

氏 名	その だ のり ゆき 園 田 紀 之
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2439 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科分子医学系専攻
学位論文題目	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands: Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier. (ウェルシュ菌腸管毒素を用いたタイトジャンクションを構成する膜蛋白質クローデインのバリアー機能に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 成 宮 周 教授 西 川 伸 一 教授 月 田 承 一 郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

多細胞生物は上皮細胞に囲まれることにより自己の外と内を区別している。そして体内においても上皮細胞や内皮細胞のシートによっていくつもの部屋に分けられている。この部屋の中の溶液環境を動的に保つことが多細胞生物の恒常性維持に必須である。そこでこの細胞間を通った物質の移動(漏れ)を防ぐために特殊な接着機構が必要になる。これを担っているものがタイトジャンクション(TJ)と呼ばれる細胞間接着装置であり、ここでは隣り合う細胞の細胞膜の距離がゼロにまで近づいていて、細胞間を通った物質の移動を防いでいる(バリアー機能)。1998年にクローデイン-1,-2という4回膜貫通型のTJに局在する内在性膜蛋白質が申請者の所属する研究室において同定された。TJを持たない線維芽細胞に各々のクローデインを単独で発現させるとTJストランドと呼ばれる電子顕微鏡で観察される特有の紐状の構造を形成することから、クローデイン分子が構造的にはTJの主要な膜蛋白質であることが明らかになったが、実際に前述のバリアー機能を担った分子かどうかに関しては不明であった。そこで申請者はクローデインのバリアー機能に関してウェルシュ菌腸管毒素(*clostridium perfringens* enterotoxin; CPE)に着目し研究を行った。

CPEは人の腸管感染症の原因となり、そのレセプターがすでに生理学的機能不明の蛋白質として同定されており、それがclaudin-3,-4と同一のものであった。CPEは分子量約35kDaのポリペプチドで細胞に作用する際そのC末端側半分(C-CPE)がレセプターとの結合に必要で、N末端側半分で毒性を発揮し(細胞膜に穴をあける)、最終的に細胞を死にいたらしめる。クローデイン-1,-2,-3,-4とCPEとの結合能を検討したところ、クローデイン-1及び-2はCPEと結合せず、クローデイン-3及び-4が特異的にCPEと結合した。また、細胞毒性をもたないが、クローデイン-3及び-4と結合するC末端側半分のC-CPEがクローデイン-3及び-4の阻害活性を有することを見いだした。次に強固なバリアー機能を持つことが知られていた上皮細胞株であるMDCK細胞を用いて実験を行った。MDCK細胞にはクローデイン-1およびクローデイン-4の発現が認められた。そこでC-CPE存在下でMDCK細胞を培養したところCPE非結合性のクローデイン-1はその局在、蛋白量ともに影響を受けなかったが、CPE結合性のクローデイン-4は培養をはじめて約1時間後からその局在の変化、蛋白量の減少を認め、少なくとも24時間はこれが持続し、C-CPEを培養液中から取り除くと、再びクローデイン-4がTJに濃縮した。またこれと平行して電気抵抗として測定されるバリアー機能は極端に低下し、細胞間のみを通る物質の透過性は増加した。同様の時間経過で電子顕微鏡にてTJストランドを観察したところ、C-CPE存在下でTJストランドは急速に溶けたように壊れ始め、最終的にはストランドの数は半分以下に減った。C-CPEとクローデイン-4との結合能、及び結合の特異性を考慮すると、以上の結果はクローデインがTJの構造的側面のみならず上皮細胞間のバリアーという機能を直接担った分子であることを初めて示したものである。また医学的にもこの様なペプチドを用いて、クローデインの機能を阻害することで人為的にTJのバリアー機能を制御しドラッグデリバリーなどへ応用できる可能性を示唆したものである。

## 論文審査の結果の要旨

多細胞生物は自己の外と内、或いは自己の内においても各器官や組織でその機能を最大限発揮するために独自の環境を維持している。このためには細胞間の特殊な接着機構であるタイトジャンクション（TJ）が重要であり、ここでは細胞間を通る物質の移動を防いでいる（バリアー機能）。申請者は、TJに局在する膜蛋白質として同定されていたクローデイン分子について、ウェルシュ菌腸管毒素（*clostridium perfringens* enterotoxin; CPE）に着目しTJのバリアー機能に関する研究を行った。

CPEは分子量約35kDaのポリペプチドでC末端側半分（C-CPE）がそのレセプターであるクローデイン-3,-4との結合に必要であることが報告されていた。申請者はC-CPEがクローデイン-3及び-4の阻害活性を有することを見いだした。次にクローデイン-1および-4が発現している上皮細胞株であるMDCKI細胞を用いて、C-CPEによってクローデイン-4のみが選択的にTJから除去され、TJの形態学的変化を認めることを示した。またこれと平行して電気抵抗として測定されるバリアー機能は極端に低下し、細胞間を通る物質の透過性は増加した。以上の研究結果はクローデインがTJのバリアーという機能を直接担った分子であることを初めて示したものである。またC-CPEの様なペプチドを用いて、人為的にTJの透過性を制御し、新しいドラッグデリバリーシステム開発などへ応用できる可能性や、バリアー機能の異常が関わる様々な疾患の病態や治療法の解明など医学的にも寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年11月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。