

博士論文（要約）

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

中津大貴

目次

略語一覧	4
第1章 序論	6
1.1 タイトジャンクションの構成タンパク質と生理的な意義	6
1.2 TJs の構造形成の制御メカニズム	7
1.3 TJs 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	9
1.4 tTJs 構成タンパク質の細胞内局在とタンパク質発現量を制御するキナーゼ の探索	11
第2章 結果	13
2.1 tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を攪乱するキナーゼ阻害剤の探索	13
2.2 Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理による angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在及びタンパク質発現量の攪乱	15
2.3 tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を制御するキナーゼの推定	16
2.4 JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在と発現 量の調節	17
2.5 JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化 制御	19
2.6 Angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化による angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs への濃縮	23
2.7 Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理による JNK 活性の変化	25
2.8 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	26

2.9	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	26
2.10	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	26
2.11	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	26
2.12	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	26
第3章	考察と結論	27
3.1	JNK 機能阻害時の tTJs への angulin-1/LSR の局在化の攪乱	28
3.2	JNK 機能阻害時の tTJs への tricellulin の局在化の攪乱	31
3.3	JNK 機能阻害時の angulin-1/LSR のタンパク質量減少	31
3.4	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	32
3.5	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	32
3.6	結論	32
第4章	材料と実験方法	34
4.1	細胞培養	34
4.2	試薬	34
4.3	抗体	34
4.4	プラスミドと siRNA	36
4.5	プラスミドのトランスフェクション	38
4.6	siRNA のトランスフェクション	39
4.7	間接蛍光抗体法による細胞の染色と蛍光顕微鏡による観察	39
4.8	共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の検出	40
4.9	試験管内リン酸化反応	40
4.10	SDS-PAGE と Phos-tag SDS-PAGE	42

4.11 ウェスタンブロッティング法	43
4.12 Angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散の定量 .	43
4.13 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	44
4.14 統計解析	44
第5章 図表	45
第6章 参考文献	83
第7章 謝辞	94

略語一覽

- BSA: bovine serum albumin
- bTJs: bicellular tight junctions
- CK2: casein kinase 2
- Cl3: claudin-3
- CP: cytoplasmic domain
- DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
- DMSO: dimethylsulfoxide
- EC: extracellular domain
- ERK: extracellular signal-regulated kinase
- GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- GFP: green fluorescence protein
- GST: glutathione S-transferase
- IP: immunoprecipitation
- JNK: c-Jun N-terminal kinase
- LSR: lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
- MAPK8: mitogen-activated protein kinase 8
- MAPK9: mitogen-activated protein kinase 9
- MAPK10: mitogen-activated protein kinase 10
- PBS: phosphate-buffered saline
- PCR: polymerase chain reaction

- PDGFR: platelet-derived growth factor receptor
- P-JNK: phosphorylated JNK
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- PKC: protein kinase C
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- PVDF: polyvinylidene difluoride
- Pyk2: proline-rich tyrosine kinase 2
- SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
- siRNA: small interfering RNA
- SP: signal peptide
- TBS: tris-buffered saline
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- TJs: tight junctions
- TM: signal transmembrane domain
- tTJs: tricellular tight junctions
- YFP: yellow fluorescence protein
- ZO: zona occludens

第 1 章 序論

1.1 タイトジャンクションの構成タンパク質と生理的な意義

血管や乳管などの管腔や皮膚の表面を覆う上皮細胞シートは、上皮細胞間の密着結合によって形成され、上皮内外の物質の混合を制限的に制御する機能（バリア機能）を有している（Furuse & Tsukita 2006; Furuse 2009）。そして、上皮細胞シートの形成に必須な密着結合を生み出す構造体として、タイトジャンクション（tight junctions: TJs）の存在が近年報告された（図 1）（Farquhar & Palade 1963; Schneeberger & Lynch 1992）。TJs は、30 種類以上の多様な細胞膜貫通型タンパク質を中核として、細胞側面の頂端面近くに構成されることが知られている（Gunzel & Fromm 2012）。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 つの異なるタイプが存在することも、電子顕微鏡観察から明らかにされている（図 2）（Staehelin *et al.* 1969; Friend & Gilula 1972; Staehelin 1973; Wade & Karnovsky 1974; Walker *et al.* 1985; Ikenouchi *et al.* 2005）。bTJs は 1 回膜貫通型、3 回膜貫通型、4 回膜貫通型のタンパク質を主要な構成成分とし、構成タンパク質としては、claudin family や occludin などが知られている（表 1）（Ichikawa-Tomikawa *et al.* 2011; Gunzel & Fromm 2012）。tTJs は 1 回膜貫通型、4 回膜貫通型のタンパク質を主要な構成成分とし、構成タンパク質としては angulin-1/lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR), tricellulin などが知られている（表 1）（Iwamoto *et al.* 2014）。また、zona occludens (ZO) family に属する ZO-1, ZO-2, ZO-3 タンパク質が、TJs の裏打ち構造を形成し、アクチン骨格に TJs をアンカーリングする役割を果たすことが報告されている（図 2）（Stevenson *et al.* 1986;

Gunzel & Fromm 2012).

TJs の構造形成の特徴としては、構成タンパク質の組織特異性の高さが挙げられる (Rosenthal *et al.* 2012). 例えば、bTJs の構成タンパク質である claudin-10 は、表皮組織では高い発現量を示すが肺組織ではほとんど発現しない (Kast *et al.* 2012). 一方、同じ claudin ファミリーに属する claudin-18 は、肺組織で発現するが表皮組織ではほとんど発現しない (Kast *et al.* 2012). また、tTJs の構成タンパク質でも同様の報告がなされている。例えば、angulin-1/LSR は小腸組織では発現するが、膵臓組織、神経組織や眼組織では発現が確認できない (Higashi *et al.* 2013). 一方、同じ angulin ファミリーに属する angulin-2/ILDR1 は、膵臓組織では発現するが、小腸組織、神経組織や眼組織では発現せず、angulin-3/ILDR2 は、神経組織や眼組織では発現するが、小腸組織や膵臓組織では発現しない (Higashi *et al.* 2013).

TJs 構成タンパク質の発現や細胞内局在の異常は、当該タンパク質が発現する特定の組織の TJs の構造形成の攪乱を介して、上皮細胞シートのバリア機能不全を誘発する。この上皮細胞シートのバリア機能不全が、生体にとって致命的な影響や様々な疾患の誘発に繋がるとも併せて明らかにされている (Sawada *et al.* 2003; Furuse 2009). 例えば、血管系、消化管、肝臓、呼吸器などに関連したエンドトキシン血症、セリアック病、黄疸、喘息などの疾患とバリア機能不全との密接な関係や、上皮細胞シートのバリア機能破綻による、皮膚からの水分流出や脳関門からの低分子の流出といった致命的な影響が報告されている (Furuse *et al.* 2002; Nitta *et al.* 2003; Sawada *et al.* 2003).

1.2 TJs の構造形成の制御メカニズム

TJs の構造形成を介した上皮細胞シートのバリア機能制御は、大きく 2 つのメカニズム

に分けられる。1つは、TJs や TJCs の裏打ちを構成するタンパク質の発現量制御である。例えば、bTJs の構成タンパク質である occludin, claudin-1, claudin-2, claudin-4, claudin-7 の発現量の変化は、TJs の構造変化を介して上皮細胞シートのバリア機能を調節することが示唆されている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008)。また、tTJs の構成タンパク質である angulin-1/LSR や tricellulin の発現量抑制や過剰発現は、TJs の構造及び上皮細胞シートのバリア機能を攪乱することが報告されており (Ikenouchi *et al.* 2005; Krug *et al.* 2009; Kojima *et al.* 2010; Masuda *et al.* 2011; Higashi *et al.* 2013)、TJs 裏打ちの構成タンパク質である ZO-1 や ZO-2 の発現抑制でも上皮細胞シートのバリア機能の低下が報告されている (Umeda *et al.* 2006)。

もう1つは、TJs や TJCs の裏打ちを構成するタンパク質の細胞内局在の制御である。例えば、TJs や TJCs の裏打ちを構成するタンパク質である claudin-16 や ZO-1 のアミノ酸変異や欠失による細胞内局在の変化は、TJs の構造及び上皮細胞シートのバリア機能を攪乱することが示唆されている (Reichert *et al.* 2000; Ikari *et al.* 2010)。tTJs の構成タンパク質である tricellulin のアミノ酸変異による細胞内局在の変化も、tTJs の構造を破綻させることが明らかにされている (Nayak *et al.* 2013)。

TJs や TJCs の裏打ちを構成するタンパク質の発現量や細胞内局在、TJs の構造形成、上皮細胞シートのバリア機能の関係を繋ぐメカニズムについても解明が進められている。そして、構成タンパク質の発現量や細胞内局在の変化に伴う TJs と TJCs 裏打ちの構造形成阻害は、異なるメカニズムで上皮細胞シートのバリア機能を攪乱することが示唆されている。TJs の構造形成の阻害による上皮細胞シートのバリア機能攪乱のメカニズムは、以下の4段階の流れが提唱されている (Tsukita & Furuse 2000; Higashi *et al.* 2013; Nayak *et al.* 2013)。①TJs 構成タンパク質の発現量や細胞内局在の変化により、TJs に局在化する TJCs

構成タンパク質の存在量が増加する。②TJs 構成タンパク質の存在量の変化により、構成タンパク質間の相互作用によって形成されるホモポリマー及びヘテロポリマーの存在比や存在量が増加する。③TJs 構成タンパク質のホモポリマー及びヘテロポリマーを核とする TJs 構造形成が阻害される。④TJs 構造形成の阻害に伴い上皮細胞シートのバリア機能が攪乱される。一方、TJs 裏打ちの構造形成の阻害による上皮細胞シートのバリア機能攪乱のメカニズムは、以下の 4 段階の流れが提唱されている (Yu *et al.* 2010)。①TJs 裏打ちを構成するタンパク質の発現量や細胞内局在の変化により、TJs 構成タンパク質をアクチン骨格にアンカーリングする TJs 裏打ちの機能が阻害される。②アクチン骨格へのアンカーリングの阻害により TJs 構成タンパク質の細胞内局在が攪乱される。③TJs 構成タンパク質の細胞内局在の攪乱により TJs の構造形成が阻害される。④TJs の構造形成の阻害に伴い上皮細胞シートのバリア機能が攪乱される。

また、TJs を構成するタンパク質の細胞内局在や発現量と、TJs の構造及び上皮細胞シートのバリア機能の関係は組織や細胞によって異なることも示唆されている。例えば、マウス乳腺上皮細胞株である EpH4 細胞と、イヌ腎臓尿細管上皮細胞株である MDCK 細胞では、tricellulin の発現抑制時の上皮細胞シートのバリア機能への影響が異なることが報告されている (Ikenouchi *et al.* 2005; Van Itallie *et al.* 2010)。また、MDCK 細胞とヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞では、occludin の発現抑制時の上皮細胞シートのバリア機能への影響が異なることが報告されている (Van Itallie *et al.* 2010; Buschmann *et al.* 2013)。

1.3 TJs 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

TJs を構成するタンパク質の細胞内局在や発現量の制御機構としては、大きく 2 つに分けることができる。1 つは、TJs を構成するタンパク質同士が、お互いの発現量や細胞内局

在を制御し合う機構である。例えば, claudin-2, claudin-6, claudin-7, claudin-9 の過剰発現が claudin-1 や ZO-1 の発現量を上昇させること, angulin-1/LSR, occludin や claudin-1 の発現量抑制が, tricellulin の細胞内局在を攪乱することなどが知られている (Ikenouchi *et al.* 2008; Masuda *et al.* 2011; Zavala-Zendejas *et al.* 2011; Cording *et al.* 2013)。

もう 1 つの機構は, TJs を構成するタンパク質以外のタンパク質や代謝物に制御される機構であり, さまざまな生体内物質やタンパク質が報告されている。中でも, タンパク質リン酸化酵素であるプロテインキナーゼ (キナーゼ) による制御機構の重要性が徐々に明らかになってきている。キナーゼは, ヒトとマウスで共に 700 種類以上が報告され, 種類によって異なる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) ことも知られている (Diella *et al.* 2004; Farhan *et al.* 2010; Jayaswal *et al.* 2010)。そして, キナーゼが, bTJs や TJs 裏打ちの構成タンパク質の発現量や細胞内局在の制御と密接に関わることが近年の研究から明らかにされている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008; Gonzalez-Mariscal *et al.* 2014)。例えば, 細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase: ERK) による occludin, claudin-1, ZO-1, ZO-2 の細胞内局在やタンパク質発現量の制御などが報告されている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008)。また, キナーゼによる特定残基のリン酸化が occludin の細胞内局在の制御因子であることが確認されるなど, キナーゼによる TJs 構成タンパク質の局在化と発現量制御の機構が次々に明らかにされている (Dorfel & Huber 2012b)。

一方, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量の制御メカニズムについては, c-Jun N-terminal kinase (JNK) の活性化が, ヒト膵癌由来 HPAC 細胞の tricellulin の細胞内局在やタンパク質量を攪乱することが報告されているものの, 十分な解析が行われていないのが現状である (Kojima *et al.* 2010)。そのため, 本研究では, tTJs の構成タ

ンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量を制御するキナーゼの探索と、その制御メカニズムの解析を行った。

1.4 *tTJs* 構成タンパク質の細胞内局在とタンパク質発現量を制御するキナーゼの探索

標的タンパク質の細胞内局在やタンパク質量の情報を取得する手法は数多く報告されている。その中でも、細胞内の標的タンパク質を蛍光で可視化する手法が注目されている。その理由として、この手法では、細胞内蛍光の場所から細胞内局在の情報を、蛍光の強さからタンパク質発現量の情報を、同時に取得できることが挙げられる。そして、標的タンパク質の蛍光による可視化には、主に2つの手法が用いられている。1つは標的タンパク質と緑色蛍光タンパク質 (green fluorescence protein: GFP) などの蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させる方法である。もう1つは、標的タンパク質を特異的な抗体で蛍光染色する方法である。前者は、低コストで汎用性が高いという利点がある一方、標的タンパク質が過剰発現した条件下で細胞内局在を観察する問題点がある。後者は、内在性の標的タンパク質を可視化できるが、標的タンパク質を特異的に蛍光染色する抗体が必要なため、高コストで汎用性が低いという問題点がある。

本研究では、可能な限り後者の可視化法を用いた。また、前者の可視化法を用いる場合は、可視化に伴うタンパク質の過剰発現が、過剰発現するタンパク質を含む、蛍光標識の標的タンパク質群の細胞内局在に、影響を与えないことを確認してから使用した。そして、阻害剤によるキナーゼの活性阻害時や、(未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)に、蛍光によって可視化された標的タンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量が攪乱されることを指標として、標的タンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量を制御するキナーゼ

を網羅的に探索した (図 3). この方法により, 今回の標的タンパク質である tTJs 構成タンパク質の, 細胞内局在やタンパク質発現量を制御するキナーゼを同定した. さらに, 同定されたキナーゼによる制御機構を詳細に解析することで, tTJs の構造形成を制御する新規メカニズムを明らかにすることをめざした.

第 2 章 結果

2.1 tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を攪乱するキナーゼ阻害剤の探索

はじめに、上皮由来癌細胞株を用いて、tTJs の構造形成に必要な、tTJs への構成タンパク質の局在化を攪乱するキナーゼ阻害剤の探索を行った。使用する細胞株は、マウスの乳腺上皮由来である EpH4 細胞に、claudin-3 (Cl3) と黄色蛍光タンパク質 (yellow fluorescence protein: YFP) の融合タンパク質 (Cl3-YFP) を恒常的に発現する EpH4-Cl3 細胞を用いた (Matsuda *et al.* 2004)。この細胞株をコンフルエント状態になるまで培養することにより、Cl3-YFP の蛍光観察像より、二細胞接着面と三細胞接着点を容易に可視化出来ることを選択の理由とした。コンフルエント状態の EpH4-Cl3 細胞の tTJs, bTJs 及び TJs 裏打ちに、構成タンパク質が正確に局在化しているかどうかは、間接蛍光抗体法を用いて構成タンパクを蛍光染色することで確認した。局在化の確認は、tTJs 構成タンパク質である angulin-/LSR と tricellulin, bTJs 構成タンパク質である Cl3 と occludin, TJs 裏打ち構成タンパク質である ZO-1 と ZO-2 に対して行った。その結果、Eph4 細胞と同様に、angulin-/LSR と tricellulin が三細胞接着点、Cl3, occludin, ZO-1 と ZO-2 が二細胞接着面に特異的に局在化することが確認できた (図 4-6)。この結果から、コンフルエント状態の EpH4-Cl3 細胞の tTJs, bTJs 及び TJs 裏打ちに構成タンパク質が正確に局在化することが示された。そして、Eph4-Cl3 細胞の三細胞接着点への tTJs 構成タンパク質の局在化の攪乱を指標として、tTJs への構成タンパク質の局在化を攪乱するキナーゼ阻害剤の探索を行えることが確認された。

続いて、Eph4-Cl3 細胞を 80 種類のキナーゼ阻害剤で処理することで、tTJs 構成タンパ

ク質の三細胞接着点への局在化を攪乱する阻害剤を抽出した (表 2, 図 7). EpH4-C13 細胞は, コンフルエントになるまで 96 well プレートで培養後, 10 μM 又は 100 μM の 2 種類の濃度の阻害剤を含む培養液に交換して, CO_2 インキュベーター内 (5% CO_2 , 37°C) で 2 時間処理した. キナーゼの種類, 濃度及び作用条件は, 標的タンパク質の細胞内局在を攪乱するキナーゼ阻害剤をスクリーニングした, 先行研究を参考に決定した (Sugawara *et al.* 2012). キナーゼ阻害剤処理のネガティブコントロールには, 阻害剤の溶媒に用いるジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide: DMSO) を加える阻害剤と同等量含む培養液を使用した. 阻害剤処理後, EpH4-C13 細胞の angulin-1/LSR 又は ZO-1 を, 蛍光抗体法を用いて蛍光染色し, C13-YFP, angulin-1/LSR, ZO-1 の蛍光画像を INCell Analyzer 1000 system (GE Healthcare) を用いて取得した. 取得した蛍光画像の情報から, angulin-1/LSR の三細胞接着点への局在化を攪乱するキナーゼ阻害剤を抽出した. 10 μM の濃度でキナーゼ阻害剤処理を行った時には, protein kinase C (PKC) を主要な標的とする 2 種類の阻害剤 (Hypericine と Ro 31-8220) が, angulin-1/LSR の三細胞接着点への局在化を攪乱させる阻害剤として抽出された (表 2, 図 8). また, Hypericine は TJs 裏打ちの構成タンパク質である ZO-1 の, Ro 31-8220 は bTJs の構成タンパク質である C13-YFP の細胞内局在を同時に攪乱することが確認された (表 2). 100 μM の濃度でキナーゼ阻害剤処理を行った時には, 14 種類の阻害剤で angulin-1/LSR の三細胞接着点への局在化の攪乱が確認された (表 2, 図 8). その中の 11 種類は, C13-YFP 又は ZO-1 の細胞内局在を同時に攪乱したが, casein kinase 2 (CK2) の阻害剤である Apigenin (Critchfield *et al.* 1997), JNK の阻害剤である SP600125 (Bennett *et al.* 2001), 血小板由来増殖因子受容体 (platelet-derived growth factor receptor: PDGFR) と proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の阻害剤である Tyrphostin 9 は (Levitzki & Gilon 1991; Fuortes *et al.* 1999), angulin-1/LSR の細胞

内局在のみを特異的に攪乱した (表 2, 図 8 及び 9).

2.2 Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理による angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在及びタンパク質発現量の攪乱

ここで, angulin-1/LSR の細胞内局在を特異的に攪乱するキナーゼ阻害剤に注目した. そして, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理が, tTJs, bTJs, TJ 裏打ちの構成タンパク質の細胞内局在へ与える影響を, 共焦点蛍光顕微鏡を用いて詳細に解析した. EpH4-C13 細胞は, cover glass にコンフルエント状態になるまで培養後, 25 μ M Apigenin, 25 μ M SP600125, 20 μ M Tyrphostin 9 の何れかを含む培養液に交換して, CO₂ インキュベーター内 (5% CO₂, 37°C) で 2 時間処理を行った. 阻害剤のネガティブコントロールには, 図 8 及び 9 と同様に DMSO を同等量含む培養液を使用した. 阻害剤の使用濃度は, 先行研究を参考に決定した (Chiang *et al.* 2007; Nicholas *et al.* 2007; Park *et al.* 2011). 阻害剤処理後, EpH4-C13 細胞の angulin-1/LSR, tricellulin, occludin, ZO-1 又は ZO-2 を, 間接蛍光抗体法を用いて蛍光染色し, C13-YFP, angulin-1/LSR, tricellulin, occludin, ZO-1, ZO-2 の蛍光画像を, 共焦点蛍光顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss) を用いて取得した. 取得した蛍光画像の情報から, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理が C13-YFP, angulin-1/LSR, tricellulin, occludin, ZO-1, ZO-2 の細胞内局在に与える影響を解析した. コントロールとした EpH4-C13 細胞では, angulin-1/LSR 及び tricellulin が三細胞接着点に濃縮していることが確認された (図 10). それに対して, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理した EpH4-C13 細胞では, angulin-1/LSR 及び tricellulin の一部の局在が, 三細胞接着点から二細胞接着面及び細胞質領域へ変化することが確認された (図 10). 一方, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理した EpH4-C13 細胞でも, コントロールと同様

に, bTJs の構成タンパク質である Cl3-YFP, occludin, TJs 裏打ちの構成タンパク質である ZO-1, ZO-2 の二細胞接着面への濃縮が確認された(図 11). これらの結果より, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理が, bTJs や TJs 裏打ち構成タンパク質の局在には影響せず, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を特異的に制御していることが示唆された.

次に, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理が tTJs, bTJs, TJs 裏打ち構成タンパク質の発現量に与える影響を解析した. 解析は, 図 10 及び 11 と同じ条件で阻害剤又は DMSO 処理した EpH4-Cl3 細胞の Cl3-YFP, Cl3, angulin-1/LSR, tricellulin, occludin, ZO-1, ZO-2 のタンパク質発現量を, ウェスタンブロッティング法を用いて検出することで行った. 内部標準タンパク質として, 同条件による glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の検出も併せて行った. 解析の結果, Apigenin (25 μ M), SP600125 (25 μ M), Tyrphostin 9 (20 μ M) 処理した EpH4-Cl3 細胞では, コントロール細胞と比較して, angulin-1/LSR の発現量の減少が確認された(図 12). 一方, Cl3-YFP, Cl3, tricellulin, occludin, ZO-1, ZO-2 のタンパク質発現量は, 同様の処理を行っても, 大きく変化しなかった(図 12). これらの結果は, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理が, angulin-1/LSR 及び tricellulin の三細胞接着点への局在化の攪乱と同時に, angulin-1/LSR のタンパク質発現量を減少させることを示唆した.

2.3 tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を制御するキナーゼの推定

次に, EpH4 細胞の tTJs 構成タンパク質の細胞内局在に特異的に影響を与えるキナーゼ候補を網羅的に抽出した. (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載). ここで, 抽出されたキナーゼ候補である JNK1 に注目した(図 14). その注目した理由は, キナーゼ阻害剤を用いた実験により, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を特異的に攪乱することが確

認められた 3 種類の阻害剤の全てにおいて、阻害剤処理により細胞内の JNK のキナーゼ活性低下が報告されていたためである (Avdi *et al.* 2001; Bennett *et al.* 2001; Van Dross *et al.* 2003). そこで次に、JNK1 を含む JNK ファミリーに属するキナーゼ群が、tTJs 構成タンパク質の細胞内局在に影響を与えるかを詳細に解析した.

2.4 JNK1 と JNK2 による *angulin-1/LSR* と *tricellulin* の細胞内局在と発現量の調節

JNK ファミリーには JNK1, JNK2, JNK3 の 3 種類のキナーゼが属することが報告されている (Bogoyevitch 2006). そこで、JNK1, JNK2, JNK3 の発現量を抑制した条件下で、tTJs, bTJs, TJs 裏打ち構成タンパク質の細胞内局在に変化があるかどうかを解析した. はじめに、EpH4-C13 細胞に 100 pmol の siRNA をトランスフェクション法で導入した. siRNA を導入した EpH4-C13 細胞は、3.5 cm² ディッシュに播き込み CO₂ インキュベーター内で培養 (72 時間, 37°C, 5% CO₂) した. 培養後、EpH4-C13 細胞の *angulin-1/LSR*, *tricellulin*, *occludin*, ZO-1 又は ZO-2 を、間接蛍光抗体法を用いて蛍光染色し、C13-YFP, *angulin-1/LSR*, *tricellulin*, *occludin*, ZO-1, ZO-2 の蛍光画像を、共焦点蛍光顕微鏡 (LSM510) を用いて取得した. そして、取得した蛍光画像から、JNK1, JNK2, JNK3 の発現抑制がそれらのタンパク質の細胞内局在に与える影響を解析した. Scramble RNA 又は JNK3 を発現抑制する siRNA を導入した EpH4-C13 細胞では、tTJs を構成する *angulin-1/LSR* 及び *tricellulin* が三細胞接着点に正常に濃縮していることが確認された (図 15). それに対して、JNK1 又は JNK2 を発現抑制した EpH4-C13 細胞では、*angulin-1/LSR* 及び *tricellulin* の一部の、三細胞接着点から二細胞接着面への拡散が確認された (図 15). また、bTJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質である C13-YFP, *occludin*,

ZO-1, ZO-2 の二細胞接着面への濃縮は, JNK1, JNK2, JNK3 それぞれを発現抑制した EpH4-C13 細胞でも, scramble RNA を導入した EpH4-C13 細胞 (コントロール細胞) と同様に確認された (図 16). これらの結果から, JNK1 及び JNK2 が, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を, bTJs や TJs の裏打ち構成タンパク質とは独立かつ特異的に制御していることが示された.

続いて, JNK1, JNK2, JNK3 それぞれの発現抑制が, tTJs, bTJs 及び TJs 裏打ちを構成するタンパク質の発現量に与える影響を解析した. 解析は, 図 15 及び 16 と同じ条件で siRNA 導入と培養を行った EpH4-C13 細胞を使用した. そして, JNK1, JNK2, JNK3, C13-YFP, C13, occludin, angulin-1/LSR, tricellulin, ZO-1, ZO-2 と内部標準タンパク質 GAPDH の発現量を, ウェスタンブロッティング法を用いて検出した. 解析の結果, JNK1, JNK2 又は JNK3 を発現抑制した EpH4-C13 細胞では, コントロール細胞と比較して, 46%, 78%, 69% の JNK1, JNK2, JNK3 の減少が確認された (図 17). また, JNK1 又は JNK2 の発現抑制細胞では, 約 50% の occludin の発現量低下が確認された (図 17). 一方, C13-YFP, C13, angulin-1/LSR, tricellulin, ZO-1, ZO-2 の発現量には大きな変化は確認されなかった (図 17). これらの結果より, JNK1 及び JNK2 が, 他の TJs 構成タンパク質とは独立に, occludin の発現量を調節する機構の存在が示唆された. 加えて, JNK1 又は JNK2 の発現が, tTJs 構成タンパク質のタンパク質発現量に影響を与えない形で, angulin-1/LSR 及び tricellulin の三細胞接着点への局在化を促進する可能性が示された.

引き続き, JNK1 及び JNK2 の両者の発現量を同時に抑制した条件下で, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在及びタンパク質発現量に変化があるかどうかを解析した. はじめに, EpH4-C13 細胞に, 50 pmol ずつの JNK1 及び JNK2 を発現抑制する siRNA をトランスフェクション法で導入し, 図 15 及び 16 と同じ条件で培養した. 培養後, EpH4-C13 細胞の

angulin-1/LSR 又は tricellulin を，間接蛍光抗体法を用いて蛍光染色し，angulin-1/LSR, tricellulin の蛍光画像を，共焦点蛍光顕微鏡（LSM510）を用いて取得した．そして，取得した蛍光画像から，JNK1 と JNK2 の二重発現抑制が angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在に与える影響を解析した．JNK1 と JNK2 を二重発現抑制した Eph4-C13 細胞では，コントロール細胞と比較して，angulin-1/LSR 及び tricellulin の一部の局在の，三細胞接着点から二細胞接着面及び細胞質への拡散が確認された（図 18）．次に，同じ条件下での，angulin-1/LSR と tricellulin のタンパク質発現量への影響を解析した．JNK1 と JNK2 の二重発現抑制を行った場合，angulin-1/LSR のタンパク質発現量が減少する一方，tricellulin のタンパク質発現量は大きく変化しないことがわかった（図 19）．これらの結果から，JNK1 と JNK2 の二重の発現抑制が，JNK1 又は JNK2 単独の発現抑制時に観察される angulin-1/LSR と tricellulin の三細胞接着点から二細胞接着面への拡散に加えて，細胞質領域への拡散と angulin-1/LSR の減少を誘導する可能性が示された．また，JNK1 と JNK2 の二重の発現抑制時に観察される angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在とタンパク質発現量の変化は，Apigenin, SP600125 又は Tyrphostin 9 処理時と類似したフェノタイプを示した．これらの結果を総合的に判断すると，上記の 3 種類の阻害剤が，JNK1 と JNK2 の活性抑制を介して，angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在とタンパク質発現量の両方を攪乱する可能性が強く示唆された．

2.5 JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化制御

次に，JNK1 及び JNK2 が，tTJs 構成タンパク質の細胞内局在を制御する分子機構の解明をめざした．Angulin-1/LSR は tricellulin を tTJs にリクルートすることが報告されてい

る (Masuda *et al.* 2011). これは, JNK1 又は JNK2 が angulin-1/LSR のリン酸化制御を介して, angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs への局在化を促進する可能性を示唆する. そこで, この可能性について検証を行った. はじめに, JNK1 及び JNK2 と angulin-1/LSR のタンパク質間相互作用があるかどうかを, 共免疫沈降法を用いて調べた. Angulin-1/LSR と GFP の融合タンパク質である angulin-1/LSR-GFP を発現させた EpH4 細胞の細胞可溶化物を, 正常ウサギ IgG 抗体又は GFP 抗体で免疫沈降後, GFP 抗体, JNK1 抗体, JNK2 抗体によるウェスタンブロッティング法で解析した. その結果, JNK1 と angulin-1/LSR-GFP の分子間相互作用が共免疫沈降法により確認できた. これに反し, JNK2 と angulin-1/LSR-GFP との相互作用は確認できなかった (図 20A). これらの結果から, JNK1 については angulin-1/LSR を直接リン酸化する可能性が示唆された.

そこで, JNK1 による angulin-1/LSR のリン酸化残基の予測と実験的検証を行うことにした. リン酸化残基の予測は, タンパク質の各アミノ酸残基の, 目的のキナーゼによるリン酸化確率を推定する POSTMOD を用いて行った (Jung *et al.* 2010). POSTMOD とは, 標的タンパク質の各アミノ酸残基と目的のキナーゼの既知のリン酸化アミノ酸残基の, 周辺のアミノ酸配列の比較を行うことで, 標的タンパク質の各アミノ酸残基のリン酸化確率を推定するソフトウェアである. POSTMOD による推定結果は, 88, 260, 288, 391, 436, 452, 550 残基目のセリンと 246, 377 残基目のスレオニンが, JNK1 によってリン酸化される可能性を示唆した (図 20B). また, 260, 288, 391 残基目のセリンは高い可能性でリン酸化されることを併せて示した (図 20B). 本研究では, これらの候補の中から, マウスの肝臓に対する質量分析法を用いた解析でリン酸化残基として報告されている, 288 残基目のセリンに注目した (Villen *et al.* 2007) (図 20C). その残基に注目した理由は, 260, 288, 391 残基目のセリンのリン酸化情報を, 実験的に検証された真核生物由来のタンパク質のリン

ン酸化残基のデータベースである Phospho.ELM から取得した時、これら 3 つのアミノ酸残基の中で、288 残基目が唯一実験的にリン酸化されることが確認されていたためである (Diella *et al.* 2004).

次に、JNK1 による angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンの実際のリン酸化の有無を以下の方法を用いて検証した。まず、angulin-1/LSR の細胞質領域 (209-575 残基) の N 末端にグルタチオン S トランスフェラーゼ (glutathione S-transferase: GST) タグを付加したアミノ酸ペプチド (GST-LSR)、又は、GST-LSR の 288 残基目のセリンをアラニンに置換したアミノ酸ペプチド (GST-LSR (S288A)) を、リコンビナントタンパク質として、大腸菌を用いて生産し、精製を行った。次に、これらのリコンビナントタンパク質を一定条件下で活性型 JNK1 と *in vitro* で反応させ、反応後の GST-LSR ペプチド及び GST-LSR (S288A) ペプチドのリン酸化状態を、Phosphoserine 抗体を用いたウェスタンブロッティング法で検出した。その結果、JNK1 との反応により、GST-LSR ペプチドのセリンのリン酸化が、GST-LSR (S288A) のそれよりも有意に亢進していることがわかった (図 20D)。これに対して、JNK1 を含まない反応では、両ペプチドのセリンのリン酸化は検出されなかった (図 20D)。これらの結果は、JNK1 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンを直接リン酸化する可能性を強く示唆した。

次に、Eph4 細胞内で、JNK1 及び JNK2 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化を亢進するかどうかを検証した。検証には、ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) 法と Phos-tag SDS-PAGE 法を用いた。Phos-tag SDS-PAGE 法は、タンパク質の分離に用いる泳動ゲルに、リン酸化アミノ酸残基と結合して泳動を阻害する Mn^{2+} -Phos-tag を添加する SDS-PAGE 法である。これにより、SDS-PAGE で同じ泳動距

離になるタンパク質同士を比較した場合、タンパク質のリン酸化残基の数が多いほど、タンパク質由来のバンドの泳動距離が短くなるという特徴がある。この特徴により、ウェスタンブロットリング法で目的のタンパク質のバンドを可視化して泳動距離を確認すれば、タンパク質のリン酸化の程度を確認することができる。そのため、タンパク質のアミノ酸変異や特定のキナーゼの発現抑制などが、目的のタンパク質の細胞内でのリン酸化状態に与える影響を解析することができる。本研究では、この Phos-tag SDS-PAGE 法の性質を利用して、JNK1 及び JNK2 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化を調節するかを確認した。はじめに、angulin-1/LSR-GFP ペプチド又は、angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドを発現させた EpH4 細胞の細胞可溶化物を、SDS-PAGE 法で解析した。その結果、SDS-PAGE 法では、angulin-1/LSR-GFP ペプチドと angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチド由来の 1 つのバンドの、泳動距離の変化は確認されなかった (図 20E)。続いて、scramble RNA 又は JNK1, JNK2 を発現抑制する siRNA を導入した EpH4 細胞に、angulin-1/LSR-GFP ペプチド又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドを発現させて、その細胞可溶化物を Phos-tag SDS-PAGE 法で解析した。コントロール (scramble RNA を導入した) EpH4 細胞の解析では、angulin-1/LSR-GFP と angulin-1/LSR(S288A)-GFP 由来の泳動距離の異なる 4 つのバンドが観察された (図 20F)。これらのバンドは、泳動距離の短い順に、①強くリン酸化されたサンプル、②中程度にリン酸化されたサンプル、③弱くリン酸化されたサンプル、④ほとんど又はまったくリン酸化されていないサンプルと考えられた。また、②-④のバンドの発光強度が、angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドでは、angulin-1/LSR-GFP ペプチドよりも増加することが観察された (図 20F)。JNK1 又は JNK2 の発現を抑制した EpH4 細胞では、angulin-1/LSR-GFP ペプチドと angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチド由来の 4 つのバンドの泳動距離、各バ

ンドの発光強度に大きな変化は確認されなかった (図 20F). また, コントロール EpH4 細胞の angulin-1/LSR-GFP ペプチド由来のバンドを除いた, 他の 5 つのサンプルのバンドを比較した場合, バンドの泳動距離, 各バンドの発光強度に大きな変化は確認されなかった (図 20F). これにより, コントロール EpH4 細胞では, angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドと比較して angulin-1/LSR-GFP ペプチドのリン酸化が亢進するが, JNK1 又は JNK2 を発現抑制した EpH4 細胞では, リン酸化が亢進されないことが示された. 併せて, コントロール EpH4 細胞で発現させた angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドと, JNK1 又は JNK2 を発現抑制した EpH4 細胞で発現させた angulin-1/LSR-GFP ペプチド及び angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドのリン酸化状態が同程度であると確認された. これらの結果は, EpH4 細胞内において, JNK1 及び JNK2 が, 288 残基目のセリン依存的な angulin-1/LSR のリン酸化の必須因子であることを示した. そして, 図 20D で示された JNK1 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンを直接リン酸化するという結果と併せて, JNK1 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンを EpH4 細胞内で直接リン酸化することが示唆された. また, 図 20A で示された JNK2 と angulin-1/LSR-GFP の相互作用が確認できないという結果と併せて, JNK2 が angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンの直接のリン酸化ではなく, JNK1 によるリン酸化の補助因子として作用する可能性が示唆された.

2.6 Angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化による angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs への濃縮

次に, angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化が, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在に与える影響を解析した. 解析は, angulin-1/LSR-GFP ペプチドと, angulin-1/LSR (S288A) -GFP ペプチドをそれぞれ発現させた EpH4 細胞の, angulin-1/LSR-GFP,

angulin-1/LSR (S288A) -GFP, tricellulin の細胞内局在を比較する方法で行った。Angulin-1/LSR-GFP, angulin-1/LSR (S288A) -GFP, tricellulin の細胞内局在の比較は、各タンパク質由来の蛍光画像を共焦点蛍光顕微鏡 (LSM510) で取得して行った。Angulin-1/LSR-GFP と angulin-1/LSR (S288A) -GFP では GFP 蛍光画像, tricellulin と ZO-1 では間接蛍光抗体法による染色の蛍光画像を取得して比較に使用した。ZO-1 の蛍光画像は, angulin-1/LSR-GFP, angulin-1/LSR (S288A) -GFP, tricellulin が, 二細胞接着面及び三細胞接着点のどこに観察されるかを正確に可視化するための指標として用いた。解析の結果, angulin-1/LSR-GFP を発現させた EpH4 細胞では, angulin-1/LSR 及び tricellulin の三細胞接着点特異的な局在化が確認された (図 21A)。それに対して, angulin-1/LSR (S288A) -GFP を発現させた EpH4 細胞では, angulin-1/LSR の一部が二細胞接着面に, tricellulin の一部が二細胞接着面と細胞質領域にそれぞれ拡散することが確認された (図 21A)。これらの結果から, angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化は, tTJs から bTJs や細胞質領域への, 構成タンパク質の拡散の阻止に必要であることが示唆された。続いて, angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散の度合いの定量化を行った。定量化は, 三細胞接着点と二細胞接着面にそれぞれ局在化する angulin-1/LSR 及び tricellulin 由来の, 蛍光量に基づいて行った (詳細は材料と実験方法に記載)。計算の結果, angulin-1/LSR (S288A) -GFP を発現させた EpH4 細胞では, angulin-1/LSR-GFP を発現させた EpH4 細胞と比較して, angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散が有意に増加していることが確認された (図 21B)。続いて, angulin-1/LSR (S288A) -GFP を発現させた EpH4 細胞における, angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs からの拡散が, angulin-1/LSR-GFP と angulin-1/LSR (S288A) -GFP の発現量の差によるものどうかを解析した。解析の結果, EpH4 細胞における,

angulin-1/LSR-GFP と angulin-1/LSR (S288A) -GFP の発現量に大きな差は無いことが確認された (図 21C 及び D). これにより, angulin-1/LSR (S288A) -GFP 発現時の angulin-1/LSR と tricellulin の bTJs への拡散が, angulin-1/LSR-GFP とのタンパク質の発現量の差に由来しないことが示された. これらの結果は, angulin-1/LSR (S288A) -GFP 発現細胞において確認された, angulin-1/LSR と tricellulin の bTJs などへの拡散は, angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化阻害によって引き起こされることを強く示唆するものである. 以上の結果より, angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化が, angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs への濃縮に重要な役割を果たしていると判断した.

2.7 Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理による JNK 活性の変化

次に, Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 処理による angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在の攪乱が, JNK 活性低下を介して行われているかどうかを解析した. 解析は, Apigenin (25 μ M), SP600125 (25 μ M) 又は Tyrphostin 9 (20 μ M) 処理により, EpH4-C13 細胞の, 活性型 (リン酸化) JNK (phosphorylated JNK: P-JNK) と JNK のタンパク質量が, 減少するかどうかを確認する方法で行った. タンパク質量の確認は, GAPDH を内部標準タンパク質とするウェスタンブロッティング法で行った. 解析の結果, Apigenin, SP600125 処理した EpH4-C13 細胞では, コントロール細胞と比較して, P-JNK のタンパク質量が約 40%程度減少していることが確認された (図 22). この時, JNK のタンパク質量については上記の処理によっても, 大きな変化は確認されなかった (図 22). これらの結果は, Apigenin の主要な阻害標的と報告されている CK2 が, JNK の活性調節を介して angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在の制御している可能性を示唆した. 一方,

Tyrphostin 9 処理した EpH4-C13 細胞では、コントロール細胞と比較して、P-JNK 及び JNK のタンパク質量が増加していることが確認された (図 22). これは、Tyrphostin 9 処理が、JNK 活性抑制とは独立に、angulin-1/LSR 及び tricellulin の細胞内局在を攪乱していることを示唆した.

2.8 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

2.9 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

2.10 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

2.11 未発表の共同研究データを含むので未掲載

2.12 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

第 3 章 考察と結論

タンパク質複合体の形態形成には、構成タンパク質の適切な発現量制御や正確な局在化が必須である。そして、キナーゼとその関連タンパク質によって形成されるキナーゼネットワークは、タンパク質の発現量調節や細胞内局在化の最も重要な制御因子の 1 つであることが知られている (Adachi *et al.* 2009; Farhan *et al.* 2010; Hoffman *et al.* 2010; Sugawara *et al.* 2012)。本研究の対象である TJs においても、キナーゼは構成タンパク質の適切な発現や局在化を介して、TJs の形態形成やバリア機能調節で重要な役割を担うことが多数報告されている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008)。例えば、PKC ファミリーに属するキナーゼが TJs の構築に関与すること、ERK1/2 が bTJs や TJs の裏打ち構造を構成するタンパク質の発現や細胞内局在を制御すること等が報告されている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008)。bTJs や TJs 裏打ち構造を構成する claudin, occludin, ZO-1, ZO-2 などのリン酸化が、TJs のバリア機能に影響を与えることも明らかにされている (Gonzalez-Mariscal *et al.* 2008; Dorfel & Huber 2012a, 2012b)。tTJs においても報告は少ないものの、キナーゼが tTJs を構成するタンパク質の発現量や細胞内局在を制御することが明らかにされている。例えば、anisomycin による JNK の活性化が tricellulin の発現や局在を攪乱することが報告されている (Kojima *et al.* 2010)。しかしながら、bTJs や TJs 裏打ち構造体の場合と比較して、キナーゼによる tTJs の構造形成制御機構に関してはほとんど明らかにされていない。この問題を解決するため、本研究では、まず、tTJs の構成タンパク質の細胞内局在を制御するキナーゼの探索を行った。探索は、キナーゼ阻害剤によるキナーゼの活性阻害時と、(未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)に、蛍光によって可視化された angulin-1/LSR の細胞内局在の変化を蛍光顕微鏡で観察する方法で行っ

た (図 3, 7 及び 13). そして, 80 種類のキナーゼ阻害剤と (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載) で処理した時の *angulin-1/LSR* の細胞内局在情報と, その後の詳細な解析から, JNK1 及び JNK2 が *angulin-1/LSR* や *tricellulin* の tTJs への局在化を制御する因子であることを確認した (表 2, 図 8, 9, 14 及び 15). 加えて, JNK1 による *angulin-1/LSR* の 288 残基目のセリンのリン酸化が, 上記の制御メカニズムで重要な役割を果たすこと, JNK2 の発現が細胞内での JNK1 によるリン酸化に必要であることも明らかにした (図 20 及び 21). (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載).

3.1 JNK 機能阻害時の tTJs への *angulin-1/LSR* の局在化の攪乱

tTJs の構成タンパク質は, *occludin* と複合体を形成したまま小胞輸送によって細胞接着面に運搬された後, 側方拡散によって tTJs に局在化すると報告されている (Westphal *et al.* 2010). また, Caco-2 細胞での fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) 法を用いた実験から, tTJs の構成タンパク質が bTJs と tTJs の間を高速で移動していることも報告されている (Raleigh *et al.* 2010). これらの報告から, *angulin-1/LSR* が tTJs に特異的に局在化するメカニズムとしては, *angulin-1/LSR* が bTJs と tTJs に平衡を保ちながら存在し, その平衡が tTJs 側に偏っていると考えることができる. そして, *angulin-1/LSR* の平衡を tTJs 側に偏って維持するメカニズムとしては, tTJs に *angulin-1/LSR* を保持する機構が存在するという可能性と, bTJs から tTJs への *angulin-1/LSR* の輸送を絶えず促進する機構が存在するという可能性の 2 つが考えられる. 前者の tTJs に *angulin-1/LSR* を保持する機構が存在する場合, *angulin-1/LSR* が *tricellulin* を tTJs に保持する機能を持つように, *angulin-1/LSR* を tTJs への保持する機能を持つタンパク質の存在が推定される. 後者の bTJs から tTJs に *angulin-1/LSR* の輸送を絶えず促進する機構が存在する場合, こ

の機能を担う bTJs 構成タンパク質の存在が推定される。そして、claudin-1 と occludin という 2 種類の bTJs 構成タンパク質が、後者の機能の担い手として考えられる。その理由として、claudin-1 と occludin の発現抑制が、tricellulin の一部を tTJs から bTJs に拡散させるという報告が挙げられる (Ikenouchi *et al.* 2008; Cording *et al.* 2013)。これは、claudin-1 と occludin が tTJs 構成タンパク質の平衡を tTJs 側に偏って維持する機能を持つことを示しており、これらのタンパク質が bTJs から tTJs に angulin-1/LSR の輸送を促進する可能性を示している。そして、JNK1 又は JNK2 の発現抑制が、claudin-1 や occludin などの bTJs 構成タンパク質の発現量の減少を介して、angulin-1/LSR の tTJs から bTJs への拡散を引き起こすというメカニズムの存在を示唆する。このメカニズムは、JNK1 又は JNK2 の発現抑制が occludin の発現量の減少と、angulin-1/LSR の tTJs から bTJs への拡散を引き起こすという、本研究の結果からも支持される (図 15 及び 17)。また、TJs を構成するタンパク質同士が互いの発現量の制御因子であるという報告を考慮した場合、JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR の S288 依存的なリン酸化の阻害が、bTJs 構成タンパク質の発現量に影響し、その結果、angulin-1/LSR が tTJs から bTJs に拡散することも考えられる (Zavala-Zendejas *et al.* 2011)。

また、JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR を tTJs に局在化させる他の可能性として、angulin-1/LSR の S288 依存的なリン酸化の阻害を介した、angulin-1/LSR と bTJs 構成タンパク質との相互作用促進も考えられる。この場合、タンパク質間相互作用の促進に伴う、angulin-1/LSR と bTJs 構成タンパク質のヘテロポリマーが bTJs で増加することの結果として、bTJs へ局在化する angulin-1/LSR の量が増加すると考えられる。その仮説を支持するものとして、angulin-1/LSR が bTJs 構成タンパク質と相互作用する、TJs 構成タンパク質のリン酸化が TJs 構成タンパク質同士の相互作用を制御するという報告がある (Dorfel &

Huber 2012a; Higashi *et al.* 2013). この場合, JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR の S288 依存的なリン酸化が, angulin-1/LSR と bTJs 構成タンパク質のタンパク質相互作用を阻害する. 相互作用の阻害により bTJs への angulin-1/LSR の局在化が抑制される. この抑制により, bTJs から tTJs への angulin-1/LSR の輸送を促進されるというメカニズムが考えられる.

一方, angulin-1/LSR の S288 をアラニンに置換した angulin-1/LSR (S288A) を発現させても, angulin-1/LSR の細胞質への局在化は増加しない (図 21). これは, JNK1 と JNK2 の同時発現抑制や, 阻害剤処理による JNK 活性阻害時における, angulin-1/LSR の細胞質領域への局在化の増加は, angulin-1/LSR の bTJs への局在化の増加と, 異なるメカニズムで行われていることを示唆する (図 10 及び 18). この制御メカニズムには, 膜貫通タンパク質の細胞質領域への取り込みの機構として知られているエンドサイトーシスの関与が 1 つの可能性として考えられる. JNK 活性が上皮細胞のエンドサイトーシス調節に関与する, TJs 構成タンパク質がエンドサイトーシスで細胞質に取り込まれるという報告は, この仮説を支持する (Dukes *et al.* 2012; Farquhar *et al.* 2012; Choi *et al.* 2014). Angulin-1/LSR の細胞質領域での増加を引き起こす別の可能性としては, angulin-1/LSR の細胞膜への輸送が, JNK の活性阻害時や発現量低下時に, 抑制されていることが考えられる. 例えば, JNK が膜貫通型タンパク質の細胞膜への輸送を促進するという報告はこれを支持する (Carriers *et al.* 2002). また, JNK の機能低下時において, bTJs の構成タンパク質である occludin や Cl3 の細胞質領域への拡散は増加しない (図 11 及び 18). このことから, JNK は tTJs 構成タンパク質特異的に, 細胞膜への輸送の促進やエンドサイトーシス抑制を行っていると考えられる.

3.2 JNK 機能阻害時の *tTJs* への *tricellulin* の局在化の攪乱

Tricellulin は angulin-1/LSR との相互作用によりタンパク質複合体を形成することが報告されている (Higashi *et al.* 2013). また, JNK の機能阻害時や angulin-1/LSR の S288 のリン酸化抑制時には, angulin-1/LSR と同様に *bTJs* への拡散が確認できる (図 10, 15, 18 及び 21). 以上の結果より, JNK による *tricellulin* の *tTJs* から *bTJs* への拡散の阻止は, angulin-1/LSR と同様のメカニズムで行われていると示唆できる. また, JNK1 及び JNK2 の二重発現抑制時や JNK の活性阻害時に, *tricellulin* が angulin-1/LSR と同様に *tTJs* から *bTJs* 及び細胞質領域に拡散することから, *tTJs* から細胞質領域への拡散阻止も, angulin-1/LSR と同じメカニズムで行われている可能性が示唆される (図 18 及び 21). 一方, *tricellulin* は angulin-1/LSR と異なり, angulin-1/LSR の S288 の非リン酸化アミノ酸置換時 (リン酸化抑制時) にも, 細胞質領域への拡散の増加が観察された (図 21). これは, 細胞膜への輸送の阻害やエンドサイトーシス促進による *tTJs* から細胞質領域への *tricellulin* の拡散には, angulin-1/LSR とは異なる制御機構が関与する可能性を示している.

3.3 JNK 機能阻害時の *angulin-1/LSR* のタンパク質量減少

JNK1 と JNK2 の同時発現抑制や活性阻害時における angulin-1/LSR のタンパク質量減少のメカニズムとしては, タンパク質分解量の増加とタンパク質生産量の低下の 2 つの可能性が考えられる (図 12 及び 19). しかしながら, JNK 活性阻害時に 2 時間という短時間で angulin-1/LSR のタンパク質量が大きく減少していることを考慮した場合, 積極的なタンパク質分解の促進が関与している可能性が高いと考えられる (図 12). この場合, JNK1 と JNK2 の同時機能阻害が, エンドサイトーシスによる angulin-1/LSR の細胞質領域への取り込みと, それに続くリソソームでのタンパク質分解を促進することが考えられる. 理

由としては、先行研究の報告が挙げられる。例えば、イヌ腎臓尿細管上皮由来である MDCK 細胞において、ERK1/2 による、occludin, claudin-2, claudin-4 のエンドサイトーシスとタンパク質分解の活性化が報告されている (Rincon-Heredia *et al.* 2014)。また、同じイヌ腎臓尿細管上皮に由来する MDCK II において、ERK による epidermal growth factor (EGF) 依存的な claudin-2 のエンドサイトーシスとタンパク質分解の抑制も報告されている (Ikari *et al.* 2011)。このように、上皮細胞において、複数の TJs 構成タンパク質のエンドサイトーシスとタンパク質分解をキナーゼが制御するという報告は、この制御モデルを支持する。また、興味深いことに、私達の実験条件下では、JNK の機能阻害時に tricellulin も angulin-1/LSR と同様に細胞質領域へ取り込まれるものの、タンパク質量の減少は確認されない (図 10, 12, 18 及び 19)。このことは、エンドサイトーシスによる細胞質領域への取り込みからリソソームによるタンパク質分解の過程での、angulin-1/LSR と tricellulin のタンパク質複合体の解離と、tricellulin の tTJs へのリサイクリングが起こっている可能性を示唆する。この仮説を支持するものとして、一部の TJs タンパク質はエンドサイトーシスで細胞質領域に取り込まれても TJs にリサイクリングされるという報告が行われている (Dukes *et al.* 2012)。

3.4 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

3.5 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

3.6 結論

本研究では、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。そして、JNK1,

JNK2, (タンパク質の 1 種類は未発表の共同研究データに含まれるので未掲載) という 3 種類のキナーゼが, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在や発現量の調節を介して, tTJs の構造形成を制御することを明らかにした (図 32). また, これらのキナーゼによる制御メカニズムの一端も明らかにした (図 32). (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載). 本研究の成果は, tTJs の構造形成の制御メカニズムや生理的意義の解明に貢献することが期待できる.

第 4 章 材料と実験方法

4.1 細胞培養

EpH4 細胞は Ernst Reichmann 博士 (University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland) から供与頂いた。EpH4-Cl3 細胞は古瀬幹夫教授 (神戸大学・医学部) から供与頂いた。EpH4 細胞は 10% ウシ胎児血清 (GIBCO), 100 unit/ml ペニシリン (GIBCO), 100 unit/ml ストレプトマイシン (GIBCO) を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Nissui) で培養した。EpH4-Cl3 細胞は 10% ウシ胎児血清 (GIBCO), 100 unit/ml ペニシリン, 100 unit/ml ストレプトマイシン, 100 unit/ml ジェネティシン (Invitrogen) を含む DMEM で培養した。特に表記しない限り, EpH4 細胞, EpH4-Cl3 細胞ともに 6 cm² プラスチックベースディッシュを培養に使用した。

4.2 試薬

本研究では, 下記に記した試薬を使用した。

- Apigenin (Wako)
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- SP600125 (Wako)
- Tyrphostin 9 (Enzo Life Science)
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- Kinase inhibitor library (Enzo Life Science)

4.3 抗体

本研究では、下記に記した一次抗体と二次抗体を使用した。各々の図表において使用した抗体は、表 3 に一覧の形で記述した。

使用した一次抗体は以下の通りである。

- ・ 抗ラット angulin-1/LSR 抗体 (Higashi et al. 2013)
- ・ 抗ラット occludin 抗体 (Saitou et al. 1998)
- ・ 抗マウス ZO-1 抗体 (Itoh et al. 1991)
- ・ 抗マウス JNK1 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗マウス GST 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)
- ・ 抗マウス GAPDH 抗体 (Millipore)
- ・ 抗ウサギ tricellulin 抗体 (Ikenouchi et al. 2005)
- ・ 抗ウサギ ZO-2 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗ウサギ SAPK/JNK 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗ウサギ Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗ウサギ JNK2 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗ウサギ JNK3 抗体 (Cell Signaling Technology)
- ・ 抗ウサギ Phosphoserine 抗体 (Zymed laboratories)
- ・ 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- ・ 抗ウサギ GFP 抗体 (Medical and Biological Laboratories)
- ・ 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- ・ 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- ・ 正常ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)

使用した二次抗体は以下の通りである.

- HRP-conjugated 抗ラット IgG 抗体 (Chemicon)
- HRP-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (Upstate Biotechnology)
- HRP-conjugated 抗マウス IgG light-chain specific 抗体 (Millipore)
- HRP-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (Chemicon)
- Immuno-Aptamer TM, 抗ウサギ IgG 抗体 (Nippon Gene)
- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載
- Cy3-conjugated 抗ラット IgG 抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories Inc)
- Cy3-conjugated 抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes)
- Cy3-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (Chemicon)
- Cy5-conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham LIFE SCIENCE)

4.4 プラスミドと *siRNA*

本研究では, 下記に記したプラスミドと *siRNA* を使用した.

使用したプラスミドと内容は以下の通りである.

- pCAGGSneodeIEcoRI- angulin-1/LSR-GFP

マウスの angulin-1/LSR の cDNA を pCAGGSneodeIEcoRI ベクターにサブクローニングしたプラスミドであり, 神戸大学の古瀬幹夫教授から供与頂いた (Niwa *et al.* 1991; Masuda *et al.* 2011).

- pEGFP-N1- angulin-1/LSR-GFP

pCAGGSneodEcoRIにコードされたマウスの *angulin-1/LSR* の cDNA をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法を用いて取得後, pEGFP-N1 ベクターにサブクローニングしたプラスミドであり, 東京大学の田口由起氏と菅原太一氏から供与頂いた.

- ・ pEGFP-N1- *angulin-1/LSR* (S288A) -GFP

pEGFP-N1- *angulin-1/LSR*-GFP にコードされた *angulin-1/LSR* の 288 残基目のセリンを, PCR 法を利用してアラニンに置換したプラスミドであり, 東京大学の田口由起氏と菅原太一氏から供与頂いた.

- ・ pGEX-5X-1- GST-LSR

pEGFP-N1- *angulin-1/LSR*-GFP にコードされた *angulin-1/LSR* の細胞質領域 (209-575 残基) を, PCR 法を用いて取得後, pGEX-5X-1 ベクターにサブクローニングしたプラスミドであり, 東京大学の田口由起氏と菅原太一氏から供与頂いた.

- ・ pGEX-5X-1- GST-LSR (S288A)

pGEX-5X-1- GST-LSR にコードされた *angulin-1/LSR* の 288 残基目のセリンを, PCR 法を利用してアラニンに置換したプラスミドであり, 東京大学の田口由起氏と菅原太一氏から供与頂いた.

使用した siRNA と内容は以下の通りである.

- ・ Mm_Mapk8_3534

マウスの mitogen-activated protein kinase 8 (MAPK8/JNK1) の発現量を特異的に抑制するために Rosetta 法を用いて設計された siRNA であり, Sigma より購入して使用した.

- Mm_Mapk9_6800

マウスの mitogen-activated protein kinase 9 (MAPK9/JNK2) の発現量を特異的に抑制するために Rosetta 法を用いて設計された siRNA であり, Sigma より購入して使用した.

- Mm_Mapk10_8711

マウスの mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10/JNK3) の発現量を特異的に抑制するために Rosetta 法を用いて設計された siRNA であり, Sigma より購入して使用した.

- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

- 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

4.5 プラスミドのトランスフェクション

本研究では, 2 種類の異なる条件で EpH4 細胞にプラスミドをトランスフェクションした (1 種類は, 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載). 1 つめの条件では以下の流れでプラスミドをトランスフェクションした. はじめに, 6-12 μg のプラスミドと 100 μl の OPTI-MEM (Gibco) を混和した溶液と, 4 μl の Lipofectamine LTX (Invitrogen), 6 μl の Lipofectamine Plus reagent (Invitrogen) と 100 μl の OPTI-MEM を混和した溶液を作製して室温で 5 分間インキュベートした. インキュベート後, 2 つの溶液を混和して, 15

分間インキュベートした。インキュベート後、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 及び EpH4 細胞と混和して、3.5 cm² ディッシュに播き込んだ。播き込んだ後、72 時間のインキュベーションを行い、その後、間接蛍光抗体法による細胞の染色、共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の検出、ウェスタンブロッティング法による解析に使用した。(未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)。

4.6 siRNA のトランスフェクション

(未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)。本研究では、2 種類の異なる条件で EpH4-C13 細胞に siRNA をトランスフェクションした (1 種類は、未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)。1 つめの条件では以下の流れで siRNA をトランスフェクションした。はじめに、100 pmol の siRNA、5 μ l の Lipofectamine RNAi Max と 500 μ l の OPTI-MEM を混和した溶液を作製して室温で 20 分間インキュベートした。インキュベート後、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 及び EpH4-C13 細胞と混和して、3.5 cm² ディッシュに播き込んだ。播き込んだ後、48-72 時間のインキュベーションを行い、その後、間接蛍光抗体法による細胞の染色、ウェスタンブロッティング法による解析に使用した。(未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)。

4.7 間接蛍光抗体法による細胞の染色と蛍光顕微鏡による観察

Eph4 細胞及び EpH4-C13 細胞は、以下の手順で間接蛍光抗体法による細胞の染色を行った。細胞は 1%のホルムアルデヒドを含む phosphate-buffered saline (PBS) で 15 分間、0.2%の Triton X-100 を含む PBS で 15 分間処理された後、5%のスキムミルクを含む PBS で 30-60 分間ブロッキングされた。これらの操作はいずれも室温で行われた。ブロッキ

グ終了後、細胞は一次抗体溶液で 12-24 時間、二次抗体溶液で 1 時間処理された。一次抗体溶液による処理は 4°C で、二次抗体溶液による処理は室温で行われた。二次抗体処理の終了後、細胞は INCell Analyzer 1000 system, 共焦点レーザー顕微鏡システム A1 又は 63x Plan-NEOFLUAR 油浸レンズを装着した LSM510 共焦点蛍光顕微鏡で観察された。

4.8 共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の検出

EpH4 細胞を用いた共免疫沈降法によるタンパク質間相互作用の検出は、Raleigh らの手法を一部改変して行った (Raleigh *et al.* 2010)。Angulin-1/LSR-GFP をトランスフェクションで導入後、培養してコンフルエント状態になった EpH4 細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄後、氷冷した RIPA 溶液 (TBS containing 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 0.004% sodium azide, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM PMSF) で 10 分間処理した。処理した細胞をセルスクレーパーで 6 cm² ディッシュから掻き取り 1.5 ml チューブに移した後、1 ml シリンジに装着した 27 ゲージ針を 15 回通過させた。得られた細胞可溶化物は、正常ウサギ IgG 抗体と Protein G Sepharose 4 Fast Flow で 30 分間ローテート後、600 g の遠心を 5 分間行い、上清を取得した。取得した上清、GFP 抗体又は正常ウサギ IgG 抗体、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を混和して 3 時間ローテートさせた後、20400 g の遠心を 5 秒間行い、上清を捨て、沈殿物を取得した。取得した沈殿物を、氷冷した RIPA 溶液で 3 回洗浄後、2×SDS-sample 溶液に溶解させた。溶解までの行程は全て 4°C の環境で行われた。溶解液は、100°C で 5 分間煮沸後、SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法により解析した。

4.9 試験管内リン酸化反応

はじめに大腸菌株を用いて、N末端に GST タグを付加した angulin-1/LSR の細胞質領域 (GST-LSR) のアミノ酸ペプチドと、GST-LSR の 288 残基目のセリンをアラニンに置換した (GST-LSR (S288A)) アミノ酸ペプチドを生成した。pGEX-5X-1-GST-LSR 及び pGEX-5X-1-GST-LSR (S288A) をヒートショック法で導入した大腸菌株 BL21 を、培養培地 (16 g/l Tryptone, 10 g/l Yeast extract, 5 g/l NaCl) の吸光度が 0.4 になるまで培養後、0.5 mM の IPTG で 3 時間誘導した。誘導時の温度は 25°C とした。IPTG 誘導後、大腸菌の培養液を遠心 (20400 g, 4°C, 1 分間) して、上清を廃棄することで大腸菌ペレットを取得した。取得した大腸菌ペレットは、タンパク質分解酵素阻害剤を含む超音波処理用溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA-NaOH (pH 8.0), 1 mM DTT) に再懸濁後、超音波処理により菌体破碎した。超音波処理は 15 秒を 1 サイクルとして、10 サイクル行った。超音波処理した溶液は終濃度 1% になるように氷冷した 12.5% Triton-X を添加後、4°C で 30 分間ローテートした。ローテートした溶液は遠心 (20400 g, 4°C, 20 分間) 後、上清を廃棄して沈殿物を取得した。沈殿物に対して、洗浄液 (0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA) により懸濁、ボルテックスによる混和の後、遠心を行い上清を廃棄するという操作を 3 回行った。操作終了後、沈殿物を 8M 尿素溶液 (8 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM EDTA) に溶解させて室温に 1 時間静置した。静置終了後、溶液は遠心 (20400 g, 4°C, 20 分間) し、上清を 4M 尿素溶液 (4M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM EDTA) で 1 時間、2M 尿素溶液 (2 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 1 mM EDTA) で 1 時間、尿素非含有溶液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) で一晩、4°C で透析した。透析終了後、上清を Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) と混和し、混和溶液を 2 時間、4°C でローテートした。ローテート終了後、遠心 (20400 g, 4°C, 2 分間) により沈殿物を取得した。

取得した沈殿物は、洗浄液（組成は超音波処理用溶液と同一）で3回洗浄後、洗浄液に再度溶解させて混和しカラム（Poly-Prep Chromatography, Biorad）に投入した。投入終了後、10 mM glutathione 溶液で GST-LSR 及び GTS-LSR（S288A）のペプチドをエッペンチューブに溶解させ、タンパク質濃度を測定後、 -80°C に保存した。試験管内リン酸化反応は、作製した GST-LSR 及び GTS-LSR（S288A）のペプチド（10 μg ）を 100 ng のマウスの活性型 JNK1 タンパク質と、10 μM ATP を含む kinase 反应用溶液（25 mM Hepes, 25 mM MgCl_2 , Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche)) の存在下で反応させることで行った。反応は 37°C で 25 分間行った。反応終了後、溶液を 2 \times SDS-sample buffer と混和して煮沸（ 100°C , 5 分間）した。煮沸終了後、SDS-PAGE と Phospho-serine 抗体, GST 抗体, JNK1 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行うことで, GST-LSR 及び GTS-LSR (S288A) の JNK1 によるリン酸化を解析した。

4.10 SDS-PAGE と Phos-tag SDS-PAGE

SDS-PAGE 法は、タンパク質に負電荷を持つ SDS を付加して、陽極方向に泳動させることで、タンパク質量を分子量に基づいて分離する手法である。Phos-tag SDS-PAGE 法は、SDS 付加に加えて、泳動ゲルに Mn^{2+} -Phos-tag を添加することで、分子量とタンパク質のリン酸化残基の数に基づいてタンパク質を分離する手法である (Kinoshita *et al.* 2006)。

SDS-PAGE は、12.5%のアクリルアミドを含むゲル、5-20%のアクリルアミドの濃度勾配を持つゲルの何れかを用いて行った。SDS-PAGE 終了後のタンパク質の検出は、Trans-Blot SD cell を用いてニトロセルロースメンブレン (Millipore) 又は, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Millipore) にタンパク質を転写後、ウェスタンブロッティング法

で行った。Phos-tag SDS-PAGE は、100 μM の Mn^{2+} -Phos-tag を添加して作製した、10% のアクリルアミドを含むゲルを用いて Kinoshita らの方法に従って行った (Kinoshita *et al.* 2006)。Phos-tag SDS-PAGE 終了後のタンパク質の検出は、Wet tank 法を用いて PVDF メンブレンにタンパク質を転写後、ウェスタンブロッティング法で行った。

4.11 ウェスタンブロッティング法

共免疫沈降後の JNK2 の解析は、1%アセチル化 bovine serum albumin (BSA, Nippon Gene) を含む TBST-Mg 溶液 (tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween 20 and 5 mM MgCl_2) に溶解させた、JNK2 抗体と Immuno-Aptamer TM, ウサギ IgG 抗体を用いて行った。共免疫沈降後の JNK1 の解析は、5%の BSA を含む TBST 溶液 (TBS containing 1% Tween 20) に溶解させた、JNK1 抗体と HRP-conjugated 抗マウス IgG light-chain specific 抗体を用いて行った。Phos-tag SDS-PAGE 後の angulin-1/LSR-GFP と angulin-1/LSR (S288A) -GFP の解析は、5%のスキムミルクを含む TBST 溶液に溶解させた、GFP 抗体と HRP-conjugated 抗ウサギ抗体を用いて行った。上記を除いた、ウェスタンブロッティング法による解析は、5%のスキムミルク、1%の BSA、5%の BSA の何れか含む TBST 溶液又は Can Get Signal Solution 1 (Toyobo) に溶解させた一次抗体と、5%のスキムミルク、5%の BSA の何れか含む TBST 溶液又は Can Get Signal Solution 2 (Toyobo) に溶解させた二次抗体を用いて行った。解析後のタンパク質の検出は LAS-4000 mini imaging system (GE Healthcare) を用いて行った。

4.12 Angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散の定量

Angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散を定量化するための第一段階と

して, angulin-1/LSR-GFP 又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP を発現している EpH4 細胞の, 三細胞接着点と二細胞接着面の angulin-1/LSR と tricellulin の蛍光強度を, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡に付属している画像解析用のソフトウェアを用いて測定した. 引き続き, 下記の式を用いて angulin-1/LSR と tricellulin の tTJs から bTJs への拡散の程度を計算した. $DS=2 \times BC_i / (TC_{i1}+TC_{i2})$. DS は angulin-1/LSR と tricellulin の拡散の程度を計算した値である. TC_{i1} と TC_{i2} は二つの隣り合う三細胞接着点での angulin-1/LSR と tricellulin の単位面積あたりの蛍光強度の値が導入される. BC_i は TC_{i1} と TC_{i2} の間の二細胞接着面での angulin-1/LSR と tricellulin の単位面積あたりの蛍光強度の値が導入される.

4.13 未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

4.14 統計解析

はじめに, 統計解析に用いるデータ群の正規性をコルモゴロフ-スミルノフ検定で検証し, 全てのデータ群が非正規分布であるとは言えないことを確認した. 続いて, F 検定を用いて比較データ群間における等分散性を検証し, 非等分散と判断された場合はウェルチの t 検定を用いて, 非等分散であるとは言えないと判断された場合はスチューデントの t 検定を用いて, 群間の差の有意性を判断した. 非正規分布, 非等分散, 群間の差に有意性有りとは判断する基準は, 検定による P 値が 0.05 未満の時とした. (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載).

第 5 章 図表

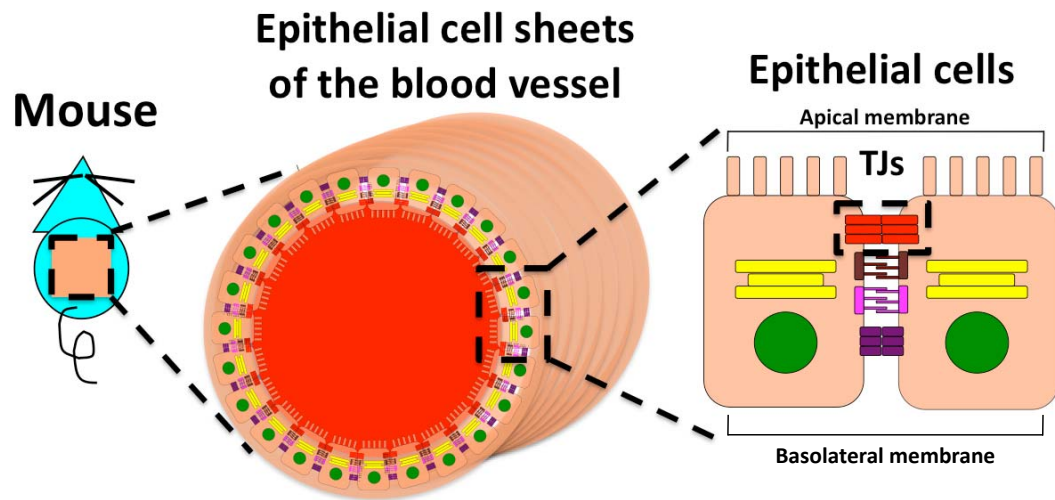


図 1 マウス (Mouse) の血管 (Blood vessel) をモデルとした上皮細胞シートとタイトジャンクションの模式図：上皮細胞シート (Epithelial cell sheets) が上皮細胞 (Epithelial cells) 同士の密着結合によって生み出されること. 上皮細胞同士の密着結合を制御する構造体として, タイトジャンクション (Tight junctions: TJs) が上皮細胞側面の頂端面 (Apical side) に構成されることを示している.

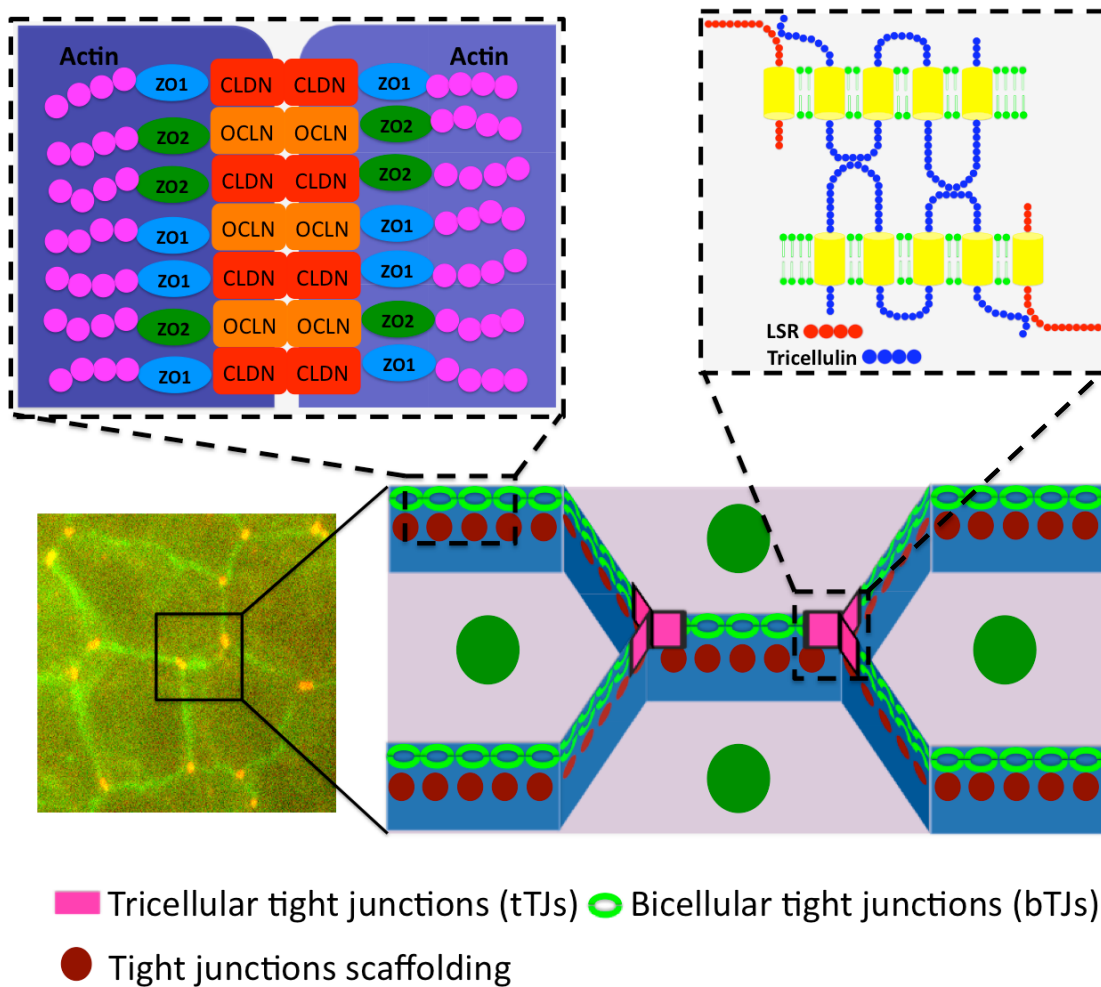


図 2 トリセルラータイトジャンクション, バイセルラータイトジャンクション, TJs 裏打ちの模式図: トリセルラータイトジャンクション (tTJs) 構成タンパク質である angulin-1/LSR (LSR) と tricellulin (Tricellulin), バイセルラータイトジャンクション (bTJs) 構成タンパク質である claudin (CLDN) と occludin (OCLN), TJs 裏打ち (Tight junctions scaffolding) 構成タンパク質である ZO-1 (ZO1) と ZO-2 (ZO2) を用いて描写した, tTJs, bTJs, TJs 裏打ちの模式図.

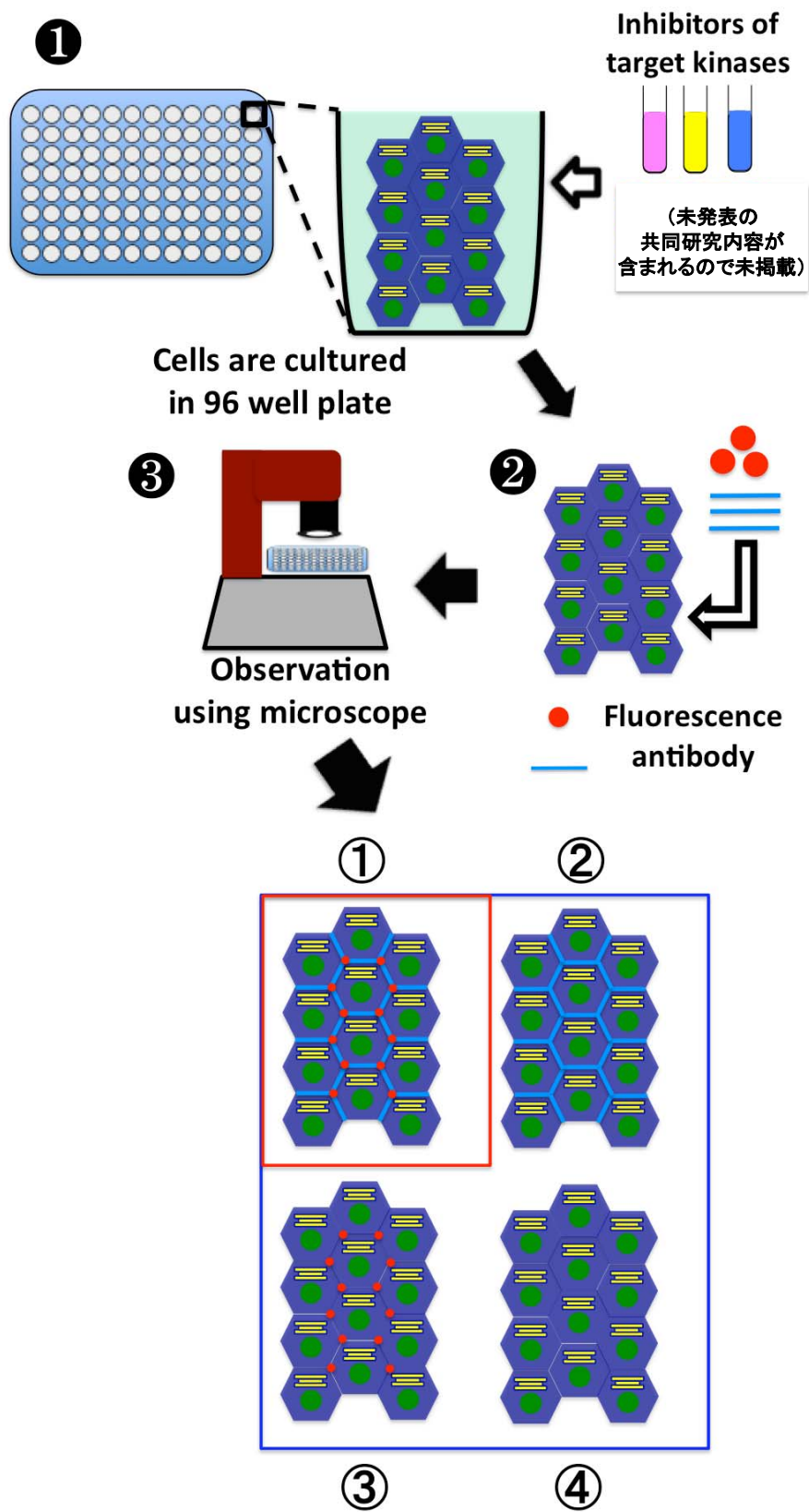


図 3 (説明は次ページに記載)

図 3 標的タンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量を制御するキナーゼの網羅的探索法の模式図（未発表の共同研究内容が含まれるので一部未掲載）：①96 well plate で培養した細胞を，キナーゼ（kinase）を標的とする阻害剤（Inhibitors）や（未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載）で処理．②阻害剤や（未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載）処理が終了した細胞の標的タンパク質を，蛍光抗体（Fluorescence antibody）で染色．③染色した標的タンパク質の蛍光画像を蛍光顕微鏡（microscope）で取得して観察．コントロール細胞（①）と阻害剤や（未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載）処理した細胞の蛍光画像（②-④）を比較して，標的タンパク質の細胞内局在やタンパク質発現量を制御するキナーゼを同定．

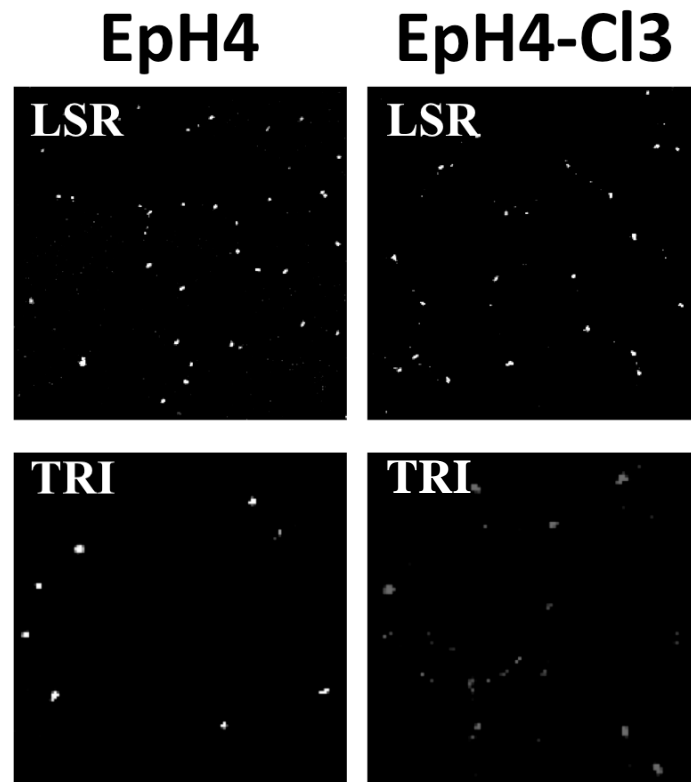


図4 EpH4細胞 (Eph4) と EpH4-C13細胞 (Eph4-C13) における tTJs 構成タンパク質の細胞内局在：細胞を固定後，一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR) 及び tricellulin (TRI) を蛍光染色した．蛍光染色した細胞の観察は LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った．

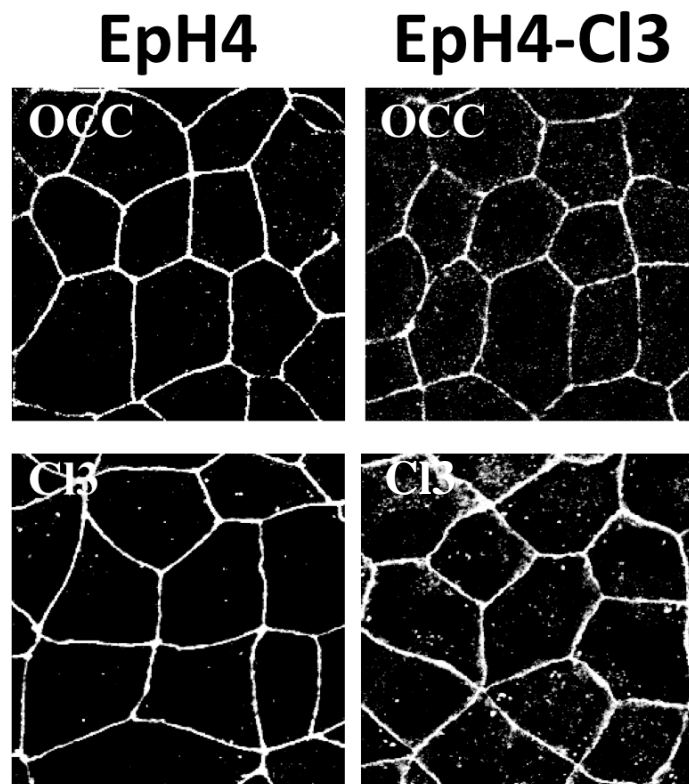


図5 EpH4細胞 (E_pH₄) と EpH4-C13細胞 (E_pH₄-C13) における bTJs 構成タンパク質の細胞内局在: 細胞を固定後, 一次抗体及び二次抗体を用いて occludin (OCC) と C13 を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った.

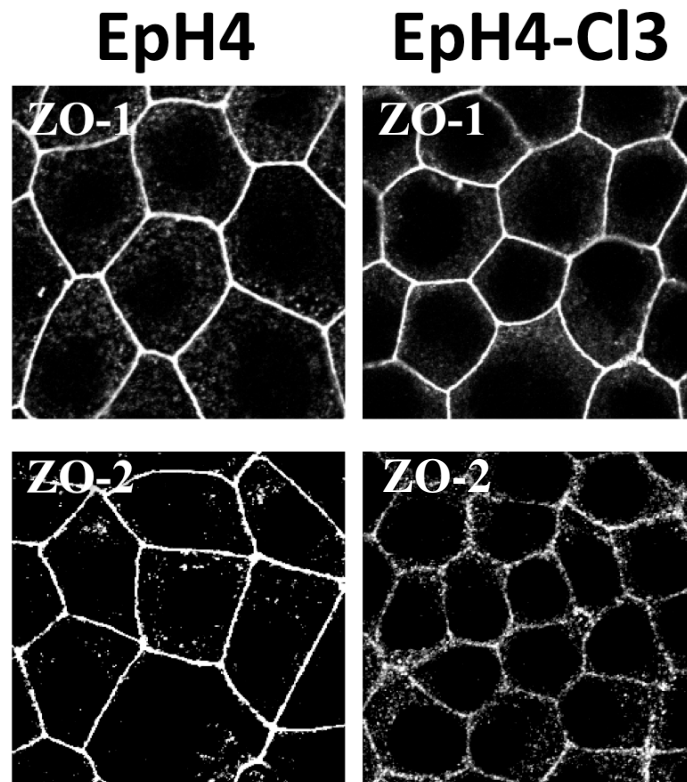


図6 EpH4細胞（EpH4）とEpH4-Cl3細胞（EpH4-Cl3）におけるTJs裏打ち構成タンパク質の細胞内局在：細胞を固定後，一次抗体及び二次抗体を用いてZO-1とZO-2を蛍光染色した．蛍光染色した細胞の観察は，LSM510共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った．

Kinase inhibitor treatment

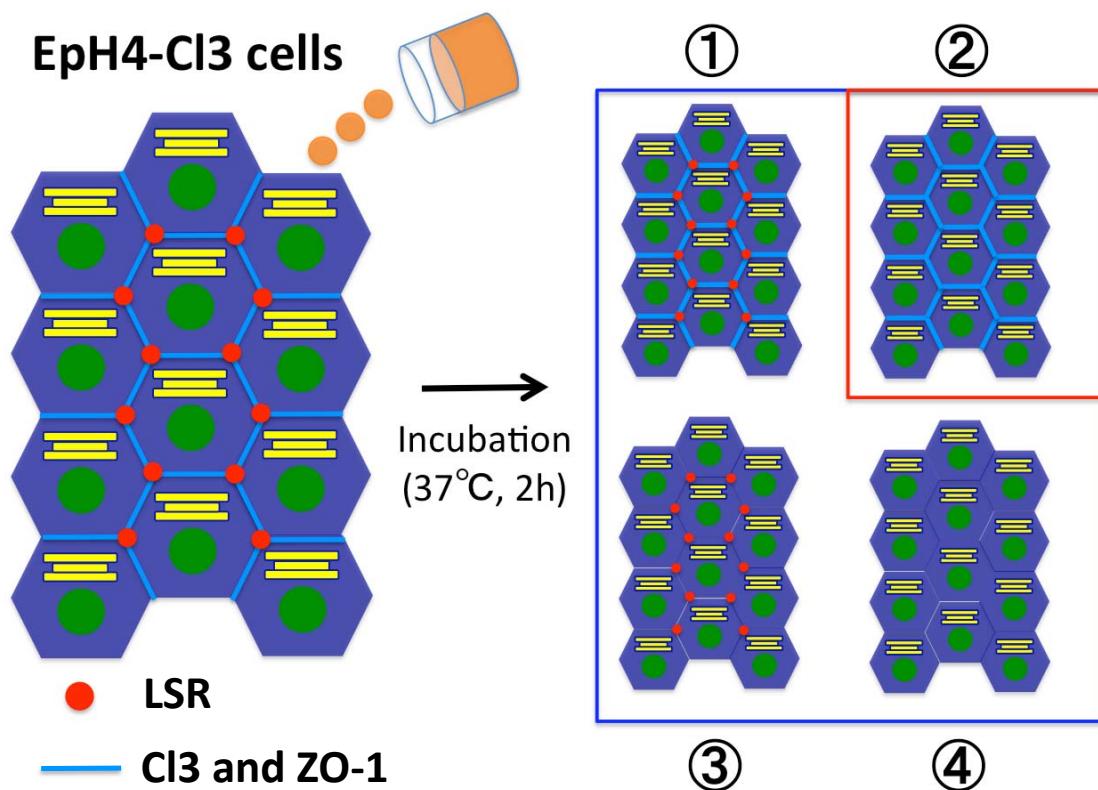


図 7 キナーゼ阻害剤によるスクリーニングの流れと、本研究の解析ターゲットにした表現系: EpH4-Cl3 細胞をキナーゼ阻害剤 (Kinase inhibitor) で処理 (37°C, 2 時間 (2h)) したところ、右図で示す 4 つの表現系が確認された (①angulin-1/LSR (LSR), Cl3-YFP (Cl3), ZO-1 の細胞内局在が正常, ②LSR の細胞内局在が異常, Cl3, ZO-1 の細胞内局在が正常, ③LSR の細胞内局在が正常, Cl3, ZO-1 の片方の細胞内局在が異常, ④LSR の細胞内局在が異常, Cl3, ZO-1 の片方又は両方の細胞内局在が異常). そして、本研究では ②の表現系を示したキナーゼ阻害剤に注目して研究を行った.

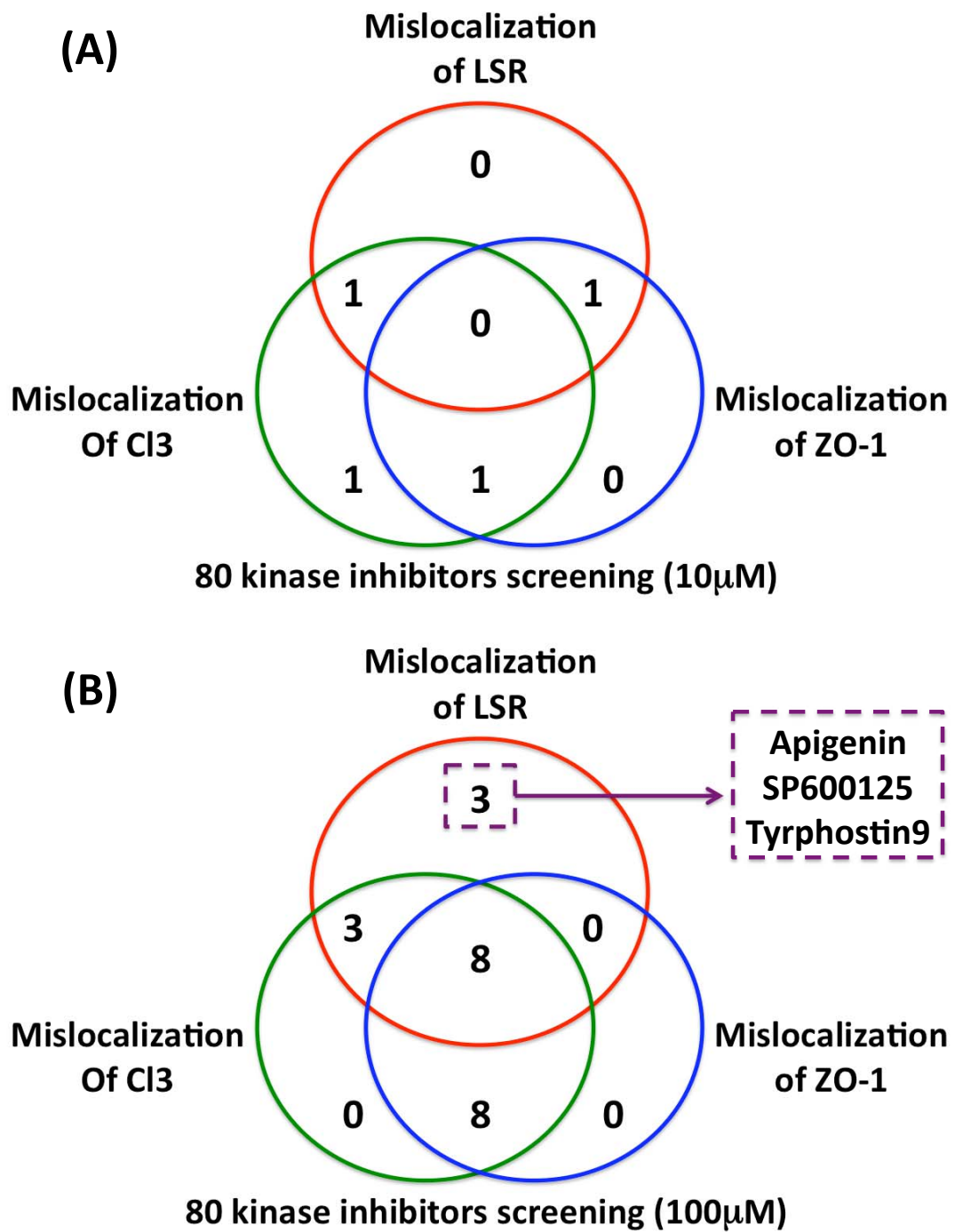


図 8 (説明は次ページに記載)

図 8 EpH4-C13 細胞の angulin-1/LSR, C13, ZO-1 の細胞内局在を攪乱するキナーゼの数を示したベン図：Eph4-C13 細胞を 10 μ M (A) 又は 100 μ M (B) の濃度の 80 種類のキナーゼ阻害剤で 2 時間処理した後，細胞を固定し，一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR) と ZO-1 を蛍光染色した．染色終了後，LSR, C13-YFP (C13) 及び ZO-1 の細胞内局在を INCell Analyzer 1000 system を用いて観察した．観察の結果，LSR, C13 及び ZO-1 の細胞内局在を攪乱すると確認されたキナーゼの数を赤円，緑円，青円の中に記述した．

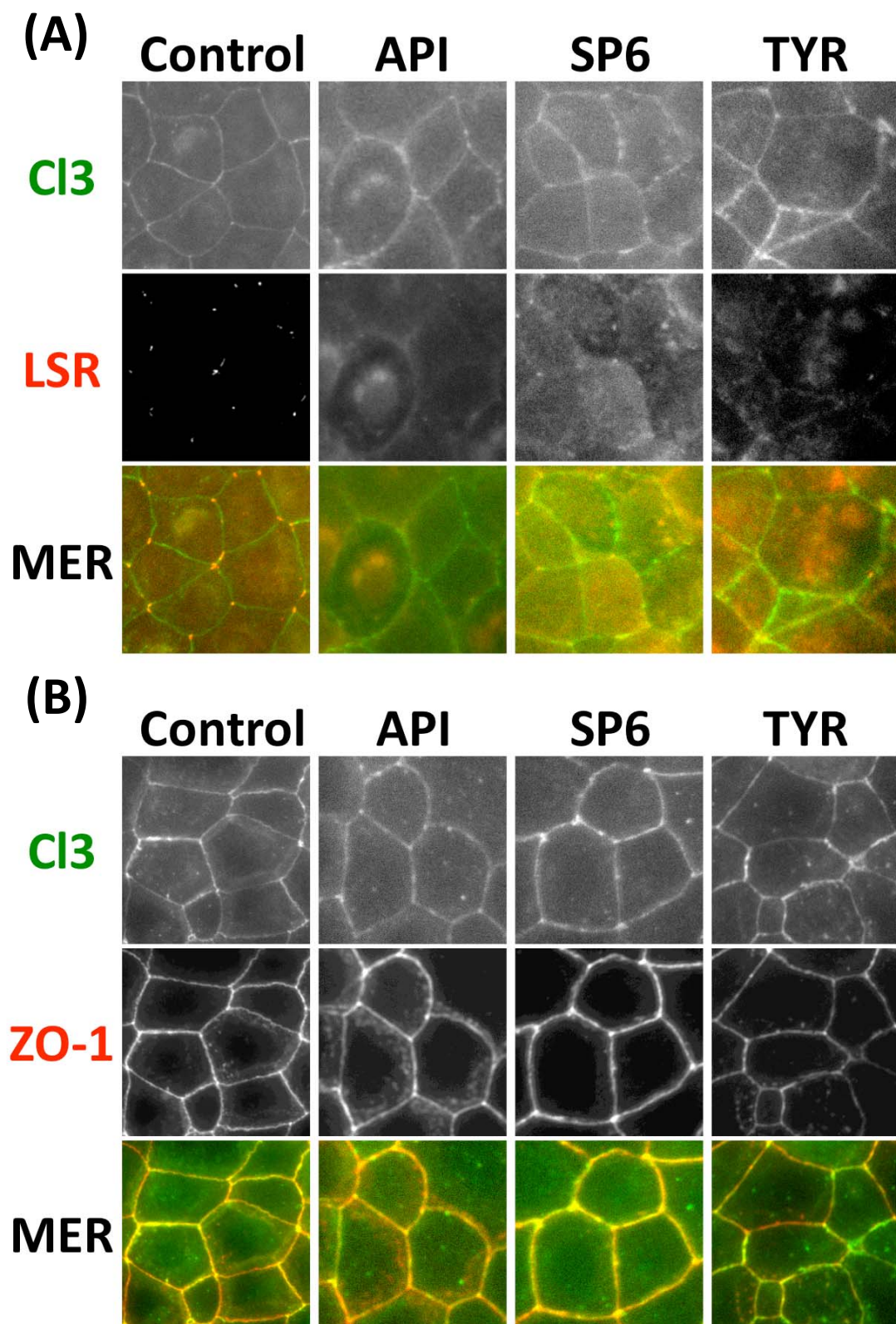


図 9 (説明は次ページに記載)

図 9 EpH4-C13 細胞を Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 で処理した時の C13-YFP, angulin-1/LSR 及び ZO-1 の細胞内局在への影響 : EpH4-C13 細胞を, DMSO (Control) 又は 100 μ M の濃度の Apigenin (API), SP600125 (SP6), Tyrphostin 9 (TYR) の何れかで 2 時間処理した後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR, A) と ZO-1 (B) を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は INCell Analyzer 1000 system を用いて行った. C13-YFP (C13, 緑色), LSR (赤色), ZO-1 (赤色) の蛍光を取得した画像はグレースケールで示した. MER は, LSR 又は ZO-1 の画像と C13 の画像の重ね合わせ画像を示す.

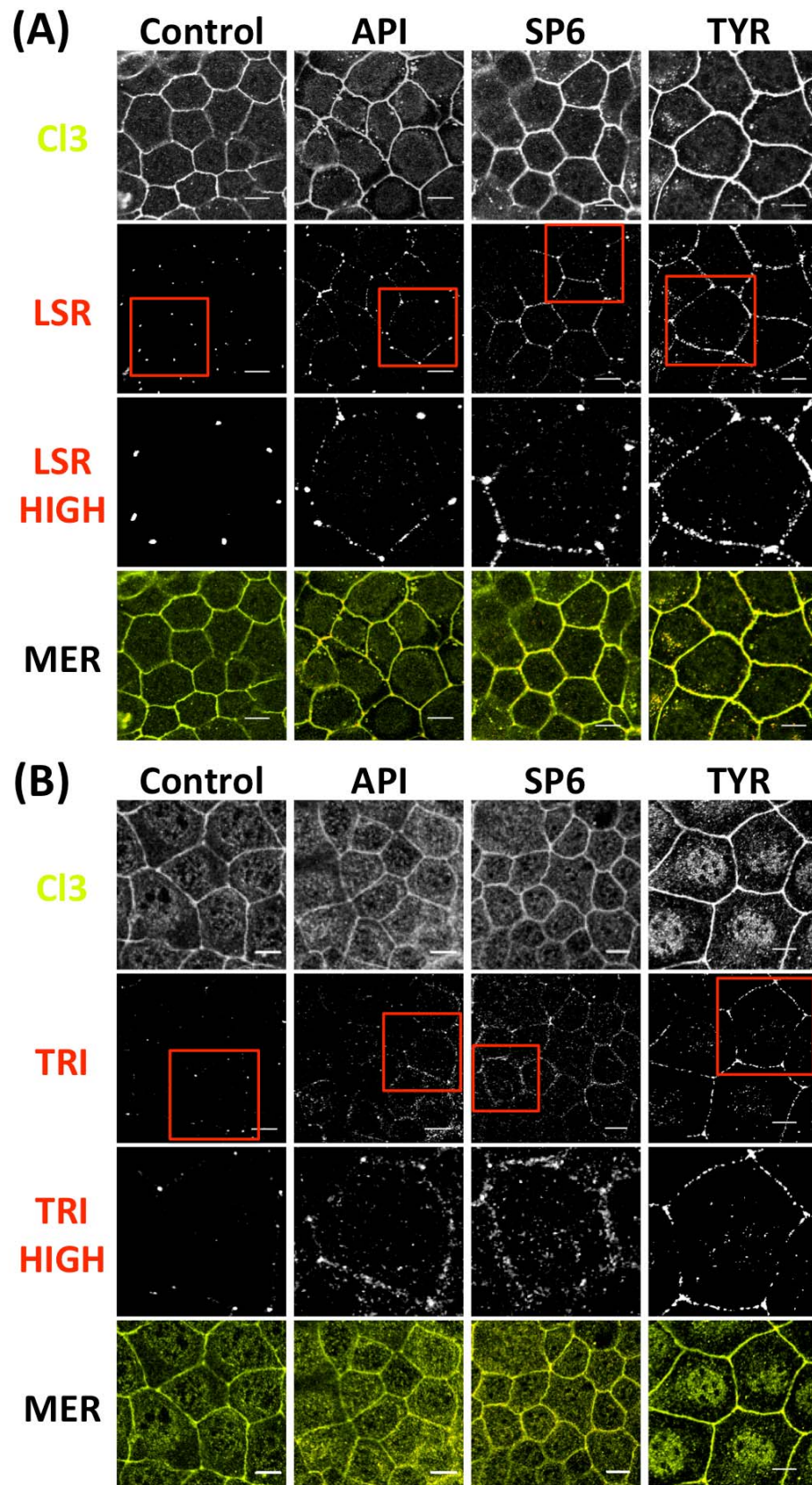


図 10 (説明は次ページに記載)

図 10 EpH4-C13 細胞を Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 で処理した時の, tTJs 構成タンパク質の細胞内局在への影響: EpH4-C13 細胞を, DMSO (Control), 25 μ M Apigenin (API), 25 μ M SP600125 (SP6), 20 μ M Tyrphostin 9 (TYR) の何れかで 2 時間処理した後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR, A) と tricellulin (TRI, B) を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った. C13-YFP (C13, 黄色), LSR (赤色), TRI (赤色) の蛍光を取得した画像及び, LSR 及び TRI の画像の赤枠の拡大画像 (LSR HIGH, TRI HIGH) はグレースケールで示した. MER は, LSR 又は TRI の画像と C13 の画像の重ね合わせ画像を示す. スケールバーは 10 μ m を示す.

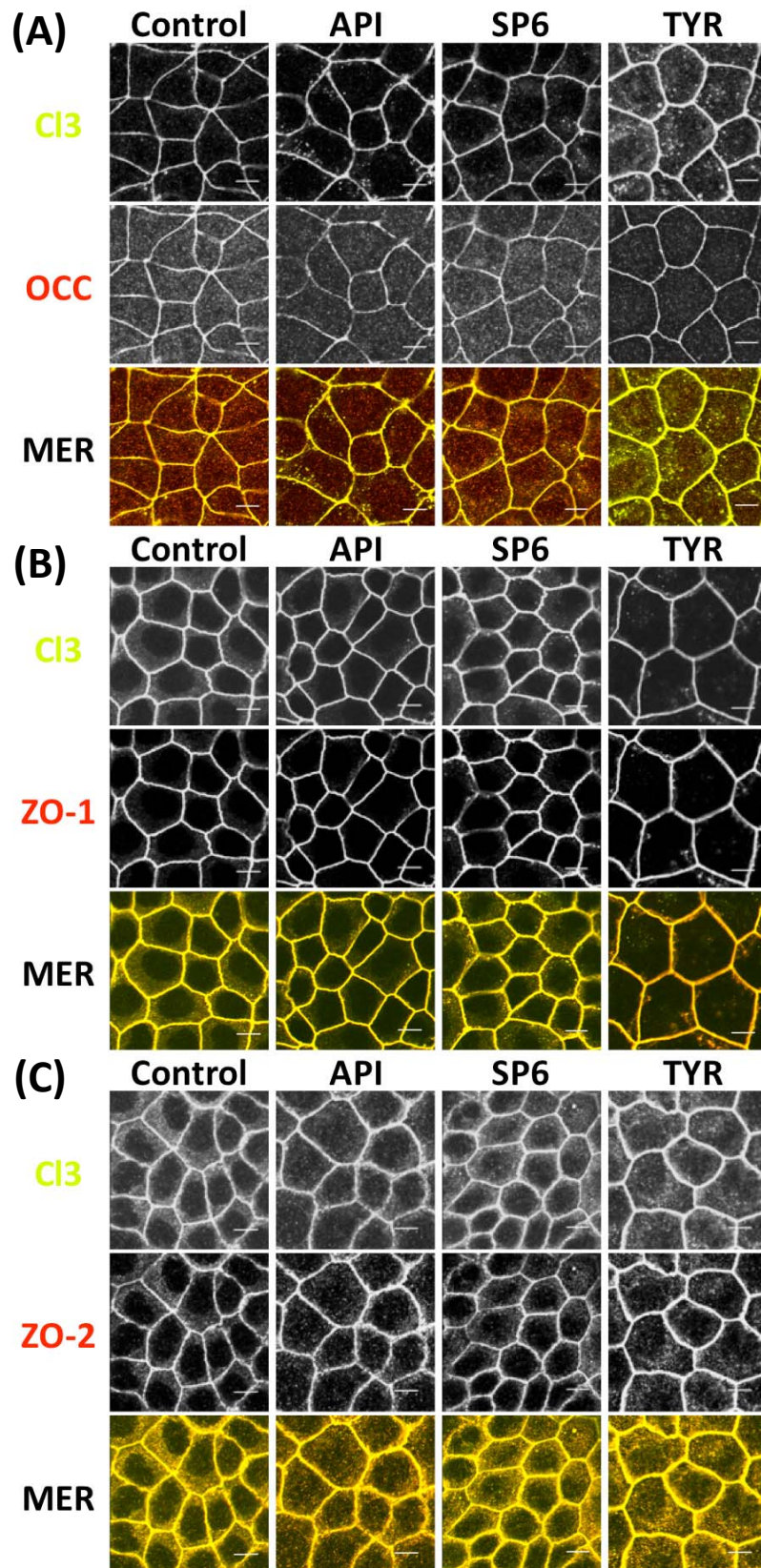


図 11 (説明は次ページに記載)

図 11 EpH4-Cl3 細胞 を Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 で処理した時の, bTJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質の細胞内局在への影響 : EpH4-Cl3 細胞を, DMSO (Control), 25 μ M Apigenin (API), 25 μ M SP600125 (SP6), 20 μ M Tyrphostin 9 (TYR) の何れかで 2 時間処理した後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて occludin (OCC, A), ZO-1 (B) と ZO-2 (C) を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った. Cl3-YFP (Cl3, 黄色), OCC (赤色), ZO-1 (赤色), ZO-2 (赤色) の蛍光を取得した画像はグレースケールで示した. MER は, OCC, ZO-1 又は ZO-2 の画像と Cl3 の画像の重ね合わせ画像を示す. スケールバーは 10 μ m を示す.

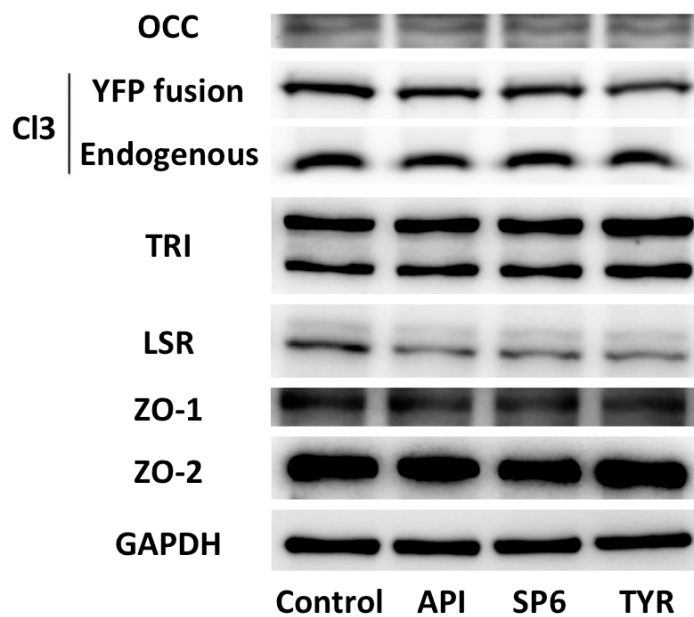


図 12 EpH4-Cl3 細胞を Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 で処理した時の, TJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質の発現量への影響: EpH4-Cl3 細胞を, DMSO (Control), 25 μ M Apigenin (API), 25 μ M SP600125 (SP6), 20 μ M Tyrphostin 9 (TYR) の何れかで 2 時間処理した後, 細胞可溶化物を取得した. その後, 一次抗体及び二次抗体を用いて, 細胞可溶化物中に含まれる occludin (OCC), Cl3, angulin-1/LSR (LSR), tricellulin (TRI), ZO-1, ZO-2 及び GAPDH の発現量を確認した. Cl3 については内在性 (Endogenous) と Cl3-YFP (YFP fusion) の各々の発現量を確認した.

図 13 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 14 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

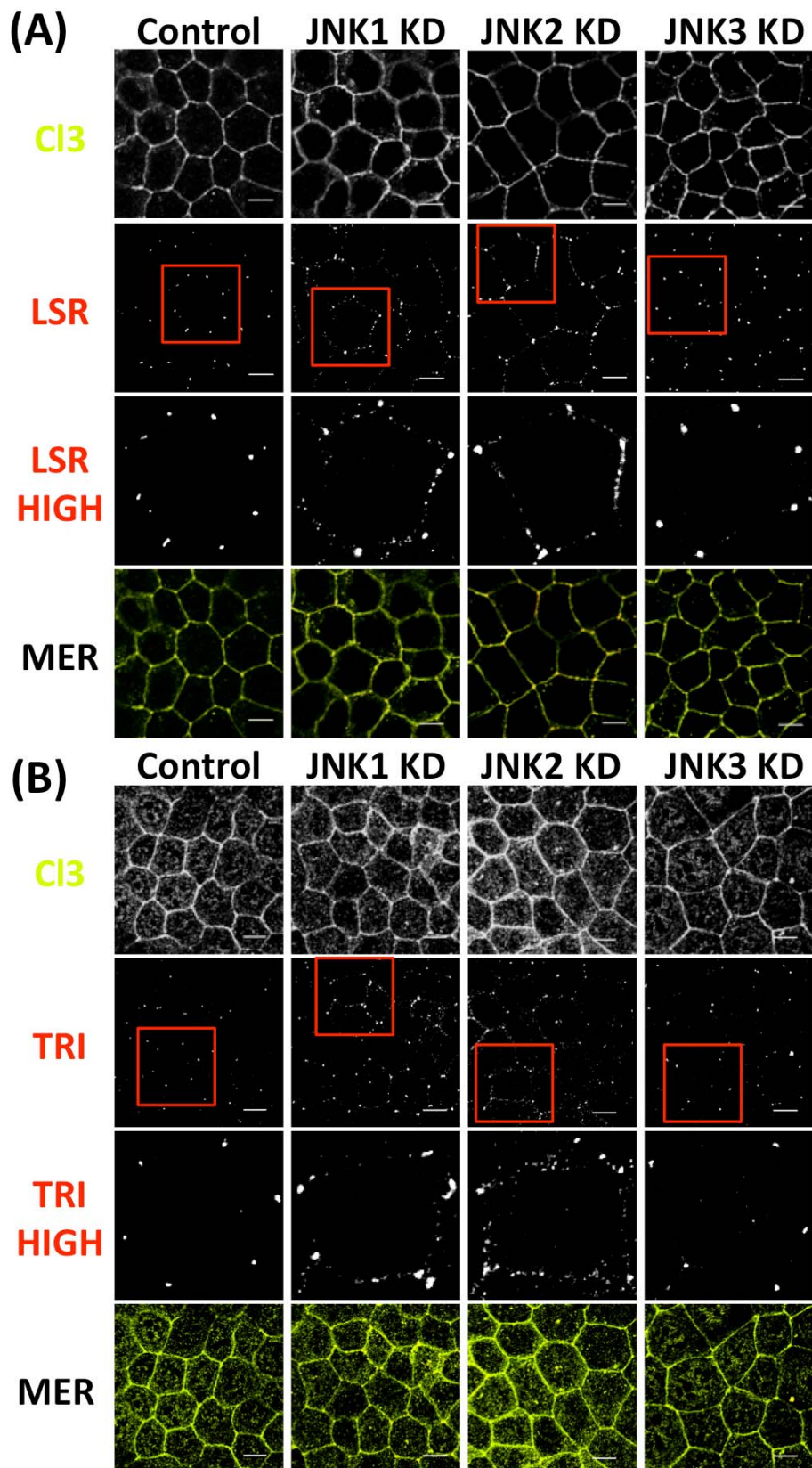


図 15 (説明は次ページに記載)

図 15 EpH4-C13 細胞の JNK1, JNK2, JNK3 の発現を抑制した時の, tTJs の構成タンパク質の細胞内局在への影響: EpH4-C13 細胞に, scramble RNA (Control), JNK1 の発現を抑制する siRNA (JNK1 KD), JNK2 の発現を抑制する siRNA (JNK2 KD), JNK3 の発現を抑制する siRNA (JNK3 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR, A) と tricellulin (TRI, B) を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った. C13-YFP (C13, 黄色), LSR (赤色), TRI (赤色) の蛍光を取得した画像及び, LSR 及び TRI の画像の赤枠の拡大画像 (LSR HIGH, TRI HIGH) はグレースケールで示した. MER は, LSR 又は TRI の画像と C13 の画像の重ね合わせ画像を示す. スケールバーは 10 μm を示す.

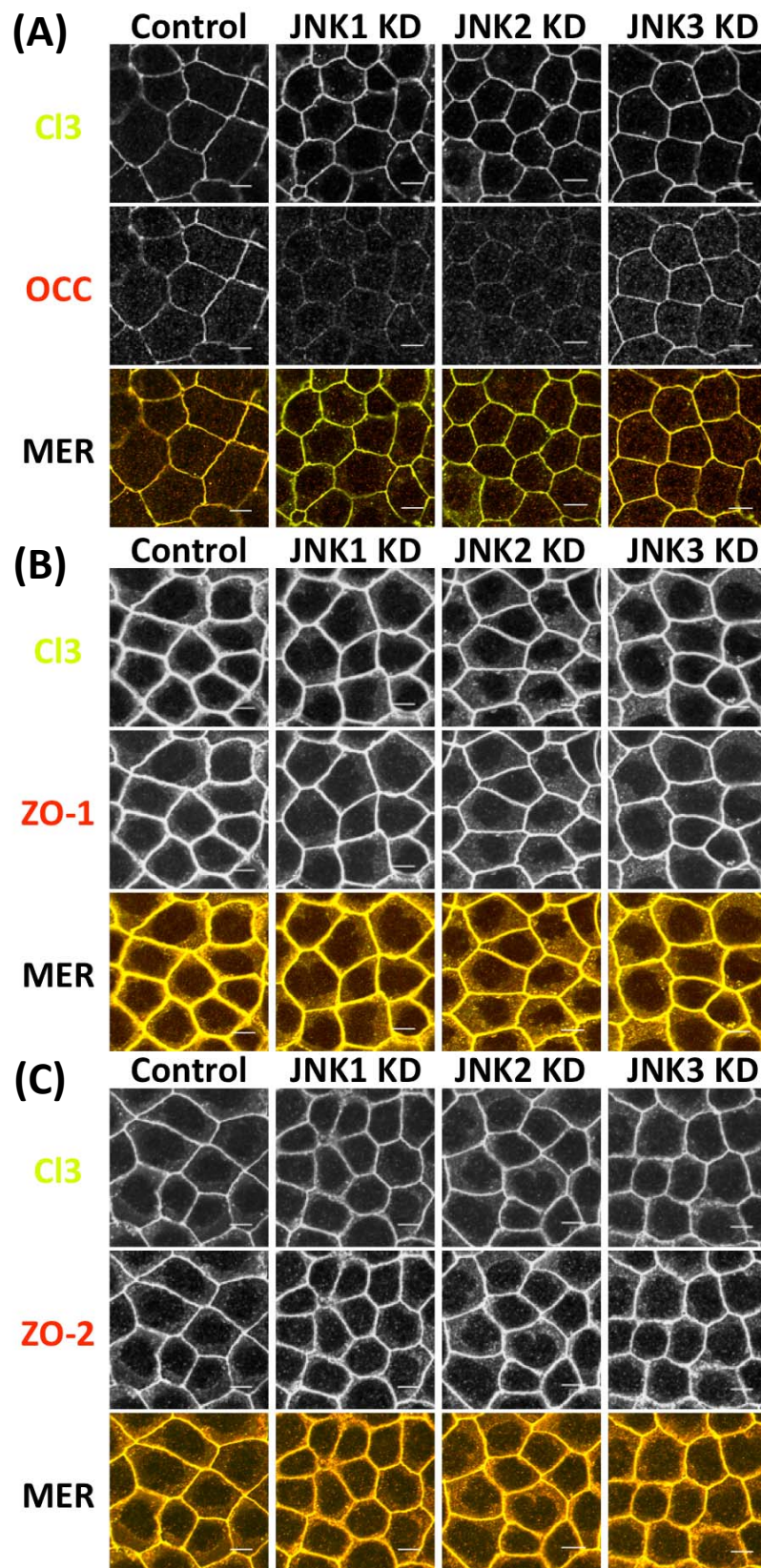


図 16 (説明は次ページに記載)

図 16 EpH4-C13 細胞の JNK1, JNK2, JNK3 の発現を抑制した時の, bTJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質の細胞内局在への影響: EpH4-C13 細胞に, scramble RNA (Control), JNK1 の発現を抑制する siRNA (JNK1 KD), JNK2 の発現を抑制する siRNA (JNK2 KD), JNK3 の発現を抑制する siRNA (JNK3 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて occludin (OCC, A), ZO-1 (B) と ZO-2 (C) を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った. C13-YFP (C13, 黄色), OCC (赤色), ZO-1 (赤色), ZO-2 (赤色) の蛍光を取得した画像はグレースケールで示した. MER は, OCC, ZO-1 又は ZO-2 の画像と C13 の画像の重ね合わせ画像を示す. スケールバーは 10 μm を示す.

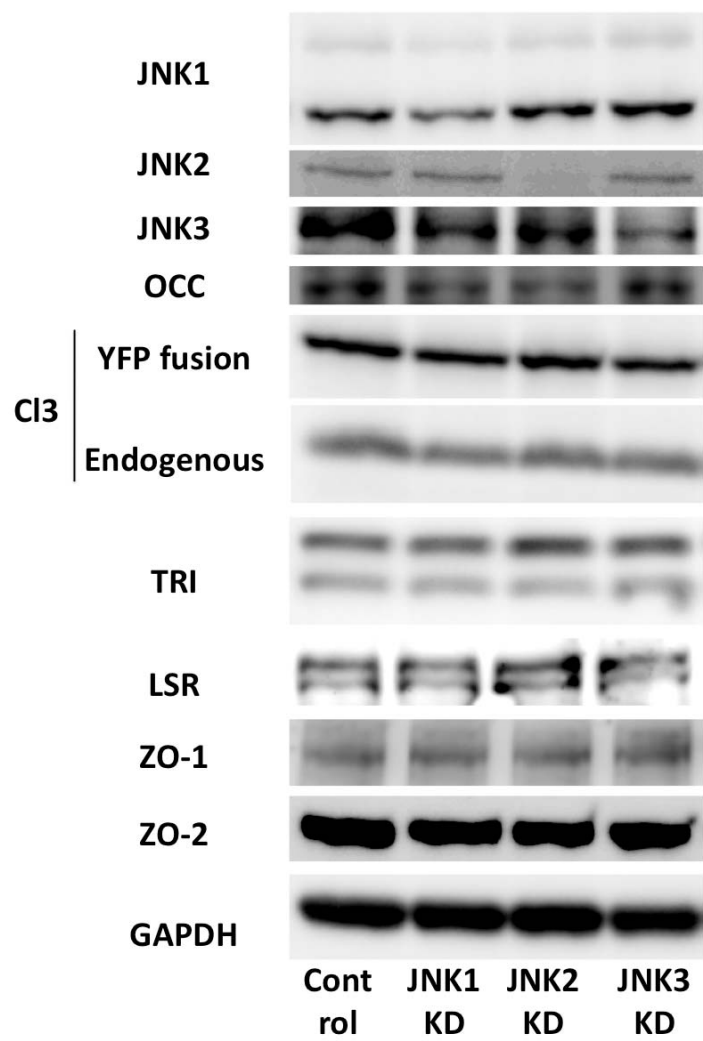


図 17 (説明は次ページに記載)

図 17 EpH4-C13 細胞の JNK1, JNK2, JNK3 の発現を抑制した時の, TJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質の発現量への影響: EpH4-C13 細胞に, scramble RNA (Control), JNK1 の発現を抑制する siRNA (JNK1 KD), JNK2 の発現を抑制する siRNA (JNK2 KD), JNK3 の発現を抑制する siRNA (JNK3 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後, 細胞可溶化物を取得した. その後, 一次抗体及び二次抗体を用いて, 細胞可溶化物中に含まれる JNK1, JNK2, JNK3, occludin (OCC), Cl3, angulin-1/LSR (LSR), tricellulin (TRI), ZO-1, ZO-2 及び GAPDH の発現量を確認した. Cl3 については内在性 (Endogenous) と Cl3-YFP (YFP fusion) の各々の発現量を確認した.

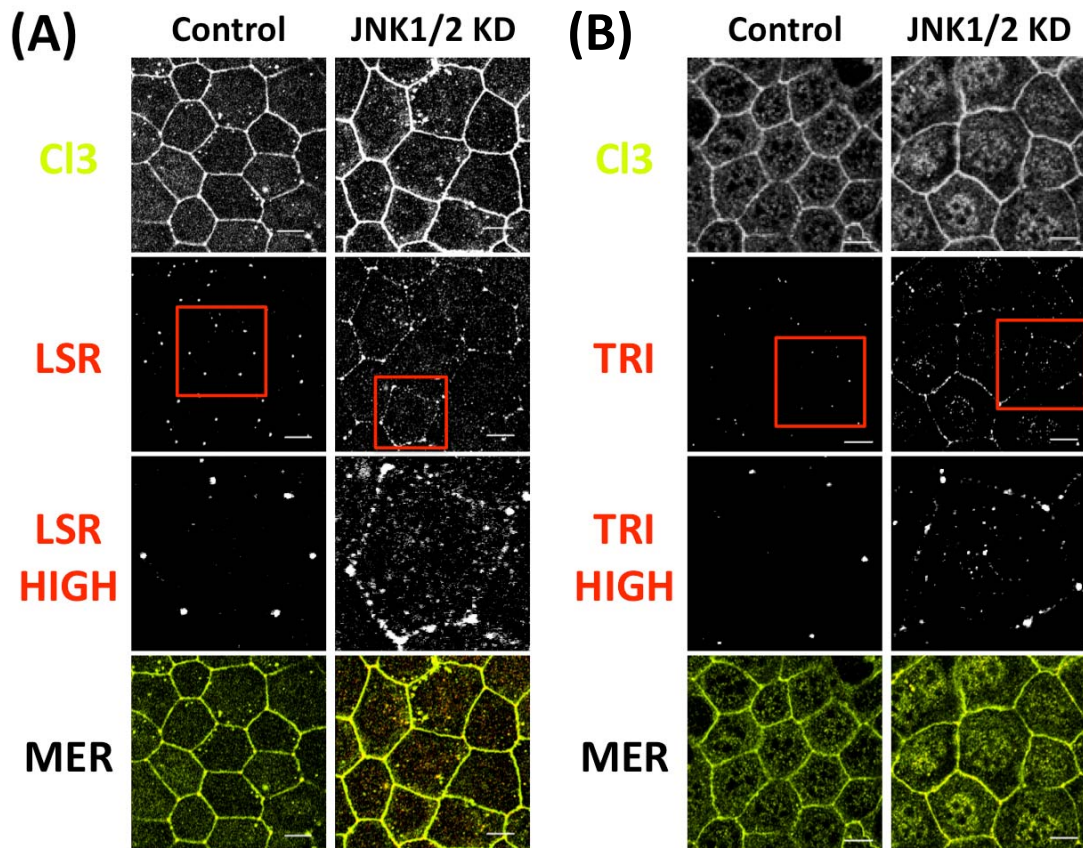


図 18 EpH4-C13 細胞の JNK1 と JNK2 の発現を共に抑制した時の、tTJs 構成タンパク質の細胞内局在への影響：Eph4-C13 細胞に、scramble RNA (Control), JNK1 と JNK2 の発現を抑制する 2 種類の siRNA (JNK1/2 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後、細胞を固定し、一次抗体及び二次抗体を用いて angulin-1/LSR (LSR, A) と tricellulin (TRI, B) を蛍光染色した。蛍光染色した細胞の観察は、LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った。C13-YFP (C13, 黄色), LSR (赤色), TRI (赤色) の蛍光を取得した画像及び、LSR 及び TRI の画像の赤枠の拡大画像 (LSR HIGH, TRI HIGH) はグレースケールで示した。MER は、LSR 又は TRI の画像と C13 の画像の重ね合わせ画像を示す。スケールバーは 10 μm を示す。

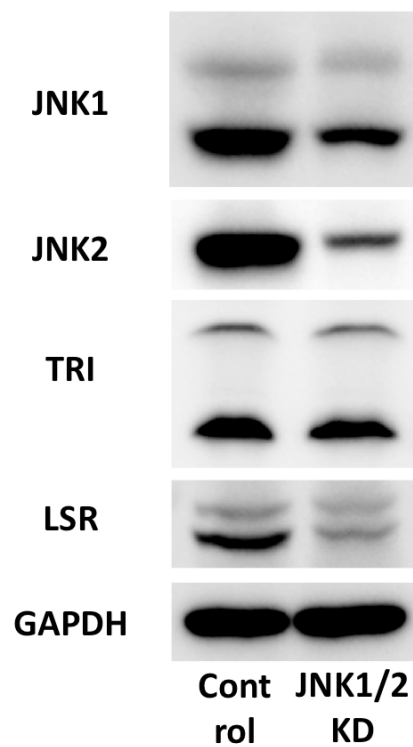


図 19 EpH4-C13 細胞の JNK1 と JNK2 の発現を共に抑制した時の, tTJs 構成タンパク質の発現量への影響: EpH4-C13 細胞に, scramble RNA (Control), JNK1 と JNK2 の発現を抑制する 2 種類の siRNA (JNK1/2 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後, 細胞可溶化物を取得した. その後, 一次抗体及び二次抗体を用いて, 細胞可溶化物中に含まれる JNK1, JNK2, angulin-1/LSR (LSR), tricellulin (TRI) 及び GAPDH の発現量を確認した.

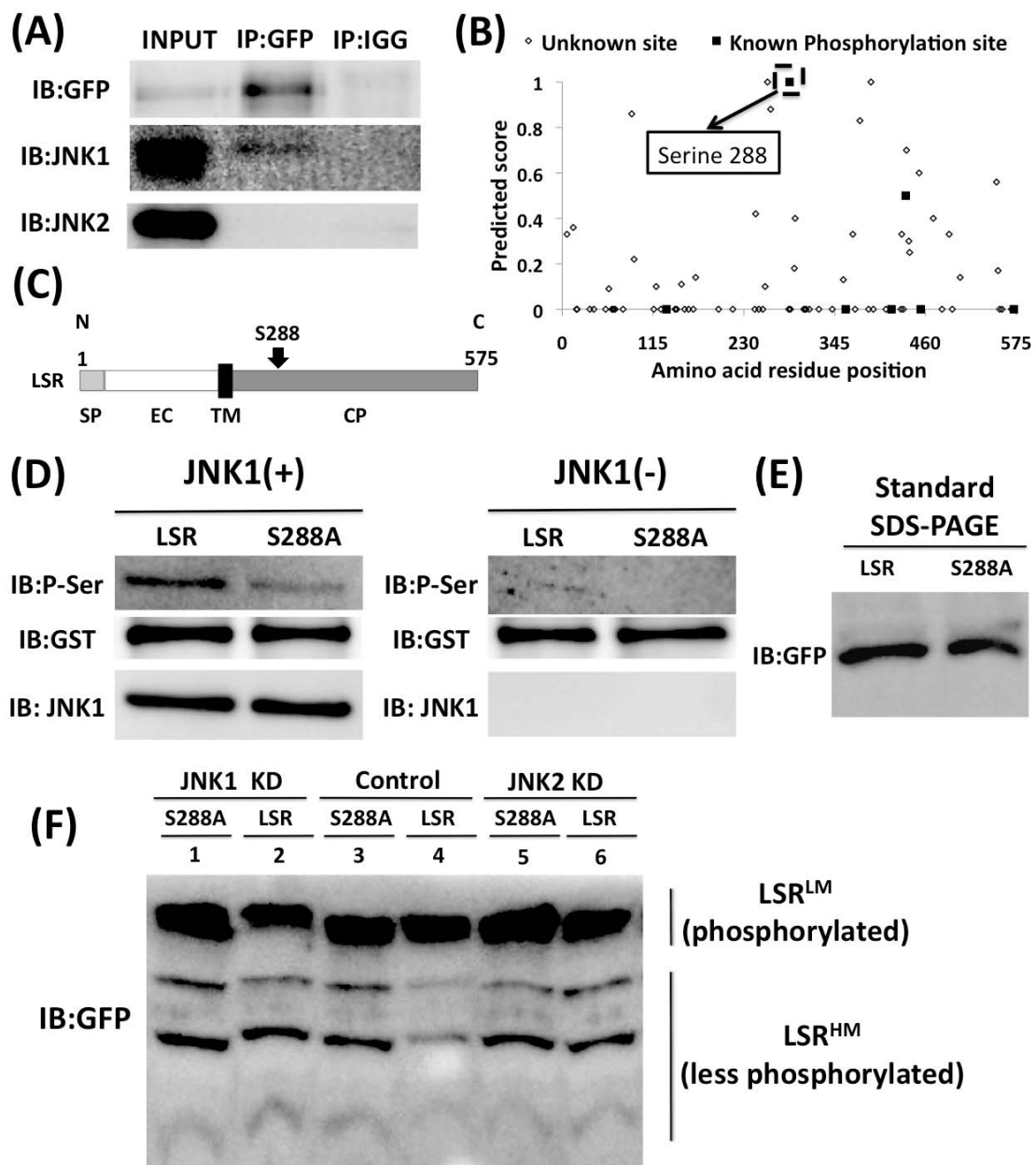


図 20 (説明は次ページに記載)

図 20 JNK1 と JNK2 による angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化制御

御：(A) 共免疫沈降法による，E_pH4 細胞内での JNK1 及び JNK2 と angulin-1/LSR-GFP との相互作用の確認．E_pH4 細胞に，angulin-1/LSR-GFP を発現するプラスミドを導入して 72 時間培養後，細胞可溶化物 (INPUT) を取得した．続いて，細胞可溶化物に対して，GFP 抗体 (GFP) 又は正常ウサギ IgG 抗体 (IGG) による免疫沈降 (immunoprecipitation: IP) を行い，沈降物を取得した．最後に，細胞可溶化物及び沈降物に対して，GFP 抗体 (GFP)，JNK1 抗体 (JNK1)，JNK2 抗体 (JNK2) を用いてウェスタンブロッティングを行い，angulin-1/LSR-GFP，JNK1，JNK2 の発現量を確認した．(B) POSTMOD を用いて算出された，angulin-1/LSR の各セリン及びスレオニンを JNK1 がリン酸化する期待値．X 軸は angulin-1/LSR の各セリン及びスレオニンのアミノ酸位置，Y 軸は各セリン及びスレオニンを JNK1 がリン酸化する期待値を示す．Known phosphorylation site (■) は Phospho.ELM に登録されている angulin-1/LSR の既知のリン酸化アミノ酸，Unknown site (◇) は Phospho.ELM に登録されていない angulin-1/LSR のリン酸化未知のアミノ酸を示す．(C) マウスの angulin-1/LSR タンパク質の構造の模式図．Angulin-1/LSR (LSR) がシグナルペプチド (signal peptide: SP)，細胞外領域 (extracellular domain: EC)，一回膜貫通領域 (single transmembrane domain: TM) 及び細胞質領域 (cytoplasmic domain: CP) から成り立つことを示す．矢印は，288 残基目のセリン (S288) が細胞質領域に存在することを示す．(D) JNK1 による LSR の S288 のリン酸化の確認．精製した GST-LSR (LSR) 又は GST-LSR (S288A) (S288A) のペプチドを，JNK1 と ATP (JNK1 (+)) 又は ATP (JNK1 (-)) と *in vitro* で反応させた後，反応液中の LSR 及び S288A のリン酸化レベルを，Phosphoserine 抗体 (P-ser) を用いたウェスタンブロッティングで検出した．また，反応液中の LSR，S288A，JNK1 の発現量も GST 抗体及び JNK1 抗体を用いたウ

ウェスタンブロッティングで併せて検出した。(E) SDS-PAGE を行なった時の angulin-1/LSR-GFP 及び angulin-1/LSR (S288A) -GFP の泳動距離。Eph4 細胞に, angulin-1/LSR-GFP (LSR) 又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP (S288A) を発現するプラスミドと scramble RNA を導入して 72 時間培養後, 細胞可溶化物を取得した。続いて, SDS-PAGE と GFP 抗体 (GFP) を用いたウェスタンブロッティングを行い LSR と S288A タンパク質由来のバンドの泳動距離を確認した。その結果, LSR と S288A の泳動距離に差が無いことが示された。(F) Phos-tag SDS-PAGE を行なった時の, angulin-1/LSR-GFP 及び angulin-1/LSR (S288A) -GFP の泳動距離への, JNK1 及び JNK2 の影響。Eph4 細胞に, angulin-1/LSR-GFP (LSR) 又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP (S288A) を発現するプラスミドと, scramble RNA (Control), JNK1 の発現を抑制する siRNA (JNK1 KD), JNK2 の発現を抑制する siRNA (JNK2 KD) の何れかを導入して 72 時間培養後, 細胞可溶化物を取得した。続いて, Phos-tag SDS-PAGE と GFP 抗体 (GFP) を用いたウェスタンブロッティングを行い LSR と S288A タンパク質由来のバンドの泳動距離を確認した。その結果, 4 レーンと比較して, 他の 1, 2, 3, 5, 6 レーンでは, 泳動距離の長いバンド (high mobility (less phosphorylated) form of LSR: LSR^{HM}) のシグナルが増加していることが確認された。また, 泳動距離の短いバンド (low mobility (phosphorylated) form of LSR: LSR^{LM}) のシグナルが全てのレーンで大きく変化しないことも併せて確認された。

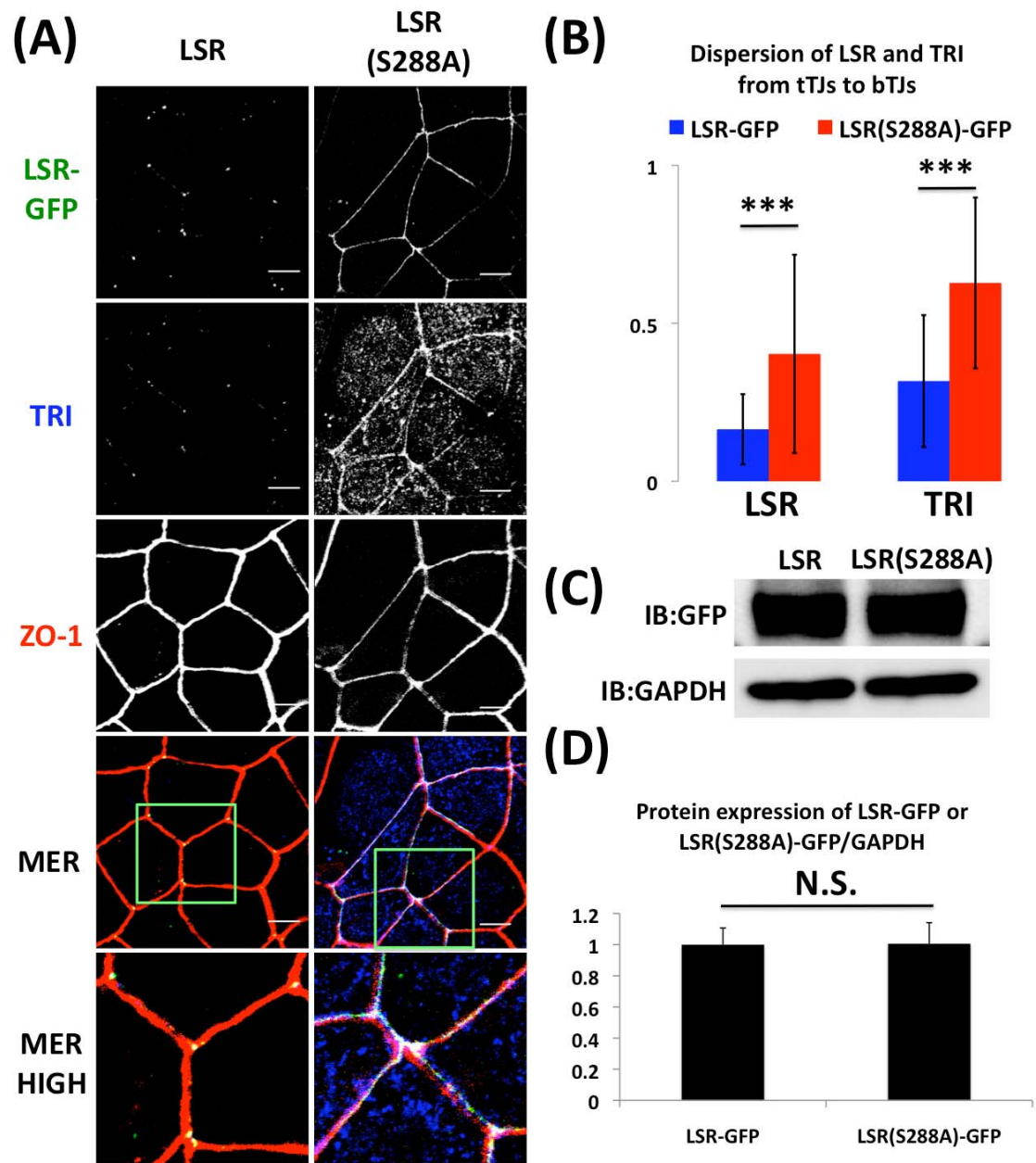


図 21 (説明は次ページに記載)

図 21 Angulin-1/LSR の 288 残基目のセリンのリン酸化阻害が, angulin-1/LSR と tricellulin の細胞内局在に与える影響: (A) EpH4 細胞に, angulin-1/LSR-GFP (LSR) 又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP (LSR (S288A)) を発現するプラスミドを導入して 72 時間培養後, 細胞を固定し, 一次抗体及び二次抗体を用いて tricellulin (TRI) と ZO-1 を蛍光染色した. 蛍光染色した細胞の観察は, LSM510 共焦点蛍光顕微鏡を用いて行った. LSR-GFP (緑色), TRI (青色), ZO-1 (赤色) の蛍光を取得した画像はグレースケールで示した. MER は, LSR-GFP, TRI, ZO-1 の画像の重ね合わせ画像を示す. MER HIGH は, MER の画像の緑枠の部分の拡大画像を示す. スケールバーは 10 μm を示す. (B) Angulin-1/LSR-GFP (LSR-GFP) 又は angulin-1/LSR (S288A) -GFP (LSR (S288A) -GFP) を発現するプラスミドを導入した EpH4 細胞での, angulin-1/LSR (LSR) 及び TRI の tTJs から bTJs への拡散を定量化したグラフである (N=50, *** P<0.01). 定量化には, (A) と同条件の処理を行った EpH4 細胞を使用した. グラフは平均±標準偏差で表記した. (C) (A) と同条件でプラスミド導入と培養を行った EpH4 細胞の細胞可溶化物を取得後, SDS-PAGE と GFP 抗体 (GFP) 及び GAPDH 抗体 (GAPDH) を用いたウェスタンブロッティングを行い, angulin-1/LSR-GFP (LSR) と angulin-1/LSR (S288A) -GFP (LSR (S288A)) の発現量を確認した. (D) (C) の条件下における angulin-1/LSR-GFP (LSR-GFP) と angulin-1/LSR (S288A) -GFP (LSR (S288A) -GFP) の発現量を定量化したグラフである (N=3, N.S. P>0.05). グラフは平均±標準偏差で表記した.

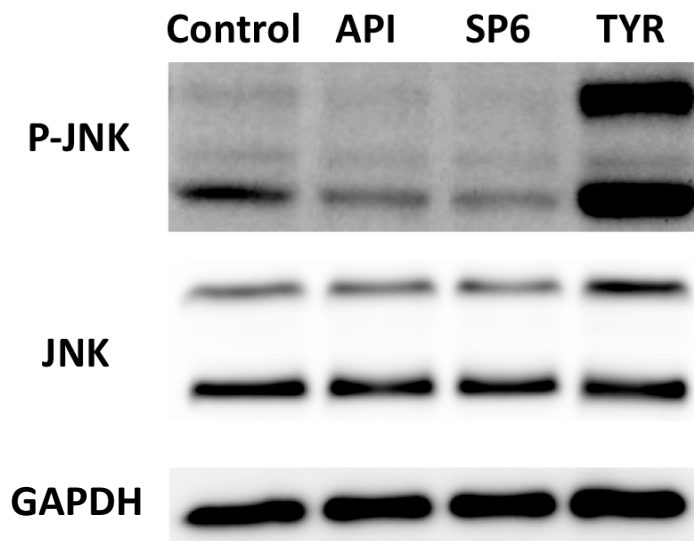


図 22 EpH4-C13 細胞を Apigenin, SP600125, Tyrphostin 9 で処理した時の, JNK の活性及び発現量への影響: EpH4-C13 細胞を, DMSO (Control), 25 μ M Apigenin (API), 25 μ M SP600125 (SP6), 20 μ M Tyrphostin 9 (TYR) の何れかで 2 時間処理した後, 細胞可溶化物を取得した. その後, 一次抗体及び二次抗体を用いて, 細胞可溶化物中に含まれる P-JNK, JNK 及び GAPDH の発現量を確認した.

図 23 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 24 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 25 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 26 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 27 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 28 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 29 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 30 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

図 31 (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載)

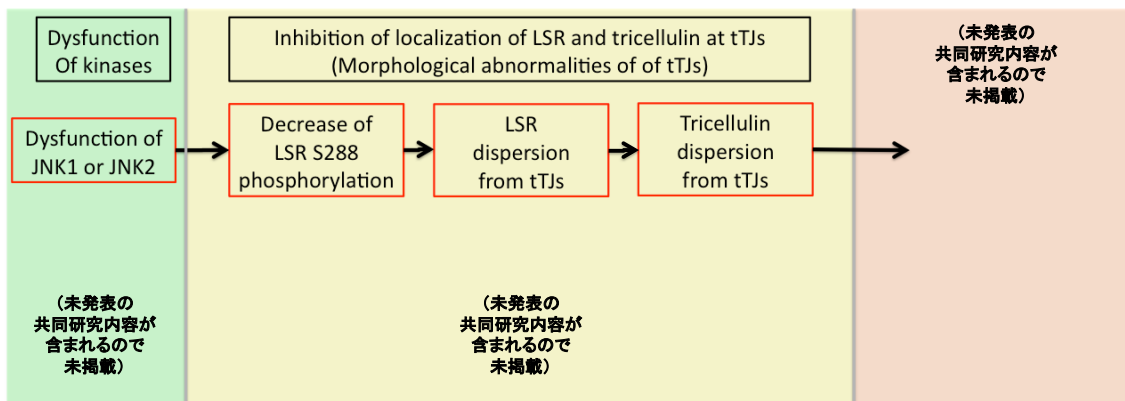


図 32 JNK1, JNK2, (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載) の機能阻害による, tTJs 構造形成の阻害と (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載) のモデル (未発表の共同研究内容が含まれるので一部未掲載) : JNK1 又は JNK2 の機能阻害は angulin-1/LSR (LSR) の 288 残基目のセリン (S288) のリン酸化阻害を介して LSR の tTJs への局在化を攪乱する. LSR の tTJs への局在化の攪乱により, tricellulin の tTJs への局在化も攪乱される. (未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載).

表 1 TJs 構成タンパク質の一覧表

構成するTJs	正式名	略称名	細胞膜貫通回数	参考文献
bTJs	junctional adhesion molecule	JAM	1回	Martin-Padura <i>et al.</i> 1998
bTJs	crumbs protein homolog 3	Crb3	1回	Makarova <i>et al.</i> 2003
bTJs	coxsackievirus and adenovirus receptor	CAR	1回	Cohen <i>et al.</i> 2001
bTJs	blood vessel epicardial substance	Bves	3回	Osler <i>et al.</i> 2005
bTJs	claudin*	—	4回	Furuse <i>et al.</i> 1998
bTJs	occludin	—	4回	Furuse <i>et al.</i> 1993
bTJs	MARVEL domain-containing protein 3	MARVELD3	4回	Raleigh <i>et al.</i> 2010
tTJs	angulin-1/lipolysis-stimulated lipoprotein receptor	angulin-1/LSR	1回	Masuda <i>et al.</i> 2011
tTJs	angulin-2/immunoglobulin-like domain-containing receptor 1	angulin-2/ILDR1	1回	Higashi <i>et al.</i> 2013
tTJs	angulin-3/immunoglobulin-like domain-containing receptor 2	angulin-3/ILDR2	1回	Higashi <i>et al.</i> 2013
tTJs	tricellulin	—	4回	Ikenouchi <i>et al.</i> 2005
— 参考文献で略称名が使用されていない				
*27種類以上ファミリータンパク質が報告されているが、構成するTJsと細胞膜貫通回数が同一なので統一				

表 2 本研究で使用したキナーゼ阻害剤の一覧と, TJs 及び TJs 裏打ち構成タンパク質の細胞内局在への影響

		キナーゼ阻害剤の濃度					
		10 μ M			100 μ M		
		TJs及びTJs裏打ち構成タンパク質の細胞内局在					
キナーゼ阻害剤	キナーゼ阻害剤の主要標的	CL3	ZO1	LSR	CL3	ZO1	LSR
PD-98059	MEK	○	○	○	×	×	○
Tyrphostin 46	EGFRK, PDGFRK	○	○	○	○	○	○
AG-490	JAK-2	○	○	○	○	○	○
HA-1004	PKA, PKG	○	○	○	×	×	○
5-Iodotubercidin	ERK2, adenosine kinase, CK1, CK2	○	○	○	×	×	×
Erbstatin analog	EGFRK	○	○	○	×	×	○
Terreic acid	BTk	○	○	○	○	○	○
U-0126	MEK	○	○	○	×	×	○
Tyrphostin 47	EGFRK	○	○	○	○	○	○
AG-126	IRAK	○	○	○	○	○	○
HA-1077	PKA, PKG	○	○	○	×	×	○
LFM-A13	BTk	○	○	○	○	○	○
Quercetin dihydrate	PI3-K	○	○	○	○	○	○
Triciribine	Akt signaling pathway	○	○	○	×	×	×
SB-203580	p38 MAPK	○	○	○	×	○	×
Tyrphostin 51	EGFRK	○	○	○	○	○	○
AG-370	PDGFRK	○	○	○	○	○	○
HDBA	EGFRK, CaMK II	○	○	○	○	○	○
SB-202190	p38 MAPK	○	○	○	○	○	○
SU1498	Fli1	○	○	○	○	○	○
BML-257	Akt	○	○	○	○	○	○
H-7	PKA, PKG, MLCK, and PKC.	○	○	○	×	×	○
Tyrphostin 1	Negative control for tyrosine kinase inhibitors	○	○	○	○	○	○
AG-879	NGFRK	○	○	○	○	○	○
KN-62	CaMK II	○	○	○	○	○	○
PP2	Src family	○	○	○	○	○	○
ZM 44829	JAK-3	○	○	○	○	○	○
SC-514	IKK2	○	○	○	○	○	○
H-9	PKA, PKG, MLCK, and PKC.	○	○	○	×	×	○
Tyrphostin AG 1288	Tyrosine kinases	○	○	○	○	○	○
LY 294002	PI3-K	○	○	○	○	○	○
KN-93	CaMK II	○	○	○	×	○	×
ZM 338372	cRAF	○	○	○	○	○	○
BAY 11-7082	IKK pathway	×	○	○	△	△	△
BML-259	Cdk5/p25	○	○	○	○	○	○
staurosporine	Pan-specific	×	×	○	×	×	×
Tyrphostin AG 1478	EGFRK	○	○	○	○	○	○
wortmannin	PI3-K	○	○	○	○	○	○
ML-7	MLCK	○	○	○	×	○	×
SU 4312	Fli1	○	○	○	○	○	○
DRB	CKII	○	○	○	×	×	×
Apigenin	CKII	○	○	○	○	○	×
AG-494	EGFRK, PDGFRK	○	○	○	○	○	○
Tyrphostin AG 1295	Tyrosine kinases	○	○	○	○	○	○
GF109203X	PKC	○	○	○	○	○	○
ML-9	MLCK	○	○	○	○	○	○
AG-1296	PDGFRK	○	○	○	○	○	○
HBDDE	PKC alpha, PKC gamma	○	○	○	○	○	○
BML-265	EGFRK	○	○	○	○	○	○
AG-825	HER1-2	○	○	○	○	○	○
Tyrphostin 9	PDGFRK	○	○	○	○	○	×
Hypericin	PKC	○	×	×	×	×	×
2-Aminopurine	p58 PITSRE beta 1	○	○	○	○	○	○
GW 5074	cRAF	○	○	○	○	○	○
SP 600125	JNK	○	○	○	○	○	×
Rapamycin	mTOR	○	○	○	○	○	○
Lavendustin A	EGFRK	○	○	○	○	○	○
HNMPA	IRK	○	○	○	○	○	○
Ro 31-8220	PKC	×	○	×	×	×	×
N9-Isopropyl-olomoucine	CDK	○	○	○	○	○	○
Palmitoyl-DL-carnitine Cl	PKC	○	○	○	○	○	○
Indirubin	GSK-3beta, CDK5	○	○	○	○	○	○
RG-14620	EGFRK	○	○	○	○	○	○
Damnacanthal	p56 lck	○	○	○	○	○	○
Sphingosine	PKC	○	○	○	○	○	○
Olomoucine	CDK	○	○	○	○	○	○
Rottlerin	PKC delta	○	○	○	○	○	○
Indirubin-3'-monoxine	GSK-3beta	○	○	○	○	○	○
Tyrphostin 25	EGFRK	○	○	○	○	○	○
Piceatannol	Syk	○	○	○	○	○	○
H-89	PKA	○	○	○	×	×	×
iso-Olomoucine	Negative control for olomoucine	○	○	○	○	○	○
Genistein	Tyrosine kinases	○	○	○	○	○	○
Y-27632	ROCK	○	○	○	×	×	○
Tyrphostin 25	EGFRK	○	○	○	○	○	○
PP1	Src family	○	○	○	○	○	○
H-8	PKA, PKG	○	○	○	×	×	×
Roscovitine	CDK	○	○	○	○	○	○
Daidzein	Negative control for Genistein	○	○	○	○	○	○
Kenpaullone	GSK-3beta	○	○	○	○	○	○

表 3 本研究の図表を得るために使用した抗体の一覧表（未発表の共同研究内容が含まれるので一部未掲載）

対応する図表	一次抗体	二次抗体	
図4	抗ラットangulin-1/LSR抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギtricellulin抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図5	抗ラットoccludin抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギCl3抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図6	抗マウスZO-1抗体	Cy3-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	抗ウサギZO-2抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図8及び図9	抗ラットangulin-1/LSR抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗マウスZO-1抗体	Cy3-conjugated 抗マウスIgG抗体	
図10	抗ラットangulin-1/LSR抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギtricellulin抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図11	抗ラットoccludin抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗マウスZO-1抗体	Cy3-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	抗ウサギZO-2抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図12	抗ラットoccludin抗体	HRP-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギCl3抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ウサギtricellulin抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ラットangulin-1/LSR抗体	HRP-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗マウスZO-1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	抗ウサギZO-2抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図14	抗マウスGAPDH抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載		
	図15	抗ラットangulin-1/LSR抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体
		抗ウサギtricellulin抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	図16	抗ラットoccludin抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体
		抗マウスZO-1抗体	Cy3-conjugated 抗マウスIgG抗体
抗ウサギZO-2抗体		Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
図17	抗マウスJNK1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	抗ウサギJNK2抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ウサギJNK3抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ラットoccludin抗体	HRP-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギCl3抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ウサギtricellulin抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
	抗ラットangulin-1/LSR抗体	HRP-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗マウスZO-1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体	
	抗ウサギZO-2抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体	
抗マウスGAPDH抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体		
図18	抗ラットangulin-1/LSR抗体	Cy3-conjugated 抗ラットIgG抗体	
	抗ウサギtricellulin抗体	Cy3-conjugated 抗ウサギIgG抗体	

対応する図表	一次抗体	二次抗体
図19	抗マウスJNK1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
	抗ウサギJNK2抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗ウサギtricellulin抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗ラットangulin-1/LSR抗体	HRP-conjugated 抗ラットIgG抗体
	抗マウスGAPDH抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
図20A	抗ウサギGFP抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗マウスJNK1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG light-chain specific抗体
	抗ウサギJNK2抗体	Immuno-Aptamer TM, 抗ウサギ IgG抗体
図20D	抗ウサギPhosphoserine抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗マウスGST抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
	抗マウスJNK1抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
図20E及びF	抗ウサギGFP抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
図21A	抗ウサギtricellulin抗体	Cy5-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗マウスZO-1抗体	Cy3-conjugated 抗マウスIgG抗体
図21C	抗ウサギGFP抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗マウスGAPDH抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
図22	抗ウサギPhospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗ウサギSAPK/JNK抗体	HRP-conjugated 抗ウサギIgG抗体
	抗マウスGAPDH抗体	HRP-conjugated 抗マウスIgG抗体
図23	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	
図24	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	
図25	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	
図26	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	
図27	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	
図28	未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載	

第 6 章 参考文献

Adachi, A., Kano, F., Saido, T.C. & Murata, M. (2009) Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. *Genes Cells* **14**, 355-369.

Avdi, N.J., Nick, J.A., Whitlock, B.B., Billstrom, M.A., Henson, P.M., Johnson, G.L. & Worthen, G.S. (2001) Tumor necrosis factor-alpha activation of the c-Jun N-terminal kinase pathway in human neutrophils. Integrin involvement in a pathway leading from cytoplasmic tyrosine kinases apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 2189-2199.

Bennett, B.L., Sasaki, D.T., Murray, B.W., O'Leary, E.C., Sakata, S.T., Xu, W., Leisten, J.C., Motiwala, A., Pierce, S., Satoh, Y., Bhagwat, S.S., Manning, A.M. & Anderson, D.W. (2001) SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13681-13686.

Bogoyevitch, M.A. (2006) The isoform-specific functions of the c-Jun N-terminal Kinases (JNKs): differences revealed by gene targeting. *Bioessays* **28**, 923-934.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Buschmann, M.M., Shen, L., Rajapakse, H., Raleigh, D.R., Wang, Y., Lingaraju, A., Zha, J., Abbott, E., McAuley, E.M., Breskin, L.A., Wu, L., Anderson, K., Turner, J.R. & Weber, C.R. (2013) Occludin OCEL-domain interactions are required for maintenance and regulation of the tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol. Biol. Cell* **24**, 3056-3068.

Cariers, A., Reinehr, R., Fischer, R., Warskulat, U. & Haussinger, D. (2002) c-Jun-N-terminal kinase dependent membrane targeting of CD95 in rat hepatic stellate cells. *Cell Physiol. Biochem.* **12**, 179-186.

Chiang, C.T., Way, T.D., Tsai, S.J. & Lin, J.K. (2007) Diosgenin, a naturally occurring steroid, suppresses fatty acid synthase expression in HER2-overexpressing breast

cancer cells through modulating Akt, mTOR and JNK phosphorylation. *FEBS Lett.* **581**, 5735-5742.

Choi, H., Nguyen, H.N. & Lamb, F.S. (2014) Inhibition of endocytosis exacerbates TNF-alpha-induced endothelial dysfunction via enhanced JNK and p38 activation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **306**, H1154-1163.

Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T. & Bergelson, J.M. (2001) The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 15191-15196.

Cording, J., Berg, J., Kading, N., Bellmann, C., Tscheik, C., Westphal, J.K., Milatz, S., Gunzel, D., Wolburg, H., Piontek, J., Huber, O. & Blasig, I.E. (2013) In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J. Cell Sci.* **126**, 554-564.

Critchfield, J.W., Coligan, J.E., Folks, T.M. & Butera, S.T. (1997) Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 6110-6115.

Diella, F., Cameron, S., Gemund, C., Linding, R., Via, A., Kuster, B., Sicheritz-Ponten, T., Blom, N. & Gibson, T.J. (2004) Phospho.ELM: a database of experimentally verified phosphorylation sites in eukaryotic proteins. *BMC Bioinformatics* **5**, 79.

Dorfel, M.J. & Huber, O. (2012a) A phosphorylation hotspot within the occludin C-terminal domain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1257**, 38-44.

Dorfel, M.J. & Huber, O. (2012b) Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 807356.

Dukes, J.D., Whitley, P. & Chalmers, A.D. (2012) The PIKfyve inhibitor YM201636 blocks the continuous recycling of the tight junction proteins claudin-1 and claudin-2 in MDCK cells. *PLoS One* **7**, e28659.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Farhan, H., Wendeler, M.W., Mitrovic, S., Fava, E., Silberberg, Y., Sharan, R., Zerial, M. & Hauri, H.P. (2010) MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *J. Cell Biol.* **189**, 997-1011.

Farquhar, M.G. & Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* **17**, 375-412.

Farquhar, M.J., Hu, K., Harris, H.J., Davis, C., Brimacombe, C.L., Fletcher, S.J., Baumert, T.F., Rappoport, J.Z., Balfe, P. & McKeating, J.A. (2012) Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J. Virol.* **86**, 4305-4316.

Friend, D.S. & Gilula, N.B. (1972) Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.* **53**, 758-776.

Fuortes, M., Melchior, M., Han, H., Lyon, G.J. & Nathan, C. (1999) Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J. Clin. Invest.* **104**, 327-335.

Furuse, M. (2009) Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**, 813-819.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K. & Tsukita, S. (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* **141**, 1539-1550.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A. & Tsukita, S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **156**, 1099-1111.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777-1788.

Furuse, M. & Tsukita, S. (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* **16**, 181-188.

Gonzalez-Mariscal, L., Dominguez-Calderon, A., Raya-Sandino, A., Ortega-Olvera, J.M., Vargas-Sierra, O. & Martinez-Revollar, G. (2014) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin. Cell Dev. Biol.* **36**, 213-223.

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R. & Chamorro, D. (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 729-756.

Gunzel, D. & Fromm, M. (2012) Claudins and other tight junction proteins. *Compr. Physiol.* **2**, 1819-1852.

Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y. & Furuse, M. (2013) Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J. Cell Sci.* **126**, 966-977.

Hoffman, G.R., Moerke, N.J., Hsia, M., Shamu, C.E. & Blenis, J. (2010) A high-throughput, cell-based screening method for siRNA and small molecule inhibitors of mTORC1 signaling using the In Cell Western technique. *Assay Drug Dev. Technol.* **8**, 186-199.

Ichikawa-Tomikawa, N., Sugimoto, K., Satohisa, S., Nishiura, K. & Chiba, H. (2011)

Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 253048.

Ikari, A., Kinjo, K., Atomi, K., Sasaki, Y., Yamazaki, Y. & Sugatani, J. (2010) Extracellular Mg(2+) regulates the tight junctional localization of claudin-16 mediated by ERK-dependent phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 415-421.

Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K. & Sugatani, J. (2011) Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J. Cell Physiol.* **226**, 2448-2456.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. & Tsukita, S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J. Cell Biol.* **171**, 939-945.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S. & Furuse, M. (2008) Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4687-4693.

Itoh, M., Yonemura, S., Nagafuchi, A. & Tsukita, S. (1991) A 220-kD undercoat-constitutive protein: its specific localization at cadherin-based cell-cell adhesion sites. *J. Cell Biol.* **115**, 1449-1462.

Iwamoto, N., Higashi, T. & Furuse, M. (2014) Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo. *Cell Struct. Funct.* **39**, 1-8.

Jayaswal, S., Kamal, M.A., Dua, R., Gupta, S., Majumdar, T., Das, G., Kumar, D. & Rao, K.V. (2010) Identification of host-dependent survival factors for intracellular Mycobacterium tuberculosis through an siRNA screen. *PLoS Pathog.* **6**, e1000839.

Jung, I., Matsuyama, A., Yoshida, M. & Kim, D. (2010) PostMod: sequence based prediction of kinase-specific phosphorylation sites with indirect relationship. *BMC Bioinformatics* **11 Suppl 1**, S10.

Kast, J.I., Wanke, K., Soyka, M.B., Wawrzyniak, P., Akdis, D., Kingo, K., Rebane, A. & Akdis, C.A. (2012) The broad spectrum of interepithelial junctions in skin and lung. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 544-547 e544.

Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Takiyama, K. & Koike, T. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell Proteomics* **5**, 749-757.

Kojima, T., Fuchimoto, J., Yamaguchi, H., Ito, T., Takasawa, A., Ninomiya, T., Kikuchi, S., Ogasawara, N., Ohkuni, T., Masaki, T., Hirata, K., Himi, T. & Sawada, N. (2010) c-Jun N-terminal kinase is largely involved in the regulation of tricellular tight junctions via tricellulin in human pancreatic duct epithelial cells. *J. Cell Physiol.* **225**, 720-733.

Krug, S.M., Amasheh, S., Richter, J.F., Milatz, S., Gunzel, D., Westphal, J.K., Huber, O., Schulzke, J.D. & Fromm, M. (2009) Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3713-3724.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Levitzki, A. & Gilon, C. (1991) Tyrphostins as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 171-174.

Makarova, O., Roh, M.H., Liu, C.J., Laurinec, S. & Margolis, B. (2003) Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1). *Gene* **302**, 21-29.

Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D. & Dejana, E. (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell*

Biol. **142**, 117-127.

Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E. & Furuse, M. (2011) LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 548-555.

Matsuda, M., Kubo, A., Furuse, M. & Tsukita, S. (2004) A peculiar internalization of claudins, tight junction-specific adhesion molecules, during the intercellular movement of epithelial cells. *J. Cell Sci.* **117**, 1247-1257.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Nayak, G., Lee, S.I., Yousaf, R., Edelmann, S.E., Trincot, C., Van Itallie, C.M., Sinha, G.P., Rafeeq, M., Jones, S.M., Belyantseva, I.A., Anderson, J.M., Forge, A., Frolenkov, G.I. & Riazuddin, S. (2013) Tricellulin deficiency affects tight junction architecture and cochlear hair cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 4036-4049.

Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M.A., Voss, O.H., Gavrilin, M.A., Wewers, M.D., Guttridge, D.C., Grotewold, E. & Doseff, A.I. (2007) Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality in vivo and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J. Immunol.* **179**, 7121-7127.

Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M. & Tsukita, S. (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* **161**, 653-660.

Niwa, H., Yamamura, K. & Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.

Osler, M.E., Chang, M.S. & Bader, D.M. (2005) Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J. Cell Sci.* **118**, 4667-4678.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Park, S.J., Park, Y.J., Shin, J.H., Kim, E.S., Hwang, J.J., Jin, D.H., Kim, J.C. & Cho, D.H. (2011) A receptor tyrosine kinase inhibitor, Tyrphostin A9 induces cancer cell death through Drp1 dependent mitochondria fragmentation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 465-470.

Pirvola, U., Xing-Qun, L., Virkkala, J., Saarma, M., Murakata, C., Camoratto, A.M., Walton, K.M. & Ylikoski, J. (2000) Rescue of hearing, auditory hair cells, and neurons by CEP-1347/KT7515, an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Neurosci.* **20**, 43-50.

Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M. & Turner, J.R. (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol. Biol. Cell* **21**, 1200-1213.

Reichert, M., Muller, T. & Hunziker, W. (2000) The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 9492-9500.

Reig, G., Pulgar, E. & Concha, M.L. (2014) Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* **141**, 1999-2013.

Rincon-Heredia, R., Flores-Benitez, D., Flores-Maldonado, C., Bonilla-Delgado, J., Garcia-Hernandez, V., Verdejo-Torres, O., Castillo, A.M., Larre, I., Poot-Hernandez, A.C., Franco, M., Gariglio, P., Reyes, J.L. & Contreras, R.G. (2014) Ouabain induces endocytosis and degradation of tight junction proteins through ERK1/2-dependent pathways. *Exp. Cell Res.* **320**, 108-118.

Rosenthal, R., Heydt, M.S., Amasheh, M., Stein, C., Fromm, M. & Amasheh, S. (2012) Analysis of absorption enhancers in epithelial cell models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1258**, 86-92.

Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. & Tsukita, S. (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell Biol.* **141**, 397-408.

Sawada, N., Murata, M., Kikuchi, K., Osanai, M., Tobioka, H., Kojima, T. & Chiba, H. (2003) Tight junctions and human diseases. *Med. Electron Microsc.* **36**, 147-156.

Schneeberger, E.E. & Lynch, R.D. (1992) Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am. J. Physiol.* **262**, L647-661.

Staehelin, L.A. (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J. Cell Sci.* **13**, 763-786.

Staehelin, L.A., Mukherjee, T.M. & Williams, A.W. (1969) Freeze-etch appearance of the tight junctions in the epithelium of small and large intestine of mice. *Protoplasma* **67**, 165-184.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. & Goodenough, D.A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J. Cell Biol.* **103**, 755-766.

Sugawara, T., Nakatsu, D., Kii, H., Maiya, N., Adachi, A., Yamamoto, A., Kano, F. & Murata, M. (2012) PKCdelta and epsilon regulate the morphological integrity of the ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC) but not the anterograde and retrograde transports via the Golgi apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 861-875.

Tsukita, S. & Furuse, M. (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* **149**, 13-16.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S. & Furuse, M. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine

where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* **126**, 741-754.

Van Dross, R., Xue, Y., Knudson, A. & Pelling, J.C. (2003) The chemopreventive bioflavonoid Apigenin modulates signal transduction pathways in keratinocyte and colon carcinoma cell lines. *J. Nutr.* **133**, 3800S-3804S.

Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Holmes, J. & Anderson, J.M. (2010) Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J. Cell Sci.* **123**, 2844-2852.

Villen, J., Beausoleil, S.A., Gerber, S.A. & Gygi, S.P. (2007) Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1488-1493.

Wade, J.B. & Karnovsky, M.J. (1974) The structure of the zonula occludens. A single fibril model based on freeze-fracture. *J. Cell Biol.* **60**, 168-180.

Walker, D.C., MacKenzie, A., Hulbert, W.C. & Hogg, J.C. (1985) A re-assessment of the tricellular region of epithelial cell tight junctions in trachea of guinea pig. *Acta Anat. (Basel)* **122**, 35-38.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Westphal, J.K., Dorfel, M.J., Krug, S.M., Cording, J.D., Piontek, J., Blasig, I.E., Tauber, R., Fromm, M. & Huber, O. (2010) Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol. Life Sci.* **67**, 2057-2068.

未発表の共同研究内容が含まれるので未掲載

Yu, D., Marchiando, A.M., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Wang, Y., Shen, L. & Turner, J.R. (2010) MLCK-dependent exchange and actin binding region-dependent anchoring of ZO-1 regulate tight junction barrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 8237-8241.

Zavala-Zendejas, V.E., Torres-Martinez, A.C., Salas-Morales, B., Fortoul, T.I., Montano, L.F. & Rendon-Huerta, E.P. (2011) Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest.* **29**, 1-11.

第 7 章 謝辞

本研究をまとめるにあたり多大な御指導を賜りました，指導教官である村田昌之教授に感謝申し上げます。また，本研究を様々な面から支えて頂きました，古瀬幹夫教授，西川喜代孝教授，加納ふみ助教，小田裕香子助教，田口由起氏，菅原太一氏，西園貴志氏，米谷信彦氏，紀伊宏昭氏，山寄洋一氏に心より感謝申し上げます。