

アドヘレンスジャンクションを介したタイトジャンクション形成の制御機構

重富 健太, 池ノ内 順一

1. はじめに

我々の体表面を覆う上皮は、上皮細胞どうしが密に結合し合うことによって、上皮細胞のシートを形成している。上皮細胞は、機能と構造の異なる複数の細胞間接着を担う細胞膜構造 [アピカル膜側から順に、タイトジャンクション (TJ), アドヘレンスジャンクション (AJ), デスモソーム (DS)] を有している (図1A)。これらの細胞膜構造は、膜タンパク質である細胞接着分子、それらの組織化に関わる裏打ちタンパク質に加えて、細胞膜脂質や細胞骨格など、多彩な要素から構成される超分子複合体である。それぞれの細胞接着構造を構成する主要なタンパク質は同定されたものの、細胞膜のどこに (局在)、どの程度 (量)、どれくらいの強度や機能を持った (質) 細胞接着構造を形成するか、という細胞接着構造の形成制御のメカニズムはほとんど明らかになっていない。筆者らは、形質膜上に異なる形態を示す細胞膜構造が秩序だって形成されるメカニズムに興味を持ち、研究を行っている。

細胞間接着装置の中で、TJは、体内外の物質の透過を制限するバリアとして機能する。たとえば、小腸上皮細胞においては体外のアレルゲンや病原菌の体内への侵入を防ぐとともに、体内からの水やイオン、グルコースが細胞の間隙を通り流出することを防いでいる。TJの主要な構成タンパク質としてクローディンが月田らによって同定された¹⁾。クローディンを欠損させたマウスにおいては、上皮細胞のバリア破綻に起因した表現型が観察されており、TJ形成にクローディンが必須であることが示された¹⁾。しかし、クローディンを発現する細胞が必ずしもTJを有するわけではない。たとえば、骨髄中に存在する樹状細胞においてもクローディン1が発現していることが報告されて

いる²⁾。また、クローディンを細胞にベクター等を用いて過剰発現させたからといって、TJが拡大することもない。したがって細胞膜構造の形成は、主要な構成タンパク質の発現量によって制御されているわけではない。上皮細胞においては、TJはアピカル膜直下の非常に限られた細胞膜の領域に形成されるが、TJの形成は、どのように制御されているのであろうか。上皮細胞の細胞接着を一度破壊し、その再形成過程を詳しく観察すると、TJの形成に先立って、まずE-カドヘリンを介したAJが形成される。この際に、E-カドヘリンの阻害抗体を細胞に処理すると、AJのみならずTJの形成も阻害される³⁾。また、AJの必須の構成要素である α -カテニンの発現が消失したPC-9細胞では、AJのみならずTJも形成されない⁴⁾。このような観察事実から、TJ形成にはAJの形成が必要であることが明らかになった。その理由として、AJを形成することによって細胞膜どうしを物理的に近接させることによって、隣接細胞間のクローディンどうしの結合が可能となりTJの形成を可能にしているのではないかと考えられてきた。しかし近年になって、AJの形成は、細胞骨格の再組織化、低分子量Gタンパク質の活性化などのさまざまな変化を細胞内にもたらすことで、TJ形成に寄与することが示唆された。さらに、筆者らは最近、AJの形成が形質膜の脂質組成を変化させ、TJの形成を促進することを明らかにした⁵⁾。本稿では、二つの細胞膜構造の形成がどのようにリンクしているかという問題について、最近の知見を概説する。

2. AJ形成はアクチン細胞骨格のダイナミックな再構成を引き起こす

上皮細胞間の細胞接着の再形成過程を観察すると、最初にまず、E-カドヘリンを介した点状AJが形成される⁶⁾。点状AJは集合し、帯状AJを形成する。それと同時にAJのアピカル側にTJが形成される。このとき、アクチン細胞骨格の再組織化が起こる (図1B)。点状AJでは、アクチン細胞骨格は細胞膜に対して垂直に配向しているのに対して、帯状AJでは、細胞膜に並行なアクチン束が細胞の内周を取り囲むように形成されて、AJとTJを細胞質側から裏打ちするようになる⁶⁾。このようなAJ形成に伴うアクチン細胞骨格の再編成は、Forminファミリータンパク質

九州大学理学院 (〒819-0395 福岡市西区元岡744)

How adherens junction formation enables tight junction formation?

Kenta Shigetomi and Junichi Ikenouchi (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, 774 Moto-oka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0395, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910555

© 2019 公益社団法人日本生化学会

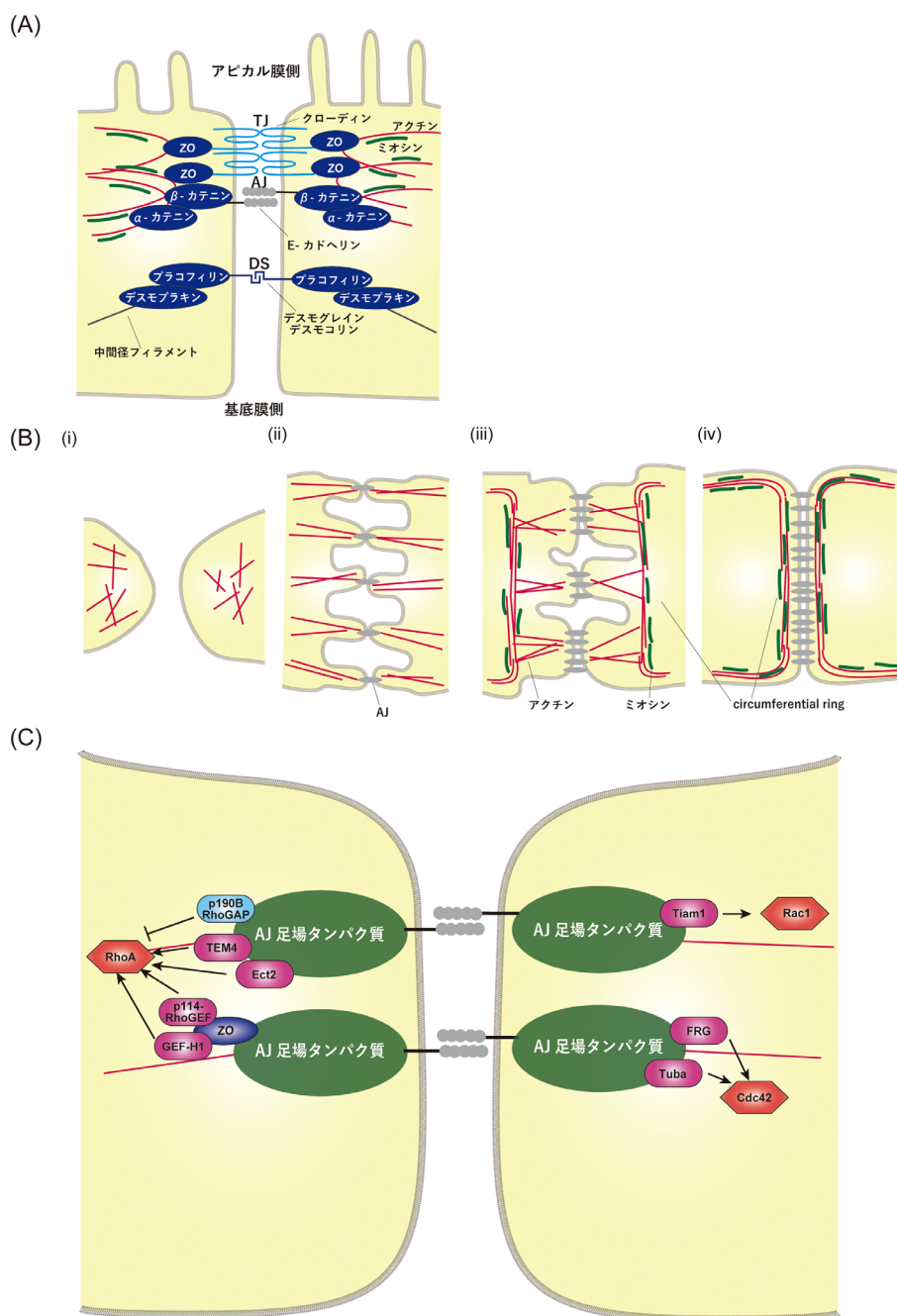


図1 AJ形成によるアクチン細胞骨格の再編成機構

(A) 上皮細胞の細胞間接着装置の模式図。タイトジャンクションには、クローディンを裏打ちするZO (zonula occludens) タンパク質が存在する。(B) 上皮細胞の細胞間接着装置の形成過程の模式図。細胞外 Ca^{2+} イオンをキレートすることにより細胞間接着を破壊した後(i), 再び Ca^{2+} イオンを加えることで細胞間接着装置の再形成が誘導される。細胞接着の初期段階では、点状にAJが形成される。アクチン細胞骨格は形質膜に垂直に配向して重合する(ii)。その後、点状AJの数が増加するとともに、ミオシンIIの収縮によりアクチン細胞骨格が環状に再編成される(circumferential ring, iii)。帯状AJが形成されると同時にTJが形成され、これらの細胞間接着装置を細胞質側からcircumferential ringが裏打ちする(iv)。(C) 細胞間接着装置に集積することが報告されているRhoファミリー低分子Gタンパク質の活性化制御因子群。

やMena/VASPといったアクチン細胞骨格の重合を促進するタンパク質が点状AJへ集積されることにより開始される。加えてAJを基点として伸びるアクチン線維に対して、

ミオシンIIが相互作用することによって、細胞内周を取り囲む環状のアクチン束(circumferential ring)に変化する。このcircumferential ringは、帯状AJおよびTJを内側から裏

打ちするアクチン細胞骨格の環状構造であり、TJの裏打ちタンパク質と相互作用することによって、TJの形成と安定化に必要であることがアクチン重合阻害剤を用いた研究から示されている。circumferential ringは、TJの裏打ちタンパク質を連続的に細胞内周にわたって配置することを可能にする。また、ミオシンIIによるcircumferential ringの収縮によって生じる細胞間接着部位にかかる張力がTJ形成に必要である^{7,8)}。このように、AJ形成によって誘導されるアクチン細胞骨格の再編成が、TJ形成において重要な役割を果たす。

3. AJ形成はRhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性を制御する

点状AJ形成によって誘導されるアクチン細胞骨格の重合と再編成は、低分子量Gタンパク質RhoAの活性化を必要とする。RhoAの活性化はForminファミリータンパク質などのアクチン重合促進因子を活性化するとともに、ミオシン軽鎖のリン酸化を介してcircumferential ringの形成に寄与する⁹⁾。このようなRhoAの活性化は、AJならびにTJの形成過程において、時空間的に制御されている。点状AJの形成時にはRhoAの活性化が一時的に起こるが、やがて

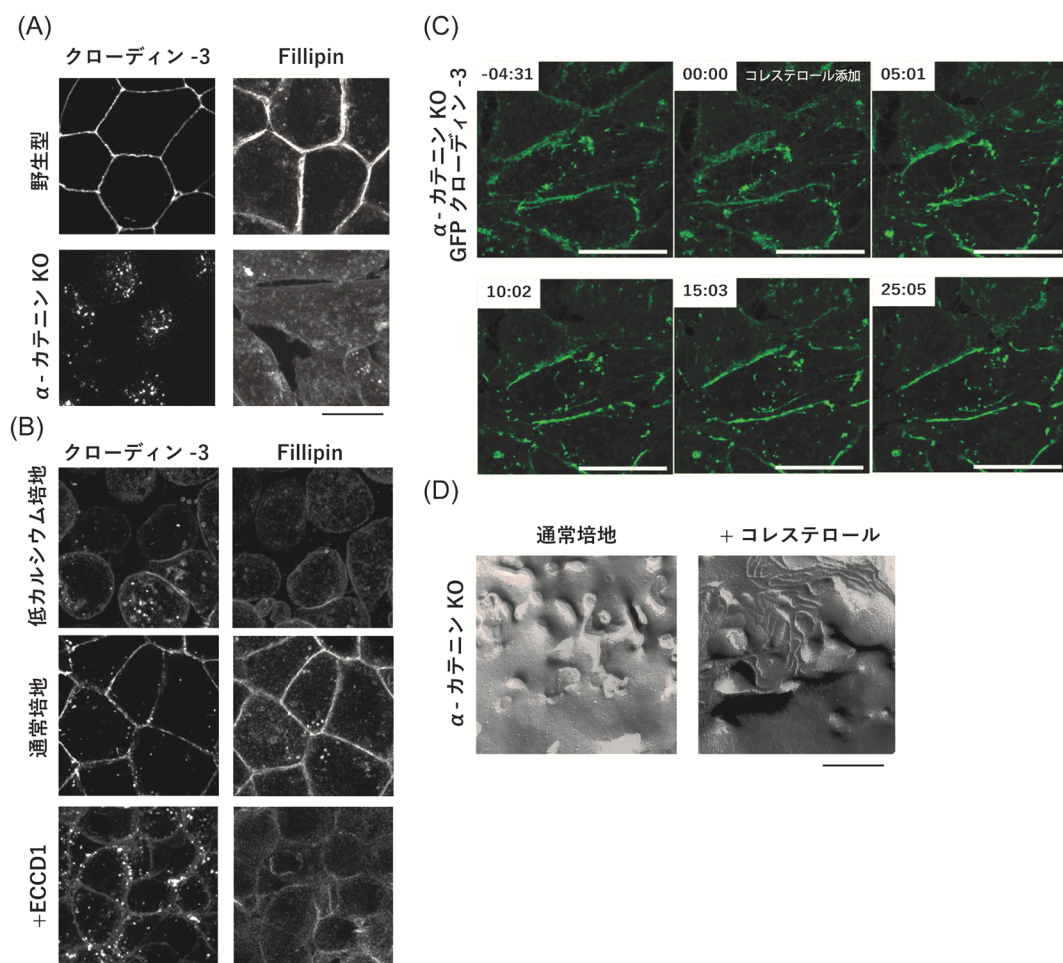


図2 AJ形成は形質膜上のコレステロールを増加させ、TJ形成を誘導する

(A)野生型の上皮細胞では、クロードインは細胞間接着部位に集積し、コレステロールは形質膜に集積している。これに対し、 α -カテニンの発現を消失させた上皮細胞(α -カテニンKO細胞)では、クロードインは細胞質の小胞に局在し、形質膜のコレステロール量は減少していた。スケールバー:20 μ m。(B)野生型の上皮細胞を、カルシウムイオン濃度を低減させた培地で培養したり、あるいはE-カドヘリンに対する機能阻害抗体(ECCD1)存在下で培養することでAJを破壊すると、クロードインは細胞質に取り込まれ、また形質膜のコレステロール量も減少する。(C) α -カテニンKO細胞にGFPタグを付加したクロードインを発現し、タイムラプスイメージングを行った。時刻0で、75mMのメチル- β -シクロデキストリンにコレステロールを包摂させた化合物を培地中に添加し、形質膜のコレステロール量を強制的に増加させると、GFP-クロードインが次第に細胞間接着部位に集積し、20分程度でTJが形成されるようすが観察された。スケールバー:20 μ m。(D) α -カテニンKO細胞の形質膜のコレステロール量を強制的に増加させると、TJが形成されることを凍結割断レプリカ法により確認した。スケールバー:200nm。

帯状AJが形成されるとRhoAの活性化は抑制される¹⁰⁾。常時活性化型RhoAを発現した細胞では、ラテラル膜に異常に拡大したTJが形成される¹¹⁾。これらの先行研究からも、RhoAの活性化の厳密な制御がTJの形成に必要であることが明らかである。このようなRhoAの活性化の制御に関わる分子として、細胞間接着部位に集積するGEF (guanine nucleotide exchange factor) やGAP (GTPase activating protein) が近年、多数同定された。RhoAに対するGEFであるTEM4 (tumor endothelial marker 4), Ect2 (epithelial cell transforming gene 2), GEF-H1, p114 Rho-GEFはAJの構成要素と相互作用することが報告されている¹¹⁾。一方、AJに局在するRhoAに対するGAPとしてp190 RhoGAPが同定されている¹¹⁾。RhoA以外にも、アクチン細胞骨格の重合やアクチン細胞骨格の配向性の制御に関わる低分子量Gタンパク質としてCdc42とRacがあげられる。Cdc42のGEFであるFRG (FGD1-related Cdc42-guanine nucleotide exchange factor) やTubaもAJを構成するタンパク質と相互作用する¹¹⁾。またRac1のGEFであるTiam1も点状AJに局在する。これらの分子群については、図1Cにまとめた。これらの点状AJに局在するRhoA, Rac, Cdc42の活性化を制御する分子群は、点状AJを基点とするアクチン細胞骨格の再編成の制御に関与すると考えられるが、これらGEFやGAPの活性がどのように制御されているかはほとんど明らかになっていない。Cdc42はアクチン細胞骨格の再編成に加えて、細胞内小胞輸送の制御にも関与する¹²⁾。このため点状AJにおけるCdc42の活性化は、クローデインの形質膜への輸送などを介してTJ形成を促進する可能性がある。TJの形成に必要なクローデインの形質膜への輸送機構は不明な点が多く残されており、今後の研究課題である。

4. AJ形成は形質膜の脂質組成を変化させ、TJ形成を誘導する

筆者らのグループは最近、AJの形成が形質膜の脂質組成を変化させ、TJ形成を促進するという新たな分子機構を発見した⁵⁾。筆者らは、AJ形成の喪失が上皮細胞にもたらす影響を詳細に調べるために、マウス乳腺由来培養上皮細胞のEpH4細胞において、AJ形成に必須である裏打ちタンパク質 α -カテニンの発現を消失させた細胞株 (α -カテニンKO EpH4細胞) を樹立した。この細胞では、AJおよびTJのいずれの細胞接着構造も消失しており、興味深いことにクローデインはリソソームに蓄積していた。このことから、AJを消失した細胞ではクローデインが恒常的に分解されていることが示唆された。AJを消失した細胞では、クローデインの細胞内の取り込みが亢進しているのではないかと考えて、さまざまな可能性について検討したところ、野生型のEpH4細胞と α -カテニンKO EpH4細胞の脂質

組成を比較した際に、 α -カテニンKO EpH4細胞では、極長鎖脂肪酸を脂肪酸鎖として持つスフィンゴミエリンが特異的に減少していることを見いだした。また、極長鎖脂肪酸スフィンゴミエリンと相互作用することが知られているコレステロールの分布を調べたところ、野生型のEpH4細胞では細胞接着領域にコレステロールが集積しているのに対して、 α -カテニンKO EpH4細胞では形質膜のコレステロールが減少していることが明らかになった (図2A)。 α -カテニンの発現を消失させる以外の方法でAJの形成を障害した場合も、同様にコレステロールの細胞内分布に変化が生じるかについて検討した。培地中に含まれる細胞外 Ca^{2+} イオンを除去した場合やE-カドヘリンに対する阻害抗体を添加することによって、AJの形成を障害した場合においても同様に、形質膜のコレステロールが減少するようすが観察された (図2B)。このことから、AJの形成は、上皮細胞の形質膜のコレステロールの量を増加させることが明らかになった。

次に、このようなAJ形成に伴う形質膜コレステロールの増加がTJの形成に必要なかを検討した。 α -カテニンKO EpH4細胞に対して、メチル- β -シクロデキストリンにコレステロールを包摂させた化合物を作用させることで、強制的に形質膜のコレステロール量を増加させると、5分程度の間にクローデインが細胞接着領域に集積し、TJが形成されるようすが観察された (図2C, D)。 α -カテニンKO EpH4細胞は、AJの必須の構成タンパク質を欠いており、形質膜のコレステロール量を増加させてもAJは形成されない。しかしながら、AJが形成されていない状態においても、形質膜のコレステロール量を増加させると、 α -カテニンKO EpH4細胞においてもTJが形成された。このことから、AJの形成は形質膜の脂質組成を変化させることによって、TJの形成を促進することがわかった。また逆に、細胞にメチル- β -シクロデキストリンを処理することでコレステロールを形質膜から除去すると、細胞間接着装置のうちTJのみが選択的に消失した。このことから、TJはコレステロールの減少に対して脆弱な細胞膜構造であることが明らかになった。この結果は、TJを構成する膜タンパク質を生化学的に分画すると、コレステロールに富む膜画分 (detergent resistant membrane) に豊富に含まれるという先行研究とも合致する¹³⁾。

それでは、AJの形成はどのようにして、形質膜のコレステロール量の制御に関与しているのだろうか？ 現在のところ、その詳細な機構は不明であるが、いくつか関連する知見が報告されている。たとえば、インテグリンを介した細胞と細胞外マトリックスとの細胞-基質間接着の形成は、形質膜へのコレステロールの小胞輸送を促進することが知られている¹⁴⁾。細胞-基質間接着の形成に伴う形質膜へのコレステロールの小胞輸送には、低分子量Gタンパク

質Arf6の活性化と微小管が必要であることが近年報告された¹⁵⁾。一方で、AJの形成においても、微小管の再配向が起こることが報告されている。また、筆者らは以前に点状AJにはArf6に対するGEFであるCytohesinが集積し、AJの形成によってArf6が活性化されることを報告した¹⁶⁾。このため、細胞-基質間接着の場合と同様に、AJの形成に伴って形質膜へコレステロールを含む小胞を輸送する分子機構が存在する可能性がある。

コレステロールの細胞内輸送には小胞輸送を介する経路以外にも、LTP (lipid transfer protein) を介した小胞によらない輸送経路が知られている¹⁷⁾。小胞体で合成されたコレステロールは、ERと他の細胞小器官や形質膜との接触部位 (membrane contact site) に局在するLTPによって輸送される。たとえば、小胞体からトランスゴルジ網へのコレステロールの輸送に関しては、oxysterol-binding protein (OSBP) が小胞体とトランスゴルジ網の接触部位に局在しており、トランスゴルジ網から小胞体へホスファチジルイノシトール4リン酸の輸送と共役して、小胞体からトランスゴルジ網へのコレステロールの輸送を行う¹⁷⁾。同様に、AJ形成に伴って、LTPが細胞接着領域に集積し、小胞体から形質膜へのコレステロールの輸送を促進する可能性がある。実際に、OSBPと同様のLTPのファミリーの一つ、deleted in liver cancer3 (DLC3) は上皮細胞においてAJに局在することが報告されている¹⁸⁾。このような細胞間接着部位に局在するLTPの機能はほとんど明らかになっておらず、今後の解析が必要である。

上述のコレステロールの輸送メカニズムに加えて、AJを裏打ちするcircumferential ringがコレステロールの集積を制御する可能性がある。circumferential ringと同様に、細胞膜を全周にわたって裏打ちするアクチン細胞骨格のリング状構造として、細胞質分裂の際に形成される収縮環 (contractile ring) があげられる。circumferential ringと収縮環を構成する分子群には、アクチン細胞骨格、ミオシンIIに加えて、Formin、RhoAやRhoAの活性化に関わるEct2など多くの共通性がある。そして、興味深いことに、収縮環が付着している分裂溝の形質膜にはコレステロールが集積することが報告されている¹⁹⁾。したがって、形質膜におけるコレステロールの局所的な集積に、細胞膜とアクチン細胞骨格との結合や、環状アクチン構造の収縮による膜への張力が寄与している可能性もある。

5. おわりに

本稿では、AJの形成がどのようにして異なる細胞膜構造であるTJの形成を可能にするのか、という点について、最近の知見を概説した。細胞膜構造の形成メカニズムを理解するためには、細胞膜脂質を形質膜の局所に集積させ

る仕組みなど、きわめて基本的な現象の分子機構の解明を今後行う必要がある。誌面の関係で扱うことはできなかったが、AJの形成は、Hippo経路やWnt- β -カテニンシグナル伝達経路の活性化に変化をもたらし、遺伝子発現を含めて細胞内にさまざまな変化をもたらすことが報告されている²⁰⁾。AJの形成によって惹起される細胞内のさまざまな要素 (細胞骨格、裏打ちタンパク質、膜タンパク質、脂質) の変化がどのように組み合わせたり、新たな超分子複合体の形成が可能になっているかという問題については、今後、従来の形態学的手法や細胞生物学的手法に加えて、合成生物学的手法などのさまざまな新しい技術を取り込んで研究を進める必要があると考える。TJの形成メカニズムを解明することによって、TJのバリア機能破綻によって引き起こされる慢性炎症などのさまざまな疾患の画期的な治療法の開発につなげたい。

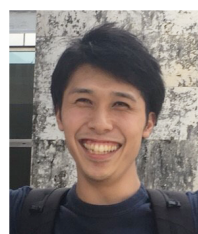
文 献

- 1) Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 285–293.
- 2) Zimmerli, S.C. & Hauser, C. (2007) Langerhans cells and lymph node dendritic cells express the tight junction component claudin-1. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 2381–2390.
- 3) Gumbiner, B., Stevenson, B., & Grimaldi, A. (1988) The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J. Cell Biol.*, **107**, 1575–1587.
- 4) Watabe, M., Nagafuchi, A., Tsukita, S., & Takeichi, M. (1994) Induction of polarized cell-cell association and retardation of growth by activation of the E-cadherin-catenin adhesion system in a dispersed carcinoma line. *J. Cell Biol.*, **127**, 247–256.
- 5) Shigetomi, K., Ono, Y., Inai, T., & Ikenouchi, J. (2018) Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. *J. Cell Biol.*, **217**, 2373–2381.
- 6) Ikenouchi, J., Umeda, K., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2007) Requirement of ZO-1 for the formation of belt-like adherens junctions during epithelial cell polarization. *J. Cell Biol.*, **176**, 779–786.
- 7) Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., Hosoya, H., & Yonemura, S. (2006) Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonula occludens formation. *Exp. Cell Res.*, **312**, 1637–1650.
- 8) Stevenson, B.R. & Begg, D.A. (1994) Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J. Cell Sci.*, **107**, 367–375.
- 9) Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., & Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of Myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.*, **271**, 20246–20249.
- 10) Noren, N.K., Niessen, C.M., Gumbiner, B.M., & Burridge, K. (2001) Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.*, **276**, 33305–33308.
- 11) Citi, S., Guerrero, D., Spadaro, D., & Shah, J. (2014) Epithelial junctions and Rho family GTPases: The zonular signalosome. *Small GTPases*, **5**, e973760.

- 12) Harris, K.P. & Tepass, U. (2010) Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic*, **11**, 1272–1279.
- 13) Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K.K., & Madara, J.L. (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.*, **113**, 1771–1781.
- 14) del Pozo, M.A., Alderson, N.B., Kiosses, W.B., Chiang, H.-H., Anderson, R.G.W., & Schwartz, M.A. (2004) Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*, **303**, 839–842.
- 15) Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., & Schwartz, M.A. (2007) Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1381–1391.
- 16) Ikenouchi, J. & Umeda, M. (2010) FRMD4A regulates epithelial polarity by connecting Arf6 activation with the PAR complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 748–753.
- 17) Wong, L.H., Gatta, A.T., & Levine, T.P. (2019) Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **20**, 85–101.
- 18) Hendrick, J., Franz-Wachtel, M., Moeller, Y., Schmid, S., Macek, B., & Olayioye, M.A. (2016) The polarity protein Scribble positions DLC3 at adherens junctions to regulate Rho signaling. *J. Cell Sci.*, **129**, 3583–3596.
- 19) Ng, M.M., Chang, F., & Burgess, D.R. (2005) Movement of membrane domains and requirement of membrane signaling molecules for cytokinesis. *Dev. Cell*, **9**, 781–790.
- 20) Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X., & Gumbiner, B.M. (2011) E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 11930–11935.

著者寸描

●重富 健太 (しげとみ けんた)



九州大学大学院システム生命科学府大学院生D3 (一貫制博士課程5年)。

■略歴 長崎県に生まれ、2015年九州大学大学院理学部生物学科卒業。17年より日本学術振興会特別研究員(DC1)に採用され現在に至る。

■研究テーマと抱負 細胞の接着形成機構の解明をテーマに、タイトジャンクションに着目し研究を進めている。脂質

や足場タンパク質など、複合的な観点から解明を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/ikelab/>

■趣味 園芸 (棘のある植物にはまっています)。

●池ノ内 順一 (いけのうち じゅんいち)



九州大学理学研究院教授。博士(医学)。

■略歴 2007年京都大学大学院医学研究科博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、さきがけ研究者を経て、08年より京都大学准教授。13年より九州大学独立准教授。16年より現職。専門は、細胞生物学、脂質生化学。

■研究テーマと抱負 細胞膜の構造形成と機能発現において、膜タンパク質と脂質がどのように協働しているかを理解したい。さらに、その過程で脂質の多様性の意義を明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~taisha/ikelab/>

■趣味 音楽鑑賞、子供との連弾。