

2023年2月16日

液-液相分離が制御する上皮細胞間バリアのメカニズムを解明

～ 液体の「つぶ」が保つ細胞形態から明かされる生体バリアの仕組み ～

【研究成果のポイント】

- ・ 私たちの体では、細胞上部に位置するアピカル骨格^{※1}と細胞間の接着部位における複数の因子が高濃度に濃縮、相互に絡み合うことで上皮バリアが形成される。しかしながらどのようにしてアピカル骨格と上皮細胞間接着因子が連携し、バリアの恒常性が維持されるか明らかになっていなかった。
- ・ 液-液相分離^{※2}を介して、アクチン重合核形成因子 Cordon bleu^{※3}が高密度に濃縮するとともに流動性を保持し、細胞骨格^{※4}の一つである微小管との相互作用をすることで、上皮細胞間バリア^{※5}が制御される新しいメカニズムを発見した。
- ・ 上皮細胞間バリアの形成原理の理解が進むことで、上皮バリア形成異常による病気疾患の仕組みの解明に繋がり、上皮細胞間バリアを操作する治療法の開発が促進されることが期待される。

【研究の概要】

帝京大学先端総合研究機構 月田和人特任研究員(現京都大学大学院医学研究科神経内科研究員、元大阪大学大学院生命機能研究科特任研究員)、同 北又学助教(元大阪大学大学院生命機能研究科特任助教)、帝京大学医学部 田村淳准教授(元大阪大学大学院生命機能研究科特任准教授)、帝京大学先端総合研究機構 月田早智子教授(元大阪大学大学院生命機能研究科特任教授)らの研究グループは、液-液相分離によって、細胞骨格同士が相互作用することで、上皮細胞間バリアが制御されているということを示しました。

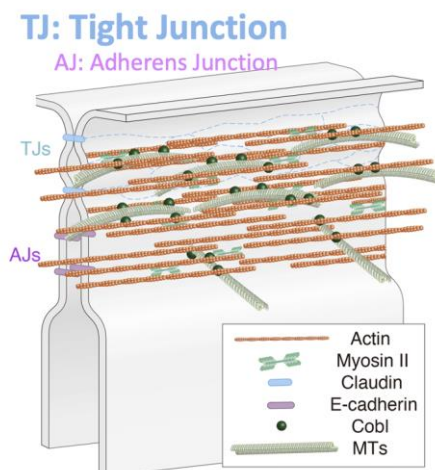


図1 TJ/AJに局在する Cordon bleu の液体つぶ状分布

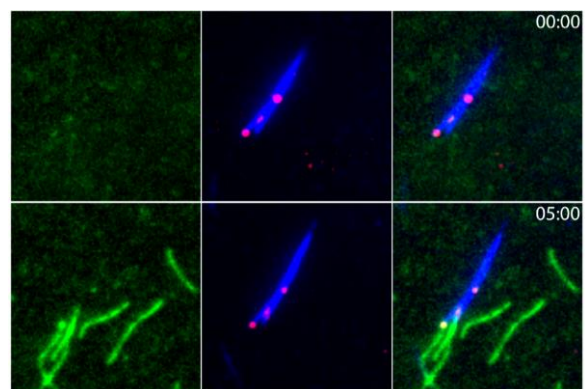


図2 Cordon bleu (赤)が、微小管(青)の上で、液滴を形成し、そこから、アクチン線維(緑)が形成・伸長している様子を、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)を用いて、リアルタイムに観察した画像

上皮細胞間バリアは、細胞の外界からの防護壁として非常に重要であり、その形態異常はさまざまな疾患の原因となっています。上皮細胞間バリア形成において、膜タンパク質であるクローディン(Claudin)^{*6}が接着部位であるタイトジャンクション(TJ)に局在し、細胞間バリア構造として機能することが知られていました(図 1)。しかしながら、近年、細胞骨格を形成するアクチンや微小管を阻害することで、バリア機能が低下するとの報告があるものの、バリア機能の獲得において細胞骨格と細胞間接着部位との関連については十分に解析が進められていませんでした。

本研究ではこれまでの上皮細胞間バリアの形成機構についての長年の研究経験・成果に基づく知見から、上皮細胞間バリアを硬いものではなく、流動性のある物体として捉え、液-液層分離による分子メカニズムの解析を試みました。液-液相分離は、均一な溶液が複数の液相に分離する現象であり、細胞内のさまざまな物質の局在や状態についても時空間的事象としての観点から捉えることで高い注目を集めていますが、液-液相分離と上皮細胞間バリアとの関連については、十分に解明されていません。

今回、月田教授らの研究グループは、主な細胞骨格の一つである微小管がアクチン重合核形成因子である Cordon bleu の液-液相分離を細胞間接着部位で促進し、アクチン繊維網を発達させることで、細胞間接着を強固にし、上皮細胞間バリアを制御していることを解明しました(図 2)。これにより、上皮細胞間バリアの形成原理がより深く理解され、上皮細胞間バリアを操作する治療法の開発が促進されることが期待されます。

【研究の背景】

上皮細胞はシート状に整列し、生体内を区画化し、生体コンパートメントを形成します。ここでは細胞上部に位置するアピカル面バリアと、細胞同士が側面で接着することで形成される細胞間バリアが密接に連携し複合体を形成することで上皮細胞間バリアが構築されます。これまで、月田研究室では、アピカル面バリアを形成する細胞骨格の一つが微小管であり、微小管がタイトジャンクションにリンクすることを明らかにしてきました。一方で、微小管に結合するタンパク質で液-液相分離を形成するものがいくつか同定されており、微小管を介した細胞間バリアの液-液相分離による制御機構の存在が予想されました。

液-液相分離は、非常に短時間で種々の因子が物理的に集まれる性質から、細胞内のさまざまな事象を時空間的に制御に関わることが知られており、非常に注目を集めています。上皮細胞間バリアは、生体の内側・外側など、複数の空間を分離するために必須であり、環境の変化に合わせて時空間的に綿密に制御されていますが、細胞間バリアの液-液相分離による制御メカニズムは全く不明でした。

【研究の内容と本研究成果の意義】

月田教授らの研究グループでは、まず、独自に単離したタイトジャンクション濃縮分画から、微小管に結合するタンパク質の探索を網羅的に行いました。その結果、アクチン重合核形成因子である Cordon bleu が同定されました。続いて、培養上皮細胞を用いて、Cordon bleu の機能の探索を行いました。超解像顕微鏡、電子顕微鏡を用いて細胞間接着の微細構造に注目することで、細胞接着部位での Cordon bleu、微小管、アクチンとの共局在を明らかにしました。

さらに高純度に精製した Cordon bleu を用いて、in vitro(生体試料内での反応ではなく試験管での再現)で包括的な機能解析を行いました。Cordon bleu と微小管を反応させたところ、Cordon bleu は微小管依存的に液-液相分離を起こしました。これは直接的に微小管が Cordon blue に結合して液-液相分離を誘導することを示しています。そして全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)を用いて、アクチン動態を観察したところ、微小管依存的に液-液相分離が生じるとアクチン重合核形成の効率が飛躍的に上昇し、アクチン繊維網を発達させることを見出しました。このアクチン繊維網により、上皮シートのバリア機能が維持されます(図 2)。

また、Cordon bleu の微小管依存的な液-液相分離が起こりにくくなるような変異をもつマウスの胃において、細胞間バリアの破綻によって胃炎を起こすことも確認し、Cordon bleu の微小管依存的な液-液相分離が、生体内においても、細胞間バリアの機能に重要であることも示しました。

以上の in vitro・培養細胞・マウスを用いた包括的な解析により、微小管がアクチン重合核形成因子である Cordon bleu の液-液相分離を細胞間接着部位で促進し、アクチン繊維網を発達させることで、細胞間接着を強固にし、上皮細胞間バリアを制御していることを解明しました。

本研究成果により、上皮細胞間バリアの形成原理がより深く理解され、上皮細胞間バリアを操作する治療法の開発が促進されることが期待されます。

【発表雑誌】

本研究成果は、2023 年 2 月 16 日(木)AM4 時(日本時間)に米国科学誌「Science Advances」(オンライン)に掲載されました。

タイトル:“Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function”

著者名:Kazuto Tsukita, Manabu Kitamata, Hiroka Kashihara, Tomoki Yano, Ikuko Fujiwara, Timothy F. Day, Tatsuya Katsuno, Jaewon Kim, Fumiko Takenaga, Hiroo Tanaka, Sungsu Park, Makoto Miyata, Hitomi Watanabe, Gen Kondoh, Ryosuke Takahashi, Atsushi Tamura, and Sachiko Tsukita

DOI:<http://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adf6358>

なお、本研究は、科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業 CREST「生命動態の理解と制御のための基盤技術の創出」における「細胞間接着・骨格の秩序形成メカニズムの解明と上皮バリア操作技術の開発」(JPMJCR13W4)(研究代表者:月田早智子教授)、日本学術振興会(JSPS)特別推進研究「JP19H05468」(研究代表者:月田早智子教授)、日本学術振興会(JSPS)基盤研究 B「JP16H05121」(研究代表者:田村淳准教授)の一環として行われ、大阪大学大学院生命機能研究科の協力を得て行われました。

【用語説明】

※1 アピカル骨格

アピカル細胞膜(生体の外側に面する側の細胞膜)直下面に広がる、上皮細胞シートに特有な厚400nmほどの薄い細胞骨格構造。月田研究室などにより、細胞骨格は、タイトジャンクションにリンクすると提唱されている。

※2 液-液相分離

水と油が混じり合わないで2つの層に分離するように、分子同士が混じり合わないで2層に分離する現象。タンパク質に関しても液-液相分離状態では、水溶液中でタンパク質同士が弱い相互作用で集合し、水溶液とタンパク質の凝集の2層に分離する。ここでの凝集は可逆的であるため、液相状態である。

※3 アクチン重合核形成因子 Cordon bleu

アクチン繊維は、アクチン重合核形成に基づいてアクチン単量体が繊維の先端に次々に結合して伸長してことで形成される。アクチン重合核形成因子はその重合核形成を担うタンパク質である。Cordon bleu はアクチン重合を促進するタンパク質として、脊椎動物の中樞神経系の形態形成系で極めて重要な役割を担うとして、2007年に同定された因子。

※4 細胞骨格

細胞骨格とは細胞形態を支える構造体のこと。主な細胞骨格ではアクチン繊維、微小管、中間径フィラメントが存在する。細胞骨格により、細胞小器官の配置、小胞輸送、細胞の極性化、力学的な張力の発生が担われる。

※5 上皮細胞間バリア

個々の細胞が密着し、隙間なく結合することで、タイトジャンクション(TJ)が構築され、上皮シートが形成される。またアピカル面における細胞骨格が TJ を起点として微小構造を形成することで、TJ との時空間的相互作用が及び、上皮細胞間バリアが形成される。

※6 クローディン(Claudin)

上皮細胞間結合様式の一つのタイトジャンクション(密着結合)における上皮細胞間バリアの構築と機能に欠かせない働きをしており、一般に哺乳類では 27 種類のサブタイプよりなる。生体のホメオスタシスの維持に必須の約 23kDa の分子量の小さな膜タンパク質。

【問い合わせ先】

<研究に関すること>

帝京大学先端総合研究機構 教授

月田 早智子

E-mail : atsukita@med.teikyo-u.ac.jp

<報道に関すること>

帝京大学 本部広報課 (板橋キャンパス広報担当者)

TEL:03-3964-4162

E-mail : kouhou@teikyo-u.ac.jp

※本リリースは、文部科学省記者会・科学記者会等に配信しています。