

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02684

研究課題名(和文)タイトジャンクションを介した上皮シートの形成と修復の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of epithelial sheet formation and its repair through the tight junction

研究代表者

米村 重信(YONEMURA, Shigenobu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：60192811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：タイトジャンクション(TJ)形成とミオシン活性との強い関連をこれまで見ていたため、ミオシン活性を制御しうると考えられる三量体Gタンパクのサブユニットに含まれる、G α 12/13のノックダウン実験を行い、その結果、TJの形成が阻害されるが、TJ形成に先立つアドヘレンスジャンクション(AJ)の形成そのものも形成が阻害されていることが明らかになった。同様にRhoの下流で働くROCK1の重要性も見出した。ミオシン張力が創傷閉鎖運動にどのように関わるのか、磁気ピンセットなどを用いたライブイメージングによる定量解析を行い、張力の感知に応じた細胞の反応が起こることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AJ形成には初期段階と成熟段階があり、AJの成熟を経てTJができるのが通常の過程である。今回見出したGalpha12/13はAJの成熟がかなり遅れているように観察された。これまで、Galpha12/13がTJ形成に重要であるという報告はあったが、TJに直接影響しているのではなく、AJ成熟に重要であることが明らかになった。これまで、ミオシンの活性を制御しうる候補が提唱されてきたが、このようなAJ形成の特別な過程に重要というものはなく、細胞間接着装置形成、上皮シート形成の分子機構を理解する上で、今後の研究の展開に深く関わる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Because I have already noticed the intimate relationship between myosin activity and tight junction formation, I performed several gene knock down experiments which might be involved in the regulation of myosin activity. Galpha12/13 are known to regulate actin cytoskeleton through myosin activity and their knock down lead to TJ formation failure together with the incomplete formation of adherens junctions (AJ). Similarly, ROCK1 was found to be important in maturing AJs resulting in TJ formation failure. Tension generated by actomyosin constriction appears to be involved in the wound closure movement of epithelial sheets. Live imaging of epithelial cells using laser ablation and magnetic beads showed that cells sense the degree of tension and respond to tension to facilitate wound closure movement.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション 上皮シート ミオシン アクチン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

損傷修復、創傷治癒に関しては多くの研究者、一般人の関心を引いてきており、修復中のアクトミオシンの集積や収縮、細胞の移動、組織における上皮以外の細胞の働き、増殖などわかっていることは少なくないが、修復が開始し、終了する機構は明らかになっていなかった。特定の分子の重要性を示す報告はあるものの(Gu et al. *J. Cell Biol.* 2011)、再現性や一般性に問題があり、多くの人々が認める状況にはなかった。また、なぜタイトジャンクション(TJ)を持つ細胞のみがアクトミオシンを傷口に集積しうるのかを説明できる仕組みの提唱もなかった。TJの構成タンパク質群に含まれる、ZO-1/2の発現抑制によってその細胞ではアドヘレンスジャンクション(AJ)付近にアクトミオシンの集積が強くなることはすでに報告があるが(Fanning et al., *Mol. Biol. Cell.* 2012)、それと隣接する細胞の死の認知に関与する可能性については全く意識されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、隣接する細胞の死は生細胞側の細胞間接着装置を構成する分子にも影響を与え、細胞間接着装置を介した張力のバランスを崩す。それが死細胞の存在を示すミオシン集積を引き起こすシグナルとなり、修復運動につながるという仮説を立てている。逆に言うと、生細胞との間の正常な接着装置形成はミオシンを離散させる生のシグナルとなる。本研究では、この仮説の検証、分子レベルの理解を目的としている。すなわち、正常な接着装置形成とミオシン集積との関係や、ミオシンによる張力が創傷の修復運動に与える影響を分子レベルで明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) ミオシン活性を制御して細胞間接着の形成、崩壊に関与する因子の探索(遺伝子ノックダウン): TJを持つ上皮細胞の典型としてヒト大腸がん由来のDLD-1細胞を用いる。候補となる遺伝子について、siRNAをトランスフェクトする。数時間後に細胞を新たに蒔き直し、三日後に新たにできる細胞シートに蛍光抗体法を施し、TJの形成を確認する。

(2) 候補遺伝子の機能の解析: ノックダウンで効果が見られた遺伝子について、細胞のアクチンフィラメント、Eカドヘリン、ZO-1の局在を比較し、AJ/TJ形成のどの段階が阻害されているのかを検証する。

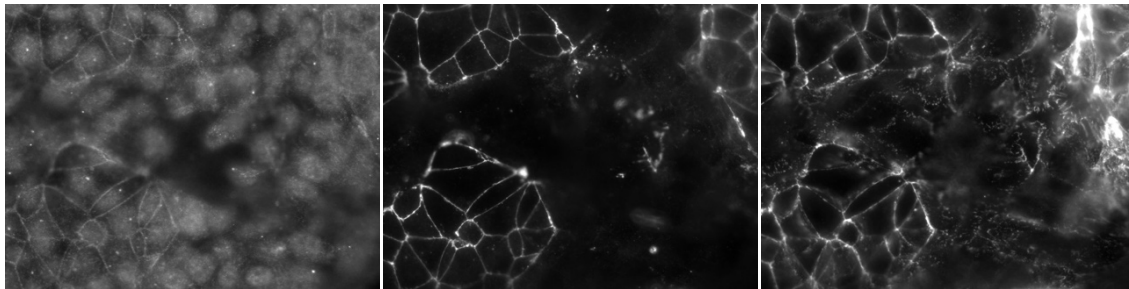
(3) 上皮シートにおける損傷修復における張力と修復運動との関係: レーザーによって細胞を殺傷すると、周囲の生細胞には張力がかかっているため、死細胞の領域(傷口)が一時的に広がり、やがて修復運動が起こってその傷口が閉じる。この際の、傷口の広がりや閉じる速度の関係、また傷口の形状を人為的に操作することにより、力のかかり方と修復運動との関係をライブイメージングによってあきらかにする。また、磁気ビーズ、磁気ピンセットを用いて、細胞の特定の箇所に力を与えて細胞の反応を見る実験も行った。これらはすべて顕微鏡下で行い、ミオシンを可視化したMDCK細胞を用いた。

4. 研究成果

(1) 細胞接着装置の形成に必要な遺伝子の探索: TJ形成に関して、Gタンパク質の α サブユニットのファミリーであるGNA12とGNA13が重要であるという報告もあり(Oda et al., 2021)、GNA12/13がこれまで、Rhoファミリータンパク質の活性化に関わることから、それらに関するタンパク質を候補としてRNAiによる機能の確認を行なった。その結果、GNA12/13やROCK

IなどがTJ形成に重要であることが明らかになった。

- (2) GNA12/13の役割：上皮細胞DLD-1にノックダウンを行ったところ、確かにTJの形成が阻害されていた。この時、TJの形成が特異的に阻害されているのではなく、TJ形成に先立つAJ形成が不十分であることが明確となった。AJはPAという点状の構造の段階と、それらが繋がって隙間なく細胞の周囲を取り巻くZAという段階とがあり、ZA形成がTJ形成を伴うことがわかっている。GNA12/13のノックダウンでは、AJがPAに止まっていた(図1)。ZAではアクチンフィラメントがZAに沿って走っており、細胞膜とは平行の方向性を持つ。一方、PAではアクチンフィラメントは細胞膜に垂直の方向性を持っており、アクチン細胞骨格の構築が大いに異なる。



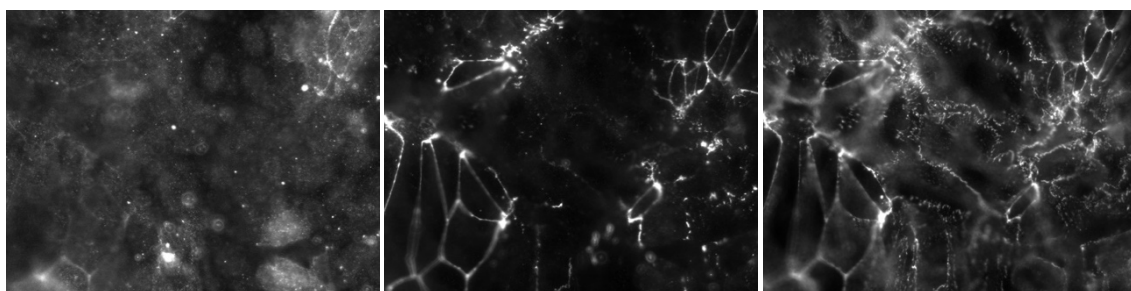
GNA12

ZO-1 (TJ)

E-cadherin

図1：GNA12/13の同時ノックダウン。GNA12の発現が抑制されている領域ではTJ形成が阻害されているが、E-cadherinの局在からZA形成は阻害されているものの、PAは正常に形成されていることがわかる。

- (3) ROCK I/IIの役割：ROCK I/IIはRhoの下流で働くキナーゼで、ミオシンを活性化させることが方向されている。上皮細胞DLD-1にノックダウンを行ったところ、ROCK IIではミオシン活性が阻害された表現形が見られ、この場合、TJ形成は阻害されない。一方、ROCK Iのノックダウンでは、AJがPAの段階に留まり、TJ形成が阻害されていた。ROCK I/IIはかなり近い機能を持つと思われていたが、実際には相当異なる機能を持つと考える必要があることが明らかになった(図2)。



ROCK I

ZO-1 (TJ)

E-cadherin

図2：ROCK Iノックダウン。ROCK Iの発現が抑制されている領域ではTJ形成が阻害されているが、E-cadherinの局在はZA形成は阻害されているものの、PAは正常に形成されていることがわかる。

以上のことにより、Gタンパクやそれが活性化させるRhoの下流キナーゼなど重要と考えられる因子は明らかになってきたが、それらが具体的に何を行って細胞接着装置の形成に関わるのか、それが今後の課題である。これまでの解析により単にミオシン活性の制御だけでなく、アクチンフィラメント側の制御が重要である可能性を検討していきたい。

(4) 損傷修復と細胞間の張力

培養下の上皮シート中の細胞をレーザーによって殺傷すると、一時的に傷口が広がり、それは修復運動によって閉鎖する (図 3)。このとき、創傷拡大率と創傷閉鎖速度との間には、強い正の相関が見られた (図 4)。このことにより、上皮細胞は細胞死による張力のアンバランスの程度を感知して、それに応じた反応を起こしたと考えることができる。

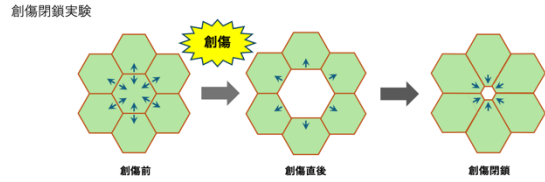


図 3

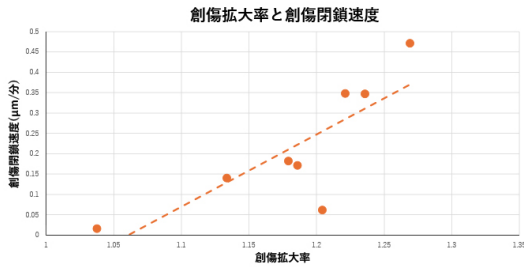


図 4

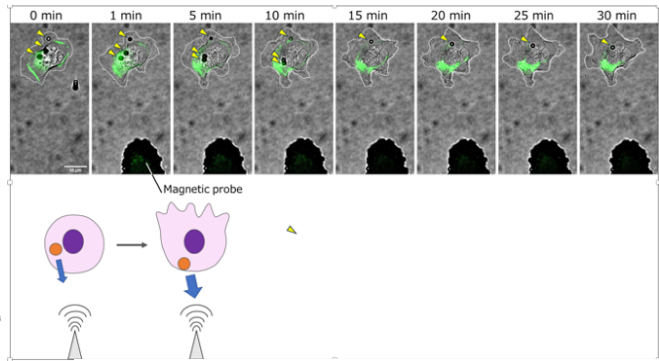


図 5: 磁気ビーズによる張力の負荷とミオシン (緑) の集積、仮足 (矢印側) の形成

そこで磁気ピンセットと磁気ビーズを用いて、細胞に付着させたビーズを引っ張るといった外力を与えることにより、細胞の反応を探ってみた。細胞は引っ張られた方向とは逆の向きに、進行の先端となる加速を形成するという、定型的な反応が見られた (図 5)。さらに力と細胞の反応について、より定量的な理解を進めるため、傷口の形状を人為的に操作してみた。

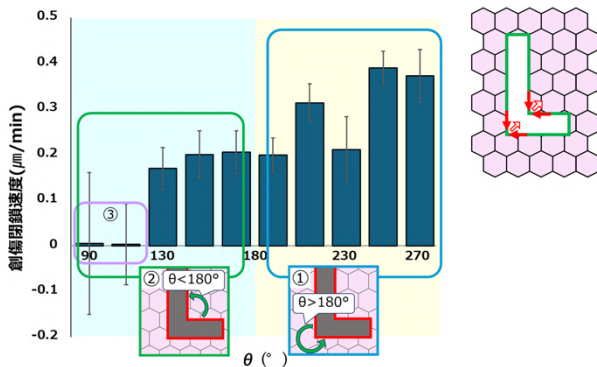


図 6: 傷口の形状と創傷閉鎖速度との関係

図 6 にあるように、基本的に傷口に面して全ての周囲の細胞にはミオシンが集積するが、突出した形状の部分にミオシンが集積して収縮すると突出は抑えられ、傷口の閉鎖スピードは遅くなる。逆に凹んでいる箇所では閉鎖しやすくなる。これは、少なくともこの実験条件下では、傷口の閉鎖はミオシンの収縮に大きく依存していることを示し、ミオシン収縮による力の方向が細胞の移動の方向を決め、移動

を促しているように考えられる。創傷の修復運動に限らず、大規模な上皮シートの移動の際に、このようなミオシンの張力によって、集団の移動方向の統率がなされているという可能性も今後検証すべき課題であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tentaku A, Kurisu S, Sejima K, Nagao T, Takahashi A, Yonemura S.	4. 巻 289
2. 論文標題 Proximal deposition of collagen IV by fibroblasts contributes to basement membrane formation by colon epithelial cells in vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 7466-7485
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16559.	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 -
1. 著者名 Nishimura R, Kato K, Saida M, Kamei Y, Takeda M, Miyoshi H, Yamagata Y, Amano Y, Yonemura S.	4. 巻 47
2. 論文標題 Appropriate tension sensitivity of a-catenin ensures rounding morphogenesis of epithelial spheroids.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 55-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.22014.	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 Saito Hiroko, Matsukawa-Usami Fumiko, Fujimori Toshihiko, Kimura Toshiya, Ide Takahiro, Yamamoto Takaki, Shibata Tatsuo, Onoue Kenta, Okayama Satoko, Yonemura Shigenobu, Misaki Kazuyo, Soba Yurina, Kakui Yasutaka, Sato Masamitsu, Toya Mika, Takeichi Masatoshi	4. 巻 32
2. 論文標題 Tracheal motile cilia in mice require CAMSAP3 for the formation of central microtubule pair and coordinated beating	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-06-0303	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 Mori Masashi, Yao Tatsuma, Mishina Tappei, Endoh Hiromi, Tanaka Masahito, Yonezawa Nao, Shimamoto Yuta, Yonemura Shigenobu, Yamagata Kazuo, Kitajima Tomoya S., Ikawa Masahito	4. 巻 220
2. 論文標題 RanGTP and the actin cytoskeleton keep paternal and maternal chromosomes apart during fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202012001	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 Fukuda Kei, Shimi Takeshi, Shimura Chikako, Ono Takao, Suzuki Takehiro, Onoue Kenta, Okayama Satoko, Miura Hisashi, Hiratani Ichiro, Ikeda Kazuho, Okada Yasushi, Dohmae Naoshi, Yonemura Shigenobu, Inoue Azusa, Kimura Hiroshi, Shinkai Yoichi	4. 巻 51
2. 論文標題 Epigenetic plasticity safeguards heterochromatin configuration in mammals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6190 ~ 6207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad387	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 Kira Akihito, Tatsutomi Ichiko, Saito Keisuke, Murata Machiko, Hattori Izumi, Kajita Haruna, Muraki Naoko, Oda Yukako, Satoh Saya, Tsukamoto Yuta, Kimura Seisuke, Onoue Kenta, Yonemura Shigenobu, Arakawa Satoko, Kato Hiroki, Hirashima Tsuyoshi, Kawane Kohki	4. 巻 58
2. 論文標題 Apoptotic extracellular vesicle formation via local phosphatidylserine exposure drives efficient cell extrusion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 1282 ~ 1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2023.05.008	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 該当する

1. 著者名 Nishida Hiroshi, Albero Antonio Bolea, Onoue Kenta, Ikegawa Yuko, Sulekh Shivakshi, Sakizli Ugurcan, Minami Yasuhiro, Yonemura Shigenobu, Wang Yu-Chiun, Yoo Sa Kan	4. 巻 13
2. 論文標題 Necrosensor: a genetically encoded fluorescent sensor for visualizing necrosis in Drosophila	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.060104	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 栗栖 修作、天宅 あや、米村 重信
2. 発表標題 大腸上皮細胞のin vitro基底膜形成における近接線維芽細胞由来IV型コラーゲンの寄与
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴田 桂太郎、米村 重信
2. 発表標題 アクチンフィラメントの流れと上皮細胞頂底極性形成との関係
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------