

- 1) Tanaka, T., Takahashi, F., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 30021–30027.
- 2) Nakamura, T., Ishikawa, K., Hagihara, Y., Oku, T., Nakagawa, A., Inoue, T., Ataka, M., & Uegaki, K. (2005) *Acta Crystallogr., Sect. F*, **61**, 476–478.
- 3) Oku, T. & Ishikawa, K. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 1696–1701.
- 4) Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., & Uegaki, K. (2007) *Acta Crystallogr., Sect. F*, **63**, 7–11.
- 5) Nakamura, T., Mine, S., Hagihara, Y., Ishikawa, K., Ikegami, T., & Uegaki, K. (2008) *J. Mol. Biol.*, **381**, 670–680.
- 6) Hurtado-Guerrero, R. & van Aalten, D.M. (2007) *Chem. Biol.*, **14**, 589–599.
- 7) Rao, F.V., Houston, D.R., Boot, R.G., Aerts, J.M., Hodkinson, M., Adams, D.J., Shiomi, K., Omura, S., & van Aalten, D.M. (2005) *Chem. Biol.*, **12**, 65–76.
- 8) Tsuji, H., Nishimura, S., Inui, T., Kado, Y., Ishikawa, K., Nakamura, T., & Uegaki, K. (2010) *FEBS J.*, **277**, 2683–2695.
- 9) van Aalten, D.M., Komander, D., Synstad, B., Gaseidnes, S., Peter, M.G., & Eijssink, V.G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8979–8984.
- 10) Bortone, K., Monzingo, A.F., Ernst, S., & Robertus, J.D. (2002) *J. Mol. Biol.*, **320**, 293–302.
- 11) Kolstad, G., Synstad, B., Eijssink, V.G., & van Aalten, D.M. (2001) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **58**, 377–379.
- 12) Synstad, B., Gaseidnes, S., van Aalten, D.M., Vriend, G., Nielsen, J.E., & Eijssink, V.G. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 253–262.
- 13) Mine, S., Ikegami, T., Kawasaki, K., Nakamura, T., & Uegaki, K. (2012) *Protein Expr. Purif.*, **84**, 265–269.

上垣 浩一¹, 中村 努¹, 峯 昇平¹, 西村 重徳²

(¹産業技術総合研究所,

²大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

Development of hyper-thermostable chitinolytic enzymes by gene hunting and functional analysis

Koichi Uegaki¹, Tsutomu Nakamura¹, Shouhei Mine¹ and Shigenori Nishimura² (¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda, Osaka 563-8577, Japan; ²Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-1 Gakuencho, Sakai, Osaka 599-8531, Japan)

上皮構造とバリア機能の調節分子機構

はじめに

多細胞生物の器官構築と生理機能の成立・維持には上皮細胞が深く関わっている。様々に分化した上皮細胞が単層

もしくは重層に整列し互いに強固に接着してシート状構造を形成するのが上皮組織の大きな特徴であり、この性質が生体の内外を隔て恒常性維持に重要な働きを果たす。シート状構造の形成には、上皮細胞間の頂端部に存在する、密着結合 (tight junction)・接着結合 (adherens junction)・接着斑 (desmosome) の3種類の構造からなる接着複合体 (apical junction complex) が重要である¹⁾。これらは各々に固有の構成分子を介して細胞骨格と連結し、特有の機能を果たしている。この中で最も頂端部に位置する密着結合は、隣接する細胞の細胞膜同士を文字通り“密着”させ、細胞間を通じた物質透過を調節する選択的バリアとして機能する。一方で細胞内においては、頂端部近傍で細胞の内縁部を環状に取り囲むアクチン・ミオシンフィラメント perijunctional actomyosin ring (PJAR) に結合しており、収縮力を持つ PJAR は接着構造と協調して細胞形態の変化、極性の形成、バリアの調節など、多様な細胞生理現象に深く関わることを示唆されている²⁾。近年、PJAR と密着結合の間をつなぐ調節分子機構の解明が進展し、予想以上に複雑な経路の存在が浮かび上がってきている。本稿では、筆者らの研究を中心にこうした点に関する最近の知見を紹介する。

1. 密着結合の構造と分子基盤の概要

密着結合を最も形態的に特徴づけるのは、凍結切断電子顕微鏡法と呼ばれる特殊な手法で観察されるストランド構造である。この構造は、隣り合う細胞の細胞膜が頂端部位で連続的に密着した状態を反映するものと考えられ、これに関わる接着分子の存在が推定されていた。密着結合に集積する膜タンパク質として、4回膜貫通型のオクルディンが最初に同定され、後に同じく4回膜貫通型のクローディン、トリセルリンが発見された。加えて、junctional adhesion molecule (JAM) および coxsackie adenovirus receptor (CAR) といった免疫グロブリン様ドメインを持つ分子の存在が明らかになった³⁾。

密着結合を持たない線維芽細胞にこれら膜タンパク質を強制発現させた場合、クローディンのみがストランド様の構造を再構築する活性を示したことから、密着結合の特徴的構造は主にクローディン分子の集積によって形成されているものと考えられている。クローディンには20種類以上のファミリー分子が存在し、組織器官の特定部位ごとにそれらが様々な組み合わせで発現している。また、クローディンはタイプによって異なる種類のイオンを選択的に透過調節することも示され、多様なクローディンの発現は各

種組織器官の生理機能と密接に結びついている可能性が示唆されている⁴⁾。

これら膜タンパク質の細胞内領域に結合する分子群も数多く明らかにされており、中でも PDZ (PSD-95/Dlg-A/ZO-1) ドメインを持つ PDZ 分子の重要性が知られている。具体的には、ZO 分子 (ZO-1, ZO-2, ZO-3), PAR 分子 (PAR-3, PAR-6), MUPP1, PATJ, MAGI などの PDZ 分子が密着結合に局在しており、膜タンパク質に加えて PKC や三量体 G タンパク質などのシグナル分子とも相互作用し、密着結合部位においてシグナル伝達のための局所的な場の構築に寄与していると考えられる⁵⁾。

2. アクチン細胞骨格系・Rho シグナル経路と密着結合

上皮バリアの形成には、特徴的な配向を持ったアクチン細胞骨格系 PJAR の存在と、その密着結合との相互作用が極めて重要である。例えば、アクチン重合を阻害する latrunculin A で細胞を処理すると、PJAR の構築が変化しバリア機能が即座に障害を受ける⁶⁾。

アクチン細胞骨格系の調節に低分子量 G タンパク質 Rho が中心的な役割を果たすことは広く知られているが、Rho を不活化するボツリヌス C3 酵素の投与によって接着複合体の形成が阻害され、密着結合を通じた物質透過も影響を受ける。Rho は活性化体の GTP 結合型が下流のエフェクター分子に働いてその作用を発揮するが、エフェクターの一つである Rho キナーゼ (ROCK) は、アクトミオシン系の形成とこれを介した収縮に働く。この ROCK に対する特異的阻害剤 Y-27632 を培養上皮細胞に添加すると、やはり PJAR の構築に乱れが生じ、Rho シグナル経路の重要性を指し示す根拠の一つとなっている⁷⁾。

さらに Rho の上流に位置して活性制御を行う RhoGEF (Rho グアニンヌクレオチド交換因子) の GEF-H1, p114RhoGEF が密着結合に存在することが報告されている。GEF-H1 は微小管との結合能を有し、Ras の活性化に伴ってその発現が亢進することが知られていたが、密着結合形成に関与すると同時に細胞周期の G1/S 停止を引き起こすとの報告がある⁸⁾。p114RhoGEF についても、密着結合における小分子透過性やアクチン配向の調節を行うことが示唆されている⁹⁾。

3. ZO 分子を軸とした密着結合とアクチン細胞骨格系・Rho シグナル経路間の調節

筆者らは ZO 分子がクローディン・オクルディン・JAM などの膜タンパク質のみならずアクチンフィラメントに直

接結合することを見いだし¹⁰⁾、ZO 分子を軸とした複合体とアクチン細胞骨格との連結が、密着結合の構築と上皮バリア機能の形成・維持に重要な役割を果たしているとの仮説を基に解析を進めてきた。

マウス乳腺上皮細胞において 3 種類全ての ZO 分子の発現が抑制された場合、密着結合構造が形成されず、上皮バリア機能の破綻が認められた¹¹⁾。さらには PJAR の形成も不完全な状態に陥ったが、ZO-1, ZO-2 のいずれか一方を発現することにより、正常な状態に回復させることが可能であった¹²⁾。したがって、ZO 分子の存在は密着結合と PJAR の形成に不可欠であり、また ZO-1 と ZO-2 は機能的に重複していることが予想された。

1) 密着結合・PJAR 構築の調節にあずかる分子の同定

ZO 分子依存性に起きるこのような細胞現象について、その詳細な分子機構を解明するため、ZO 分子の様々な部分フラグメントを混合したベイトを用いて酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、調節に関わる可能性を持つ分子の同定を試みた。その結果、Rho を活性化する GEF 分子の一つ ARHGEF11 の部分フラグメントの単離に成功した¹³⁾。

ベイトとして用いた ZO 分子フラグメントをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質として発現・精製し、ARHGEF11 部分フラグメントの組み替えタンパク質と反応させ解析した結果、ZO-1 の C 末端部分が結合することが明らかになった。この領域は、ZO-1 がアクチンと結合する領域に隣接する領域であった。また免疫沈降法によって、ZO-1 と ARHGEF11 が細胞内で複合体を形成することも確認された。一方で、ZO-1 に類似した一次構造を持つ ZO-2, ZO-3 と ARHGEF11 の間には直接的相互作用が検出されなかった。

2) ARHGEF11 は ZO-1 依存性に密着結合へ局在する

ARHGEF11 は神経細胞においてセマフォリン・Plexin-B からの刺激に応じた神経軸索形成のためのシグナル伝達経路に関与することが報告されていたが¹⁴⁾、上皮組織における局在や働きについては不明であった。

そこでまず、上皮組織における ARHGEF11 と ZO-1 の局在を、マウス乳腺や腎臓などの凍結切片を用いて比較したところ、両分子は密着結合部位に共局在することを見いだした。次いで、ARHGEF11 の発現および密着結合部位への局在に ZO-1 が影響を及ぼすか否かを明らかにするため、マウス乳腺上皮細胞 EpH4、および ZO-1 遺伝子を欠失させた変異 EpH4 細胞を用い、ARHGEF11 の性質について比較検討を行った。その結果、ZO-1 を欠失しても

ARHGEF11の発現レベルに有意な変化を認めなかったが、密着結合への集積は著しく減弱し、その多くが細胞質に存在していた。また、ZO-2の発現を抑制した細胞ではARHGEF11の局在に変化を生じなかった。逆にARHGEF11の発現を抑制した場合、ZO-1の発現、密着結合への局在、どちらにも変化は起きなかった。これらの結果は、RhoGEF分子ARHGEF11の密着結合への集積に、数ある密着結合構成因子の中でZO-1が選択的に関与していることを示唆している。

3) ARHGEF11の発現抑制は密着結合・PJAR形成や上皮バリアの発達に遅延を引き起こす

ARHGEF11はZO-1の密着結合局在化には必要でないものの、密着結合・PJARの形成や上皮バリアの発達に関与する可能性についてさらなる検討を加えることにした¹³⁾。この目的のため、カルシウムスイッチと呼ばれる、細胞間接着やバリア機能の形成・発達を*in vitro*で動的に解析するアッセイ系を用いた。細胞間接着形成の最初のステップとして、接着結合の構成膜タンパク質カドヘリンおよびネクチンが接着部位に集積し、カテニンやアファディンといったアダプター分子を介してアクチン細胞骨格と結合する。この状態において密着結合は未形成であるが、ZO-1はカテニンと相互作用することで接着部位に局在する。時間経過に伴い接着部位に蓄積したアクチン・ミオシンがPJAへと組織化され、同時に密着結合形成が開始する。この際にZO-1はカテニンから離れ、密着結合形成の足場になると考えられる。PJAR形成の指標として、タイプII非筋型ミオシン non-muscle myosin-II (NM-II)の配向状態を経時的に観察した結果、NM-IIとアクチンフィラメントが収縮し細胞頂端部を環状に取り囲んで作られるPJARが完成するまでに、ARHGEF11発現抑制細胞ではコントロール細胞に比較してより多くの時間を要することが明らかになった。また密着結合膜タンパク質の集積もARHGEF11発現抑制によって遅延が認められたことから、PJARと密着結合の双方の形成過程にARHGEF11が関与することが示唆された。さらに、経上皮電気抵抗を測定することによって上皮バリア機能について評価を行った結果、ARHGEF11の発現が抑制されることでバリア機能の障害が起きることを見いだした¹³⁾。

4) ARHGEF11はRho-MLC経路を介して密着結合・PJARの形成過程に機能する

次に、Rhoの下流で働くアクチン細胞骨格系の調節因子がARHGEF11の発現抑制によって影響を受ける可能性について検討した。Rhoの下流ターゲットである、ERM、

myosin light chain (MLC)、Srcの発現ならびに活性を解析したところ、MLCの活性が特異的にARHGEF11発現抑制によって低下することが判明した。さらには、活性化型MLCの細胞間接着部位への集積も阻害されていた。したがってARHGEF11は、細胞間接着部位においてRho-MLC経路を介し、PJARの構築に関与するものと推察した。カルシウムスイッチアッセイ系にMLCキナーゼ阻害剤ML-7を加えてMLCの活性を抑制しその影響について解析したところ、ARHGEF11の発現抑制を行った場合と同様の表現系、すなわち、密着結合・PJARの構築の遅延、バリア機能の障害を認めた。この結果は、MLCの活性化が必要であることを示している。その一方で、密着結合やPJARが一度完成した状態に至った場合、ARHGEF11の発現抑制による影響はごくわずかなものであった。すなわち、ARHGEF11-Rho-MLC経路は密着結合・PJARの形成過程に働き、完成した後の維持には必ずしも必要でないことが示唆された¹³⁾。

5) ZO-1による密着結合・PJARの調節にARHGEF11は必要である

前述したように、3種類全てのZO分子の発現が抑制されると密着結合・PJARの構築とバリア機能は著しく障害を受け、ZO-1もしくはZO-2の再発現によって回復が起きる。そこで、ZO-1、ZO-2による回復の際にARHGEF11が必要となるかどうかを明らかにするため、ZO分子発現抑制細胞にZO-1と共にコントロールsiRNA（低分子干渉RNA）もしくはARHGEF11 siRNAを導入した。その結果、コントロールsiRNAを共発現させた細胞ではZO-1陽性細胞においてPJARの形成不全は回復したが、ARHGEF11 siRNAを共導入した細胞ではZO-1陽性細胞においてもPJARは回復しなかった。さらに、ARHGEF11結合領域を欠失させたZO-1を発現させた場合、変異型ZO-1は正常なZO-1同様に細胞間接着部位に集積したもののARHGEF11は細胞質に留まったままの状態にあり、この場合にはPJARが回復しなかった。また、ARHGEF11のC末端に位置するZO-1結合領域を欠損させた変異型ARHGEF11は、正常ZO-1と共発現させても細胞質に留まっていた。

最後に、ZO-2の発現を抑制した上皮細胞においてARHGEF11の発現を同時に抑制することを試みた。ZO-2発現のみを抑制した上皮細胞では、密着結合ならびにPJARに顕著な異常は生じない。しかし、ZO-2とARHGEF11の両方を同時に発現抑制した場合、ZO分子欠損細胞に類似した異常すなわち、密着結合・PJARの

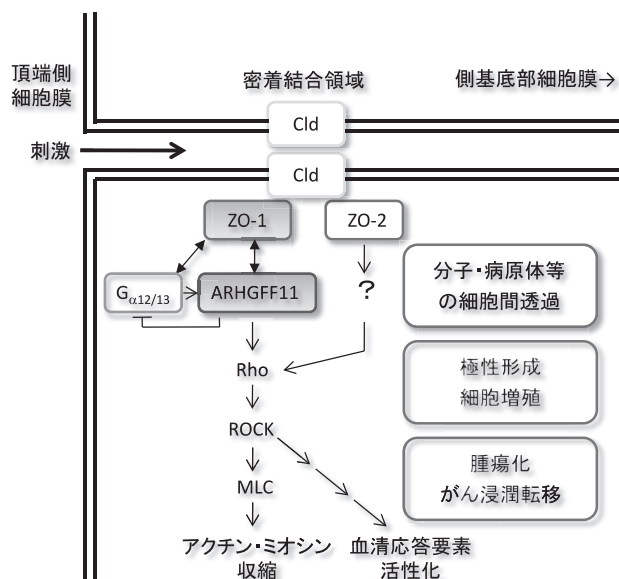


図1 ZO分子とRhoシグナル経路による上皮密着結合調節機構

ZO-1はARHGEF11を介してRhoとその下流因子の細胞間接着部位における局所的活性化を制御する。また、クローディン(Cld)を上皮細胞間の頂端部に集積させ、密着結合構造の形成に寄与する。同様の働きをZO-2が重複して担うことにより、破綻を生るリスクを軽減しているものと予想される。ただし、ZO-2がRhoを調節する分子機構は不明である。また、ARHGEF11の活性化能を持つ三量体Gタンパク質の $G_{\alpha 12/13}$ がZO-1と結合する。 $G_{\alpha 12/13}$ は逆にARHGEF11から抑制を受ける可能性が示されており、 $G_{\alpha 12/13}$ がどのような刺激情報を受け取って密着結合の調節に関わるのか興味を持たれる点である。

構築不全が観察された。これらの結果は、ARHGEF11がZO-1と選択的に協調して密着結合・PJARの制御に関与すること、またZO-1/ARHGEF11経路とは独立にZO-2を介して制御を行う経路が存在することを示唆している(図1)。

おわりに

密着結合の存在は、生体の正常な生理環境の維持に不可欠である。ウイルス・細菌など多くの病原体が細胞内に侵入し増殖する際に、密着結合の構成分子を標的として利用したり分解したりするケースが近年数多く報告されており、密着結合が広くバリアとして機能していることを示している¹⁵⁾。また、上皮細胞ががん化し転移能を獲得していく過程で失われる上皮細胞極性にも密着結合が関わっており、様々な病態と密着結合の間には深いつながりが存在す

る。したがって、密着結合の形成維持について詳細な分子基盤を明らかにすることは、多細胞生物の成り立ちについて知識を深めるばかりでなく、疾患の発症機構さらには治療方法を探ることに貢献する可能性を持つものと考えられる。そのためにも、培養細胞などを用いた*in vitro*解析とノックアウトマウスなど個体を用いた*in vivo*解析を融合させ、高次のレベルで解析に取り組むことが今後の発展にとって重要になると思われる。

- 1) Bryant, D.M. & Mostov, K.E. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 887-901.
- 2) Hartsock, A. & Nelson, W.J. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1778, 660-669.
- 3) Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 285-293.
- 4) Rosenthal, R., Heydt, M.S., Amasheh, M., Stein, C., Fromm, M., & Amasheh, S. (2012) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1258, 86-92.
- 5) Steed, E., Balda, M.S., & Matter, K. (2010) *Trends Cell Biol.*, 20, 142-149.
- 6) Ivanov, A.I., Hunt, D., Utech, M., Nusrat, A., & Parkos, C.A. (2005) *Mol. Biol. Cell*, 16, 2636-2650.
- 7) Walsh, S.V., Hopkins, A.M., Chen, J., Narumiya, S., Parkos, C.A., & Nusrat, A. (2001) *Gastroenterology*, 121, 566-579.
- 8) Aijaz, S., D'Atri, F., Citi, S., Balda, M.S., & Matter, K. (2005) *Dev. Cell*, 8, 777-786.
- 9) Terry, S.J., Zihni, C., Elbediwy, A., Vitiello, E., Leefa Chong San IV, Balda, M.S., & Matter, K. (2011) *Nat. Cell Biol.*, 13, 159-166.
- 10) Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., & Tsukita, S. (1997) *J. Cell Biol.*, 138, 181-192.
- 11) Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2006) *Cell*, 126, 741-754.
- 12) Yamazaki, Y., Umeda, K., Wada, M., Nada, S., Okada, M., Tsukita, S., & Tsukita, S. (2008) *Mol. Biol. Cell*, 19, 3801-3811.
- 13) Itoh, M., Tsukita, S., Yamazaki, Y., & Sugimoto, H. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 9905-9910.
- 14) Swiercz, J.M., Kuner, R., Behrens, J., & Offermanns, S. (2002) *Neuron*, 35, 51-63.
- 15) Bonazzi, M. & Cossart, P. (2011) *J. Cell Biol.*, 195, 349-358.

伊藤 雅彦

(獨協医科大学学生化学講座)

Molecular regulatory mechanisms of epithelial structure and barrier function

Masahiko Itoh (Department of Biochemistry, Dokkyo Medical University, Kitakobayashi 880, Mibumachi, Tochigi 321-0293, Japan)