

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291043

研究課題名(和文)トリセルラータイトジャンクションによる上皮バリア機能形成の分子機構

研究課題名(英文)The molecular mechanism underlying the epithelial barrier formation by tricellular tight junctions

研究代表者

古瀬 幹夫 (Furuse, Mikio)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号：90281089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの体表や管腔は上皮とよばれる細胞のシートにより覆われている。上皮をつくる上皮細胞は敷石状に並んで強く接着しており、細胞同士が密着することによって、細胞間の隙間における物質の漏れを防いでいる。本研究では、上皮細胞同士の密着部位のうち、3つの上皮細胞の角が接する部分を構成するタンパク質アンギュリンファミリーのはたらきを研究した。アンギュリンファミリーの1つを欠失させたマウスが内耳有毛細胞の変性による難聴を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The surface of our body is covered by the cellular sheet which is designated the epithelium. Epithelial cells are arranged like cobblestones and adhere with each other, thereby the leak of water-soluble substances through the intercellular space is restricted. In this study, we investigated the function of angulin family proteins constituting tricellular contacts, where the vertices of three epithelial cells meet. The mice lacking one of the angulin family proteins showed hearing loss caused by the degeneration of hair cells in the inner ear.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 細胞接着 タイトジャンクション 上皮バリア機能 遺伝性難聴 アンギュリン トリセルリン

1. 研究開始当初の背景

上皮が体内のコンパートメントを仕切るバリアとしてはたらくためには、敷石状に接着した上皮細胞同士の隙間からの物質の漏れを防ぐことが重要である。そのために、脊椎動物の上皮細胞は、細胞間接着装置タイトジャンクション(TJ)によって細胞間隙をベルト状にシールしている。ところが、上皮細胞シートの中には、2細胞間の接着部位以外に、3つの上皮細胞の角(かど)が接する領域(3細胞結合)が多数存在する。上皮の十分なバリア機能には3細胞結合の細胞外空間も塞ぐ必要があり、この領域に存在するトリセルラータイトジャンクション(tTJ)とよばれるTJの特殊な構造がその役割を担っていると考えられている。現在、tTJの構成分子として、2005年に同定された膜タンパク質トリセルリン、申請者の研究グループが2011年に同定したアンギュリンファミリー(アンギュリン1/LSR、アンギュリン2/ILDR1、アンギュリン3/ILDR2)が知られているが、TJに比べてtTJの研究は相当遅れている。本研究開始前までに、培養上皮細胞を用いた研究から、トリセルリン、アンギュリンとともに上皮細胞シートの強いバリア機能に必要なこと、アンギュリンがトリセルリンをtTJにリクルートする役割をもつことが明らかになっていた。また、トリセルリンがそのN末端側細胞質領域により細胞のアクチン線維形成に関与しうることが示されていた。しかし、アンギュリンファミリーのサブタイプ間の機能差、トリセルリンのリクルート以外にもつ機能等、これらtTJ構成分子の詳細な機能やふるまいについて、多くの点が不明であった。

2. 研究の目的

第一に、アンギュリンファミリーのtTJへの局在化、機能のための責任ドメインの決定、局在化メカニズムの解明、各サブタイプ間の機能差の解明、トリセルリンをリクルートする以外の機能の解明、第二に、トリセルリンの上皮バリア、およびTJ形態の複雑化の両機能を担う責任ドメインの解明を本研究の目的とした。従来のRNA干渉法によるノックダウンではなく、ゲノム編集によってアンギュリン、トリセルリンを完全に欠失した培養上皮細胞を樹立し、それらを用いて解析を実施した。

3. 研究の方法

(1)ゲノム編集によるアンギュリン及びトリセルリンをそれぞれ欠失するマウス乳腺由来培養上皮細胞クローンの樹立とその性状の解析

アンギュリンファミリーのうちアンギュリン1のみを発現することが知られている

EpH4細胞において、CRISPR/Cas9法により、アンギュリン1あるいはトリセルリン遺伝子に変異を導入した。蛍光抗体法により各タンパク質が検出できなくなった細胞クローンを限界希釈法によりクローニングし、PCRによりゲノムの変異導入領域を増幅して塩基配列を決定し、フレームシフト変異が導入されてそれぞれの機能タンパク質が発現し得ないことを確認して、アンギュリン、あるいはトリセルリン欠失細胞とした。この細胞のバリア機能を電気抵抗値(TER)測定によって、TJ関連分子の発現や局在を蛍光抗体法により評価した。

(2)アンギュリンを欠失するイヌ腎臓由来培養上皮細胞MDCKIIクローンの樹立とその性状の解析

まずTALEN法によりMDCKII細胞のクローディング2遺伝子に変異を導入し、上記のスクリーニング法によりクローディング2欠失MDCKII細胞を樹立して、この細胞におけるTJ関連分子の発現、局在、バリア特性を電気抵抗、拡散電位、トレーサー拡散の測定により評価した。次に、クローディング2欠失MDCKII細胞および親株のMDCKII細胞をもとに、CRISPR/Cas9法によりアンギュリン1遺伝子を欠失させた細胞を樹立し、その性状を上記の方法により調べた。これら細胞にアンギュリン1の全長や変異分子を再発現させ、tTJの形態や上皮バリア機能を解析した。

(3)アンギュリン2/ILDR1遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析

アンギュリン2/ILDR1遺伝子欠失マウスをKnock Out Mouse Project (KOMP)から入手し、聴性脳幹反応による聴力の評価、走査型電子顕微鏡による内耳の微細構造の観察、蛍光抗体法によるtTJ構成分子の発現と局在変化の解析を行った。

(4)トリセルリンがTJ構造に与える影響の解析

クローディング1、2、3をそれぞれ外来的に発現させてTJ様構造を形成することができるマウスL線維芽細胞に、トリセルリン全長、あるいは欠失変異体をさらに発現させた細胞を樹立し、凍結割断レプリカ法によりTJ様構造を解析した。

(5)腸管上皮特異的にアンギュリン1を欠失するマウスの表現型解析

Villin-Creマウスとアンギュリン1/LSRfloxマウスを交配させることにより、腸管上皮細胞特異的にアンギュリン1を欠失させたマウスを作出し、その表現型を腸管組織の形態とUssing chamberを用いた生理学的測定により解析した。また、TJの構成分子の発現を蛍光抗体法により解析した。

4. 研究成果

(1) アンギュリン及びトリセルリンをそれぞれ欠失するマウス乳腺由来培養上皮細胞 EpH4 のクローンの樹立とその性状の解析

ゲノム編集によりアンギュリン1を欠失させた EpH4 細胞を樹立することに成功した。この細胞ではトリセルリンが tTJ に集積できなかったことから、アンギュリン欠失細胞であることが確認された。一方、この細胞のバリア機能を評価するために TER を測定したところ、TER 値がクローンによって大きくばらつき、コントロールや親株と比較して一貫した結果が得られないことがわかった。Eph4 細胞が遺伝的に不安定であることが原因と考えられ、少なくとも TER 測定には向かない細胞であると判断し、その後のバリア機能の解析に使用することを断念した。

興味深いことに、アンギュリン欠失 EpH4 細胞では、蛍光抗体染色において TJ 構成分子クローデインファミリーのうち、少なくともクローデイン 3、クローデイン 4、クローデイン 7 の細胞間接着部位における集積が増加していた。この結果は、tTJ アンギュリンが 2 細胞間の TJ の形成にも関与することを示唆する新しい知見であり、今後そのメカニズムの解明が望まれる。

(2) アンギュリンを欠失するイヌ腎臓由来培養上皮細胞 MDCKII のクローンの樹立とその性状の解析

ゲノム編集法の一つである TALEN により、アンギュリン1を欠失させた MDCKII 細胞を樹立することに成功したが、その上皮バリア機能を TER 測定で評価したところ、MDCKII 細胞の TER 値が低いために、アンギュリン1の寄与が判別できなかった。一方、MDCKII 細胞の低 TER の要因となっている TJ の構成分子クローデイン 2 遺伝子を欠失させた細胞を TALEN 作製して解析したところ、TER 値が 50 倍上昇し、傍細胞経路の陽イオン選択性が低下していることが明らかになった(図1)。次に、この細胞を元に CRIPR/Cas9 法によってアンギュリン1を欠失させた細胞クローンを複数樹立した。上皮バリア機能を調べたところ、これらのクロー

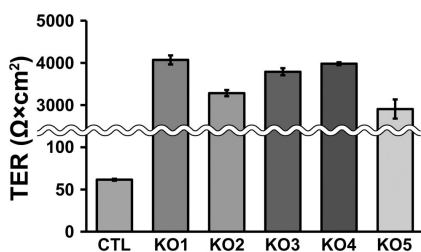


図1 MDCKII細胞(CTL)とクローデイン2欠失MDCKII細胞クローン(KO1-5)の電気抵抗値

ンでは、上皮バリア機能がコントロールと比較して約1桁低下すること、分子量443の水溶性トレーサの透過性が上昇したことから、アンギュリン1が十分な上皮バリア機能

に必要であることが確認された。

MDCKII 細胞(クローデイン 2 欠失 MDCKII 細胞を含む)では、tTJ 領域において tTJ 構成分子だけでなく、TJ 構成分子であるオクルディン、クローデインも基底側に伸長した局在を示すことが明らかになった。この結果をもとにマウス腎臓凍結切片において、集合管上皮の tTJ 領域におけるオクルディン、クローデイン 8 の局在を蛍光抗体法にて調べたところ、これら分子がトリセルリンとともに基底側へ伸長して局在することが確認された。この結果は、電子顕微鏡観察によってこれまで確認されていた tTJ の形態的特徴と一致する。したがって、MDCKII 細胞の実験系は tTJ 構成分子の機能を解析するうえで、上皮バリア機能の観点からも、tTJ の形態の観点からも、Eph4 細胞より優れていることが明らかになり、以後の研究で用いることとした。

上記アンギュリン 1 欠失 MDCKII 細胞、アンギュリン 1 欠失/クローデイン 2 欠失 MDCKII 細胞にアンギュリン 1 の全長、変異分子を戻した細胞を樹立して解析した結果、アンギュリン 1 の C 末端に存在する PDZ ドメイン結合モチーフ様の配列が tTJ 重要な役割を果たすことが明らかになった。すなわち、アンギュリン 1 の C 末端は、tTJ が基底側に伸長するのに必要なこと、アンギュリン 1 の C 末端は少なくとも TJ の裏打ちタンパク質である ZO-1 と結合すること、アンギュリン 1 の C 末端の有無は、現時点で我々が評価できる TER、分子量 443 の水溶性トレーサの透過性には影響しないこと、である。アンギュリンの C 末端の役割についてはこれまで全く報告がなく、3 つのアンギュリンサブタイプ間の比較も含めて、今後も継続すべき興味ある問題である。

一方、Eph4 細胞、MDCKII 細胞を用いて CRISPR/Cas9 により開始コドン周辺のゲノム配列をターゲットとしてトリセルリン欠失細胞の取得を試みたが、翻訳領域の第 3 メチオニンから翻訳されたと推測される部分トリセルリンタンパク質が発現しており、これが tTJ 領域に局在することがわかった。この部分タンパク質は構造からトリセルリンの完全な機能を持つとは考えられないものの、tTJ に局在することを考え合わせると現時点でこれをトリセルリン完全欠失細胞とよぶことはできず、第 3 メチオニンをターゲットするゲノム編集を重ねて行う必要があり、継続中である。

(3) アンギュリン 2/ILDR1 遺伝子ノックアウトマウスの表現型解析

アンギュリン 2/ILDR1 遺伝子の変異がヒトの遺伝性難聴の原因となる報告を受け、アンギュリン 2/ILDR1 遺伝子を欠失するマウスの解析を行った。このマウスは聴性脳幹反応の測定から重度の難聴を示した。内耳コルチ器の組織学的解析から、生後 12 日周辺で

有毛細胞変性が生じていることがわかり、これが難聴の原因と推測された(図2)。興味深いことにアンギュリン 2/ILDR1 の欠失により、アンギュリン 1 が代償的にコルチ器の tTJ に発現し、トリセルリンも tTJ に局在し

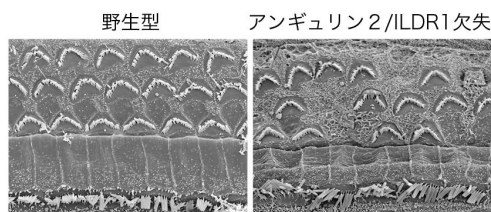


図2 アンギュリン 2/ILDR1 欠失マウスの有毛細胞変性

ていた。この結果は、アンギュリンファミリーに、トリセルリンを tTJ にリクルートする以外の機能があり、その機能がアンギュリンサブタイプ間で異なるという説をさらに強く支持するものである。また、ILDR1 遺伝子変異に起因するヒト遺伝性難聴 DFNB42 の病態の理解に重要な情報を与える。

(4) トリセルリンが TJ 構造に与える影響の解析

これまでに、クローディング 1 をマウス L 線維芽細胞に発現させて形成される TJ 様構造の形態がトリセルリンの重複発現により複雑化すること(具体的には TJ ストランドの T 字連結の増加とそれに伴う TJ ストランド長の短縮)が示されていた。他のクローディングについても同じ効果が見られるか、クローディング 2、クローディング 3 をそれぞれ発現する L 細胞にトリセルリンを重ねて発現させて凍結切断レプリカ法で調べたところ、いずれの場合も、TJ ストランドの形態の複雑化が観察された。また、トリセルリンの C 末端側細胞質領域を欠失させた変異分子もこの機能を保持していた。

(5) 腸管上皮特異的にアンギュリン 1 を欠失するマウスの表現型解析

腸管上皮特異的にアンギュリン 1 を欠失するマウスにおいて、コントロールマウスと比較して小腸が有意に長くなることを明らかにした。太さも増加していた。特に炎症等は見られず、絨毛の肥厚が観察された。Ussing chamber を用いて腸管上皮の透過性を調べたところ、アンギュリン 1 欠失マウスでコンダクタンスおよび分子量 4000 の水溶性トレーサーの透過の増加傾向が見られた。しかし、このマウスにおける絨毛の肥厚の効果がコンダクタンス増大の方向に加味されると推測されることを考え合わせると、著しい透過性の変化はないと考えられた。

腸管上皮特異的アンギュリン 1 欠失マウスの小腸では、予想通りトリセルリンの tTJ における局在が失われており、小腸上皮におけるアンギュリンサブタイプの発現はアンギュリン 1 のみであることが確認された。一方、興味深いことに、コントロールマウスにおいて小腸上皮細胞側底膜に存在し、蛍光免疫染

色レベルでは TJ 領域に局在が見られないクローディング 7 が、アンギュリン 1 欠失マウスでは明らかに TJ に濃縮していた。この予想外の結果は、tTJ の構成分子が 2 細胞間の TJ の形成にも関与することを示しており、両者が関連するメカニズムの解明が今後の課題となった。

以上のいずれの研究成果も tTJ 研究において新規な知見を含む。未発表の成果については国際学術雑誌への発表に向けて研究を継続している。

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 10 件)

- (1) Yokouchi M., Atsugi T., Logtestijn M.V., Tanaka R.J., Kajimura M., Suematsu M., Furuse M., Amagai M., Kubo A. Epidermal cell turnover across tight junctions based on Kelvin's tetrakaidecahedron cell shape. 査読有 eLife 5:e19593 (2016) doi: 10.7554/eLife.19593.
- (2) Tokuda S., Hirai, T., Furuse M. Effects of osmolarity on paracellular transport in MDCK II cells. 査読有 PLoS One 11: e0166904 (2016). doi: 10.1371/journal.pone.0166904.
- (3) Izumi Y., Motoishi M., Furuse K., Furuse M. A tetraspanin regulates septate junction formation in Drosophila midgut. 査読有 J. Cell Sci.129: 1155-1164 (2016). doi: 10.1242/jcs.180448.
- (4) Tokuda S., Kim Y.H., Matsumoto H., Muro S., Hirai T., Mishima M., Furuse M. Effects of Hydrostatic Pressure on Carcinogenic Properties of Epithelia. 査読有 PLoS One 10: e0145522 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0145522.
- (5) Higashi T., Katsuno T., Kitajiri S., Furuse M. Deficiency of angulin-2/ILDR1, a tricellular tight junction-associated membrane protein, causes deafness with cochlear hair cell degeneration in mice. 査読有 PLoS One 10: e0120674 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0120674.
- (6) Tokuda S., Furuse M. Claudin-2 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: Claudin-2 independently determines the leaky property of tight junctions in MDCK cells. 査読有 PLoS One 10: e0119869 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0119869.
- (7) Furuse M., Izumi Y., Oda Y., Higashi T., Iwamoto N. Molecular organization of tricellular tight junctions. 査読有 Tissue Barriers 2: e28960 (2014). doi: 10.4161/tisb.28960.
- (8) Izumi Y., Furuse M. Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. 査読有 Semin. Cell Dev. Biol. 36:186-193 (2014). doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.009.
- (9) Oda Y., Otani T., Ikenouchi J., Furuse M. Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through

Cdc42. 査読有 J. Cell Sci. 127: 4201-4212 (2014). doi: 10.1242/jcs.150607.
(10) Tokuda S., Higashi T., Furuse M. ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape. 査読有 PLoS One 9: e104994 (2014). doi: 10.1371/journal.pone.0104994.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Furuse M. Tricellular tight junctions and its associated proteins. International conference Tight junctions and their proteins. 2016.9.8-10 (Berlin, Germany)
- (2) Otani T., Tokuda S., Watanabe M., Furuse M. ZO-1 and ZO-2 are required for epithelial polarity in MDCK II cells. International conference Tight junctions and their proteins. 2016.9.8-10 (Berlin, Germany)
- (3) Tokuda S., Furuse M. Hydrostatic pressure gradient induces stratification of simple epithelial cells. 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016.6.15-17 京都テルサ (京都府京都市)
- (4) Otani T., Tokuda S., Watanabe M., Furuse M. Revisiting the role of tight junctions in epithelial polarity. 第 68 回日本細胞生物学会大会 2016.6.15-17 京都テルサ (京都府京都市)
- (5) Furuse M. The angulin-tricellulin system at epithelial and endothelial tricellular tight junctions. The 18th International Symposium on Signal Transduction of the Blood-Brain and Blood-Retinal Barriers. 2015.7.5 (Paris, France)
- (6) Furuse M., Izumi Y. Molecular dissection of septate junctions in the insect midgut and Malpighian tubules. Society for Experimental Biology Annual Meeting. 2015.6.30-7.3 (Prague, Czech Republic)
- (7) Furuse M. Molecular organization of tricellular tight junctions. The American Physiological Society at Experimental Biology 2015. 2015.4.1 (Boston, USA)
- (8) 古瀬幹夫 多角形の上皮細胞の角が接する領域の細胞間隙をいかにして閉じるか：トリセルラータイトジャンクションの分子構築 第 87 回日本生化学会大会 2014.10.15-18 国立京都国際会館(京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nips.ac.jp/dcs/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古瀬 幹夫 (FURUSE MIKIO)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・教授

研究者番号：90281089

(2) 研究分担者

泉 裕士 (IZUMI YASUSHI)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・准教授

研究者番号：10373268

菅原 太一 (SUGAWARA TAICHI)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特任助教

研究者番号：30758412

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()