

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26640057

研究課題名(和文)非興奮性上皮細胞の膜電位の可視化とシグナル伝達における意義の解明

研究課題名(英文)The membrane potential and signal transduction of non excitable epithelial cells.

研究代表者

田村 淳(Tamura, Atsushi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：00362525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞間のイオンの透過性は、膜電位の変化やその変化が細胞内にどうした影響(例えば、カルシウム濃度の上昇や成長因子受容体のリン酸化など)を与えるかについての解析はほとんどない。

本研究では、上皮細胞のタイトジャンクションが電流の抵抗や通路となることで、細胞の膜電位を制御すると思われるが、特に、微小環境プロトン濃度が、細胞間透過性/上皮細胞シート電位に影響し、フィードバック的に細胞間の透過性をも制御する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：The effects of ion or water permeability through epithelial tight junction is not well understood.

In this research, the aim is to clarify the biological functions and its mechanisms regulated directly or indirectly by the properties of intercellular tight junction in epithelial cells. One of the most interesting biological function is pH dependency, especially dependency of lower pH of basal side culture medium on TER. It suggests there is some special mechanism which works as a sensor residing only in basal side of cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タイトジャンクション クローディン 微小環境 電流 膜電位 上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

12指腸潰瘍では、潰瘍周囲の細胞が特殊に変化して修復のためのEGFを分泌する細胞に分化したり、細胞競合では周囲の細胞にアポトーシスのシグナルを送る。こうした細胞どうしの密接なインタラクションの分子機構は、増殖にともなって互いに押し合うメカニカルな刺激や、接着分子からのシグナル、などで理解する試みがなされてきた。細胞の接着阻害(コンタクトインヒビション)と呼ばれる現象は、細胞生物学者の興味から、長い間研究の対象となってきたが、現在でも十分な理解は得られていない。

コンタクトインヒビション、12指腸潰瘍周辺の修復細胞、細胞競合いずれも上皮細胞がつくるシートで生じる現象である。私の所属する教室では、長い間、上皮細胞間接着装置の解析を進めてきた。その過程で、細胞間のイオンの透過性は、細胞の密度の影響を受けること、通常タイトジャンクションをイオンが通過するときには、その電荷選択性から、拡散電位とよばれる電場が生じること、さらに考えられることは、局所のイオン環境や膜電位、アピカルとベール側の膜電位のバランスまで崩す可能性があることである。しかし、膜電位の変化やその変化が細胞内にどうした影響(例えば、カルシウム濃度の上昇や成長因子受容体のリン酸化など)を与えるかについての解析は皆無といってよい。

上皮細胞のタイトジャンクションが電流の抵抗や通路となることで、細胞の膜電位を制御し、細胞内のシグナルへつなぐと考える本概念は、新しく斬新と思われる。本申請では、本仮定が正しいかを調べる。本仮説が正しかった場合には、十分に掘り下げた研究に進む。

2. 研究の目的

神経や筋などの興奮性細胞における膜電位

や活動電位の生物機能上の重要性は良く知られている。一方で、一般的な上皮細胞も十分な静止膜電位を持ち、例えば、小腸の吸収上皮細胞では、糖やアミノ酸の吸収で利用される。組織間質に存在する繊維芽細胞とは異なり、上皮細胞は細胞間接着装置で接着する。興味深いことは、最もアピカル側に存在するタイトジャンクション TJ は、クローディンと呼ばれる膜タンパク質の網目構造により連続して囲まれることである。このストランドと呼ばれる構造は、電気の抵抗となるので、アピカル膜とベール膜を電氣的に隔離するが、膜電位の変化におけるタイトジャンクションの機能は知られていない。

本萌芽研究では、非興奮性上皮細胞における膜電位の細胞内シグナルとしての重要性を、特に、タイトジャンクションの視点から検討する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の密度の乱れから生じる電位・電流および生じるイオン環境・細胞内シグナルの測定系の樹立および計測
= MDCK-1 (イヌ腎臓由来上皮細胞) および EpH4 (マウス乳腺上皮細胞) 培養細胞を、12穴のフィルター膜上に播種し、細胞の密度ごとに、経上皮細胞シート電気抵抗(TER)を測定した。

(2) 本培養条件では、アピカル膜側と、ベール側の培養液の条件を変更することができるが、ベール側のpHを2程度まで低下させると、TERが大きく低下し、細胞間の透過性の亢進が認められた。一方、アピカル側のpHを変化させても、細胞間の透過性は変化しなかった。pHの変化は、ベール側で0.5程度であっても、TERに影響を及ぼした。

なお、ベール側およびアピカル側の培養液中の血清濃度を0.05%程度の濃度まで低下させても、上皮細胞シートの抵抗は維

持された。

(3) 申請者の所属する教室で解析された胃型クローディング 18 のノックアウトマウスの胃では、胃酸が、タイトジャンクションの機能障害により、胃酸粘膜下へ漏出することで、胃炎が発症する。このとき、タイトジャンクションがつくる野生型では見られる緻密なタイトジャンクションストランドが消失する。上皮細胞のベール側の pH 変化は、上皮細胞のバリア機能にもさらに影響を与える可能性が示唆された。

(4) 生理学的な経上皮膜電位は、数 mV の電位であり、プロトンのアピカル側およびベール側で、生じる電位も、同程度である。

pH 変化が惹起する膜電位などの変化のセンス機構については、今後明らかにしていきたい。

4. 研究成果

(1) MDCK-1 をフィルター膜上に播種し、細胞の密度により電気抵抗を測定すると、細胞密度の上昇に連れて、上皮細胞シートの電気抵抗 (TER) の増加が認められた。

(2) 密度に応じた TER は、 $100-8000 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度となる。

(3) 培養条件の微小環境を種々変化させ、上皮細胞シート抵抗への影響を観察した。無血清条件では、TER の低下が見られた。

最も高感度で、TER に影響を及ぼしたのは、pH の変化であった (図 1)。

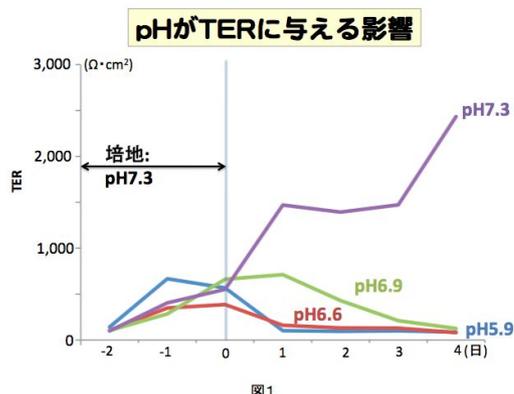


図1

(4) pH のアピカル側の低下では、TER に影響はほぼ認められなかった (図 2)。

一方、ベール側の pH 低下では、TER の低下が認められた。特に、この変化は、pH の低下の割合に依存し、pH=6.9 への低下でも、TER の低下が認められた (図 3)。

(5) こうした変化は、Claudin-18st ノック

アウトマウスの胃炎での、慢性活動性胃炎の急性炎症の持続が、胃内腔から胃粘膜下への

頂端側pHがTERに与える影響

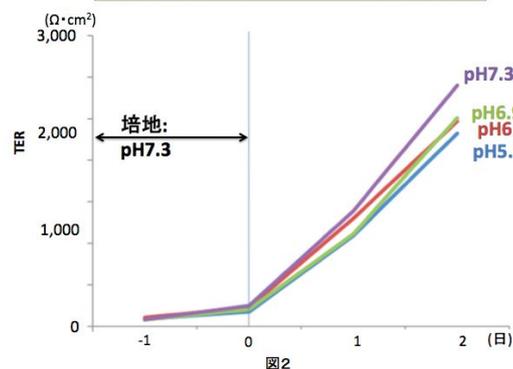


図2

胃酸の漏出にともなって炎症が惹起されるとともに、バリアの障害が持続しやすい蛍光をつくるものと推察される。

基底側pHがTERに与える影響

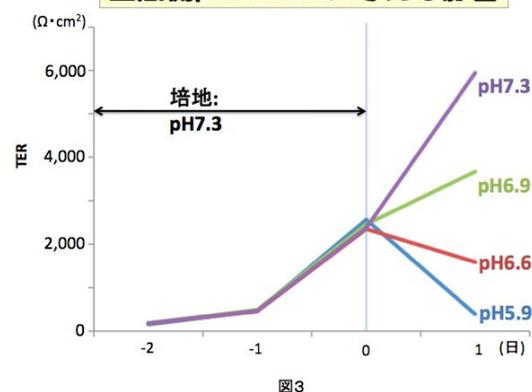


図3

(6) アピカル側とベール側のイオン濃度勾配により生じるプロトン電位は、数 mV 程度で、細胞内へのシグナルを導くことが示唆された。

(7) シグナル伝達については、今後、さらに解析を進める。

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6件)

Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A, Tsukita S. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. Gut. 2015 Feb 17. pii: gutjnl-2014-308419. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308419.

Saitoh Y, Suzuki H, Tani K, Nishikawa K, Irie K, Ogura Y, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. Tight junctions. Structural

insight into tight junction disassembly by Clostridium perfringens enterotoxin. Science. 2015 Feb 13;347(6223):775-8. doi: 10.1126/science.1261833.

Suzuki H, Tani K, Tamura A, Tsukita S, Fujiyoshi Y. Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. J Mol Biol. 2015 Jan 30; 427(2):291-7. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.020.

Hatano R, Akiyama K, Tamura A, Hosogi S, Marunaka Y, Caplan MJ, Ueno Y, Tsukita S, Asano S. Knockdown of ezrin causes intrahepatic cholestasis by the dysregulation of bile fluidity in the bile duct epithelium in mice. Hepatology. 2015 May; 61(5):1660-71. doi: 10.1002/hep.27565. Epub 2015 Mar 23.

Tamura A, Tsukita S. Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. Semin Cell Dev Biol. 2014 Dec;36:177-85. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.09.019. Epub 2014 Oct 12.

Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. Science. 2014 Apr 18;344(6181):304-7. doi: 10.1126/science.1248571.

〔学会発表〕(計 11 件)

田村淳、月田早智子「タイトジャンクション(TJ)クロードインにより調節される消化管 TJ の機能」第 120 回解剖学会・第 92 回生理学会(合同大会)2015.3.21~2015.3.21 神戸ポートアイランド

月田早智子、田中啓雄、田村淳「Regulation of epithelial morphogenesis by a tight junction (TJ)-apical complex」ASCB annual

meeting. 2014.12.8~2015.12.8 ペンシルベニアコンベンションセンター(フィラデルフィア)

鈴木浩也、田村淳、月田早智子「胃型クロードイン 18 欠損マウス胃における加齢に伴ったポリポシス及び慢性活動性炎症の自然発症モデル」第 87 回日本生化学会 2014.10.16~2014.10.16 京都国際会館

鈴木浩也、田村淳、月田早智子「胃型クロードイン 18 欠損マウス胃における肺胞内微小環境の破綻と肺炎」第 37 回日本分子生物学会 2014.11.25~2014.11.25 パシフィコ横浜

柏原宏香、山本康子、田中啓雄、峯田克彦、武内恒成、田村淳、月田早智子「タイトジャンクション構成蛋白質クロードイン 21 の解析」第 66 回日本細胞生物学会 2014.6.11~2014.6.11 奈良県新公会堂

田中啓雄、松本健吾、今里光伸、田村淳、山崎裕自、月田早智子「マウス胆管系微小循環と胆石形成性に影響を与える肝臓のタイトジャンクション構成蛋白質クロードイン」第 87 回日本生化学会 2014.10.16~2014.10.16 京都国際会館

鈴木浩也、田村淳、月田早智子「胃型クロードイン 18 欠損マウス胃における加齢に伴ったポリポシスおよび慢性活動性炎症の自然発症モデル」第 87 回日本生化学会 2014.10.16~2014.10.16 京都国際会館

鈴木浩也、田村淳、月田早智子「Stomach-type claudin-18-deficient mouse develops polyposis and chronic gastritis」上皮バリアと輸送シンボジウム 2014.11.1~2014.11.2 立命館大学

田中啓雄、松本健吾、今里光伸、山崎裕自、田村淳、月田早智子「Claudin regulates bile flow and change susceptibility to gallstone formation in claudin deficient mice」上皮バリアと輸送シンボジウム 2014.11.1~2014.11.2 立命館大学

田村淳、松本健吾、今里光伸、山崎裕自、田中啓雄、月田早智子「肝クロードインはマウスの胆汁微小循環と胆石形成性に影響を与える」第 37 回日本分子生物学会 2014.11.25~2014.11.25 パシフィコ横浜

鈴木浩也、田村淳、月田早智子「肺型クロードイン 18 欠損マウスに置ける肺胞内微小環境の破綻と肺炎」第 37 回日本分子生物学会 2014.11.25~2014.11.25 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学大学院 生命機能研究科/医学系研究科 月田研究室
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>
大阪大学大学院 生命機能研究科 分子生体情報学研究室（月田教授）
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jpn/general/lab/13/>
大阪大学大学院 医学系研究科 生化学/分子生物学 分子生体情報学
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/jpn/students/research.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 淳 (TAMURA, Atsushi)
大阪大学・大学院生命機能研究科/医学系研究科・准教授
研究者番号： 00362525

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：