

氏名	ふじ 藤 田 晃 司
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2320 号
学位授与の日付	平 成 13 年 3 月 23 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 脳 統 御 医 学 系 専 攻
学位論文題目	“Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein.” (腸毒素 CPE とタイトジャンクションに局在する膜蛋白クローデインとの結合についての研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 出 千 東 教 授 成 宮 周 教 授 橋 本 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

タイトジャンクション (tight junction: TJ) は、細胞間接着装置のひとつで、脊椎動物の上皮や血管内皮細胞に存在し、物質が細胞間を通して移動するのを防ぐバリアーとして機能している。さらに、細胞膜を基底膜側と外腔側 (basolateral and apical side) に分けるフェンスの役割も持ち細胞極性に関与するとも言われる。

1998年に発見された、claudin-1,2 は TJ を構成する膜蛋白であるが、機能的にも TJ のバリア機能を担うことがわかってきている。

現在では18種の claudin が同定され、それらは4つの膜貫通部位と2つの細胞外部位を持つことが特徴である。この中でも、claudin-4 はこれまで食中毒の原因となりうる腸毒素; clostridium perfringens enterotoxin (CPE) の receptor として知られていた。CPE はその C 末端 (C-CPE) で細胞表面に発現しているレセプターに結合し N 末端で細胞膜に孔をあけることで細胞の透過性を上げ、細胞体の膨腫と細胞死を起こす。加えて、RVP1 (rat ventral prostate-1) として知られていた claudin-3 も CPE のレセプターとなりうることが報告されている。

最近の報告では、claudin-1 と 4 を発現させた MDCK 細胞と C-CPE を反応させると claudin-4 の発現の減少とバリア機能の阻害がみられる。このことは、C-CPE により TJ バリア機能の調節の可能性を示唆した。

この方向性で研究を進めるために、まず claudin 側の結合部位を探し、任意の claudin を選択的に調節する可能性を追求した。

今回の実験では、CPE が結合しない caludin-1 と結合する claudin-3 の組み合わせによるキメラ蛋白を作製し (CL-1/3, CL-3/1), それを L 細胞に発現させ、毒素に対する反応を検討した。まず、キメラ分子の発現を免疫蛍光抗体法とウエスタンブロットにて確認した。その後、培地に CPE を加えると CL-3 と CL-1/3 を発現する細胞のみに特徴的な形態変化と細胞死が見られた。これより、caludin-3 の第 2 細胞外部位 (EC loop 2) が結合部位として期待された。

次に、部位を絞り込むためと、結合活性を測定するため、EC loop-2 の GST fusion protein を作製し、in vitro 結合アッセイ (overlay assay) を行い EC loop-2 の 18 アミノ酸という短いドメインと C-CPE とのニトロセルロース膜上での結合が確かめられた。

実際に人体の組織では、それぞれの臓器に異なった複数の claudin が発現しており、複数の claudin がさまざまな組み合わせで TJ に発現し、物質の透過性を調節していると考えられる。今回の研究により、claudin による TJ の制御機構の解明の手がかりが得られた。

さらには、毒素部分を持たない C-CPE を利用して、細胞レベルでの TJ の調節だけでなく固体レベルでの、たとえば血液脳関門での薬物移行の新しい方法をもたらす可能性がある。

論文審査の結果の要旨

タイトジャンクション (TJ) は、細胞間接着装置のひとつで、脊椎動物の上皮や血管内皮細胞に存在し、物質の細胞間移動に対するバリアーとして機能している。

1998年に発見された、クローディン-1,2 は TJ に構造的にも機能的にも必須の膜蛋白である。現在では18種のクローディンが同定され、それらは4つの膜貫通部位と2つの細胞外部位を持つ。

これまでに、ある種のクローディンを発現させた細胞とクロストリディウム腸毒素 (CPE) を反応させるとクローディンの発現の減少とバリア機能の阻害がみられることがわかっている。

今回、CPE が結合しないクローディン-1 と結合するクローディン-3 の組み合わせによるキメラ蛋白を作製し、それを線維芽細胞系の L 細胞に発現させ、毒素に対する反応を検討した結果、クローディン-3 の第2細胞外部位が結合部位として予想された。

さらに、第2細胞外部位の融合蛋白質を作製し、CPE との生体外結合アッセイを行い、結合部位と結合活性を明らかにした。

以上の研究は、複数のクローディンが発現している TJ の制御の解明に貢献し、細胞レベルだけでなく固体レベルでの、たとえば血液脳関門での薬物移行の研究に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思われる。なお、本学位授与申請者は、平成13年1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。