

氏 名	はま 濱 ざき 崎 よう 洋 こ 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2574 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	Multi-PDZ Domain Protein 1 (MUPP1) Is Concentrated at Tight Junctions through Its Possible Interaction with Claudin-1 and Junctional Adhesion Molecule (タイトジャンクションに局在する新規クローディン結合分子 MUPP1 の同定と解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 鍋 島 陽 一 教 授 本 庶 佑 教 授 月 田 承 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

タイトジャンクション (TJ) は上皮細胞間接着複合体の最頂端に存在する細胞接着装置で、細胞膜間の距離をほぼゼロに近づけることにより上皮細胞間をシールする役割を果たしている。この働きによりイオンや分子などの細胞間における通過が制御され体内外の区画化が確立されることから、TJ は多細胞生物の恒常性の維持に必須であると考えられる。TJ はフリーズフラクチャー法により特徴的な紐状構造 (TJ ストランド) として観察されるが、本研究室ではこの構造が主に4回膜蛋白質であるクローディンからなることを明らかにした。これにより長い間困難であった TJ の機能と構造に関する分子レベルでの解析が急速に進展しつつある。

一方、近年 TJ ストランドの細胞内側に様々な分子群が集積していることが明らかとなっており、TJ が細胞間接着を介する様々なシグナル伝達系に関与することが示唆されてきている。興味深いことに、多数の分子からなるファミリーを形成するクローディンは、そのほとんどが細胞内ドメインの C 末端部位に蛋白質間相互作用に関わる PDZ ドメインに対する結合配列を有する。このため、TJ ストランドの細胞内側は PDZ 結合配列が高度に濃縮し、様々な PDZ ドメインを含む分子 (PDZ 蛋白質) が集積した特殊な膜ドメインであると予想される。本研究ではこのような観点から、シグナル伝達の場合としての TJ の役割を明らかにするために、クローディン-1 の細胞内領域を bait にした Yeast Two-hybrid screening にて新規クローディン結合蛋白質の同定を試みた。その結果、既にクローディンとの結合が報告されていた TJ に局在する PDZ 蛋白質 ZO-1 と共に、PDZ ドメインを13個も有する Multiple-PDZ domain Protein-1 (MUPP1) を単離した。

まず MUPP1 の哺乳類上皮細胞における局在を検討するために、MUPP1 分子の全長 cDNA をマウス乳腺上皮細胞株 EpH4 に導入したところ、細胞間接着部位への局在を認めた。また抗 MUPP1 特異抗体を用いた蛍光抗体染色においても上皮細胞の TJ 領域にクローディンや ZO-1 と共局在したことから、この結合は細胞内における生理的なものであると考えられた。さらに免疫電顕法により MUPP1 の局在を詳細に調べたところ、ZO-1 と異なり TJ の中でも特に最頂端部に局在する傾向を認めた。また細胞間接着の形成過程における動態も MUPP1 は ZO-1 と異なっていたことなどから、これら2つのクローディン結合 PDZ 蛋白質の役割には相違点があると予想される。MUPP1 は PDZ ドメインを多数有することより、多種類の分子と相互作用し複合体を形成することが重要な機能の一つであると考え、さらに Yeast Two-hybrid screening 及び in vitro 結合実験により結合分子の解析を行った結果、クローディンと同じく PDZ ドメイン結合配列を持つ TJ 局在膜蛋白質の一つである JAM に対しても、異なる PDZ ドメインを介して結合能を有することが明らかとなった。したがって、MUPP1 は13個の PDZ ドメインを単にクローディンを集積させるために使うのではなく、個々に別々の蛋白質と結合することに利用し、TJ の膜裏打ち領域における様々な分子の集積に寄与していると考えられる。今後、さらなる結合蛋白質を探索することにより、MUPP1 の TJ における生理的意義の一端が明らかになるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞間接着複合体の最頂端に位置する細胞接着装置タイトジャンクション (TJ) は、多細胞生物の恒常性の維持に必須な細胞間を通じた物質の透過制御に中心的な役割を果たす。この機能の構造的基盤である TJ ストランドが主に膜タンパク質クローディンによって構成されることが近年明らかとなり、TJ の機能を制御するメカニズムや TJ が最頂端に位置する機構といった重要な課題に対して分子レベルで解析を行う道が開かれた。

本研究では TJ ストランドの細胞内領域に注目し、この膜ドメインに存在するであろうシグナル伝達系が TJ の機能制御に重要であるという仮定の下に、ストランドの主要構成因子であるクローディンに結合する新規裏打ちタンパク質の解析を試みた。その結果、タンパク質間相互作用に関わる PDZ ドメインを13個も有する MUPP1 を同定した。分子構造上の特徴から MUPP1 は TJ において様々な分子の集積に寄与しているものと考え、他の TJ 構成分子との相互作用を検討したところ、膜タンパク質 JAM に対しても強い結合能を持つことが明らかとなった。また特異抗体を用いた詳細な解析から、MUPP1 は TJ の中でもアピカル面に近い領域に特に濃縮すること、上皮細胞極性の形成過程では比較的后期に集積してくることなどを明らかにした。こうした結果から、MUPP1 の動態および結合分子の時間的・空間的变化が TJ の機能制御に関わるものと考えられる。

以上の研究は、タイトジャンクションの構造と機能の解明に貢献し、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15年2月3日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格を認められたものである。