

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590263

研究課題名(和文)腎尿細管における細胞間タイト結合の新たな制御機構の解明

研究課題名(英文)Clarification of novel regulatory mechanism of intercellular junction in renal tubules

研究代表者

五十里 彰(Ikari, Akira)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50315850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞間を接着させるタイト結合は、膜貫通型蛋白質のクローディン、足場蛋白質、転写調節因子などの複合体で形成される。クローディンには20種類以上のサブタイプが存在し、これらの組み合わせの違いにより、各組織におけるタイト結合の機能が変化すると考えられている。しかし、生理的および病態生理的なクローディンの発現制御機構は大部分が不明なままである。我々は腎尿細管におけるクローディンの発現調節機構を検討し、クローディン-2とクローディン-4の新たな転写調節機構、クローディン-16の細胞内局在の調節機構を解明した。さらに、浸透圧ストレスに対するクローディン-2、-4の新たな役割を解明した。

研究成果の概要(英文)：Tight junctions, which seal adjacent epithelial cells in a narrow band, composes a large complex of proteins including transmembrane, scaffolding, and transcriptional proteins. Claudins are tetraspanning proteins and comprise a superfamily of more than 20 homologous isoforms. Different combinations of claudins can confer different properties to epithelial cells. However, the regulatory mechanisms of claudins expression remain largely unknown. We investigated the regulatory mechanisms of claudins expression in the renal tubule and found the novel transcriptional mechanism of claudin-2 and -4, and intracellular trafficking mechanism of claudin-16. Furthermore, we clarified the novel function of claudin-2 and -4 against hyperosmotic stress.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：腎臓 タイト結合 クローディン リン酸化 会合 転写調節

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間タイト結合は薬剤や電解質イオンの透過性を制御するだけでなく、細胞の分化や増殖の調節にも関与する。タイト結合は膜貫通型蛋白質のクローディン、足場蛋白質、転写調節因子などの複合体で形成される。これまでにクローディンは 20 種類以上のサブタイプが報告され、これらの組み合わせの違いにより、各組織におけるタイト結合の機能が変化すると考えられている。そのため、各クローディンの細胞内分布および発現調節機構を解明することは生理的に大変重要である。クローディン遺伝子の変異によりコードされるタンパク質の細胞内局在が異常になることや、クローディン発現の変化と炎症やがんなどの病態との関係が報告され、クローディン発現の異常機構を解明することは、病態生理的にも意義がある。これまでタイト結合の形態やイオン透過性の制御機構に関する研究が国内外で積極的に進められてきたが、クローディンの発現と細胞内分布の調節機構に関する研究報告はほとんどない。

## 2. 研究の目的

これまでに申請者らは、腎障害惹起性薬剤や高浸透圧処理により、上皮成長因子(EGF)の産生を介してクローディン-4 の発現が増加することを発見した。また、遺伝性低マグネシウム血症患者で同定されたクローディン-16 の遺伝子変異は、クローディン-16 の細胞内局在の異常を引き起こした。腎尿細管におけるクローディンの局在・発現異常が明らかになってきたにも関わらず、これらの調節機構は不明なままである。そこで本研究では、各クローディンに選択的な発現・局在調節機構を解明し、クローディンの発現をコントロールできる薬剤の開発へと展開するための研究基盤を確立することを目的として実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

MDCK Tet-OFF 細胞を、Dulbecco's modified Eagle's medium で培養した。ベクターの導入には、Lipofectamine 2000 を使用した。G418 と hygromycin B に対する薬剤耐性細胞を選別し、安定発現細胞を樹立した。

### (2) プラスミド DNA の構築

ラットの腎臓から mRNA を抽出し、RT-PCR 法によってクローディン-4 の cDNA を作成した。cDNA を pCMV-Tag2A ベクターにサブクローニングし、FLAG タグを融合した。その後、pTRE2hyg ベクターにサブクローニングした。QuichChange site-directed mutagenesis kit を用いて点変異体を作成した。

### (3) 細胞抽出物の調製

コンフルエントの状態まで培養した MDCK 細胞を氷冷 PBS で洗浄し、セルスクレーパーで細胞を回収した。Lysis buffer に懸濁後、超音波処理を行った。遠心処理により、核画

分と細胞質画分を分離した。

### (4) 免疫沈降

細胞抽出物を抗体、プロテイン G-セファロースビーズまたは ExactaCruz C と混合し、低温室で転倒混和した。結合したタンパク質複合体を洗浄後、サンプルバッファーに溶解した。

### (5) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット

細胞抽出物と免疫沈降物を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、2%スキムミルクでブロッキングした。リン酸化抗体を使用する場合は、2% BSA でブロッキングした。一次抗体を反応後、HRP 標識二次抗体を反応させた。ECL ウエスタンブロットキットを用いて発光後、バンドを検出した。

### (6) 細胞間透過性の測定

細胞をトランスウェルに培養し、Volt ohm meter を用いて上皮膜間電気抵抗値(TER)を測定した。分子量が 4 kDa と 20 kDa の高分子デキストランを用いて、細胞間の物質透過性を測定した。デキストランを FITC または Rhodamine 標識することにより、蛍光プレートリーダーで透過量を測定した。

### (7) タンパク質の細胞内局在の測定

細胞をカバーガラス上にコンフルエントの状態まで培養した。細胞をメタノールで固定後、一次抗体を反応させた。その後、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 546 標識した二次抗体を反応させた。LSM510 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、タンパク質の細胞内分布を調べた。

### (8) 酵母ツーハイブリッド法による会合タンパク質の探索

クローディン-16 のカルボキシ末端を bait ベクターに組み込み、腎臓の cDNA ライブラリーを prey ベクターに組み込んだ。両者を酵母に形質転換し、寒天培地で培養した。陽性コロニーから DNA を抽出後、塩基配列を解析した。データベースを利用して、クローディン-16 に会合するタンパク質を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) クローディン-4 の発現増加による細胞間接着能の強化

MDCK 細胞を高浸透圧溶液に暴露したところ、クローディン-4 の発現が時間依存的に増加した。この時、クローディン-4 の細胞内局在はほとんど変化しなかった。クローディン-4 の役割を調べるため、クローディン-4 過剰発現細胞を作製した。クローディン-4 の過剰発現により、内在性細胞間接着タンパク質のクローディン-1、-2、-3、オクルディン、カドヘリン、ZO-1 の発現量はほとんど変化しなかった。上皮膜間電気抵抗値、細胞凝集能が増加したのに対し、細胞移動能は低下した。以上のことから、クローディン-4 は細胞間接着能を強化し、細胞間透過性と細胞移動能を低下させることが明らかになった。

クロードイン-4の過剰発現により、クロードイン-1、-3の細胞内局在は変化しないように見えたが、詳細に調べたところ、側膜におけるクロードイン-1、-3の分布範囲が狭くなることを発見した。クロードイン-4の過剰発現により、クロードイン-1、-3がタイトジャンクションに集積すると示唆された。この仮説を生化学的に証明するため、免疫沈降を行った。Z0-1抗体またはクロードイン-4抗体で免疫沈降したところ、クロードイン-4の過剰発現により、クロードイン-1、-3、-4、Z0-1の複合体量が増加することが明らかになった。以上のことから、尿細管上皮細胞が高浸透圧溶液に暴露されると、クロードイン-4の発現増加を介して電解質の細胞間透過性を低下させるとともに、細胞間接着能を亢進し、尿細管から細胞が剥離することを防ぐと示唆された。

### (2) 高浸透圧ストレスによるクロードイン-4発現の増加機構

タンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドの存在下、高浸透圧溶液暴露によるクロードイン-4の発現増加が阻害された。また、高浸透圧溶液暴露によりクロードイン-4 mRNA量が増加したことから、クロードイン-4の発現増加に転写調節が関与すると示唆された。そこでクロードイン-4プロモーター領域をクローニングし、転写活性とその調節因子を調べた。デリションアッセイにより、高浸透圧感受性の領域が、-598~-334に存在することを明らかにした。MAPキナーゼ経路の阻害剤であるU0126やSP600125処理により、クロードイン-4の発現増加が阻害されたことから、本経路の下流に存在する転写調節因子の関与が示唆された。そこで、Sp1とc-Junの関与について検討した。高浸透圧溶液暴露により、Sp1とc-Junの発現量が増加した。Sp1とc-Junが結合すると推測されるプロモーター領域に変異を導入したところ、高浸透圧溶液による転写活性の増加が阻害された。免疫クロマチンアッセイにおいて、クロードイン-4のプロモーター領域に、c-JunとSp1が結合することが明らかになった。また、ラット腎スライスを用いて高浸透圧溶液暴露の影響を調べたところ、培養細胞で得られた結果と同様の結果が得られた。以上のことから、高浸透圧ストレスにより、Sp1とc-Junの増加を介して、クロードイン-4発現が増加することが明らかになった。

### (3) Syntaxin 8によるクロードイン-16の細胞内局在の調節

家族性低マグネシウム血症の患者で、クロードイン-16の遺伝子変異が同定され、変異体の多くは細胞内局在が異常となることが報告されている。我々も、カルボキシ末端領域に存在する一アミノ酸変異により、クロードイン-16がタイトジャンクションから解離して細胞質内に分布することを報告してい

る。クロードイン-16は腎マグネシウム再吸収において重要な役割を果たすと考えられるが、クロードイン-16の細胞内局在の調節機構は、ほとんど解明されていない。我々は酵母ツーハイブリッド法を用いて、クロードイン-16の局在調節に関わる候補タンパク質(syntaxin 8, STX8)の同定に成功した。そこで本年度は、STX8の機能解析を行った。

ラットの腎臓を摘出後、ホモジネートを調製した。クロードイン-16抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、クロードイン-16とSTX8の結合が確認された。次に、イヌ腎臓由来の培養細胞にクロードイン-16を安定発現させ、免疫沈降を行ったところ、クロードイン-16とSTX8の結合が再現された。以上のことから、クロードイン-16とSTX8は生体内で結合して存在することが示唆された。

STX8の役割を明らかにするため、STX8 siRNAを用いて、クロードイン-16の機能と細胞内分布に及ぼす影響を調べた。STX8ノックダウン細胞では、細胞質内に分布するクロードイン-16量が増加した。細胞内オルガネラマーカーと共染色したところ、クロードイン-16が小胞体、初期エンドソーム、リソソームに分布することが明らかになった。一方、ゴルジ装置のマーカーとは共局在しなかった。そのため、STX8は小胞体から初期エンドソーム、初期エンドソームから細胞膜へのクロードイン-16の移行調節に関与すると示唆された。

細胞膜タンパク質の局在は、細胞質からのエキソサイトーシス、細胞膜からのエンドサイトーシスによって調節される。ピオチン化法を用いてこれらの関与を調べたところ、STX8ノックダウン細胞ではクロードイン-16のエキソサイトーシスが阻害されたが、エンドサイトーシスは変化しなかった。このことから、STX8は細胞膜へのクロードイン-16のエキソサイトーシスを補助すると示唆された。

クロードイン-16の機能に対するSTX8の影響を明らかにするため、TER、高分子デキストランの透過性、マグネシウム透過性を調べた。クロードイン-16の発現により、TERとマグネシウム透過性が増加したが、デキストランの透過性は変化しなかった。STX8ノックダウンにより、TERとマグネシウム透過性はクロードイン-16非発現細胞と同程度まで低下した。これらのことから、STX8はクロードイン-16の機能発現に必要であることが明らかになった。

これまでに我々は、クロードイン-16の細胞膜局在に、cAMP/PKAによるリン酸化が関与することを報告している。PKA阻害剤のH-89とPKI処理により、クロードイン-16とSTX8との結合量が低下し、クロードイン-16は細胞質内に分布した。しかし、クロードイン-16とSTX8の細胞内局在は一致した。また、ク

ローディン-16 の脱リン酸化変異体でも、同様の結果が得られた。これらのことから、脱リン酸化したクロードイン-16 は、STX8 との結合が阻害され、細胞膜へのトラフィッキングが阻害されると示唆された。

以上のことから、クロードイン-16 の細胞内局在を制御するタンパク質として、STX8 が初めて明らかになった。今後、家族性低マグネシウム血症で同定されたクロードイン-16 の遺伝子変異が STX8 を含めた会合タンパク質との結合に及ぼす影響を調べ、変異型クロードイン-16 の細胞内局在を正常化する薬剤の開発につなげていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Akira Ikari, Chie Tonegawa, Ayumi Sanada, Toru Kimura, Hideki Sakai, Hisayoshi Hayashi, Hajime Hasegawa, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, and Junko Sugatani: Tight junctional localization of claudin-16 is regulated by syntaxin 8 in renal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 289, 13112-13123 (2014) 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M113.541193
  2. Akira Ikari, Kosuke Atomi, Yasuhiro Yamazaki, Hideki Sakai, Hisayoshi Hayashi, Masahiko Yamaguchi, and Junko Sugatani: Hyperosmolarity-induced up-regulation of claudin-4 mediated by NADPH oxidase-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and Sp1/c-Jun cooperation. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1833, 2617-2627 (2013) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.016
  3. Akira Ikari, Tomonari Sato, Ryo Watanabe, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani: Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1823, 1110-1118 (2012) 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.04.005
  4. Akira Ikari, Kosuke Atomi, Ayumi Takiguchi, Yasuhiro Yamazaki, Hisayoshi Hayashi, Jotaro Hirakawa, Junko Sugatani: Enhancement of cell-cell contact by claudin-4 in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell. Biochem.*, 113, 499-507 (2012) 査読有  
DOI: 10.1002/jcb.23373
- 〔学会発表〕(計 20 件)
1. 五十里彰、佐藤友成、渡邊諒、山口賢彦、山崎泰広、遠藤智史、松永俊之、菅谷純子:細胞間接着分子クロードイン-2 は肺腺癌の新しい治療標的となるか? 第 134 年回日本薬学会(熊本) 講演要旨集、p.173、2014 年 3 月 29 日
  2. 五十里彰、真田あゆみ、利根川千恵、木村徹、長谷川元、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子:Syntaxin-8 による細胞間マグネシウムチャネル claudin-16 のトラフィッキング調節 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(東京) 講演要旨集、pp.132-133、2013 年 11 月 22 日
  3. 五十里彰、跡見康輔、山崎泰広、林久由、酒井秀紀、山口賢彦、菅谷純子:腎尿細管における細胞間接着分子クロードイン-4 発現に対する高浸透圧の影響 第 60 回中部日本生理学会(岐阜) 講演要旨集、p.30、2013 年 10 月 26 日
  4. 五十里彰、跡見康輔、山崎泰広、山口賢彦、菅谷純子:腎尿細管における高浸透圧によるクロードイン-4 発現の転写調節 第 86 回日本生化学会大会(横浜) プログラム、p.114、2013 年 9 月 11 日
  5. 渡辺諒、五十里彰、佐藤友成、山崎泰広、山口賢彦、菅谷純子:細胞間接着分子クロードイン-2 の発現による肺腺がん細胞の増殖能の増加 第 90 回日本生理学会大会(東京) 講演要旨集、p.234、2013 年 3 月 29 日
  6. 五十里彰、山崎泰広、山口賢彦、菅谷純子:腎尿細管上皮細胞の細胞間接着分子と疾患 第 90 回日本生理学会大会(東京) 講演要旨集、p.133、2013 年 3 月 29 日
  7. 五十里彰、渡辺諒、佐藤友成、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子:肺腺がんにおけるクロードイン-2 の機能と発現調節機構の解明 第 85 回日本生化学会大会(福岡) プログラム、p.155、2012 年 12 月 16 日
  8. Shinya Hahakabe, Akira Ikari, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani : Effect of epigallocatechin-3-gallate on claudins expression in renal tubular epithelial cells. The 1st International Conference on Pharma-Food (ICPF 2012) (Shizuoka)、2012 年 11 月 16 日
  9. 五十里彰、跡見康輔、波々壁信也、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子:高浸透圧によるクロードイン-4 発現の増加と細胞間接着の増強 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(京都) 講演要旨集、pp.68-69、2012 年 11 月 15 日
  10. 五十里彰:尿細管マグネシウム輸送の分子病態生理

- 第 102 回東京腎生理集談会(東京) 講演要旨集、2012 年 11 月 10 日
11. Akira Ikari, Kosuke Atomi, Ayumi Takiguchi, Shinya Hahakabe, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani: Effect of hyperosmolarity on claudin expression in renal tubular epithelial cells.  
International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012 (Shiga), Abstract, pp.33-34, 2012 年 9 月 16 日
  12. Ryo Watanabe, Akira Ikari, Tomonari Sato, Masahiko Yamaguchi, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani : Up-regulation of claudin-2 expression by a MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells.  
International Symposium on Epithelial Barrier and Transport 2012 (Shiga), Abstract, p.P14, 2012 年 9 月 15 日
  13. Akira Ikari, Ayumi Takiguchi, Kosuke Atomi, Yasuhiro Yamazaki, Junko Sugatani : Increase in clathrin-dependent endocytosis of claudin-2 by epidermal growth factor. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Kyoto), Abstracts, p.150, 2012 年 8 月 29 日
  14. 波々壁信也、五十里彰、山口賢彦、山崎泰広、菅谷純子: 腎尿細管上皮細胞の細胞間タイト結合に対するカテキンの影響  
第 58 回日本薬学会東海支部大会(静岡) 抄録集、p.97、2012 年 7 月 7 日
  15. 五十里彰、跡見康輔、山崎泰広、平川城太郎、菅谷純子: マグネシウムによるクロロゲン-16 のリン酸化と細胞内局在の調節  
第 89 回日本生理学会大会(長野) 講演要旨集、p.211、2012 年 3 月 31 日
  16. 五十里彰、利根川千恵、真田あゆみ、山崎泰広、菅谷純子: 腎尿細管上皮細胞における免疫抑制剤によるマグネシウムチャネルの発現低下  
第 132 年回日本薬学会(札幌) 講演要旨集、p.203、2012 年 3 月 29 日
  17. 五十里彰、滝口亜佑美、跡見康輔、平川城太郎、山崎泰広、菅谷純子: 腎尿細管上皮細胞におけるクラスリン依存性エンドサイトーシスを介したクロロゲン-2 発現の調節  
第 33 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(岡山) 講演要旨集、pp.162-163、2011 年 11 月 25 日
  18. 渡邊諒、五十里彰、佐藤友成、平川城太郎、山崎泰広、菅谷純子: 肺腺がん由来 A549 細胞においてクロロゲン-2 の転写活性は MEK/ERK/c-Fos 経路を介して増加する

- 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2011(愛知) 講演要旨集、p.76、2011 年 11 月 23 日
19. 五十里彰、滝口亜佑美、波々壁信也、平川城太郎、山崎泰広、菅谷純子: クロロゲン-2 のエンドサイトーシス機構の解明  
第 84 回日本生化学会大会(京都) プログラム、p.168、2011 年 9 月 23 日
  20. 佐藤友成、五十里彰、平川城太郎、山崎泰広、菅谷純子: クロロゲン-2 は MMP-9 の産生を介してヒト肺腺がん細胞の移動性を亢進する  
第 75 回日本生化学会中部支部シンポジウム(静岡) 抄録集、p.48、2011 年 5 月 28 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 尿管管マグネシウム輸送の分子病態生理 腎と透析, 74, pp.293-299 (2013)
2. 細胞間隙を介したマグネシウム輸送と異常 腎と骨代謝, 26, pp.181-186 (2013)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十里 彰 (IKARI, Akira)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50315850

(2) 研究分担者

なし