

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570229

研究課題名(和文) 上皮細胞のトリセルラージャクションによる細胞・組織形態維持機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of cell morphology by tricellular junction in epithelia

研究代表者

小田 裕香子 (Yukako, Oda)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70452498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、上皮細胞が敷石状形態を維持するための、“頂点(=tricellular junction; TCJ)”の機能と分子機構の解明を目的として行われた。上皮細胞の“頂点”に局在する分子であるトリセルリンが、Tuba-Cdc42を介してアクチン細胞骨格を制御することを見出した。

本研究により、上皮細胞研究においてこれまでほとんど明らかにされてこなかった「多角形の細胞の頂点」の役割が明らかになり、免疫系やがん、発生など上皮細胞のダイナミクスが密接に関連する様々な生命現象の理解につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When the surface view of each epithelial cell is compared with a polygon, its sides correspond to cell-cell junctions, while its vertices correspond to tricellular contacts, whose roles in epithelial cell morphogenesis have not been well studied. We have shown that tricellulin, which is localized at tricellular contacts, regulates F-actin organization via Cdc42 and Tuba; a Cdc42 GEF. These findings indicate that tricellular contacts play crucial roles in regulating the actomyosin-mediated apical junctional complex tension through the tricellulin-Tuba-Cdc42 system.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：細胞間接着 細胞形態

1. 研究開始当初の背景

多細胞生命体を構成する多くの器官は、上皮細胞のシートからなる大小の袋や管を基本構造として形作られる。この上皮細胞シートの役割は、体の外と内、また体内の様々な区画を仕切ることで多くの異なる環境をつくり、これによりそれぞれの区画の機能を維持することにある。

上皮細胞シートにおける個々の細胞は六角形を基本とした多角形状の形態をとり、細胞同士が接着する細胞間接着面は直線的である。このような形態は“敷石状形態”もしくは“蜂の巣状形態”と形容される。六角形で敷き詰められた平面は各辺のたわみが最も少なく、そのため外界からの変形圧力に対して最も強く抵抗性を示すと考えられる。このような細胞形態の維持には、細胞間接着とその裏打ち細胞骨格が重要であることが示されている (Hayashi and Carthew *Nature*, 2004, Classen et al *Dev. Cell*, 2005)。しかしながら、どのような分子メカニズムによって細胞裏打ち骨格と細胞間接着がリンクして細胞形態を制御し、“敷石状形態”を維持しているのかは不明であった。

上皮細胞シートにおける六角形の“頂点”に相当する場所は、トリセルラージャンクション (TCJ) と呼ばれる細胞接着装置によって3つの細胞が接着している。TCJは、1970年代に電子顕微鏡を用いた観察によりその特殊な構造が報告されて以来、その機能や役割は長らく不明であった (Wade & Karnovsky, *J. Cell. Biol.* 1974)。しかしながら近年、発生過程における上皮組織の再編成や組織再生過程、さらには免疫系細胞やがん細胞の組織浸潤にTCJが重要な役割を果たすことが示唆されつつある。このような状況の中、2005年に池ノ内らによってTCJに局在する分子として初めてトリセルリンが報告された (Ikenouchi et al, *J. Cell. Biol.* 2005)。本研究開始直前、我々は細胞内局在を指標にした発現スクリーニングにより、TCJに特異的に局在し、かつトリセルリンのTCJへの局在を制御する分子 Angulin/LSR の同定に成功した (Masuda, and Oda et al., *J. Cell. Sci.*, 124, 548-55 (2011))。本研究開始時において、TCJの分子構築に関してはこれらトリセルリンと Angulin/LSR の2分子のみが報告されていた。

2. 研究の目的

以上のような背景の中、上皮細胞シート形成におけるTCJの機能及びTCJの裏打ち細胞骨格に関する研究は、その重要性が強く示唆されているにもかかわらず、ほとんどなされていなかった。そこで本研究では、上皮細胞の“頂点”にあたるTCJの機能に焦点を当て、TCJの上皮細胞形態形成における役割とその

分子機構を明らかにし、実験データに基づいて数理モデルによる細胞形態形成のロジックやその組織構築における役割の理解に迫ることを目指した。

3. 研究の方法

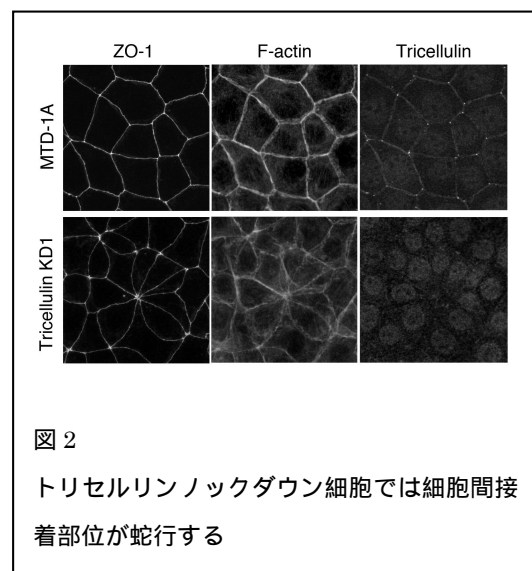
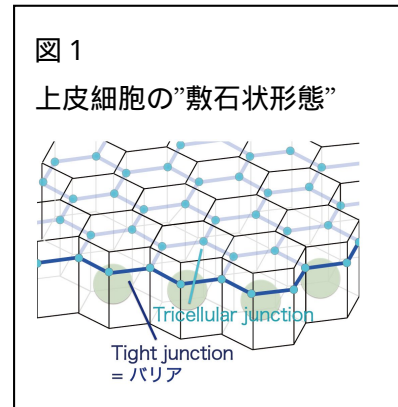
(1) 本研究の開始時に、我々はTCJに局在するトリセルリンが上皮の細胞形態形成に関わることを見出した (図1, 2)。そこで、TCJ構成タンパク質トリセルリンの下流でアクチン制御に関わる因子を探索した。敷

石状形態形成におけるそれら因子の機能およびメカニズムについて、生化学的・細胞生物学的な解析を行った。

(2) 次に、TCJ裏打ち細胞骨格の配向と形態に関して時空間的解像度で解析を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究開始時に、我々は、トリセルリンノックダウン上皮細胞シートでは多角形の各辺がたわむことを見出した (図2)。すなわち、トリセルリンがアクチン骨格の制御を介して細胞膜の張力発生による細胞形態形成に関与することが示唆された。そこで本研究では、トリセルリンがアクチン細胞骨格を制御する分子メカニズムの解明に迫った。



まず、トリセルリン分子内のアクチン制

御ドメインを探索し、N 末内にそのドメインが存在することを見出した。さらにそのドメインに結合しアクチンを制御する候補因子の探索を行い、Cdc42 GEF Tuba の同定に成功した。

次に、この Cdc42GEF Tuba がトリセルリンの下流で機能し、TCJ におけるアクチン骨格編成を担うか検討を行った。初めに、トリセルリンとの結合を免疫沈降法にて確認した。結合に関しては、上皮細胞における内在性タンパク質同士の結合を検出し、また *in vitro* で合成したタンパク質同士の直接結合を検出した。さらに、結合領域を絞り込み、トリセルリンに関しては N 末に存在する進化的に保存された Proline rich region が、Tuba に関しては C 末の 6 番目の SH3 ドメインがそれぞれの結合に必要な十分であることを示した。またこれらの結合の細胞形態制御における重要性を検討するため、Tuba に結合できないトリセルリン点変異体を作製し形態観察を行った。この変異体ではアクチン配向が見られず、トリセルリンノックダウン細胞の細胞形態の異常を回復させることができないことを見出し、トリセルリン-Tuba の結合が細胞形態制御に必要であることを示した。

次に、トリセルリン、Tuba のそれぞれの特異的抗体を作製し、上皮細胞内局在を詳細に調べた。細胞間接着形成時における局在を経時的に調べると、トリセルリンは TCJ 付近からトリセルラータイトジャンクションに濃縮していくことを見出した。Tuba に関しては、細胞間接着形成途中において頂点付近に濃縮し、この時期にトリセルリンと共局在することを見出した(図3)。さらに、このトリセルリンと Tuba が共局在する TCJ 付近の領域が、F-アクチン繊維の特徴的な配向の起点となることを見出した(図4)。

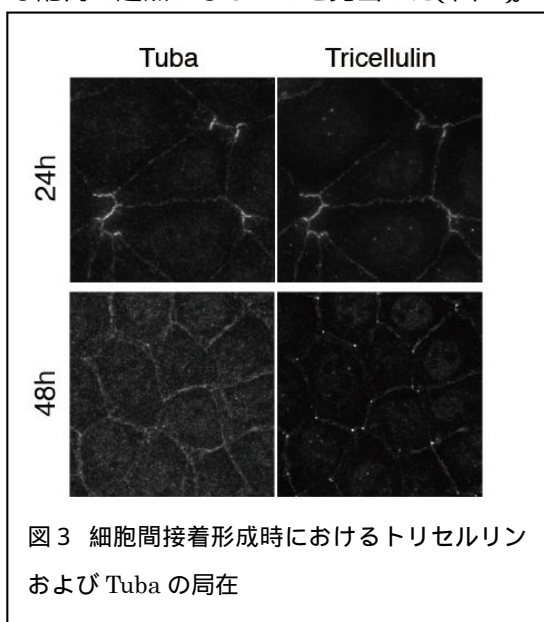


図3 細胞間接着形成時におけるトリセルリンおよび Tuba の局在

と並行して、Tuba ノックダウン細胞やトリセルリンノックダウン細胞の詳細な形態観察、機能解析を行った。これらのノックダウン細胞では で述べたような特徴的なアクチン配向が認められず、また Cdc42 の活性化が抑制されていた(図4)。このため、細胞間接着形成時に一過的に見られる TCJ からのアクチン配向が、胞形態を制御すると考えられた。細胞間接着面の直線性、真円度、rosette (1 頂点に 5 辺以上集まる形態) について定量的解析を行い、有意差があることを示した。また、これらのノックダウン細胞ではリン酸化ミオシン、張力感受性 カテニンの発現が弱くなっていることを見出し、トリセルリンノックダウン細胞では細胞間接着部位の張力が減弱していると考えられた。

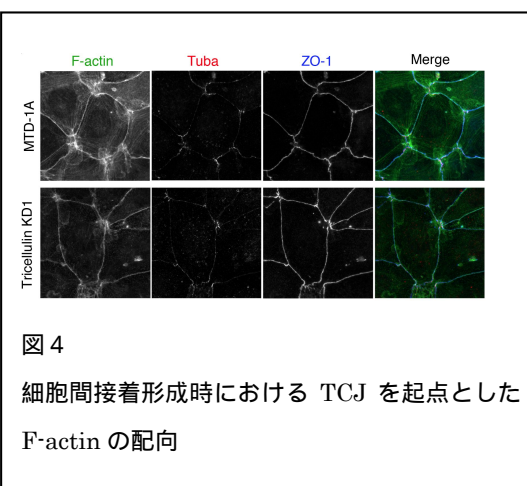


図4 細胞間接着形成時における TCJ を起点とした F-actin の配向

さらに、TCJ におけるアクチン細胞骨格制御のシグナル経路の解明に取り組んだ。トリセルリンによる Cdc42 の活性化について、生化学的に検討したところ、トリセルリンは Tuba を介して Cdc42 を活性化することを見出した。また、Tuba はいわゆる auto-inhibition 効果により自身の活性を抑制しており、トリセルリンがそれを解除し Cdc42 を活性化することを示した。

最後に、トリセルリンの TCJ への局在が、アクチン制御に必要などうかを検討した。TCJ に局在できないトリセルリン変異体すなわち C 末欠損トリセルリンを作製し、トリセルリンノックダウン細胞に発現させると、細胞形態の異常を回復させることができなかった。よって、トリセルリンの TCJ への局在が敷石状細胞形態の維持に重要であると考えられた。以上の結果をまとめ、現在論文リバイズ中である。

(2)(1) で述べたように、細胞間接着形成過程において、アクチン細胞骨格が均一に細胞の周囲を取り囲むのではなく、図3のように各細胞の頂点付近を起点とした方向

性を持ったパターンが認められた。これらが上皮細胞に保存されているものか、いくつかの培養上皮細胞について調べた。マウス乳腺上皮細胞である MTD-1A 細胞や EpH4 細胞においては、細胞間接着形成中に TCJ 付近を起点とする F-アクチンの配向が良く観察された。この F-アクチン繊維に実際 G-アクチンが取り込まれているかに関して、生細胞における時空間的な解析を行った。蛍光タンパク質で標識した細胞を作製し、FRAP 解析を行ったところ、G-アクチンが F-アクチン繊維に取り込まれる様子を捉えることに成功した。

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4件)

1. Furuse M, Izumi Y, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N

Molecular organization of tricellular tight junctions

TISSUE BARRIERS, in press, review

2. Nakatsu D, Kano F, Taguchi Y, Sugawara T, Nishizono T, Nishikawa K, Oda Y, Furuse M and Murata M

JNK1/2 dependent-phosphorylation of angulin-1/LSR is required for the exclusive localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts in Eph4 epithelial sheet

Genes to Cells, in press (査読有)

3. Higashi T, Tokuda S, Kitajiri S, Masuda S, Nakamura H, Oda Y, Furuse M

Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis.

J Cell Sci., 126, 966-77 (2013)

doi: 10.1242 (査読有)

4. Furuse M, Oda Y, Higashi T, Iwamoto N, Masuda S.

Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor: a novel membrane protein of tricellular tight junctions.

Ann N Y Acad Sci., 1257, 54-8 (2012), review

doi: 10.1111

[学会発表](計3件)

1. The structure of tight junctions in brain endothelial cells

Mikio Furuse, Noriko Iwamoto, Yukako Oda, Tomohito Higashi

第35回日本神経科学学会 2012年9月18-21日 名古屋

2. Tricellulin regulates epithelial cell shape by controlling actomyosin organization via a

Cdc42GEF Tuba

Yukako Oda, Tetsuhisa Otani, Junichi Ikenouchi, and Mikio Furuse

第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会 2012年5月28-31日 神戸

3. 細胞間接着装置—膜蛋白質の解析から見えてくるもの—

古瀬幹夫, 増田小百合, 小田裕香子

日本顕微鏡学会第67回学術講演会 2011年5月16~18日 福岡

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当無し

取得状況(計0件)

該当無し

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/cellb/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 裕香子 (ODA, Yukako)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70452498

(2)研究分担者

該当無し

(3)連携研究者

該当無し