

タイトジャンクションの構造・機能連関の新しい視点

大谷 哲久, 古瀬 幹夫

1. はじめに

動物の体を構成する上皮は、外界と体、あるいは体内のさまざまな空間を仕切るバリアとして働き、もう一つの重要な機能である方向性を持つ物質輸送と合わせて体内の液性環境の形成・維持に寄与している。上皮がバリアとして働くためには細胞どうしの隙間を介する物質の自由な透過を制限する必要がある。そのための「ゲート」の役割を、脊椎動物ではタイトジャンクション (tight junction, 密着結合, 以下 TJ) と呼ばれる細胞間結合が担っている^{1,2)}。TJのゲート機能の基盤は、膜タンパク質クローディンファミリーが両細胞から集積して形成される TJ ストランドと呼ばれる紐状の細胞膜密着構造である (図1)。TJ ストランドはクローディンが細胞あたり逆平行2列に並んで細胞間で会合していると考えられ^{3,4)}、ネットワークを形成して帯状に細胞周囲を取り巻く。その結果、細胞間隙が連続的にシールされ、電解質のような低分子も細胞間隙を自由に透過できない。一方、TJの細胞質側にはこれら膜タンパク質に直接結合するZO-1, ZO-2, ZO-3からなるZOファミリータンパク質などの裏打ちタンパク質が存在する^{1,2)}。ZO-1, ZO-2はクローディンの細胞質領域に直接結合し、TJストランド形成に必須である。クローディンの同定以降、TJ研究はクローディンの解析を中心として一気に発展し、傍細胞輸送の制御の重要性および病態との関係において多くのことが明らかになった^{1,2)}。一方で、TJの細胞生物学には残された重要な課題も多い。本稿では、TJの中核構造の構成分子であるクローディンファミリー、ZOファミリーをそれぞれゲノム編集により欠失させた培養上皮細胞の解析から明らかになったTJの新しい姿について考察する。

2. TJによる物質透過制御

1) TJのゲート機能：ポア経路とリーク経路

TJは細胞間隙における物質の自由な透過を制限するバリアとして働くが、完全なバリアではない。上皮輸送の観点からは細胞間隙すなわちTJを受動的に溶質が透過する輸送ルートが存在し、傍細胞経路 (paracellular pathway) と呼ばれている^{1,2)}。すなわち、TJは傍細胞経路の透過性を規定しており、これをTJのゲート機能と呼ぶ。TJが規定する傍細胞経路には少なくとも二つのモードがあることが知られてきた。一つは直径4Å (0.4nm) 以下の電解質のような低分子を電荷選択的に通すモードで「ポア経路」と呼ばれる。もう一つは、ごくわずかな量の高分子を電荷に関係なく透過させるモードで「リーク経路」と名づけられている^{1,2)}。TJストランドを構成するクローディンのサブタイプの中には、TJの細胞外部分に電荷選択性の小さい穴を形成するチャンネル型クローディンが含まれる。チャンネル型クローディンは特定の上皮で多く発現し、電解質を電荷選択的に透過させて経細胞経路 (transcellular pathway) の輸送と共役させることで生理的な上皮輸送を

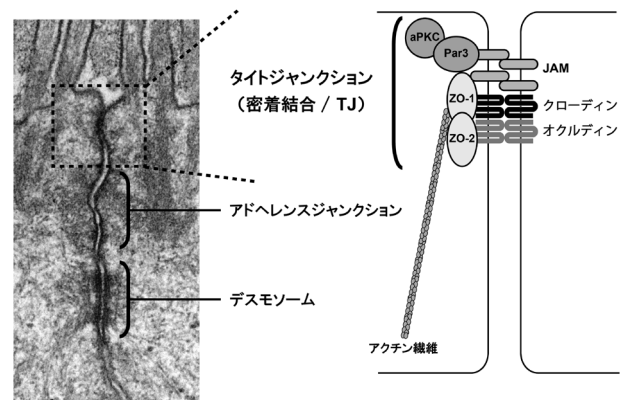


図1 タイトジャンクションとその分子構成

タイトジャンクション (密着結合/TJ) は細胞間隙をシールする細胞間接着構造であり、細胞どうしの隙間を介する物質の自由な透過を制限する働きがある。TJはクローディン、JAM、オクルディンなどの膜タンパク質、およびこれらの膜タンパク質と結合するZOファミリータンパク質などの裏打ちタンパク質によって構成され、ZOファミリータンパク質を介してアクチン細胞骨格と連結している。また、TJにはPar3やaPKCといった細胞極性形成に関与する極性シグナル複合体が局在している。

自然科学研究機構生理学研究所細胞構造研究部門 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1)

New perspective of the structure and function of tight junctions
Tetsuhisa Otani and Mikio Furuse (Division of Cell Structure, National Institute for Physiological Sciences, National Institute of Natural Sciences, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920731

© 2020 公益社団法人日本生化学会

達成している。このチャンネル型クローディンを介する細胞間隙の電解質の透過ルートが、先述のポア経路に相当する。これに対して、リーク経路のメカニズムはいまだ不明である。一つの可能性として、TJストランドが断裂、再結合を繰り返す際に、その合間を縫って高分子がわずかながら細胞間隙を徐々に透過するという仕組みが提唱されている^{5,6)}。

2) クローディンとJAMによる細胞間隙バリアの二重構造

我々は、TJ研究に用いられてきた典型的上皮細胞株であるイヌ腎臓由来MDCK細胞を用いて、発現する主要なクローディンサブタイプ五つをゲノム編集によりすべて欠失させることにより、クローディンが構成するTJの特徴的な構造であるTJストランドを欠失した上皮細胞（本稿ではクローディン欠失MDCK細胞とする）を樹立した⁷⁾。従来のTJの定義に従えば「TJを持たない上皮細胞株」が樹立されたといえる。クローディン欠失MDCK細胞は、予想どおり、電解質を含む低分子に対するバリア機能が破綻していた。ところが、この細胞は、TJストランドを欠くにもかかわらず、依然TJ様の細胞膜の近接構造を有しており、高分子トレーサの透過に対してバリア機能を保持していた。解析の結果、この細胞膜の近接構造は別のTJ膜タンパク質であるJAM-Aによって形成されていた（図2）⁷⁾。

これらの観察は、従来のTJの構造機能連関の概念に修正を迫る。第一に、これまでTJと定義されてきた細胞膜領域には、クローディンが形成するTJストランドによる低分子の透過バリアに加えて、JAM-Aが形成する細胞膜近接構造による高分子の透過バリアが存在する。すなわち、TJ領域における透過バリアはモードの異なる二重構造からなることが新たに提唱された。JAM-Aだけを欠失させたときには低分子のバリア機能に異常はなかったことから、JAM-Aが形成する高分子の透過バリアの重要性は低分子の透過バリアを欠いたときに顕在化すると考えられた。個体においてTJストランドを持たずJAMファミリーの細胞膜による近接構造だけを持つような上皮が実際に存在するのか、するのであればどのような機能を担っているのか興味を持たれる。第二に、JAMによる高分子の透過に対するバリアがTJストランドと独立に存在するのであれば、リーク経路はTJストランドの断裂だけでは説明できず、JAMが形成する細胞膜の近接構造による高分子透過バリアの部分的な破綻も想定する必要がある。アクトミオシンの再編成を介してリーク経路が増すと報告がある⁶⁾。アクトミオシンの張力がTJに力学的な負荷を加えることによりこれらの二重のバリアの局所的な破綻を引き起こすことがリーク経路の実体である可能性がある。

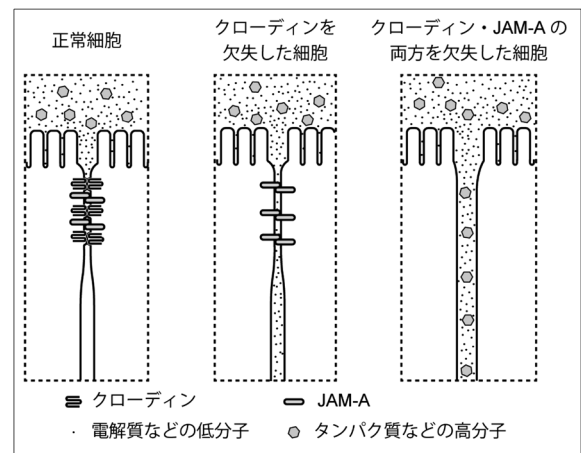


図2 クローディンとJAMによる細胞間隙バリアの二重構造
TJが規定するバリアには少なくとも二つのモードがあることが知られており、一つは直径4Å以下の電解質のような低分子を電荷選択的に通す「ポア経路」、もう一つは、ごくわずかな量の高分子を電荷に関係なく透過させる「リーク経路」として知られている。クローディン欠失MDCK細胞は、TJストランドを欠失し、電解質を含む低分子に対するバリア機能が破綻していたが、依然としてTJ様の細胞膜の近接構造を有しており、高分子トレーサの透過に対してバリア機能を保持していた。解析の結果、この細胞膜の近接構造は別のTJ膜タンパク質であるJAM-Aによって形成されていたことが明らかとなった。つまり、これまでTJと定義されてきた細胞膜領域には、クローディンが形成するTJストランドによる低分子の透過バリアに加えて、JAM-Aが形成する細胞膜近接構造による高分子の透過バリアが存在し、TJ領域における透過バリアはモードの異なる二重構造からなることが新たに提唱された。

3. タイトジャンクションと上皮細胞極性

1) TJのフェンス機能

ゲート機能に加えて、TJには上皮細胞の細胞膜の極性を維持する役割が古くから提唱されてきた。上皮細胞の細胞膜はTJを境界としてアピカル領域（管腔側）とパララテラル領域（基底膜側）の二つのドメインに分かれており、トランスポーターをはじめとする細胞膜上の膜タンパク質が各ドメインに選択的に存在することが上皮細胞の機能発現の基礎となっている。そして、TJは両ドメインの境界に位置し、TJストランドが膜タンパク質の脂質二重層内での拡散を妨げる囲い（フェンス）として働くことによって細胞膜の極性維持に寄与すると考えられてきた（TJのフェンス機能）。脂質に関しては、TJ領域が細胞膜の外葉の脂質の拡散に対して実際にフェンスとして機能することが示されている⁸⁾。さらに、Par3やaPKCといった細胞極性形成に関与する極性シグナル複合体がTJの裏打ちに局在することもTJと上皮細胞極性形成の密接な関係を示唆する⁹⁾。

2) TJストランドは上皮細胞極性に必須ではない

先述のクローディン欠失MDCK細胞は、TJストランドを欠く上皮細胞であることから、TJのフェンス機能を実証するための理想的な細胞である。そこで、細胞膜のアピカルマーカーとして膜タンパク質gp135、裏打ちタンパク質Ezrin、糖脂質のForssman抗原、バソラテラルマーカーとして膜タンパク質Na⁺/K⁺-ATPase、裏打ちタンパク質Scribbleの局在を指標に解析した結果、クローディン欠失MDCK細胞の上皮細胞極性は正常であった⁷⁾。少なくともこれらの上皮極性マーカーの正しい局在にTJストランドは必須でない。

ただし、この結果はTJストランドのフェンス機能、あるいはフェンス機能そのものの存在を否定するものではない。クローディン欠失細胞においては、先述のJAM-Aによる帯状の細胞膜の近接構造がフェンスとして機能している可能性がある。TJのフェンス機能の具体的なメカニズムとして、少なくとも二つの可能性が考えられる。まず、膜タンパク質の集積があれば分子夾雑により拡散フェンスは形成される¹⁰⁾。クローディンが重合したTJストランドだけでなく、JAM-Aもコンパクトに集積すれば同様の機能を持つことが可能であろう。別のメカニズムとして、膜間狭窄による立体障害を介した膜タンパク質の分布制御が考えられる。最近、クローディン-4分子を再構成した二つのリポソーム膜の接着部位において、5ナノメートル以上の細胞外ドメインを持つ膜タンパク質が排除されることが示された¹¹⁾。この現象は、クローディン4がホモに相互作用して膜が密着した部分に、立体障害によって一定サイズ以上の細胞外ドメインを持つ膜タンパク質が侵入できないためと考えられる。JAM-Aが形成する細胞膜の近接構造も同様の効果によって膜タンパク質の侵入を排除することでフェンスの役割を果たす可能性がある。興味深いことに、線維芽細胞に発現させたJAM-Aの細胞間接着部位への集積を凍結切断レプリカ法で電子顕微鏡観察すると、細胞膜の膜内粒子が排除されたフラットな面としてみえる¹²⁾。この観察は、JAM-Aが膜タンパク質に対する細胞膜上の拡散フェンスとして働きうることを示唆する。ただし、膜タンパク質の中には膜骨格等と相互作用してその局在が規定されているものも知られており、上皮細胞膜上のタンパク質の偏在におけるTJのフェンス機能の寄与の度合いはまだ明らかでない。TJがどのように脂質に対するフェンスとして働きうるかについてはまだ十分に理解されておらず、今後の展開が期待される。

3) ZO-1, ZO-2と上皮細胞極性形成

マウス乳腺由来EpH4細胞においてTJの裏打ちタンパク質ZO-1を標的組換えによりノックアウト、ZO-2をRNAiによりノックダウンして二重に欠失させると(ZO-1ko/

ZO-2kd EpH4)、TJストランドが消失する一方、上皮細胞極性は維持されることが報告されている¹³⁾。ところが、ゲノム編集によりZO-1とZO-2を二重にノックアウトさせたMDCK細胞(ZO-1/ZO-2 dKO MDCK)では、TJストランドが形成されないだけでなく、興味深いことに細胞膜の極性が乱れる⁷⁾。ZO-1ko/ZO-2kd EpH4細胞との乖離は、同細胞におけるZO-2のわずかな発現の漏れに起因することが明らかになった。では、ZO-1, ZO-2はどのように上皮細胞極性形成に寄与するのであろうか。ZO-1, ZO-2はPDZドメイン三つ、SH3ドメインGUKドメイン等を含む足場タンパク質であり、これらのドメインを介してクローディン以外のTJの膜タンパク質であるJAM、オクルディンに加え、アドヘレンスジャンクションの構成分子やアクチン線維とも相互作用する¹⁴⁾。実際、ZO-1/ZO-2 dKO MDCKでは、TJの膜タンパク質であるオクルディンやJAMや、極性シグナル複合体であるPar3やaPKCの細胞間接着部位における局在も大きく乱れ、ミオシンの活性が亢進してアクチン細胞骨格の編成に顕著な異常がみられた⁷⁾。正常な上皮細胞において、クローディンが形成するTJストランドとJAM-Aが形成する細胞膜の近接構造が細胞膜の極性形成を維持するフェンスとして働いているのであれば、ZO-1, ZO-2の二重欠失により両者の集積が損なわれフェンスの集積は失われるだろう。ただし、ZO-1/ZO-2 dKO MDCKの広範な表現型は、ZO-1, ZO-2がTJ構成分子のみならず、さまざまな分子との相互作用を通じて、上皮細胞極性形成のより根本的なステップに関与する可能性がある。たとえばJAM-Aは極性シグナル複合体のPar3と結合することから、ZO-1, ZO-2の欠失はJAM-Aの局在異常を介してPar3の作用に影響を及ぼすかもしれない。また、以前から言及されてきたように、上皮細胞極性形成に重要なアドヘレンスジャンクション形成にZO-1, ZO-2が関与する可能性もある¹⁵⁾。ただし、アドヘレンスジャンクション形成に必要なカドヘリン接着を制御するαカテニンを欠失したMDCK細胞と比較すると、ZO-1/ZO-2 dKO MDCKは部分的に細胞極性を維持しているようである⁷⁾。ZO-1/ZO-2 dKO MDCK細胞を用いたZO-1の詳細なドメイン解析により、上皮細胞極性形成におけるZO-1の役割、およびこれまで知られていなかった上皮細胞極性形成の詳細なステップが解明されることが期待される。

4. おわりに

ゲノム編集技術により培養上皮細胞におけるTJ構成分子の完全な機能欠失実験が可能となったことで、TJの新しい姿がみえてきた。これらTJ構成分子欠失細胞を用いて各分子の機能解析をさらに進めることはもちろん重要であるが、これらの細胞の表現型から、TJにおける膜タン

パク質-足場タンパク質-細胞骨格の密接なつながりが垣間みえることは大変興味深い。中でもZO-1, ZO-2が多くのタンパク質間相互作用を仲介しながら果たす多彩な役割は、最近のZO-1の液-液相分離の報告^{16,17)}とともに今後ますます注目されるだろう。TJ研究が、TJ機能のみならず上皮細胞の接着複合体形成、細胞極性形成のメカニズムの解明に寄与することが期待される。

文 献

- Anderson, J.M. & Van Itallie, C.M. (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **1**, 1-16.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M.S. (2016) Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 564-580.
- Suzuki, H., Tani, K., Tamura, A., Tsukita, S., & Fujiyoshi, Y. (2015) Model for the architecture of claudin-based paracellular ion channels through tight junctions. *J. Mol. Biol.*, **427**, 291-297.
- Tsukita, S., Tanaka, H., & Tamura, A. (2019) The claudins: from tight junctions to biological systems. *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 141-152.
- Sasaki, H., Matsui, C., Furuse, K., Mimori-Kiyosue, Y., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003) Dynamic behavior of paired claudin strands within apposing plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3971-3976.
- Shen, L., Weber, C.R., Raleigh, D.R., Yu, D., & Turner, J.R. (2011) Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu. Rev. Physiol.*, **73**, 283-309.
- Otani, T., Nguyen, T.P., Tokuda, S., Sugihara, K., Sugawara, T., Furuse, K., Miura, T., Ebnet, K., & Furuse, M. (2019) Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J. Cell Biol.*, **218**, 3372-3396.
- Van Meer, G., Simons, K., & Simons, K. (1986) The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J.*, **5**, 1455-1464.
- Suzuki, A. & Ohno, S. (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J. Cell Sci.*, **119**, 979-987.
- Trimble, W.S. & Grinstein, S. (2015) Barriers to the free diffusion of proteins and lipids in the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, **208**, 259-271.
- Belardi, B., Son, S., Vahey, M.D., Wang, J., Hou, J., & Fletcher, D.A. (2018) Claudin-4 reconstituted in unilamellar vesicles is sufficient to form tight interfaces that partition membrane proteins. *J. Cell Sci.*, **132**, 221556.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., & Tsukita, S. (2001) Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: A possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.*, **154**, 491-497.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., & Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*, **126**, 741-754.
- Fanning, A.S. & Anderson, J.M. (2009) Zonula Occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1165**, 113-120.
- 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.
- Beutel, O., Maraspini, R., Pombo-Garcia, K., Martin-Lemaitre, C., & Honigsmann, A. (2019) Phase separation of zonula occludens proteins drives formation of tight junctions. *Cell*, **179**, 923-936.
- Schwayer, C., Shamipour, S., Pranjic-Ferscha, K., Schauer, A., Balda, M., Tada, M., Matter, K., & Heisenberg, C.P. (2019) Mechanosensation of tight junctions depends on ZO-1 phase separation and flow. *Cell*, **179**, 937-952.

著者寸描

●大谷 哲久 (おおたに てつひさ)

自然科学研究機構生理学研究所細胞構造研究部門助教。博士(生命科学)。

■略歴 2000年京都大学理学部卒業。05年同大学院生命科学研究科修了。理化学研究所発生再生科学総合研究センター研究員を経て、15年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞の構造がどのようにその細胞の機能に関与するのかに関心があります。現在は、特に上皮組織の構造と機能が構築される仕組み、また上皮組織の恒常性が保たれている仕組みに興味をもって研究を進めています。

■ウェブサイト <http://www.nips.ac.jp/dcs/>

■趣味 身近な生き物の観察、音楽鑑賞と演奏。

●古瀬 幹夫 (ふるせ みきお)

自然科学研究機構生理学研究所教授。博士(学術)。

■略歴 1987年京都大学理学部卒業。同大学院修士課程、塩野義製薬、総合研究大学院大学生理学専攻博士課程、京都大学大学院医学研究科助手、同助教、神戸大学大学院医学研究科教授を経て2014年より現職。

■研究テーマと抱負 大学院修士課程で上皮細胞の極性形成に興味をもって以来、多細胞体制の基本構造である上皮の性質に魅せられて上皮細胞の研究を続けてきました。若手研究者の上皮生物学へのさらなる参加を願っています。

■ウェブサイト <http://www.nips.ac.jp/dcs/>

■趣味 音楽鑑賞。