

ニッポン火腿の未来財団 2020 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	消化管上皮細胞のタイトジャンクションの人為的強化法の開発
フリガナ	イケノウチ ジュンイチ
代表者名	池ノ内 順一
所属機関 (機関名) (役職名)	九州大学 大学院理学研究院 教授
本助成金による 発表論文, 学会発表	<ul style="list-style-type: none"> ・ 第 72 回日本細胞生物学会 池ノ内順一 「上皮細胞の接着形成過程におけるアドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションの相互制御」 ・ 第 72 回日本細胞生物学会 長 佑磨、池ノ内順一 「上皮細胞における Tricellular Tight Junction の形成機構」

研究結果要約

消化管の上皮細胞は、食物中の糖やアミノ酸を吸収するという役割に加えて、腸管の細菌や食事に由来する抗原性の高いタンパク質の侵入を防ぐバリアとしての重要な役割を担っています。上皮細胞のバリア機能を担う構造は、タイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置です。タイトジャンクションの機能の低下は、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症の病態を引き起こします。また、乳児が卵などの食べ物を早期に摂取すると、食物アレルギーを発症するのは、乳児の腸管上皮細胞のタイトジャンクションが未成熟であることが原因だと考えられています。このように上皮細胞のタイトジャンクションは、食物アレルギーを予防する上で重要な細胞膜構造ですが、タイトジャンクションのバリア機能がどのように調節されているかについては、殆ど明らかになっていません。

タイトジャンクションを構成する主要な細胞接着分子は、クローディンと呼ばれる 4 回膜貫通タンパク質です。私たちの研究室では、クローディンのリン酸化の役割 (Shiomi et al. Sci Rep 2015) やタイトジャンクション領域に豊富に存在する脂質、コレステロールの役割 (Shigetomi et al. J Cell Biol 2018) など、タイトジャンクションのバリア機能の制御に関わる新たな分子機構の解析を進めてきました。本研究では、食物アレルギーを予防する上で重要なタイトジャンクションのバリア機

能の制御機構の解明を行いました。

研究目的

消化管の上皮細胞は、糖やアミノ酸の吸収という機能に加えて、細菌や食事に由来するタンパク質抗原など、感染性微生物や食物アレルギーの体内への侵入を防ぐバリアとして機能する。上皮細胞のバリア機能を担う細胞膜構造はタイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置である。1999年にタイトジャンクションを構成する主要な膜タンパク質としてクローディンが同定されて以降、タイトジャンクションのバリア機能を分子レベルで解析できるようになった。例えば、炎症性腸疾患やアトピー性皮膚炎などの慢性炎症では、クローディンの発現が低下していることなどが報告されている。また、乳幼児期に卵などの抗原性の高い食物を与えることによって食物アレルギーの発症が惹起されるのは、乳幼児の消化管上皮細胞のタイトジャンクションが十分に形成されていないことが原因であることが報告されている。私たちの研究グループでは、これまでタイトジャンクションを構成するタンパク質や脂質の研究に取り組み、タイトジャンクションの形成メカニズムについて研究を進めてきた。タイトジャンクションを構成する主たる細胞間接着分子はクローディンであるが、クローディン遺伝子の発現量を単純に増加させるだけでは、タイトジャンクションのバリア機能を増強することができず、タイトジャンクションのバリア機能を制御する分子機構はまだまだ不明である。本研究ではこれまでの知見や研究材料のアドバンテージを活かし、消化管上皮細胞のバリア機能の人為的な増強法の開発に取り組み、食物アレルギーの予防や治療に資する知見を得ることを目的とした。

研究計画及び研究手法

私たちの研究グループでは、以前の研究において、タイトジャンクションの機能強化剤のスクリーニングを行い、これまでにクローディンの mRNA 発現量に影響を与えることなく、タイトジャンクションの形成を促進する化合物

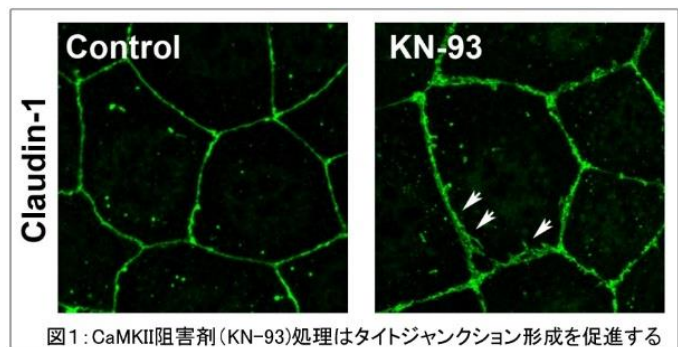
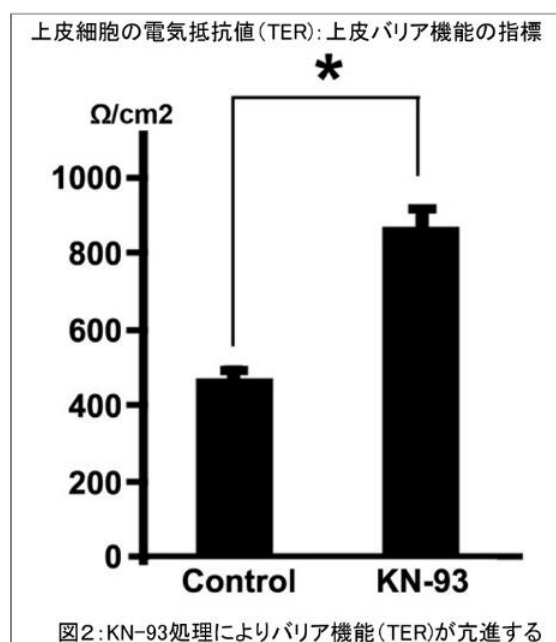


図1: CaMKII阻害剤(KN-93)処理はタイトジャンクション形成を促進する

としてカルモジュリン依存性キナーゼ CaMKII 阻害剤 (KN-93) を同定した¹⁾。

CaMKII 阻害剤 KN-93 を上皮細胞に処理すると、
図 1 に示すように、Claudin-1 が細胞間接着部位に集積する領域が拡大する (図 1 矢印)。このことは、タイトジャンクションの形成領域が増大していることを示唆する結果である。このような形態学的な変化のみならず、KN-93 処理した細胞において、タイトジャンクションのバリア機能の機能的評価に用いられる上皮細胞シートの電気抵抗値 (Trans epithelial Electrical Resistance ; TER) を測定すると、対照の上皮細胞に



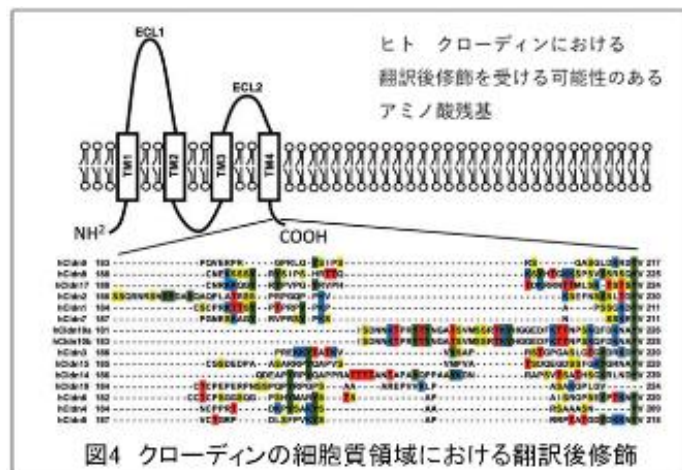
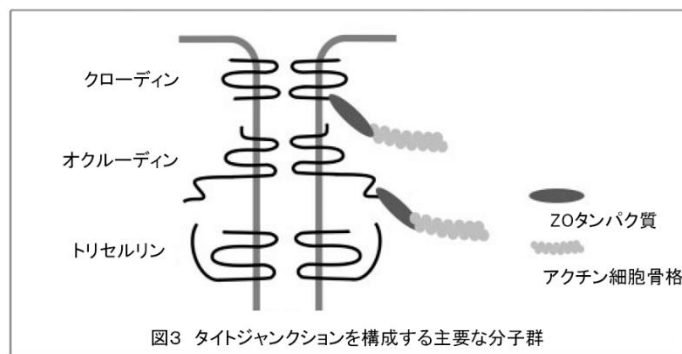
比べてタイトジャンクションのバリア機能が大幅に上昇していることが明らかになった (図 2)。

CaMKII は脳における役割が詳しく解析されているのに対し、タイトジャンクションに対する作用は殆ど明らかにされていない。また、KN-93 には細胞毒性があることが知られており、KN-93 自体を食物アレルギーの予防や治療の薬としてそのまま使うことができない。このため、CaMKII シグナル伝達経路がどのようにタイトジャンクションの形成を促進するのかを明らかにすることができれば、食物アレルギーを予防・治療する新たな方法論の確立につながると思った。

近年、タイトジャンクションを構成する主要な細胞接着分子クローディンは、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが報告されている²⁾。そこで、KN-93 によるタイトジャンクション領域の拡大とバリア機能の亢進には、クローディンのリン酸化が関与している可能性が考えられた。マウス乳腺由来培養上皮細胞 EpH4 細胞を用いて、KN-93 処理によってクローディンのリン酸化状態の変化が惹起されるか否かを検討し、KN-93 によるタイトジャンクション形成促進におけるリン酸化修飾の関与を検討した。

結果と考察

CaMKII 阻害剤 KN-93 は細胞質に存在する CaMKII キナーゼの阻害剤であるが、これまでタイトジャンクションとの形成について研究されたことはなく、図1 および図2 のようなタイトジャンクションの増強効果をもたらす機序は全く不明である。タイトジャンクションが体内からの水分の蒸散を防ぎ皮膚の保湿に重要な構造であること、また外界からのアレルギーや病原菌の侵入に対するバリアであることを考えると、CaMKII によるタイトジャンクションの形成が促進され



る分子メカニズムの詳細を解明することは重要であると考え、分子メカニズムに関する検討を行った。

タイトジャンクションを構成する主要なタンパク質として、図3のような分子群が既に知られている。膜タンパク質のクローディン、オクルーディン、トリセルリン、さらにこれらの膜タンパク質を細胞質側から裏打ちする ZO タンパク質が挙げられる。特に、クローディンをノックアウトするとタイトジャンクションが消失することから、クローディンがタイトジャンクションの主たる細胞接着分子であると考えられる。また、図4に示すように、クローディンの細胞質領域のアミノ酸残基には、リン酸化やユビキチン化をうけるアミノ酸が多く含まれている。このような観点から、KN-93 処理がクローディンのタンパク量や翻訳後修飾に影響を及ぼすのではないかと仮説を立てた。

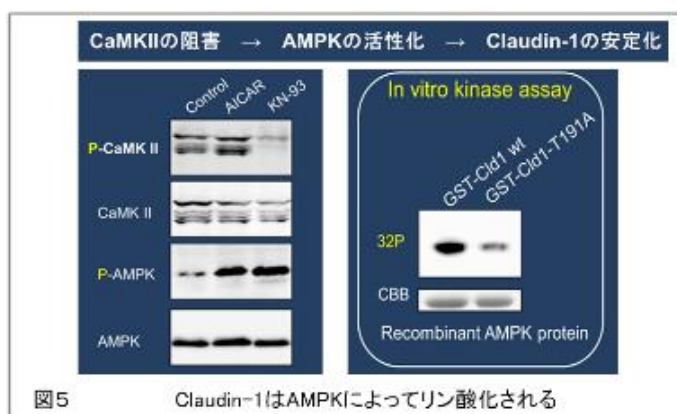
まず、KN-93 で上皮細胞を処理した際に Claudin-1 のタンパク量が増加するか否か検討をウエスタンブロットにより行った。しかしながら KN-93 の処理によって Claudin-1 のタンパク量は変化していなかった。しかしながら、GFP-Claudin-1 を発現する L 細胞を用いて KN-93 で処理したとき

に、GFP-Claudin-1 のバンドが 2 本に分離し、特に高分子量側のバンドが顕著に減弱していることを見出した。そこで、高分子量側のバンドに相当する Claudin-1 のバンドは、何らかの翻訳後修飾を受けたものである可能性を考えて、Claudin-1 の細胞質領域に存在するすべてのセリン・スレオニンアラニンに置換した変異体を作製した。191 番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体 GFP-Claudin-1 (T191A) では、高分子量側のバンドしか出現しないことを見出した。さらに、T191A の非リン酸化型の変異株が高分子量側に移動する原因として、189 番目のリジンが恒常的にモノユビキチン化を受けていることがわかった。すなわち 191 番目のスレオニンのリン酸化状態によって、189 番目のリジンのユビキチン化状態が変化しており、KN-93 で処理した細胞では、191 番目のスレオニンのリン酸化が亢進することによって、モノユビキチン化される量が減少することが明らかになった。

上述の結果から、KN-93 で処理した細胞では、Claudin-1 の 191 番目のスレオニンがリン酸化されることによって、モノユビキチン化される Claudin-1 が減少することによって、余剰の Claudin-1 が形質膜に蓄積した結果、タイトジャンクションの形成が促進されるのではないかと考えられる。

次に、KN-93 処理によって Claudin-1 のリン酸化が亢進する理由について検討を行った。その結果、図 5 に示すように、KN-93 で処理した細胞においては、AMP-activated protein kinase (AMPK) が活性化していることを見出した。さらに、AMPK によって、Claudin-1 がリン酸化されることを見出した。またこのようなリン酸化による制御は、Claudin-1 のみならず、他の Claudin のアイソフォームにおいても保存されていることを見出した (論文未発表)。

以上の結果から、CaMKII キナーゼの阻害によって、AMPK が活性化し、タイトジャンクションを構成する細胞接着分子クローディン (特に Claudin1 や Claudin3 のアイソフォーム) をリン酸化



することによって、タイトジャンクションの形成が促進される可能性が明らかになった。

今後は、これらのクローデインのリン酸化がどのようにして、タイトジャンクション構造の形成につながるかを明らかにすることが重要である。タイトジャンクションは、クローデイン同士が重合することによって形成されるため、クローデインのリン酸化修飾によって立体構造の変化が惹起されて、重合が促進される可能性が考えられる。あるいは別の可能性として、クローデインに対する裏打ちタンパク質である ZO タンパク質がクローデインの重合化に関わることが知られているため^{3) 4)}、クローデインのリン酸化修飾が ZO タンパク質との相互作用に影響を与えている可能性がある。今後はこれらの可能性について検証を進めていきたい。

本研究助成によって得られたクローデインとタイトジャンクションに関する知見の一部については、2020年度に日本細胞生物学会にて発表を行った。

・第72回日本細胞生物学会 池ノ内順一

「上皮細胞の接着形成過程におけるアドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションの相互制御」

・第72回日本細胞生物学会 長 佑磨、池ノ内順一

「上皮細胞における Tricellular Tight Junction の形成機構」

今後は、これらのクローデインの翻訳後修飾によるタイトジャンクションのバリア機能の制御機構に関する知見を論文発表できるように引き続き解析を進めていく。

また、クローデインのリン酸化の意義に加えて、本研究によって明らかになった CaMKII キナーゼ阻害によって AMPK が活性化する分子機構も詳細は不明であり、今後の研究において明らかにする必要がある。既に他の生命現象に於いて知られている CaMKII キナーゼの既知の標的分子が、AMPK の活性化に関与していないかを調べることによって、CaMKII キナーゼから AMPK の活性化につながる一連のシグナル伝達経路を明らかにしたい。また、CaMKII キナーゼ阻害剤で処理し

た細胞を用いてリン酸化プロテオーム解析を行い、CaMKII キナーゼ活性に依存してリン酸化されるタンパク質をコードする遺伝子をリストアップし、タイトジャンクションの制御に関わる新たな遺伝子の探索を進めていきたい。

今後の研究活動について

本助成研究によって、私は、CaMKII キナーゼの阻害剤 KN-93 で処理した際にタイトジャンクションの形成が亢進する理由として、CaMKII キナーゼの阻害が AMPK の活性化を促し、AMPK がタイトジャンクションを構成する細胞接着分子であるクローデインの複数のアイソフォームをリン酸化することによって、タイトジャンクションの形成を促進するという知見を得た。

KN-93 は細胞毒性が高く、食物アレルギーを防ぐためのタイトジャンクションのバリア機能増強剤として利用することはできないが、CaMKII キナーゼ経路の下流で働く分子を同定することができればその活性化もしくは不活性化によってタイトジャンクションのバリア機能を制御することが可能になる。その観点では、本助成研究で同定した AMPK やクローデインのリン酸化酵素、あるいはクローデインの脱リン酸化酵素を今後同定することで食物アレルギーに対する新たな予防法や治療法の開発につながることを期待できる。

上皮細胞のバリア機能を人為的に向上させることができれば、食物アレルギーのみならず、アトピー性皮膚炎や潰瘍性大腸炎などのバリア不全によって起こる慢性炎症病態の治療法の確立にも貢献できる⁵⁾。今後も、CaMKII-AMPK-クローデイン経路によるタイトジャンクションの形成機構を明らかにすることによって、上皮バリア機能の人為的制御を目指していきたい。

参考文献

- 1) Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci Rep.* 2015 18;5:13262.
- 2) Shigetomi K, Ikenouchi J. Regulation of the epithelial barrier by post-translational modifications of tight junction membrane proteins. *J Biochem* 2018 Apr;163(4):265-272.
- 3) Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T,

Tsukita S, Furuse M, Tsukita S. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 2006 Aug;126(4):741-54.

4) Beutel O, Maraspini R, Pombo-García K, Martin-Lemaitre C, Honigsmann A. Phase Separation of Zonula Occludens Proteins Drives Formation of Tight Junctions. *Cell* 2019 Oct;179(4):923-936.

5) Samadi N, Klems M, Untersmayr E. The role of gastrointestinal permeability in food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2018 Aug;121(2):168-173.

以上