Junction) 構築の概要を明らかにすることができた。AJ と TJ の密接な関係が分子レベルで明らかになったことで、上皮細胞間接着と上皮細胞間バリアーの制御機構に新たな展開を確立する基盤を築くことができたと思われる。

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)

① Yamazaki, Y.#, Tokumasu, R#., Kimura, H., and Tsukita, S.

Role of claudin species-specific dynamics in reconstitution and remodeling of the zonula occludens.

Mol. Biol. Cell 22: 1495-1504 (2011)

#equal contribution (査読有り)

② Yano, T.#, Yamazaki, Y.#, Adachi, M., Okawa, K., Fort, P., Uji, M., Tsukita, S., and Tsukita, S.* Tara up-regulates E-cadherin transcription by binding to the Trio RhoGEF and inhibiting Rac signalin g.

J. Cell Biol. 193: 319-332 (2011)(査読有り)

③ Mineta, K.*, Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., and Tsukita, S.* Predicted expansion of the claudin multigene family.

FEBS letters 585: 606-612 (2011) (査読有り)

④ Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y., and Tsukita, S.* Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and Glucose malabsorption in mouse small intestine.

Gastroenterology 140: 913-923 (2011) (査読有り)

⑤ Tsukita, S., Katsuno, T., Yamazaki, Y., Umeda, K., Tamura, A., Tsukita, S. Roles of ZO-1 and ZO-2 in establishment of the belt-like adherens and tight junctions with paracellular permselective barrier function.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 1165: 44-52 (2009) (査読無し)

[学会発表] (計 3 件)

① Yuji Yamazaki

Novel TBP/Trio/Rac1/p38/Tbx3 cascade regulates E-cadherin expression to fine-tune the epithelial cell sheet Membrane dynamics of the cell.

2010年9月23日

Heinrich Heine University, Germany

② 山崎 裕自

クローデインによるストランド形成のダイナミクス

第62回 日本細胞生物学会

2010年5月21日 大阪国際会議場

③ Yuji Yamazaki

Roles of ZO1/2 in the Formation of Epithelial Cell-cell Junctions and Paracellular Transport

IUPS2009

2009年7月30日 京都国際会館

[図書] (計 1 件)

① Yamazaki, Y., Tamura, A., and Tsukita, S. Water-based biological homeostasis in multiple fluid-compartments in the higher organisms: regulation by the paracellular barrier-forming tight junction of epithelial cell sheets.

In Water: The Forgotten Biological Molecule PanStanford Publish (p.247-258) (2010)

[その他]

ホームページ等

月田研究室ホームページ URL: <http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 裕自 (YAMAZAKI YUJI)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 80527664