

論文内容の要旨

論文題目 トリセルラータイトジャンクションの構造形成を
 制御するキナーゼの同定と解析

氏名 中津大貴

上皮細胞シートは、上皮細胞間の密着結合によって形成され、上皮内外の物質やイオンの往来を制限的に制御する機能（バリア機能）の担い手である。タイトジャンクション (tight junctions: TJs) は、上皮細胞間の密着結合を生み出す構造体として報告され、複数の細胞膜貫通型タンパク質を中心に構成されることも近年の研究から明らかにされている。TJs は二細胞接着面に形成されるバイセルラータイトジャンクション (bicellular tight junctions: bTJs) と三細胞接着点に形成されるトリセルラータイトジャンクション (tricellular tight junctions: tTJs) という 2 つの異なるタイプを持ち、それぞれ異なるタンパク質によって構成される。bTJs の構成タンパク質としては、occludin や claudin などが、tTJs の構成タンパク質としては angulin-1/lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) や tricellulin などが報告されている。また、zona occludens (ZO) family に属するタンパク質が、TJs の裏打ち構造を形成することも明らかにされている。そして、構成タンパク質の発現や細胞内局在の攪乱による TJs の構造形成の異常が、上皮細胞シートのバリア機能不全を誘発し、個体発生直後の死亡や

様々な疾患の発症に繋がることが示唆されている。このように、TJs 構成タンパク質の発現や細胞内局在の適切化が、個体の生存や健康維持に必須であることが、徐々に明らかになりつつある。これに伴い、TJs を構成するタンパク質の発現や細胞内局在の制御メカニズムの研究は、近年急速に進んでいる。特にタンパク質のアミノ酸残基にリン酸基を付加する（リン酸化する）酵素であるプロテインキナーゼ（キナーゼ）による制御機構は、生命維持や疾患の発症との密接な関わりから、重要性が増加している。そして、キナーゼによるリン酸化が、bTJs や TJs 裏打ちを構成するタンパク質の細胞内局在や発現量の調節を介して、上皮細胞シートのバリア機能を調節することも明らかにされている。しかしながら、tTJs を構成するタンパク質の細胞内局在や発現の制御に、キナーゼがどのような形で関与するのかはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、tTJs を構成するタンパク質の細胞内局在や発現量を介して、tTJs の構造形成を制御するキナーゼの同定と解析を行った。

はじめに、マウス乳腺上皮由来癌細胞株である EpH4 細胞を用いて、tTJs の構成タンパク質である angulin-1/LSR の細胞内局在や発現量を調節するキナーゼの同定を行った。キナーゼの同定は、阻害剤や siRNA を用いてキナーゼの機能を抑制した時、蛍光で可視化した angulin-1/LSR の細胞内局在や蛍光強度（発現量）が、攪乱されるかを基準に行った。80 種類のキナーゼ阻害剤と 571 種類のキナーゼを標的とする 1713 種類の siRNA を用いた網羅的なスクリーニングの結果、angulin-1/LSR の細胞内局在や発現量を調節するキナーゼ候補として、c-Jun N-terminal kinase (JNK) family に属するキナーゼを得た。詳細な解析を行ったところ、JNK family に属する JNK1 又は JNK2 の発現抑制条件下では、angulin-1/LSR 及び tricellulin が tTJs から bTJs に拡散することが確認された。また、同条件下では、bTJs や TJs の裏打ちに属する claudin-3, ZO-1, ZO-2 の細胞内局在や発現量及び、angulin-1/LSR や tricellulin の発現量に大きな変化は確認できなかった。JNK family 全体の不活性化や JNK1

及び JNK2 の同時発現抑制では、単独での発現抑制時の細胞内局在異常に加えて、angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞質領域への拡散、angulin-1/LSR の発現量低下が確認された。これらの結果より、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs から bTJs への拡散の阻止に、JNK1 及び JNK2 が必須であることが示唆された。また、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs から細胞質への拡散及び angulin-1/LSR の発現量低下を、JNK1 及び JNK2 が互いに補完し合う形で、抑制していることが示唆された。

続いて、JNK1 及び JNK2 が angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在を制御するメカニズムの解析を行った。angulin-1/LSR は tricellulin の tTJs 特異的な局在化を促進する、タンパク質のリン酸化が構成タンパク質の TJs への局在化を調節する、という 2 点から、本研究では、まず、angulin-1/LSR のリン酸化を通じて、angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在制御が行われているかどうかを調べた。はじめに、バイオインフォマティクスによる予測と実験的な検証を行い、angulin-1/LSR の 288 残基目のセリン (S288) が、*in vitro* において JNK1 によって直接リン酸化されることを確認した。続いて、EpH4 細胞内で JNK1 が S288 依存的に angulin-1/LSR のリン酸化を亢進すること、angulin-1/LSR の S288 を、リン酸化修飾を受けないアラニンに置換したタンパク質 (angulin-1/LSR (S288A)) を発現させた EpH4 細胞では、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs から bTJs への拡散が増加することを確認した。これらの結果から、JNK1 が angulin-1/LSR の S288 の直接的なリン酸化を介して、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs から bTJs への拡散を阻止していることが示唆された。また、JNK2 は EpH4 細胞内での JNK1 による angulin-1/LSR の S288 のリン酸化に必須であり、JNK2 の機能低下は、同リン酸化の低下を介して、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs から bTJs への拡散を促進していることが示唆された。

続いて、JNK 以外のキナーゼによる、tTJs 構成タンパク質の細胞内局在及びタンパク質

発現量の、制御機構を解析した。ここで、キナーゼ阻害剤を用いたスクリーニングから、angulin-1/LSR の細胞内局在を特異的に制御することが確認された Apigenin 及び Tyrphostin 9 に注目した。そして、Apigenin 及び Tyrphostin 9 の主要な阻害標的である、Casein kinase 2 (CK2) 及び proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の活性抑制やタンパク質発現量低下が、angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在及びタンパク質発現量に与える影響を解析した。解析の結果、CK2 の活性阻害による JNK の活性低下を介した、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs への局在化の攪乱、及び angulin-1/LSR のタンパク質発現量の抑制が示唆された。また、Pyk2 のタンパク質発現量低下が、JNK の活性やタンパク質発現量に影響を与えない形で、angulin-1/LSR 及び tricellulin の tTJs への濃縮を阻害することも確認された。

最後に、JNK1, JNK2, Pyk2 の機能阻害による tTJs 構成タンパク質の細胞内局在の攪乱が、上皮細胞シートのバリア機能に与える影響を調べた。方法として、JNK1, JNK2, Pyk2 の発現抑制及び angulin-1/LSR (S288A) の発現が、バリア機能の指標である経上皮電気抵抗 (transepithelial electrical resistance: TER) に与える影響を解析した。その結果、JNK1, JNK2, Pyk2 の発現抑制又は angulin-1/LSR (S288A) の発現は、TER の上昇を促進するという結果を得た。これにより、tTJs の構成タンパク質の細胞内局在の攪乱による tTJs の構造形成の異常は、上皮細胞シートのバリア機能を増強することで、上皮内外に必要な物質やイオンの交換を阻害することが示唆された。

本研究では、JNK1, JNK2 及び Pyk2 が angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs への局在化の促進を介して、tTJs の構造形成を制御することを明らかにした。これらのキナーゼによる tTJs の構造形成制御が、生命維持や疾患の発症と密接に関わる上皮細胞シートのバリア機能を調節することも示唆した。本研究の結果は、tTJs の構造形成の制御メカニズムや生理的意義の解明を進める上で重要な知見になると期待できる。