

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460455

研究課題名(和文) タイト結合に存在するジスルフィド結合の機能解明：酸化還元センサーとしての可能性

研究課題名(英文) The function of disulfide bond in tight junction protein, as an oxidative sensor

研究代表者

田中 敏 (TANAKA, Satoshi)

北海道大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号：30374250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タイト結合膜蛋白オクルディンの細胞外ループには2か所にシステインがあり、その安定性や細胞内局在を保つ働きを持つ。オクルディンの安定性には周囲酸素濃度との関連性が見られ、低酸素では細胞質内のオクルディンが分解されるが、細胞膜上のオクルディンは比較的保たれた。以上からオクルディンのジスルフィド結合の存在が推測される。オクルディンの分解はユビキチンE3リガーゼITCH結合によるポリユビキチン化を介して生じる。オクルディンとその他のタイト結合膜蛋白(トリセルリン、クローディン-4など)は相互作用を示すが、それぞれのタイト結合膜蛋白のシステイン変異の有無による結合性変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Occludin, a tight junction transmembrane protein, has 2 cysteine residues in its extracellular loop, which affect its stability and subcellular distribution. Under hypoxia, occludin degradation occurs in the cytoplasm, but occludin in the cytoplasmic membrane is stable. These results suggest that there is disulfide bond formation in or between occludin molecules. Occludin requires ITCH, a ubiquitin E3 ligase, for its degradation via poly-ubiquitination. Occludin interacts with other tight junction proteins, such as tricellulin and claudin-4, but there is no difference in its interactions with tight junction proteins in the presence or absence of cysteine mutations.

研究分野：人体病理学、実験病理学、分子病理学

キーワード：タイト結合 ジスルフィド結合 thioredoxin redox ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

タイト結合とは、上皮や血管内皮の細胞間に存在する微小構造で、細胞膜貫通タンパクと膜裏打ちタンパクから構成される。細胞間の隙間を埋めるバリア機能のみでなく、細胞極性形成やシグナル伝達、物質輸送など様々な機能を持っている。従来の研究は各々の構成蛋白の発現調節の解析が主で、各分子の蛋白発現後の二次修飾のメカニズムやタイト結合の構造形成に関する研究は進んでいなかった。またジスルフィド結合に関しては、膜貫通タンパク JAM のみが安定したジスルフィド結合を持つとされてきていた。

申請者は以前の研究で、オクルディン (occludin) -FLAG 融合蛋白を作成し培養細胞中で解析したところ、既存の occludin の動態を再現できた。また、occludin のシステイン アラニン変異型 (分子内部位により数種類) の発現解析により、一部の変異型 occludin は発現量が極端に少なく、野生型より不安定であることが推測された。この現象は他の細胞株でも例外なく再現され、occludin がジスルフィド結合形成による安定性調節を受けていることを間接的に示していると考えられた。

2. 研究の目的

今回の研究ではタイト結合蛋白、特に occludin についてジスルフィド結合の機能、その形成に関与する thioredoxin 蛋白の同定を通じて、タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の調節が occludin の安定性やタイト結合の機能に及ぼす影響の検出を目標とした。

3. 研究の方法

概要：タイト結合蛋白とタグ (FLAG や GFP) を融合させた蛋白発現ベクターを用いて、培養細胞に発現させる。同様のベクターでシステイン アラニン変異蛋白も発現させる。これらの融合蛋白の安定性や、細胞内分布などの変化を観測する。また、ジスルフィド結合形成の調節因子を探るため、周囲酸化還元環境を変化させる。さらにタイト結合膜蛋白の安定性調節の解析の一つとして、ユビキチン化を介した系についても検討する。培養細胞で発現させた蛋白について共免疫沈降を行い、タイト結合蛋白と相互作用を持つ分子 (他のタイト結合蛋白や thioredoxin family 蛋白) を検出し、ジスルフィド結合との関連を検討する。ジスルフィド結合と関連のある Thioredoxin family 蛋白を二次元電気泳動や MALDI-TOF MS 解析し、同定を目指す。

(1) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の測定

培養細胞でタイト結合蛋白を還元条件、非還元条件でウエスタン解析し、安定したジスルフィド結合の有無を検討する。
システイン変異ベクターを上皮細胞に導入し、ウエスタン解析で量的変

化を比較する。

GFP 付加したタイト結合膜蛋白について、蛍光顕微鏡で観察し、細胞内分布をシステイン変異型と野生型で比較する。

(2) タイト結合蛋白に存在するジスルフィド結合形成の調節因子の検討

培養細胞を酸化ストレスや低酸素状態に置き、タイト結合蛋白の細胞内分布やタイト結合膜蛋白の量的変化を野生型、システイン変異型で比較観測する。

(3) タイト結合蛋白の安定性とジスルフィド結合の関連

膜貫通蛋白について、ジスルフィド結合と膜表面や細胞質内での安定性の関連を蛍光顕微鏡観察やウエスタン解析で検討する。

ジスルフィド結合による膜蛋白のリサイクリング周期の変化も検討する。

(4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合とタイト結合蛋白との相互作用の検討

共免疫沈降により、タイト結合蛋白の相互作用を測定する。

変異ベクターの発現、共免疫沈降も行い、ジスルフィド結合の有無と相互作用の関連を検討する。

(5) タイト結合膜蛋白の安定性とユビキチン化の関連性の検討

ユビキチン化と蛋白安定性の関連をウエスタン解析で測定する。

ユビキチン E3 リガーゼ結合部位を変異させたタイト結合蛋白 (特に occludin) の安定性を、様々な環境で測定する。

(6) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出

ジスルフィド結合形成の見られる蛋白について共免疫沈降し、MALDI-TOF MS 解析を行い、occludin と相互作用を持つ thioredoxin family 蛋白を同定する。

4. 研究成果

(1) タイト結合膜蛋白のジスルフィド結合の測定

ウエスタン解析で occludin やトリセルリン (tricellulin)、クローデイン-4 (claudin-4) について解析したが、いずれにも安定した生細胞内のジスルフィド結合は確認できなかった。その一方、occludin にはジスルフィド結合を形成しやすい部位が確認され、生細胞内でもジスルフィド結合を一過性に形成する可能性が考えられた。

システイン変異型 tricellulin や claudin-4 には野生型に比べ明らかな発現量の変化は見られなかった。これは occludin の細胞外ループに

あるシステインを変異させると発現量が低下するというのと異なる結果である。

システイン変異型 GFP 付加 occludin は野生型に比べ細胞質内に集積する傾向が見られた。同様の傾向は、FLAG 付加した occludin でも見られた。

(2) タイト結合蛋白に存在するジスルフィド結合形成の調節因子の検討

occludin は低酸素 (2%) 培養の状態では分解が促進される。細胞外ループに存在するシステイン (C216 および C237) を変異させると、低酸素での安定性がさらに低くなる。細胞外ループ内の別な部位にシステインを回復させると、occludin 安定性が回復した。その一方、H2O2 曝露状態では安定性に大きな変化がなかった。Tricellulin や claudin-4 については、低酸素培養で野生型、システイン変異型で安定性に変化が見られなかった。

(3) タイト結合蛋白の安定性とジスルフィド結合の関連

細胞質内の occludin は低酸素で減少することが確認できた。その一方細胞膜上では、低酸素状態でも occludin は保たれていた。これらの結果は蛍光顕微鏡観察およびウェスタン解析で確認できた。

細胞膜上の occludin のリサイクリング周期の測定を試みたが、野生型とシステイン変異型に大きな差が見られなかった。

(4) タイト結合蛋白のジスルフィド結合とタイト結合蛋白との相互作用の検討

occludin と tricellulin について、通常培養と低酸素培養で相互作用を検討したが、大きな差は確認できなかった。

occludin と tricellulin、claudin-4 について互いに野生型、数種類のシステイン変異型について共免疫沈降により相互作用を検討したが、システイン変異の有無による明らかな差は確認できなかった。

(5) タイト結合膜蛋白の安定性とユビキチン化の関連性の検討

occludin はポリユビキチン化されている。また、プロテアソーム阻害剤で occludin の安定性が増加した。よって、ユビキチンを介した分解によりその安定性が調節されていることが分かった。

ユビキチン E3 リガーゼ ITCH 結合部位を変異させた occludin は、ITCH との結合性が消失し、occludin のポリユビキチン化も大きく減少した。ITCH 結合部位変異型 occludin は、システイン変異があっても、野生型

と同様の安定性を示した。低酸素状態でも同様であり、occludin の分解は ITCH が大きく関与していることが判明した。

(6) タイト結合蛋白と相互作用を持つ、thioredoxin family 蛋白の検出

occludin と共免疫沈降させた蛋白について、SDS-PAGE で分離し、システイン変異型と野生型で変化のあったいくつかのバンドについて、質量分析を試みた。検出されたタンパクには明らかな thioredoxin family 蛋白は見いだせなかった。さらなる解析が必要であると考えられた。

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6件)

Takasawa A, Murata M, Takasawa K, Ono Y, Osanai M, Tanaka S, Nojima M, Kono T, Hirata K, Kojima T, Sawada N: Nuclear localization of tricellulin promotes the oncogenic property of pancreatic cancer. *Sci Rep*. Sep 19; 6: 33582, 2016 査読有
doi: 10.1038/srep33582

Ono Y, Hiratsuka Y, Murata M, Takasawa A, Fukuda R, Nojima M, Tanaka S, Osanai M, Hirata K, Sawada N: Claudins-4 and -7 might be valuable markers to distinguish hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma. *Virchows Arch*. 469(4):417-26, 2016 査読有
doi: 10.1007/s00428-016-1984-z

Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N: Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins, claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. *Histol Histopathol*. 5:11729, 2016 査読有
doi: 10.14670/HH-11-729

Tsujiwaki M, Murata M, Takasawa A, Hiratsuka Y, Fukuda R, Sugimoto K, Ono Y, Nojima M, Tanaka S, Hirata K, Kojima T, Sawada N: Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. *Med Mol Morphol*. 48(1):33-43, 2015 査読有
doi: 10.1007/s00795-014-0074-z

Keira Y, Takasawa A, Murata M, Nojima M, Takasawa K, Ogino J, Higashiura Y, Sasaki A, Kimura Y, Mizuguchi T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N, Hasegawa T: An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens. *Virchows Arch.* 466(3):265-77, 2015 査読有 doi: 10.1007/s00428-014-1705-4.

Wei Q, Zhang F, Richardson MM, Roy NH, Rodgers W, Liu Y, Zhao W, Fu C, Ding Y, Huang C, Chen Y, Sun Y, Ding L, Hu Y, Ma JX, Boulton ME, Pasula S, Wren JD, Tanaka S, Huang X, Thali M, Hämmerling GJ, Zhang XA: CD82 restrains pathological angiogenesis by altering lipid raft clustering and CD44 trafficking in endothelial cells. *Circulation.* 130(17):1493-504, 2014 査読有 doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011096.

〔学会発表〕(計9件)

田中 敏, 高澤 啓, 村田雅樹, 小山内誠, 澤田典均: タイト結合蛋白 occludin のジスルフィド結合はユビキチン化を介してその安定性や細胞増殖を制御する. 第106回日本病理学会総会, 京王プラザホテル(東京都新宿区)2017, 4, 27-29.

田中 敏, 高澤 啓, 村田雅樹, 高澤久美, 小山内誠, 澤田典均: タイト結合蛋白 occludin のジスルフィド結合を介したユビキチン化は、その細胞内分布や安定性を調節し、細胞増殖に関与する, 第39回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2016, 11, 30-12, 2,

田中 敏, 小野佑輔, 平塚佑太郎, 高澤啓, 村田雅樹, 高澤久美, 小山内誠, 澤田典均: タイト結合蛋白 occludin の低酸素下でのジスルフィド結合とユビキチン化を介した細胞内分布調節, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)2015, 12, 1-4.

田中 敏, 小野佑輔, 平塚佑太郎, 高澤啓, 村田雅樹, 高澤久美, 田上洋平, 真柄和史, 澤田典均: 低酸素環境でのタイト結合蛋白 occludin の細胞内分布調節, 第104回日本病理学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)2015, 4, 30-5, 2.

屋国際会議場(愛知県名古屋市)2015, 4, 30-5, 2.

田中 敏, 小野佑輔, 平塚佑太郎, 高澤啓, 村田雅樹, 高澤久美, 澤田典均: タイト結合蛋白 occludin のジスルフィド結合を介した安定性調節機構, 第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2014, 11, 25-27.

田中 敏, 小野佑輔, 平塚佑太郎, 高澤啓, 村田雅樹, 高澤久美, 澤田典均: 低酸素環境でのタイト結合膜蛋白 occludin の分解に対するユビキチンの役割, 第60回日本病理学会秋期特別総会, 浦添市産業振興センター・結の街(沖縄県浦添市)2014, 11, 20-21.

田中 敏, 小野佑輔, 平塚佑太郎, 高澤啓, 村田雅樹, 高澤久美, 澤田典均: タイト結合蛋白 Occludin のジスルフィド結合を介した酸化センサー機能の解明, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場(広島県広島市)2014, 4, 24-26.

秋元太志, 高澤 啓, 村田雅樹, 小嶋結, 田中 敏, 計良淑子, 荻野次郎, 長谷川匡, 澤田典均: 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連分子の免疫組織化学的検討, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場(広島県広島市)2014, 4, 24-26.

高澤 啓, 村田雅樹, 計良淑子, 田中 敏, 澤田典均: 胆道癌における claudin-18 の発現と調節機構および機能解析, 第103回日本病理学会総会, 広島国際会議場(広島県広島市)2014, 4, 24-26.

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 敏 (TANAKA Satoshi)

北海道大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号: 30374250