

タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路の解明

九州大学理学研究院生物科学部門

池ノ内 順一

Epithelial cells define the boundary between the outside and the inside of our body by constructing the diffusion barrier. Tight junctions (TJs) of epithelial cells function as barriers against invasion of harmful microorganisms into the human body and free diffusion of water or ions from the body. Therefore, formation of TJs has to be strictly controlled in epithelial cells. However, the molecular mechanisms governing this regulation are largely unknown. In this study, we identified Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) as a regulator of the barrier function of TJs. CaMKII inhibition led to enlargement of TJ-areas and up-regulation of the barrier function. CaMKII inhibition induced excess TJ formation in part by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and subsequent phosphorylation of claudin-1. As up-regulation of epithelial barriers is essential for the prevention of chronic inflammatory diseases, the identification of CaMKII as a modulator of TJ function paves the way for the development of new drugs to treat these diseases.

1. 緒言

私たち多細胞生物のからだは、数兆個の細胞から構成されており、細胞同士はタイトジャンクションと呼ばれる細胞接着装置によって密に結合している。タイトジャンクションを構成する細胞接着分子として、4回膜貫通タンパク質のClaudinが同定された。しかしながら一方で、タイトジャンクションの形成がどのような仕組みで制御されているかについては、殆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形成の分子メカニズムを明らかにすることにより、皮膚のタイトジャンクションの形成促進を可能とする化粧品・外用薬・医薬品の開発の基礎となる知見を得ることを目的としている。

タイトジャンクションは、上皮細胞や血管内皮細胞などの細胞が持つ細胞接着装置であり、特に皮膚においては、タイトジャンクションは、体内からの水分の蒸散を防ぐ上で必須の構造である。皮膚の上皮細胞が持つタイトジャンクションを構成する膜タンパク質Claudin-1をノックアウトしたマウスでは、水分が蒸散して、生後すぐに脱水を呈する¹⁾。これまで皮膚において保湿を担うのは、角質のセラミド層であるとされていたが、上記の知見は、タイトジャンクションもセラミド層と同様に皮膚の保湿において重要な役割を果たすことを意味している。従って、タイトジャンクションのバリア機能を強化することは、保湿効果を高めることが期待できる。

またClaudin-1の発現が低下したマウスでは、アトピー性皮膚炎に類似した症状を示すことが近年明らかになった²⁾。このことは、皮膚顆粒層に存在するタイトジャンクションが外来抗原に対するバリアとして機能し、タイトジャンクションの破綻が慢性炎症の原因になっていることを示唆する。

このようにタイトジャンクションやその主たる構成因子であるClaudinが生理的なバリアとして機能し、その破綻が病態発症につながるということが明らかになった。しかしながら、タイトジャンクションの形成がどのように制御されるかはこれまで全く明らかになってこなかった。タイトジャンクションの機能を人為的に制御することは医学的に重要な試みであるが、Claudinタンパク質の発現量を人為的に制御するだけでは不十分である。Claudin-1を過剰に発現しても余剰のタイトジャンクションは形成されない。私は、タイトジャンクションの形成に関わる分子機構を明らかにする目的で、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、タイトジャンクションの形成を促し、上皮細胞のバリア機能を亢進させるシグナル伝達経路の解明を試みた。

2. 方法

2. 1. 細胞培養

実験に用いたマウス唾液腺由来培養上皮細胞であるCSGI細胞は、最終濃度10% Fetal Bovine Serum (FCS)を添加したDMEMを用いて37℃、5% CO_2 で培養した。

2. 2. 蛍光抗体染色

顕微鏡観察に用いる細胞はφ35 mm glass-base dishesまたはφ15 mm カバーガラス上でコンフルエントになるまで培養した。これを2% PFA/PBS (-)で10分間固定処理を行い、続いて50 μg/mL Digitonin/PBS (-)を用いて10分



Elucidation of molecular mechanisms involved in the formation of tight junction

Junichi Ikenouchi

Kyushu University Faculty of Science
Department of Biology

間透過処理を行った。次いで、1% BSA/PBS (-)を加え15分間ブロッティング処理を行った。一次抗体を1% BSA/PBS (-)に適切な濃度で希釈したものを加え1時間、その後、同様に希釈した二次抗体を加え30分間静置し、よく洗浄を行ってから観察した。

2. 3. Western Blotting

ウエスタンブロッティング用に作製したサンプルをSDS-PAGEにより分離後、ウェット法によりニトロセルロース膜に転写した。転写した膜を5%スキムミルク/PBS (-)に浸し、室温で30分間振盪しブロッティングした。続いて一次抗体を5%スキムミルク/PBS (-)に適切な濃度で希釈したものを加え1時間、その後、5%スキムミルク/PBS (-)に1/2000に希釈した二次抗体を加え30分間室温で振盪した。その後PBS (-)で30分間振盪洗浄し、Super Signal west Dura 発色試薬を用いて検出した。

2. 4. 経上皮電気抵抗値(TER)の測定

CSG1細胞を12 wellのトランスウエル (Corning) に細胞数が 1×10^6 個になるように播種し、2日ほど培地を交換してコンフルエントになるまで培養した。培養後、電気抵抗値を測定した。

3. 結 果

3. 1. タイトジャンクションの形成を促進する化合物の同定

タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路を同定する目的で、標的の明らかになった小分子化合物のライブラリーを用いて、上皮細胞のタイトジャンクション領域を拡大する化合物を探索した。具体的には、タイトジャンクションの構成分子であるClaudin-1にGFPを融合させたGFP-Claudin-1遺伝子を安定的に発現するL線維芽細胞を樹立し、化合物の添加によって、細胞間接着部位にClaudin-1の集積を促す化合物をスクリーニングした。その結果、カルシウム-カルモジュリン依存性キナーゼII (CaMKII) の阻害剤であるKN-93で処理すると、Claudin-1-GFPの細胞接着部位への集積が顕著に促進されることを見出した(図1)。

次に、KN-93によるタイトジャンクションの形成促進効果が、上皮細胞でも観察されるか検討を行った。マウスの唾液腺由来の培養上皮細胞であるCSG1細胞にKN-93を添加しClaudin-1に対する抗体で固定染色を行った。その結果、培養上皮細胞においてもClaudin-1が細胞接着部位のラテラル膜に過剰に集積する様子が観察された(図2)。

さらにこのようなClaudin-1のラテラル膜の集積がタイトジャンクション構造の拡大を反映しているかを確かめるために、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察を行っ

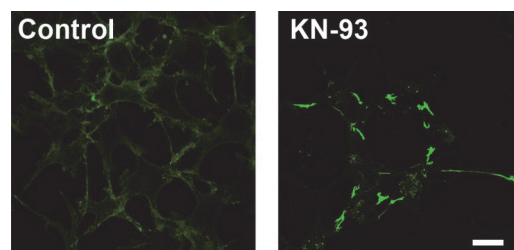


図1 GFP-Claudin-1を安定発現するL線維芽細胞にKN-93を最終濃度が $10\mu\text{M}$ になるように添加した。DMSOを培地に添加した対照群に比べてKN-93を培地に添加した細胞ではGFP-Claudin-1が顕著に細胞間接着部位に集積している。スケールバーは、 $5\mu\text{m}$ 。

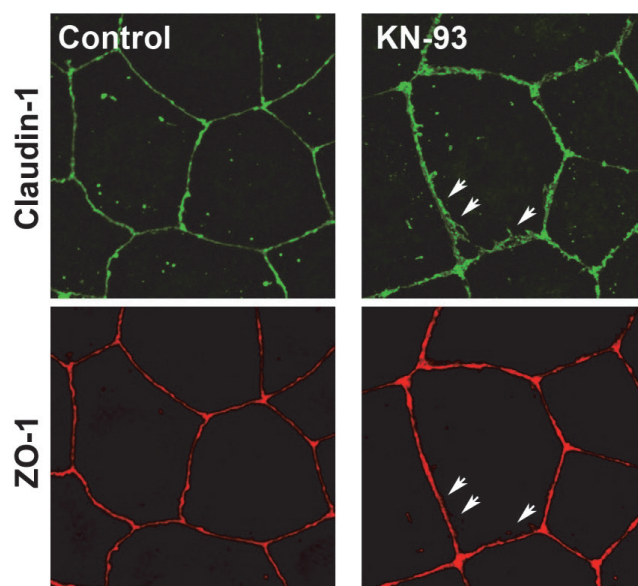


図2 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞にKN-93を最終濃度が $10\mu\text{M}$ になるように添加し、固定後、抗Claudin-1抗体と抗ZO-1抗体で二重染色した。DMSOを培地に添加した対照群に比べてKN-93を培地に添加した細胞ではClaudin-1の細胞間接着部位への集積がラテラル膜まで拡大している(白矢印)。Claudin-1に結合する裏打ちタンパク質のZO1の染色は拡大していない。

た。その結果、ラテラル膜に余剰なタイトジャンクションストランドが形成されていることを確かめた(図3)。

このことから、KN-93処理によってタイトジャンクションの形成量が拡大するということが明らかになった。

KN-93の効果について、上記の形態学的な評価に次いで、上皮細胞のバリア機能に対する評価を行った。経上皮電気抵抗測定 (Trans-epithelial electrical resistance : TER) は、上皮細胞シートに一定の電圧をかけた際に流れる電流を測ることにより、タイトジャンクションを介して上皮細胞の間隙を通るイオンの通しやすさを測定する。TERが高いほど、イオンを通しにくく、したがって上皮細胞のバリア機能が高い状態であると言える。KN-93を培地に添加した上皮細胞では対照群に比べて高いTER値を示すことから、KN-93の添加によってタイトジャンクションのバリア機能

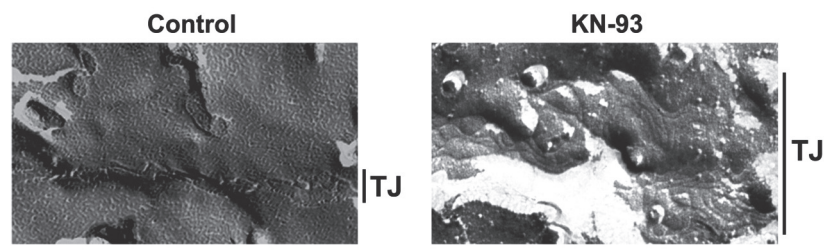


図3 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞に KN-93 を最終濃度が $10\mu\text{M}$ になるように添加し、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察を行った。DMSO を処理した群に比べて、タイトジャンクションの形成領域が拡大している様子が観察された。スケールバーは、200 nm。

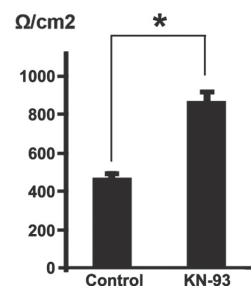


図4 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞に KN-93 を最終濃度になるように添加し、TER の測定を行った。KN-93 で処理した細胞では TER が有意に上昇した。

が増加していることが明らかになった(図4)。

3. 2. KN-93 処理による Claudin の翻訳後修飾

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、図に示したような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ゲン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。

まず、KN-93 で CSG1 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・スレオニンを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。

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、過剰なタイトジャンクションが形成されと考えられる。上記の内容は全く新しいタイトジャンクション形成の制御機構であるため、論文報告を行った³⁾。

このように Claudin-1 のユビキチン化による制御が、タイトジャンクションの動的な制御に関わることを明らかにすることができた。現在は、Claudin-1 のユビキチン化に関わる酵素の探索を進めている。

4. 考 察

皮膚の上皮細胞が持つタイトジャンクションは水分の恒常性を維持する必須の細胞膜構造である。保湿は皮膚の質感に大きな影響を与える要素である。一方で、皮膚のタイトジャンクションは、我々の体と外界を分け隔てる構造の実体であり、皮膚からの薬剤の吸収を障害する。このようなタイトジャンクションの機能を強化もしくは減弱させるシグナル情報伝達経路を同定し、人体への安全性の高い阻害剤や機能増強剤を開発することに成功すれば、それらを化粧品に添加すること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となり、新しい化粧品の機能性成分に利用可能であると考えている。本研究で同定した CaMKII 阻害剤はそのまま化粧品など人体に使用することはできないが、CaMKII 阻害によるタイトジャンクションの形成促進の分子機構をさらに詳細に解析することによって、薬剤によって人為的に上皮バリア機能を強化させることができるのではないかと考えられる。近年、ヒトにおいて、皮膚の Claudin-1 の遺伝子多型 (SNP) とアトピー性皮膚炎の発症の関連に関する論文報告が為された⁴⁾。上皮バリアの破綻を原因とする慢性炎症の治療に向けて、さらに上皮バリアの制御に関わる分子機構の解明を引き続き目指していきたい。

(引用文献)

- 1) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. : Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156, 1099-111., 2001
- 2) Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. : CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci Rep.*, 5, 13262, 2015
- 3) Yu HS, Kang MJ, Kwon JW, Lee SY, Lee E, Yang SI, Jung YH, Hong K, Kim YJ, Lee SH, Kim HJ, Kim HY, Seo JH, Kim BJ, Kim HB, Hong SJ. : Claudin-1 polymorphism modifies the effect of mold exposure on the development of atopic dermatitis and production of IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 135, 827-30. 2015
- 4) Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S. : Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, E4061-8. 2016