OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Claudinの遺伝子発現パターン変化による生体機能制御の解析 |
| Author(s) | 徳増, 玲太郎 |
| Citation | 大阪大学, 2014, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/34585 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

# 論　文　内　容　の　要　旨

〔　題　　名　〕

Claudinの遺伝子発現パターン変化による生体機能制御の解析

学位申請者　　徳増　玲太郎

[背景・目的]

私たちヒトを始めとする多細胞生物は、その複雑な形態の構築・維持のため、時空間的もしくは部位特異的に多様な遺伝子発現パターンを呈している。遺伝子発現パターンは、主に発現している遺伝子の種類と、その発現量によって規定される。従来より、各遺伝子の機能を知るための手段として、ノックダウン・ノックアウトといったアプローチが多く用いられてきた。しかしながら、発現パターンという見地から考えれば、上記のような減算方式で得られる知見は、目的遺伝子を除いた発現パターンの表現型であり、必ずしも、その遺伝子の機能を追っているとは限らない。また、目的遺伝子の「有る」状態から「無い」状態への遷移を想定するために、遺伝子の機能をオン・オフ、もしくは１・０で捉えざるを得ない。そのため、遺伝子の種類についての議論は可能であっても、その遺伝子の発現量を反映することは困難である。だが、実際には、生体内における遺伝子発現量の変化を無視することはできない。

本研究においては、細胞間接着装置の一つであるTight Junction(TJ)の構成因子Claudinに焦点をあて、前述の問題に対して二つアプローチを試みるに至った。TJは、膜タンパク質であるClaudinが細胞接着面で重合し網目状のストランド(TJストランド)を形成することで、上皮細胞シートにおける細胞間バリアーの要となっている。Claudinは、現在までに27種類のサブタイプからなるファミリーで構成されることが報告されており、器官・臓器ごとにその発現パターンが異なることで、それぞれの特性に合わせた多様なバリアーの構築を可能にしていると考えられている。そのため、発現パターンが生体機能与える影響について考える際に、Claudinは非常に魅力的な題材となりうる。こうした背景から、第一に、ひとつひとつのClaudinの特性を評価するための*in vitro*再構成系の作製、そして、第二に、Claudinの発現量を段階的に変化させた複数の遺伝改変マウスを作ることで、発現量依存的に個体発生における時空間的な制御を観察する*in vivo*解析系を作り出した。これらのアプローチから、Claudinを例に、遺伝子発現パターンにおける遺伝子の種類と量に応じた変化を捉えることを目的とした。

[方法]

①種類へのアプローチ：単一なClaudinによるTJストランドの*in vitro*再構築系

TJを構築するための裏打ちタンパク質がありながら、TJを持たないマウス精巣セルトリ細胞由来のSF7細胞に、Venusタグのついた Claudinを遺伝子導入することで一種類のClaudinからなるTJストランドを再構成させ、安定発現株の樹立を試みた。この手法によって次に、Freeze-Fracture法(FF法)を用いてTJストランドの観察、および光褪色後蛍光回復法(FRAP)を用いて、各ClaudinとZO-1の分子動態を調べた。さらに、通常上皮細胞でも、ClaudinのFRAPを行うことで、複数のClaudinが発現しているときの相互作用についても検討した。

②量へのアプローチ：発現量制御による個体レベルでの*in vivo*解析系

表皮のTJ形成に強く関与しているClaudin-1(Cldn1)について、発現量を１から０の状態を含め、全部で六種類の遺伝子改変マウス(WT, mildHE(mHE), HE, KD, severeKD(sKD), KO)を用いた実験モデルを考案した。このマウスから表皮ケラチノサイトの単離を行い、初代培養を行うことでCldn1の発現量に応じたバリアー能の相関について検討を行った。次に、Cldn1のノックアウト(KO)マウスは出生当日に死亡することから、出生した時点での発現量に応じた表現型の解析を行った。また、出生後から成長するに従って、Cldn1の発現量に応じて生じる表皮の分化異常や炎症について、生じる変化を追った。

［結果・考察］

①上皮様の培養細胞であるSF7細胞にVenusタグのついた各Claudinを遺伝子導入した結果、通常の上皮細胞が持つTJと非常に類似したTJを再構成する安定発現株を得る事に成功した。得られた安定発現株のTJストランドをFreeze Fracture法を用い電子顕微鏡下で観察を行うと、Claudinの種類によってTJストランドの形態が異なることがわかった。一方で、Claudin-10(Cldn10)のようにTJストランドが観察されないものが存在することもわかった。僅か20kDa程の小分子であるClaudinが、種類によってこれほどまでTJストランド形成能に違いがあることは興味深く、TJストランドのダイナミクスも種類によって異なるのではないかと考えた。そこで、TJの主要構成分子であるClaudinの分子動態を追えば、TJストランドのダイナミクスを知ることができると考え、経時的に分子の動きを測定するFRAPを行った。結果、ストランドはClaudinの種類に応じて分子動態が異なっており、Cldn10は他のClaudinに比べて大きな分子動態を持っていた。また、解析を進めた結果、TJストランドのダイナミクスはClaudin分子それ自身によって規定されていることを明らかにした。さらに、既にTJがある典型的な上皮細胞にVenusタグをつけたClaudinを遺伝子導入し、FRAPを行うと、SF7細胞と同じ傾向を持つClaudinや異なった分子動態のClaudinがあることがわかり、Claudin同士が相互作用し合うだけでなく、独立な振る舞いをするClaudinもあることが強く示唆された。TJストランドの有無におけるZO-1のFRAPも行ったが、回復に有意差は認められなかった。したがって、ZO-1とClaudinの相互作用は、それぞれ独立な分子動態をしていることから、ルースカップリングであることが考えられた。

②Cldn1の発現量が段階的に異なる６種類の遺伝子改変マウスを作製した。この遺伝子改変マウスからケラチノサイトを初代培養し、上皮バリアー能を測定すると、Cldn1が全く発現していないKOケラチノサイトと、少しであるがCldn1の発現があるsKDケラチノサイトでは低下するバリアー能のレベルに大きな差が開いていた。新生児の皮膚における水分蒸散量を測定すると、KOでは非常に高い水分蒸散が観察されるが、バリアー能のレベルが下がっているKDやsKDの個体では、野生型との差は見受けられなかった。しかしながら、sKDは生まれて二日目には約70%が死亡することや、HE染色像などの観察像には顕著な変化が生じていた。これらの知見から、わずかなCldn1の発現があるだけでも、マウスの生存率や皮膚機能を規定していると考えられる。さらに、発現量のコントロールをすることで、これまでKOマウスの解析では観察することができなかった、出生後の加齢による皮膚の変化を追った。結果、発現量が半分以下になっているKD、およびsKDの個体では幼児期において、上皮の分化異常および、顕著な好中球とマクロファージの浸潤が観察された。さらに、大人になると幼児期に比べて各表現型の改善が観察された。また、sKDとKDを比べると、発現量の少ないsKDの表現型において、より重症度の高い病態を示していた。こうしたことから、Cldn1は、発現量に応じて、得られる表現型に大きな差があること、そして、幼児期において皮膚機能の主要な役割を担っていることがわかった。

上記の二つのアプローチから、Claudinの種類と量の遺伝子発現パターンが、生体機能制御において、多様な役割を持ち得ることを、実質的に示唆されたと考えられる。

様式７

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名 | （　徳増　玲太郎　） |
|---|---|

| | （職） | 氏　名 |
|---|---|---|
| 論文審査担当者 | | |
| 主 査 | 教授 | 月田　早智子 |
| 副 査 | 教授 | 八木　健 |
| 副 査 | 教授 | 濱田　博司 |
| 副 査 | 准教授 | 木村　宏 |

## 論文審査の結果の要旨

上皮細胞シートは、その場所や部位に応じて多様な細胞間バリアーを構築している。この細胞間バリアーは、主にタイトジャンクションの主要構成成分であるクローディンの遺伝子発現パターンによって制御されている。また、現在までに、クローディンは27種類のサブタイプが報告されていた。

本論文では、こうした背景をもとに、クローディンの種類と、その発現量に関して、それぞれ独立した研究を行っている。第一に、タイトジャンクションストランドの再構築系を用いることで、単一クローディンにおけるストランドの構築能とその分子動態の関連性を報告している。さらに、クローディンの裏打ちタンパク質であるZO-1との分子動態の解析を合わせることで、ストランドのダイナミクスはクローディン分子それ自身によって規定されていることを明らかにしている。第二に、クローディンのサブタイプの中でも皮膚に強く発現しているクローディン-1の発現量を６段階に振り分けた遺伝子改変マウスを作ることによって、クローディンの量的な変化に伴う表現型と細胞間バリアーとの相関性を示した。また、これまで、アトピー性皮膚炎における原因遺伝子の一つとしてクローディン-1は示唆されていたが、その役割は不明であった。今回の研究では、発現量を制御することによって、アトピー性皮膚炎におけるクローディン-1の寄与を詳細に調べ、その重要性を明らかにしている。このどちらの内容においても、重要な知見であり、論文審査を通過するに値すると考えられる。