

氏 名	うめ だ かず あき 梅 田 一 彰
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2814 号
学位授与の日付	平 成 17 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1 (ZO-1 遺伝子欠損培養上皮細胞の作製およびその解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 成 宮 周 教 授 光 山 正 雄 教 授 鍋 島 陽 一

論 文 内 容 の 要 旨

タイトジャンクション (TJ) は上皮組織が有する細胞間接着装置の一つである。この TJ に局在するタンパク質群のなかで、ZO-1 は TJ の裏打ちタンパク質として存在し、4 回膜貫通タンパク質である occludin や claudin、そして細胞骨格であるアクチンと結合している。その他にも、様々なタンパク質が ZO-1 に結合することが報告されている。そこで、TJ における ZO-1 の役割を詳細に解析するため、マウス上皮細胞株である Eph4 細胞の ZO-1 遺伝子を gene-targeting 法により欠損させ、その表現型を解析した。

まず、電子顕微鏡による形態観察をおこなったところ、ZO-1 KO 細胞 (KO) において、野生型 (WT) と遜色のない TJ が形成されていた。しかし、蛍光免疫染色による観察では、TJ に局在するタンパク質 ZO-2 と cingulin において顕著な差が見られた。KO では WT と比較して、ZO-2 は TJ へより高濃縮しており、逆に cingulin は TJ へ濃縮していなかった。ZO-2 のタンパク発現量をウェスタンブロットで確認すると、WT と KO で差は見られず、また ZO-2 の蛍光免疫染色において、WT は KO と比較して、より細胞質側が濃く染色された。これらのことから、KO で観察される ZO-2 の TJ への高濃縮は、ZO-2 の局在する場所が細胞質側から TJ 側へシフトしたものと推測された。cingulin は ZO-1、-2、-3 に結合するという報告があるが、KO で cingulin が TJ へ濃縮されていなかったことを考えると、少なくとも細胞レベルで、cingulin が TJ へリクルートされるためには、ZO-1 は必須であると推測された。アドヘレンスジャンクション (AJ) に局在するタンパク、E-cadherin、 α -、 β -catenin 等においては、すべて KO と WT は同じ染色像であった。

ZO-1 の上皮極性形成における役割を調べるべく、Ca switch 法を行い、蛍光免疫染色により経時観察した。KO では WT と比べ、claudin や occludin の TJ への濃縮が明らかに遅くなっていた。ZO-1 は TJ の形成過程で重要な働きをしていることが示唆された。この現象が TJ の機能にどのような影響を及ぼしているかを、Ca switch を行った時の FITC-dextran の透過性を指標に調べた。KO では、WT と比べて透過性が上昇していた。TJ 形成の遅れが、直接 TJ 機能の一つであるバリアー機能にも影響していることが推測され、免疫染色の結果と相関が認められた。

ZO-1 はジャンクション形成初期には、E-cadherin と colocalize することが知られている。そこで、Ca switch 時の E-cadherin を免疫染色して観察したが、KO と WT で変化は見られなかった。また、KO 細胞で E-cadherin の接着活性に変化があるかどうかを調べるため、aggregation assay を行ったかが、wild との差は観察されなかった。

つぎに、ZO-2 の ZO-1 に対する redundancy を確認するため、ZO-1 KO 細胞に HA tag 付き ZO-2 を過剰発現させた。しかし、TJ 形成および cingulin の染色のいずれにおいても、KO 細胞と同様の表現型を示した。ZO-2 は ZO-1 の機能を相補できないことが示唆された。

以上より、ZO-1 は TJ 形成の促進に重要な働きをしており、この機能は ZO-2 に相補されることが明らかとなった。

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一つで、上皮細胞のもっともアピカル側に存在している。上皮細胞シートによって仕切られた2つの区画は、TJによって厳密にシールされている。TJに局在するタンパク質群のなかで、ZO-1はTJの膜裏打ちタンパク質として存在し、4回膜貫通タンパク質であるクローデイン、そして細胞骨格タンパク質であるアクチンと結合している。本研究では、TJにおけるZO-1の役割を解析するため、マウス上皮細胞株であるEph4細胞を用いた遺伝子破壊法を開発し、ZO-1遺伝子欠損細胞を得て、その表現型を解析した。

電子顕微鏡による形態観察をおこなったところ、ZO-1 KO細胞 (KO) において、野生型 (WT) と遜色のないTJが形成されていた。しかし、蛍光免疫染色による観察では、TJに局在するZO-1結合タンパク質のZO-2とチングリンにおいて変化が見られた。WTと比較してKOでは、ZO-2はTJへ高濃縮し、一方、チングリンはTJへ局在することができなくなっていた。興味深いことに、KO細胞ではTJ形成時にクローデインやZO-2のTJへの濃縮が遅くなっていた。また、この遅れと対応して、細胞間の透過性が亢進していた。以上より、ZO-1はTJ構成タンパク質と協調して、TJの形成促進を図り、上皮細胞シートの区画化に重要な働きをしていることが示唆された。

以上の研究は、TJの分子レベルでの機能解析に新しい道を拓くものであり、基礎医学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認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年1月21日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。