

研究題目 細胞接着装置を構成する新規タンパク質の同定

研究組織

研究代表者：池ノ内順一（九州大学理学院）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：長佑磨（九州大学理学院）

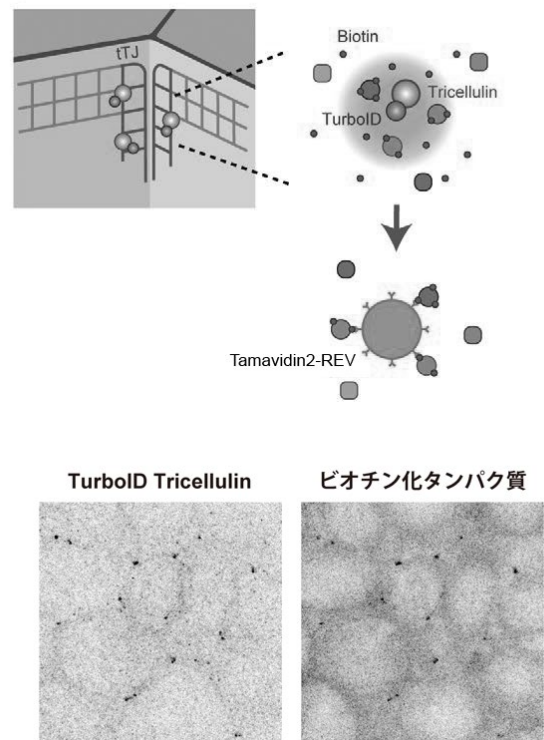
【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

研究代表者は、上皮細胞の細胞接着装置の形成機構について研究を行っている。細胞接着装置の中でもタイトジャンクションは、上皮細胞シートのバリアを担う構造であり、その破綻は、病原体や抗原の体内への侵入を引き起こすため、慢性炎症の原因となる。タイトジャンクションを構成する分子については多くの知見が得られてきたが、とりわけ3細胞間において形成されるタイトジャンクションを構成する分子はほとんど明らかになっていない。本研究では、タイトジャンクションを構成する新たな接着関連タンパク質の網羅的な同定を目指す。タイトジャンクションの分子機構を明らかにすることによって、慢性炎症などのタイトジャンクションによるバリアの破綻に起因する疾患の予防法や治療法の開発に資する知見を得る。

[1-2] 研究の方法・経過

研究代表者は、3細胞間のタイトジャンクションに局在するトリセルリンに近位依存性ビオチン化酵素 TurboID を融合したキメラ遺伝子を安定発現する上皮細胞株と、2細胞間のタイトジャンクションに局在するオクルーディンに TurboID を融合したキメラ遺伝子を安定発現する上皮細胞株を樹立した（Cho et al. J Cell Biol 2022）。本研究では、両者の細胞において、近接ビオチン化反応を用いてビオチン化されるタンパク質群について、小迫教授の Tamavidin 2-REV を用いたプロテオーム解析によって、網羅的な同定を行った。



Tricellulin-TurboID による近位依存的なビオチン化反応を用いた新規接着関連分子の探索

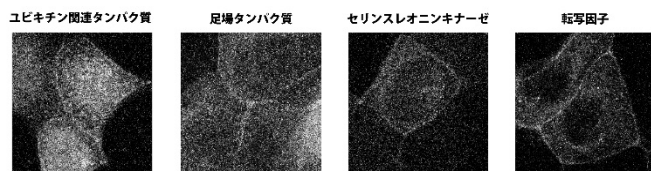
【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

初回の実験から得られた解析結果では得られたビオチン化ペプチドの数が少なかったため、ビオチン化の条件検討（ビオチン濃度並びに反応時間）およびトリセルリンと TurboID を融合したキメラ遺伝子の安定発現株の再取得を行った。ビオチン化条件の最適化ならびに安定発現株を選抜することによって、2回目の解析では多くのビオチン化されたペプチドフラ

グメントを同定することに成功した。また、発現量の低いポジティブコントロールとなる接着関連タンパク質についても再現性良く検出できている。現在、これらの解析結果から得られた情報を基に、候補となる新規遺伝子の細胞内局在のスクリーニングを進めている。

現在、膜タンパク質を中心に局在の解析を進めているが、一方で、脱ユビキチン化酵素、転写因子など、当初は想定していなかった分子群が細胞接着部位に集積していることを見出している（下図）。このような結果は、高感度な解析技術を用いた網羅的なプロテオーム解析でなければ得られなかった想定外の結果であり、引き続き、機能解析を進めることによってタイトジャンクションの分子機構の全貌を解き明かしたい。



Tricellulin および Occludin の近接バイオチン化アッセイによって新たに細胞接着部位への集積が確認された分子群

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

上皮細胞のバリア機構の破綻は、アトピー性皮膚炎や炎症性腸疾患などの慢性炎症などの病態発症につながることで知られている。これらの病態に対して、現在の医療では、異物の侵入によって惹起された免疫細胞の活性化を免疫抑制剤で抑え込む治療戦略がとられている。しかしながら、病態の本質は、上皮細胞のバリアの破綻であり、どうして患者では上皮細胞のバリアが破綻するのか、健常人では上皮バリアを恒常的に保つために、どのような上皮バリアの破綻に対する修復機構が備わっているかを解明することが重要であると考えられる。タイトジャンクションの主要な細胞接着分子としてクローディンが同定（1999 年）されて以降、20 年以上にわたって、タイトジャンクションを標的とした抗炎症療法の治療戦略はいまだに道筋がついていない。本共同研究において、タイトジャンクションの形成に関わる分子群を網羅的に同定し、それらの機能解析を進めるこ

とによって、上皮バリアの破綻を基礎とする慢性炎症に対する新たな治療標的を同定したい。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

なし

[3-3] 成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今回の共同研究によって、得られたトリセルリンの TurboID の解析結果は、発現量の低いポジティブコントロールの膜タンパク質を再現性良く検出できていた。今後、共同研究によって得られた候補遺伝子のリストの局在解析を精力的に進めて新たな細胞接着関連分子の同定を行う。また、今後の課題としては、細胞間接着の形成機構を理解するために、Ca スイッチアッセイを用いて、経時的に細胞接着装置が形成される過程で、どのような過渡的な分子複合体が形成されるかについて検討を行いたい。