

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（九州大学医学研究院）

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（九州大学医学研究院）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

研究代表者は、これまで上皮細胞における細胞接着装置の形成機構について研究を進めてきた。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機能を担う構造であり、その破綻は病原体や抗原の体内侵入を引き起こし、慢性炎症の原因となることが知られている。細胞接着装置を構成する分子に関しては多くの知見が蓄積されてきたが、(1) 三細胞間におけるタイトジャンクションの形成機構 および (2) 上皮バリア機能を動的に制御する分子機構 については、依然として未解明な点が多い。

本研究では、新規接着関連タンパク質の網羅的な同定を行い、三細胞間タイトジャンクションの形成および上皮バリア機能の制御に関与する分子群を明らかにすることを目的とする。これにより、タイトジャンクションのバリア破綻に起因する慢性炎症などの疾患に対する新たな予防法や治療法の開発に資する知見を得ることを目指す。

[1-2]研究の方法・経過

三細胞間タイトジャンクションの形成機構については、研究代表者がこれまでの研究で同定した三細胞間タイトジャンクションに局在するトリセルリン (Tricellulin) 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を樹立した。また、対照として、二細胞間タイトジャンクションに局在するオクルーディン (Occludin) に TurboID を融合したキメラ遺伝子を安定発現す

る上皮細胞株も樹立した。これらの細胞を用いて、近接ビオチン化反応を利用し、ビオチン化されるタンパク質群の網羅的同定を行った。この解析には、小迫教授が開発した Tamavidin 2-REV を用いたビオチン化ペプチドの精製によるプロテオーム解析を適用した。

上皮バリア機能を動的に制御する分子機構については、細胞間接着装置に局在するタンパク質リン酸化酵素が関与すると仮説を立てた。そこで、細胞間接着装置に集積するタンパク質リン酸化酵素 Kinase X をノックアウトした細胞株を樹立し、TMT 標識による網羅的比較定量リン酸化プロテオーム解析を実施した。本解析は、小迫教授に行っていただき、Kinase X の発現の有無によるリン酸化レベルの変動を受けるタンパク質群を同定した。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

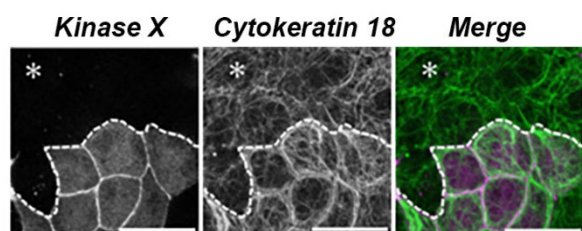
三細胞間タイトジャンクションの形成機構に関して、トリセルリンに近接する分子群の同定を目的とし、近位依存性ビオチン化法を用いた解析を実施した。

具体的には、トリセルリンに TurboID を融合したキメラ遺伝子の安定発現株および、オクルーディンに TurboID を融合したキメラ遺伝子の安定発現株を用い、これらの細胞におけるビオチン化ペプチドフラグメントを定量的に比較した。その結果、トリセルリンに近接する分子群のリストアップに成功した。

さらに、同定した候補分子群に GFP タグを付加し、上皮細胞株に発現させることで、それら

の細胞内局在を解析した。その結果、三細胞接着部位に集積する新規分子群を同定することに成功した。現在は、これらの分子群の機能解析を進めている。

また、上皮バリア機能の動的制御に関与する分子機構の解析のため、細胞間接着装置に局在するタンパク質リン酸化酵素 Kinase X をノックアウトした細胞株を樹立し、網羅的リン酸化プロテオーム解析を実施した。この解析により、野生型上皮細胞と比較して有意にリン酸化レベルが低下するタンパク質群を同定した。



Kinase X をノックアウトした上皮細胞は中間径フィラメントの配向異常を示す。スケールバーは 20 μm 。

Kinase X をノックアウトした上皮細胞株は、上図に示すように、中間径フィラメントの配向異常という表現型を示した。このことから、Kinase X はデスモゾームや中間径フィラメントに結合する分子をリン酸化する可能性が示唆された。実際に、網羅的リン酸化プロテオーム解析の結果、Kinase X ノックアウト細胞では、デスモゾームの構成要素および中間径フィラメントの制御に関与する分子群のリン酸化レベルが変動していることが明らかとなった。

今後、リン酸化プロテオーム解析の結果をさらに詳細に検討することで、タンパク質リン酸化酵素を介した細胞接着装置の動的制御機構の全貌を解明することを目指す。

[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の病態発症に関与することが知られている。現在の医療においては、異物の侵入によって惹起される免疫細胞の活性化を免疫抑制剤で抑制する治療戦略が主に用いられている。しかしながら、病態の本質は上皮細胞のバリア破綻にあり、その発症メカニズムの解明が重要である。具体的には、なぜ患者では上皮細胞のバリアが破綻

するのか、また健常者においてはどのような修復機構が上皮バリアの恒常性維持に寄与しているのかを明らかにする必要がある。

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 1999 年に同定されて以降、20 年以上にわたる研究にもかかわらず、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確立されていない。本共同研究の成果を踏まえて、今後は、上皮バリアに関与する新規分子群をプロテオミクス解析により同定し、それらの機能解析を進めることで、上皮バリア破綻を基盤とする慢性炎症に対する新たな治療標的の同定を目指す。

【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

本共同研究において、トリセルリンの TurboID 解析の結果に基づき、三細胞間接着装置に局在する分子群を新規に同定することに成功した。さらに、これらの分子群の機能解析を進めることで、タイトジャンクションのバリア破綻に起因する慢性炎症などの疾患に対する新たな予防法や治療法の開発につなげることを目指す。また、細胞接着装置に局在する Kinase X の解析から、上皮細胞における中間径フィラメントの配向に関する新たな制御機構の存在が明らかとなった。これらの研究成果については、今後、着実に論文化し、発表を進める予定である。

今後の課題として、細胞間接着の形成機構の解明をさらに進めるため、Ca スイッチアッセイを用いた解析を実施する。特に、細胞接着装置の形成過程において、各段階でどのような過渡的な分子複合体が形成されるのかを詳細に検討する。