

タイト結合研究の新展開

New Insights into Studying Tight Junctions

稲井 哲一郎

Tetsuichiro Inai

福岡歯科大学基礎医歯学部門生体構造学講座機能構造学分野

要旨 タイト結合構成膜蛋白 claudin は 24 の分子種からなるファミリーを形成し、組織特異的発現パターンを示す。タイト結合の組織特異的形態と機能は、発現する claudin の組合せと比率により制御されていると考えられる。本稿では、claudin 分子間の相互作用の解析、タイト結合の形態と機能の解析について、最近の我々の結果と課題を紹介する。

キーワード：タイト結合，クロードリン，フリーズフラクチャー，共培養

1. はじめに

タイト結合は上皮細胞、内皮細胞、中皮細胞において、アドヘレンス結合とデスモゾームとともに細胞側面膜の頂端部において接着複合体を形成する。タイト結合を超薄切片法により電子顕微鏡観察すると、細胞側面膜の最も頂端部において細胞膜の外葉同士を密着させて細胞間隙をシールする接着構造として認められ、しかも細胞全周を帯状に取り囲んでいるため密着帯と呼ばれる。タイト結合の機能としては、細胞間隙をシールして細胞間透過性を制御するバリア機能の他に、細胞膜を頂端部領域と側底部領域に区切ることで膜蛋白が両者間で混じり合うのを防ぐフェンス機能がある。タイト結合を構成する膜蛋白である claudin は、1998 年に古瀬らにより発見された¹⁾。claudin-1 または claudin-2 をタイト結合を形成しない線維芽細胞で発現すると、タイト結合ストランド（フリーズフラクチャー法で観察される分岐・吻合する線条構造で、膜内粒子で構成される）を形成することから、claudin がタイト結合の基本骨格を形成していることがわかった²⁾。このように、タイト結合構成膜蛋白である claudin が発見されてからまだ 12 年しか経過しておらず、タイト結合の研究はようやくスタート地点に立ったところであると言える。claudin 分子は N 末端と C 末端を細胞質側に向けて、細胞膜を 4 回貫通する膜蛋白で、2 つの細胞外ループ (ECL1,

ECL2) を持つ。ヒトやマウスでは少なくとも 24 種類の claudin 分子種が知られており、claudin-1, claudin-2 のように発見順に番号が付けられている。一般に、一つの上皮細胞で 2 種類以上の claudin 分子種が発現している。また、タイト結合のストランドの本数、分岐・吻合の程度、形態（タイト結合の膜内粒子が P 面または E 面に付着する様式）、細胞間透過性は、組織による違い（組織特異性）があることが知られている。おそらく、発現する claudin 分子種の組合せとそれらの発現比率によってタイト結合の形態と機能が制御されていると考えられているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。claudin は、タイト結合の裏打ち蛋白である ZO-1 (zonula occludens-1) を介してアクチン細胞骨格と結合している。claudin や ZO-1 の他にもタイト結合の膜蛋白や裏打ち蛋白が知られているが、優れた総説が数多くあるのでそれらを参照していただきたい。

本稿では、claudin に焦点を当て、タイト結合の形態と機能について、我々の最近の研究結果と将来の課題を紹介する。

2. claudin-claudin 相互作用の解析法

claudin 分子は一つの細胞の細胞膜上で side-by-side に相互作用 (cis-interaction) し、さらに、隣接する細胞間で head-to-head に相互作用 (trans-interaction) してタイト結合を形成すると考えられている (図 1)。一般に、一つの上皮細胞で 2 種類以上の claudin 分子種が発現しており、図 1A のように同種 (hemophilic) または異種 (heterophilic) の claudin 分子同士が cis- および trans-interaction してタイト結合を形成していると考えられている。claudin-1 と claudin-2 は cis-interaction により同じタイト結合ストランドに組み込まれて共重合する。しかし、claudin-1 と claudin-2 を単独で線維芽細胞で発現して共培養すると、異種細胞間 (claudin-1 を発現する細胞と claudin-2 を発現する細胞の細胞接着面) に両者はともに局在できないことから、claudin-1 と claudin-2 は trans-interaction できないと考えられる³⁾。この例のように、一部の組み合わせについては claudin 分子同士が trans-interaction できないことが知られている。MDCK I 細胞の細胞間電気抵抗値 (TER, transepithelial electrical resistance) は MDCK II 細胞の TER の 10 倍以上の値を示すが、両細胞での claudin の発現パターンの違いは MDCK II 細胞が claudin-2 を発現することである。claudin-2 を MDCK I 細胞で発現すると、TER 値が MDCK II 細胞と同程度まで低下することがわかった。このことから、図 1B に示すように trans-interaction できない claudin 分子間、この場合は claudin-1 と claudin-2、に仮想的間隙が形成されることで細胞間透過性が亢進する (TER 値が低下する) と考えられた⁴⁾。このように、claudin 分子間の cis- および trans-interaction の解析は、タイト結合の機能の制御メカニズムを解明するために重要であると思われる。

タイト結合を形成しない線維芽細胞や HEK293 細胞で、異なる claudin 分子種を発現して共培養することで、claudin

〒 814-0193 福岡市早良区田村 2 丁目 15-1
TEL: 092-801-0411 (内) 683; FAX: 092-801-4909
E-mail: tinaitj@college.fdcnet.ac.jp
2010 年 5 月 9 日受付

分子間の trans-interaction を解析できる. 図 2 (A, B) は, claudin-1 同士および claudin-1 と claudin-15 間の trans-interaction を HEK293 細胞の共培養で解析した例である. claudin-1 と claudin-15 は trans-interaction できないことがわかった⁵⁾.

しかし, 前述のように上皮細胞では 2 種類以上の claudin 分子種が発現することが一般的であり, 複数の claudin 分子種が発現する細胞においては, claudin 分子間の interaction が HEK 細胞で解析した場合と異なる可能性がある. また, タイト結合は本来上皮細胞で形成されるものであるため, claudin 分子間の相互作用を上皮細胞で解析する必要がある. そこで, タイト結合を形成する MDCK II 細胞に外因性に claudin-15 を発現し, これと親細胞である MDCK II 細胞を共培養して, claudin-15 と MDCK II 細胞に内因性に発現する claudin-1, -2, -3, -4, -7 との trans-interaction を調べた (図 2C, D). その結果 claudin-15 は MDCK II 細胞に内因性に発現する claudin と trans-interaction できないことがわかった⁶⁾. claudin-15 は, claudin-15 を外因性に発現する MDCK II 細胞間においてタイト結合の位置を示す ZO-1 と共存した (図 2D, 矢頭). このことから, 少なくとも claudin-15 は内因性 claudin と cis-interaction してタイト結合に組み込まれていると考えられる. 今後, claudin-15 と claudin-2, -3, -4, -7 との trans-interaction を HEK293 細胞の共培養系で調べることで, claudin-15 が

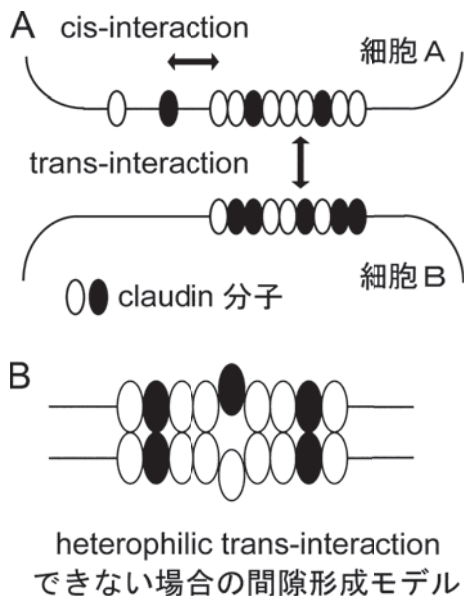


図 1 claudin-claudin 分子間の相互作用のモデル. claudin 分子は一つの細胞の細胞膜上で side-by-side に相互作用 (cis-interaction) し, さらに, 隣接する細胞間で head-to-head に相互作用 (trans-interaction) してタイト結合を形成すると考えられている. 図 1A のように同種 (homophilic) または異種 (heterophilic) の claudin 分子同士が cis- および trans-interaction していると考えられている. また, claudin-1 と claudin-2 の例のように, 一部の組み合わせについては claudin 分子同士が trans-interaction できないことがわかっており, 仮想的な間隙が形成されると考えられている (図 1B).

MDCK II 細胞で異種細胞間に局在できない理由が, 全ての内因性 claudin と trans-interaction できないためか, それとも少なくとも claudin-1 と trans-interaction できないためかを確定する必要がある.

3. タイト結合の細胞間透過性の制御メカニズム

タイト結合は細胞間隙をシールするバリアとしての機能があるが, それは絶対的バリアではなく, 組織により陰イオンまたは陽イオンを通しやすい場合がある. 細胞間透過性も発現する claudin の組合せと比率により決定されると考えられている. claudin-2 の細胞外第 1 ループである ECL1 には, 陰性荷電アミノ酸であるアスパラギン酸とグルタミン酸があり, これにより claudin-2 はナトリウムなどの陽性イオンを通過させる仮想的 pore を形成すると言われている^{7,8)}. 我々の研究でも, ECL1 に陰性荷電アミノ酸を持つ claudin-10b ま

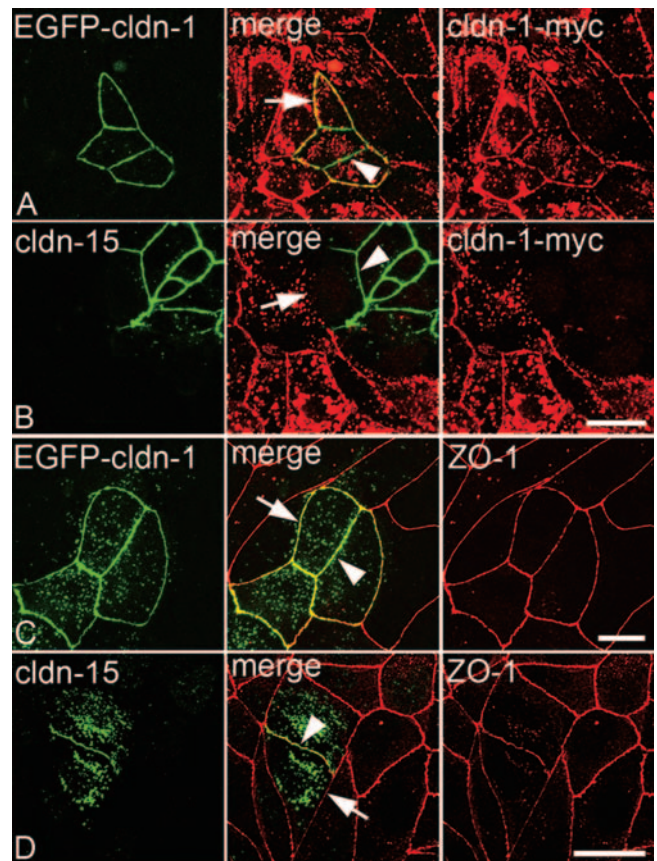


図 2 HEK293 細胞または MDCK II 細胞を使った共培養による claudin-claudin 相互作用の解析. EGFP-claudin (cldn)-1 または cldn-15 を発現する HEK293 細胞と cldn-1-myc を発現する HEK293 細胞を共培養し, cldn-15 および myc に対する抗体で免疫染色した (A, B). EGFP-cldn-1 または cldn-15 を発現する MDCK II 細胞と MDCK II 細胞を共培養し, cldn-15 および ZO-1 に対する抗体で免疫染色した (C, D). EGFP-cldn-1, cldn-15 を緑, cldn-1-myc, ZO-1 を赤で示す. HEK293 細胞はタイト結合を形成しないが, MDCK II 細胞はタイト結合を形成する細胞である. 矢印は異種細胞間の細胞接合面, 矢頭は同種細胞間の細胞接合面を示す. スケールバー 10 μ m.

たは claudin-15 を MDCK I 細胞で発現すると、ナトリウムイオンの細胞間透過性が増大して TER が顕著に減少した⁵⁾。しかし、trans-interaction ができない claudin 分子間の間隙形成モデルも今のところ完全には否定できず、今後の課題である。

4. タイト結合の形態形成のメカニズム

上皮細胞のタイト結合をフリーズフラクチャー法で観察すると、タイト結合の形態は組織特異的であることがわかる。タイト結合の形態をタイト結合の膜内粒子の付着様式で分類すると、P 型と E 型の 2 種類に大別できる。P 型は、細胞膜の内葉表面である P 面にタイト結合の膜内粒子が融合してできるタイト結合ストランドを形成し、細胞膜の外葉表面である E 面に溝を形成し、その溝には膜内粒子がない。E 型は、P 面にわずかな線状の隆起を形成し、その隆起の上に膜内粒子が存在せず、E 面には数珠状に繋がった膜内粒子が存在する溝を形成する。実際の組織では、P 型と E 型のさまざまな移行型が見られる。

タイト結合を形成しない HEK293 細胞で claudin-10b を発現すると、P 面に疎らな膜内粒子が存在し、E 面の溝に数珠状に繋がった膜内粒子が存在するという E 型に近いタイト結合ストランドを形成した⁵⁾ (図 3 左)。一方 claudin-15 は、P 面に膜内粒子が一部融合してできるタイト結合ストランドを形成し、E 面の溝には膜内粒子がない P 型ストランドを形成した (図 3 右)。このように、タイト結合ストランドの形

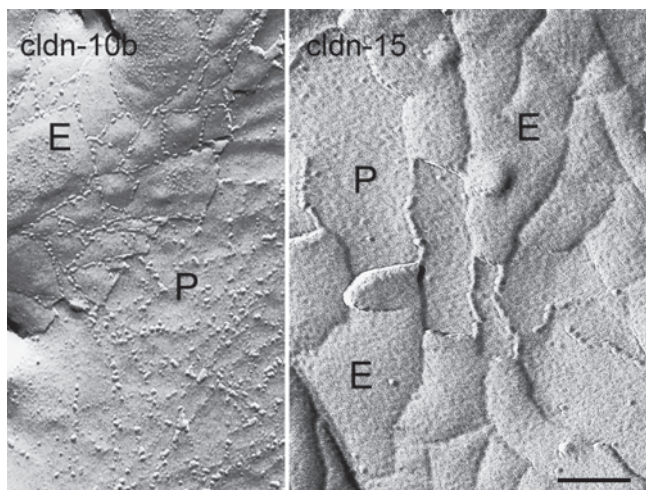


図 3 claudin-10b または claudin-15 が形成するタイト結合ストランドの形態。タイト結合を形成しない HEK293 細胞で claudin-10b または claudin-15 を発現し、細胞を凍結切断後にプラチナとカーボン蒸着してレプリカを作成し、タイト結合ストランドの形態を電子顕微鏡で観察した。claudin-10b は、P 面に疎らな膜内粒子からなるタイト結合ストランドと、E 面の溝に数珠状に連なる膜内粒子からなるタイト結合ストランドを形成する。claudin-15 では、膜内粒子が連なって形成されるタイト結合ストランドが P 面に認められ、これらの粒子の一部は部分的に融合する。また、E 面には膜内粒子のない溝が観察される。スケールバー 200 nm。

態は、claudin 特異的であることがわかる。また、線維芽細胞で P 型ストランドを形成する claudin-1 と E 型に近いストランドを形成する claudin-2 を共発現すると、両者の中間の形態のストランドを形成する³⁾。このことは、実際の組織では claudin の発現パターンが組織特異的であり、そのために組織特異的な形態のタイト結合、ひいては組織特異的な機能を発現すると考えられる。

タイト結合の形態形成では、claudin の細胞外第 2 ループである ECL2 のフェニルアラニン (F) とチロシン (Y) が重要であると考えられている⁹⁾。実際、FY というアミノ酸配列はほとんどの claudin 分子種で保存されている。しかし、claudin-1 の ECL2 の FY を欠失させて HEK293 細胞で発現すると、予想外に、野生型の claudin-1 と同じ P 型のタイト結合ストランドを形成した¹⁰⁾。タイト結合の形態が claudin 分子種によりどのように決定されているかは、今後さらなる研究が必要である。

5. おわりに

細胞の癌化により claudin の発現パターンが変化し、この変化と癌の転移・予後との関連を示唆する報告が最近出てきた。また、C 型肝炎ウイルスが肝細胞に感染するとき claudin-1 が必要であることがわかった。このように、タイト結合は単に細胞間接着装置として機能しているだけでなく、さまざまな生物学的機能を果たしていることがわかってきた。今後、ますますタイト結合の新たな機能が判明すると共に、新しい研究手法が確立してタイト結合の形態と機能の制御メカニズムの詳細が判明していくことを期待している。

文 献

- 1) Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K. and Tsukita, S.: *J. Cell Biol.*, 141, 1539–1550 (1998)
- 2) Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K. and Tsukita, S.: *J. Cell Biol.*, 143, 391–401 (1998)
- 3) Furuse, M., Sasaki, H. and Tsukita, S.: *J. Cell Biol.*, 147, 891–903 (1999)
- 4) Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S.: *J. Cell Biol.*, 153, 263–272 (2001)
- 5) Inai, T., Kamimura, T., Hirose, E., Iida, H. and Shibata, Y.: *Eur. J. Cell Biol.*, 89, 547–556 (2010)
- 6) Sengoku, A., Inai, T. and Shibata, Y.: *Histochem. Cell Biol.*, 129, 211–222 (2008)
- 7) Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A.H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J.D. and Fromm, M.: *J. Cell Sci.*, 115, 4969–4976 (2002)
- 8) Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C. and Anderson, J.M.: *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 283, C142–147 (2002)
- 9) Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Muller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G. and Blasig, I.E.: *FASEB J.*, 22, 146–158 (2008)
- 10) Inai, T., Sengoku, A., Hirose, E., Iida, H. and Shibata, Y.: *Histochem. Cell Biol.*, 131, 681–690 (2009)