

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成 19 年度採択分

平成 22 年 4 月 14 日現在

研究課題名（和文） **上皮細胞系の統合的理解を目指した
細胞接着・細胞骨格研究の新展開**
研究課題名（英文） A novel approach to cell adhesion/cytoskeleton
research for exploring the epithelial cell system
研究代表者
氏名 **月田 早智子 (TSUKITA SACHIKO)**
大阪大学大学院・生命機能研究科/医学系研究科・教授



推薦の観点：学際性、創造性、革新性の高い学術研究分野を創成する研究
研究の概要：上皮組織を構成する上皮細胞は多細胞生物において、体表面をおおうシート構造を形成して、体内のコンパートメントを形成する。コンパートメントごとに特異な内部環境が維持される。そのために上皮細胞シートの物性やものの透過性などの特性は生体の部位ごとに異なると思われるが、その多様性の分子的、機能的基盤は必ずしも明らかではなく、その解明は、上皮細胞の機能異常に起因する多くの病態の理解と対策に重要である。本研究において先進的プロテオミクスで新たに同定した新規細胞間接着関連因子のうちの2種類(①②)と、従来の同定を進展させるべく、claudins (③), IQGAP3 (④), Odf2 (⑤)についての機能解析を行った。これらが、各々、①上皮細胞シートのリモデリング、②細胞の大きさ、③細胞間バリアーによる生体内ホメオスタシスの維持、④細胞の増殖、⑤細胞間接着を基盤とした細胞の極性形成、において大きな役割を果たしていることを明らかにすることができ、細胞間接着分子に起因した上皮細胞の多様性の分子基盤に対する新しい局面を提示することができたものと思われる。今後、③-⑤の関連で作製したノックアウトマウスにおいて病態モデルを確立することも目指す。

研究分野：細胞生物

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：上皮細胞、細胞間接着、細胞間バリアー、細胞骨格、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ホメオスタシス維持のために、機能的な仕切りを形成するという上皮細胞シートの役割は、多細胞生物の生存にとってきわめて本質的である。上皮細胞シートは、生体内の場所と時間に相応しい多様な特性を持つことで、生体に必要な微小環境の提供と機能の発揮を行う。しかしながら、「上皮細胞シート多様性の分子基盤」についての研究は充分とはいえない状況であった。

2. 研究の目的

上皮組織は、私たちの体の中で大きな体積を占める。上皮組織を構成する上皮細胞は多細胞生物において、体表面を覆うシート構造を形成して、体内のコンパートメント化とホメオスタシスに本質的な機能を担う。この上皮細胞シートを形成するために、個々の上皮細胞は相互に強く機械的に接着する。上皮細胞シートが機能的な隔壁としての役割を果たすために、上皮細胞は明瞭な極性を形成し、細胞内は内腔側のアピカル膜、細胞接着装置の膜、および側面・基底側膜に分化する。こうした上皮細胞シートの「多様な機能」について、主に生理学的手法による測定技術や

イメージングの技術を取り入れながら、上皮細胞シートの特性とその分子機構を明らかにしていくことを目的とする。

3. 研究の方法

上皮細胞シートを構築する上皮細胞の特性について分子レベルでアプローチするための鍵が、細胞間接着装置・アピカル膜・細胞骨格複合体にあると考え、当研究室で開発した精製法により調製した当複合体より新規に同定した細胞間接着関連因子に注目する。培養細胞およびマウス個体を用いて、上皮細胞シートでの機能的役割について、分子生物学的、生理学的、細胞生物学的、個体機能解析学的手法で、解析を進める。

4. これまでの成果

研究の概要で掲げた4課題について、①-⑤の5種類の新規細胞間接着関連因子の同定あるいは機能解析を行ってきた。

1) 先進的プロテオミクスによる多様な分子群の解析：細胞間接着装置・アピカル膜・細胞骨格複合体より同定した機能未知の細胞間接着関連因子の解析を進めた。細胞間接着装置を構成する新規因子として4種の膜蛋白質および細胞骨格蛋白質 10 数種類を同定

したが、現実的にはそのなかの細胞骨格蛋白質2種(①②)でのみ良質な抗体を作製することができたため、それらについて培養細胞レベルでの解析を進めた。①は、カドヘリンに結合する上皮細胞シートのリモデリングに重要な RacGEF 結合性のシグナル因子であることが明らかになった。②については、ノックダウンすることにより上皮細胞の高さが減少するという効果が現れ、上皮細胞の高さを保持するシグナル経路を解析中である。

2) 上皮細胞間バリアー制御機構の解析: タイトジャンクションを構築する主要蛋白質クローディング(③)は大きなファミリーを形成するが、その動態を FRAP など で検討すると、いろいろな動態を示す可能性が明らかになった。また、ノックアウトマウスの解析から、生体内でのクローディングの機能は、単なる細胞間バリアーとしての機能を越えて、より巧妙であることが明らかとなった。

3) 細胞間接着装置・アピカル膜裏打ち骨格の機能解析: 細胞接着関連因子として IQGAP3(④)を同定した。この分子は、細胞増殖時に細胞間に局在する。静止期の細胞に過剰発現すると、増殖がみられる。分子細胞生物学的な解析から、IQGAP3は Ras を安定化することで Ras-MAP キナーゼ経路を介して細胞増殖を導くことが分かった。現在、ノックアウトマウスを用いた解析を始めており、がんの病態解析や治療方法の創出、組織幹細胞生物学への応用など、今後の発展が期待される。

4) アピカル膜の繊毛形成による上皮細胞の特性の制御: 一次繊毛の構築に重要な因子としての Odf2 (⑤)の機能について、ノックアウトマウスの作製と解析を目指した。細胞での解析では予想されなかった表現型も得られており、繊毛一般の疾患を対象とした機能解析の発展が期待される

以上のように、本学術創成研究では、上皮細胞間接着装置を中心に、上皮細胞シートの統合的な理解を目指し、広範な分子を標的とした解析を進めている。細胞間接着に起因した、上皮細胞の特性構築の基本原則と多様性について重要な所見が得られており、今後のさらなる発展につながると思われる。さらには病態解析という視点からも興味深く重要な展開が得られる可能性を見出している。

5. 今後の計画

前半で得られた広範囲に及ぶ知見や獲得された技術、整った設備、一緒に研究を育てて来た研究者の共通認識を基盤に、上皮細胞の統合的な理解に向けた収束を目指す。①②については上皮細胞シートのリモデリングという観点から斬新な境地がさらに開かれると思われる。分子細胞生物学的な解析がさらに高度なレベルで展開されるであろう。

③-⑤については、ノックアウトマウスの解析から、細胞間バリアーの巧妙な物質透過性の制御と代謝の関係、その機能不全による病態解析や、生体再生、繊毛機能などの生体での役割などについて、特に、研究の総括/統合および疾患/創薬などへの応用を視野にさらに進める予定である。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

[主な発表論文]

Kunimoto, K., Nojima, H., Yamazaki, Y., Yoshikawa, T., Okanoue, T., and Tsukita, Sa. Involvement of IQGAP3, a regulator of Ras/ERK-related cascade, in hepatocyte proliferation in mouse liver regeneration and development. (2009) J. Cell Physiol. 220:621-631.

Tsukita, Sa., Yamazaki, Y., Katsuno, T., and Tamura, A. Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. (2008) Oncogene 27:6930-6938.

Yamazaki, Y., Umeda, K., Wada, M., Nada, S., Okada, M., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. ZO-1- and ZO-2-dependent integration of myosin-2 to epithelial zonula adherens. (2008) Mol. Biol. Cell 19:3801-3811.

Nojima, H., Adachi, M., Matsui, T., Okawa, K., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. (2008) Nature Cell Biol. 10:971-978.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. (2008) Mol. Biol. Cell 19:2465-2475.

Yamazaki, Y., Okawa, K., Yano, T., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. Optimized proteomic analysis on gels of cell-cell adhering junctional membrane proteins. (2008) Biochemistry 47:5378-5386.

Tamura, A., Kitano, Y., Hata, M., Katsuno, T., Moriwaki, K., Sasaki, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Noda, T., Furuse, M., Tsukita, Sh., and Tsukita, Sa. Megaintestine in claudin-15- deficient mice. (2008) Gastroenterology 134:523-534.

[その他]

朝日新聞 2008年7月21日朝刊
「腸のたんぱく質細胞分裂を促進」(IQGAP3に関する報道)

[ホームページ]

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/>