

別刷

生命を科学する 明日の医療を切り拓く

# 実験医学

Experimental Medicine

Vol.41 No.13

2023

8

特集

## がん治療標的の新星 スプライシング 異常

non-coding 領域、スプライシング因子の  
変異から挑むがんの病態解明と創薬

企画／吉見昭秀

いま知りたい!!

免疫のブレーキ“制御性B細胞”研究から疾患制御へ

2023年ウルフ賞解説レビュー

GLP-1研究/特殊ペプチド創薬

羊土社

## 微小管依存的なアクチン核形成因子の液-液相分離による、時空間的な上皮バリア制御

月田和人, 北又 学, 田村 淳, 月田早智子

上皮バリアの絶え間ない調節は、常に変化し続ける生体外環境に対して、生体内環境の恒常性を保つために必須であるが、その機構については不明な点が多い。われわれは、アクチン重合核形成促進因子 cordon-bleu (Cobl) が、微小管依存的に液-液相分離を起こすことで、上皮細胞間接着部位のアクチン線維束を発達させ、時空間的に細胞接着を制御することを見出した。

体内には、腸・肺・脳という大きな区画から、毛細血管のような小区画まで、大小さまざまな区画（生体コンパートメント）がある。生体コンパートメントに共通することは、上皮細胞シートがこれを内包し、バリアとして機能する、ということである。上皮バリアは、さまざまな形態をとりながら、絶えず変化する外部刺激に適応し、内部環境をおのおの至適状態に維持している。

上皮バリアは、細胞のアピカル面細胞膜（頂端膜）と、細胞間に存在するタイトジャンクション（TJ）とアドヘレンスジャンクション（AJ）で構成される apical junctional complex（AJC）により形成される。重要なことに、AJCは、AJC直下のアクチン・ミオシン線維束〔細胞を1周取り囲むことから、circumferential ring（CR）とよばれる〕と密に結合し、CRはその発達度合いを微調整しながら、AJCに適切な緊張を与え、TJの接着分子クローニン（Cldn）の重合で構築されるTJの細胞間バリア機能を時空間的に制御する<sup>1)~3)</sup>。一方で、われわれのグループを含め、AJCはアクチン線維

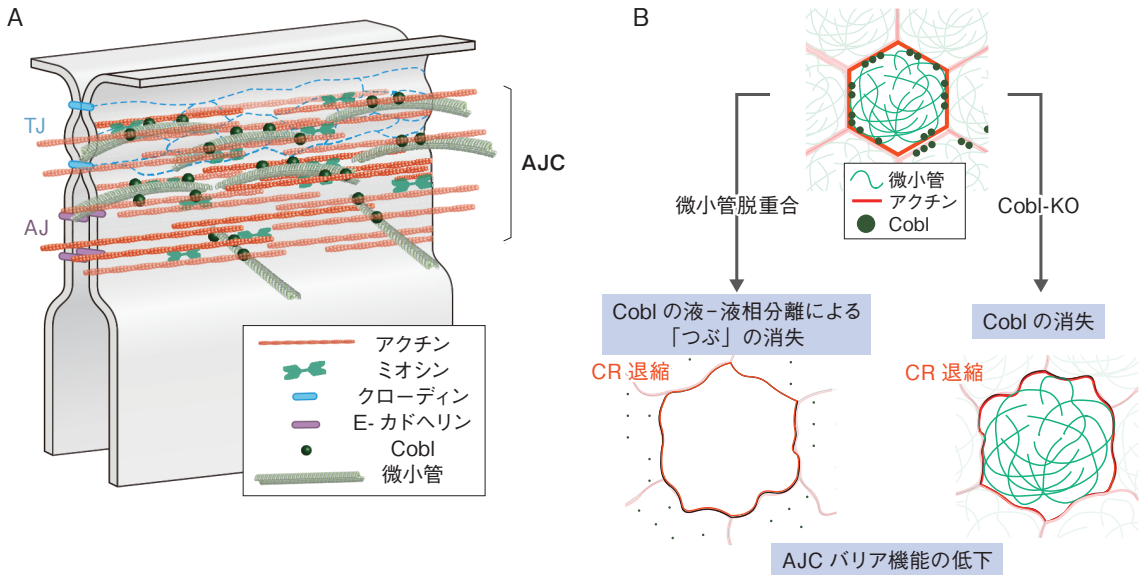
だけでなく微小管とも密接に関連することが報告されてきた<sup>4)~6)</sup>。微小管を退縮させると、TJの細胞間バリア機能も低下することから、微小管を介してのCldn重合制御によるTJ細胞間バリア機能制御の重要性も示唆されてきたが、その分子機構について多くが未解明であった。そこでわれわれは液-液相分離という現象に注目し、Coblが微小管、CR、AJCを密接につなげ、上皮バリアを時空間的に制御することを明らかにした。

### アクチン重合核形成促進因子Coblは、AJC直下に濃縮する微小管関連タンパク質である

微小管とAJC間の相互作用の分子機構を明らかにするために、われわれは独自に単離したAJC濃縮分画から、微小管に結合するタンパク質の探索を網羅的に行った。そして、AJC直下に濃縮する微小管関連タンパク質として同定されたのが、アクチン重合核形成促進因子として知られていたCoblであった。培養上皮細胞・マウス組織上皮細胞の双方において、「Coblは、AJC直下に局在し、アクチン線維・微小管と密接に関

### Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function

Kazuto Tsukita<sup>1)2)</sup>/Manabu Kitamata<sup>1)</sup>/Atsushi Tamura<sup>1)~3)</sup>/Sachiko Tsukita<sup>1)</sup> : Advanced Comprehensive Research Organization, Teikyo University<sup>1)</sup>/Department of Neurology, Graduate School of Medicine, Kyoto University<sup>2)</sup>/Department of Pharmacology, Teikyo University School of Medicine<sup>3)</sup>(帝京大学先端総合研究機構<sup>1)</sup>/京都大学大学院医学研究科臨床神経学<sup>2)</sup>/帝京大学医学部薬理学講座<sup>3)</sup>)



**図1 Coblは、AJC直下で、微小管依存的に「つぶ」として存在し、AJCバリア機能を調節する**  
 A) Coblの局在を示す模式図。AJC直下には、アクチンとミオシンで構成されるアクチン・ミオシン線維束 (CR : circumferential ring) が存在する。Coblは「つぶ」を形成し、CRに局在する。B) 上皮細胞におけるCoblの機能低下が引き起こす表現型をあらわす模式図。Coblは微小管依存的に「つぶ」を形成する。微小管の脱重合により、この「つぶ」の形成が阻害されると、Coblノックアウト (KO) と同様の表現型 (CRの退縮とAJCバリア機能の低下) を示す。(主論文より引用)

連する」ことが見出された (図1A)。

### Coblは液-液相分離を起こし、それは、微小管依存的に促進される

上皮細胞の蛍光抗体染色像の観察から、Coblは、「つぶ」を形成していた。Coblのアミノ酸配列は天然変性領域 (intrinsically disordered regions) を豊富に含むことが予測され、一部の天然変性領域が液-液相分離を誘導することが知られていることから、Coblが液-液相分離を起こしている可能性が考えられた。

まず、培養上皮細胞において、ライブイメージングを用いてCoblの「つぶ」が融合することを確認し、さらに、FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) を用いてCoblの「つぶ」の内部と外部にダイナミックな拡散があることを確認した。さらに、*in vitro*においても同様にCoblが「つぶ」を形成すること、またこの「つぶ」は融合し、「つぶ」の内部と外部にダイナミックな拡散があることを確認した。よって、上皮細胞に認められるCoblの「つぶ」は、Coblの液-液相分離によって生じることが見出された。

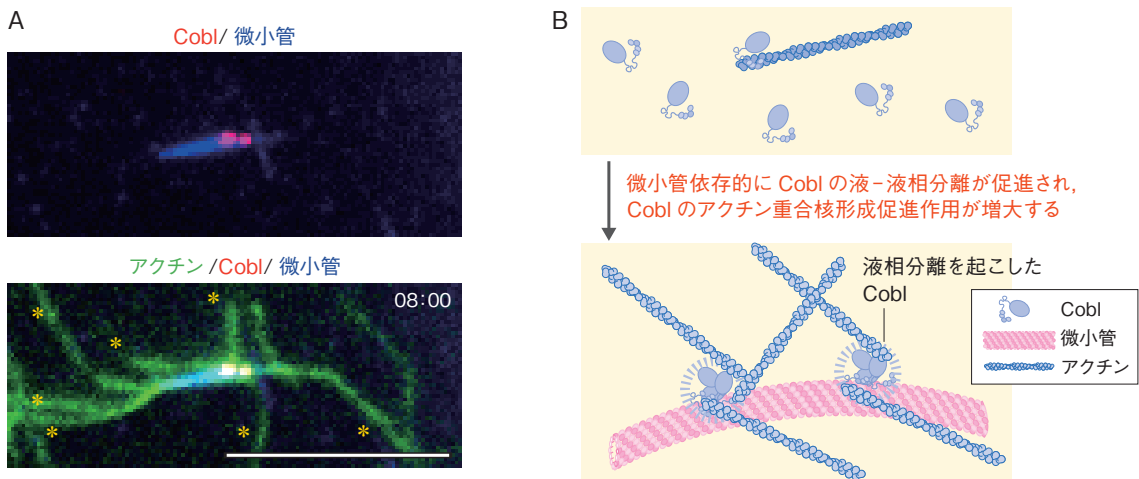
次に、Coblと微小管の関連性を確認するため、上皮

細胞において微小管をノコダゾール処理で退縮させたところ、驚くべきことに、Coblの「つぶ」が消失することを見出した。さらに *in vitro* においてもCoblの液-液相分離を起こす閾値濃度は、微小管の存在下で減少することが確認され、「微小管はCoblの液-液相分離を促進する」ことが見出された。

### 微小管はCoblの液-液相分離を促進し、AJC直下のアクチン線維束を発達させることで、AJCバリア機能を調節する

上皮細胞AJCにおけるCobl液-液相分離の役割を検証するために、まず、培養上皮細胞において、Coblノックアウト (KO) 上皮細胞を解析した。すると、Cobl-KO上皮細胞では、CR中のアクチン線維束が顕著に菲薄化 (減少) することで、CRが退縮し、AJCバリア機能も低下することが見出された。さらに、ノコダゾール処理において、通常の上皮細胞ではCoblの「つぶ」が退縮すると同時にCRが退縮しはじめること、また、Cobl-KO上皮細胞ではさらなるCRの退縮が認められないことを確認した (図1B)。

次に、Cobl遺伝子改変マウスとして、Coblのエクソ



**図2 Coblは液-液相分離を起こすと、アクチン重合核形成促進作用が顕著に増大する**

A) 微小管(青)上の液-液相分離を起こしたCobl(赤)から、アクチン線維(緑)が伸長する様子を捉えた全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)ライブイメージング像。この像では、2つのCoblの「つぶ」から計7本のアクチン線維が伸長している。B) Cobl液-液相分離と微小管、アクチン線維との関連を示した模式図。(主論文より引用)

ン1とイントロン1の境界部分に84塩基欠失を示すマウス(Cobl<sup>Δ84/Δ84</sup>マウス)を作製した。この部分は、Coblの微小管結合ドメインに含まれており、*in vitro*でCobl<sup>Δ84</sup>の機能を検証すると、驚くべきことに、Cobl<sup>Δ84</sup>の液-液相分離は微小管では促進されないことが判明した。そして、Cobl-KO培養上皮細胞にCobl<sup>Δ84</sup>を導入しても、Coblは「つぶ」を形成せず、CRは退縮したままであり、TJ細胞間バリアが回復しないことを確認した。さらに、Cobl<sup>Δ84/Δ84</sup>マウスの胃の検討を経時的に行うと、成長に伴って胃の上皮バリア機能が低下し、胃炎が引き起こされることが判明した。これにより、培養上皮細胞のみならず、生体内においても、「微小管はCoblの液-液相分離を促進し、CRを発達させることで、TJ細胞間バリア機能を調節する」ということが見出された。

**Coblが、微小管上で「つぶ」を形成すると、そのアクチン重合核形成促進作用が著明に増大する**

最後に、多角的にCoblの液-液相分離が、Coblのアクチン重合核形成促進作用に与える影響を検証した。特に、CoblとG-アクチン、 $\alpha$ -チューブリンを精製し、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF: total internal reflection fluorescence microscope)による種々の検討を

行った。その結果、Coblのアクチン重合核形成促進作用は、微小管を加えると著明に増大することが見出された。また、CoblとG-アクチン、 $\alpha$ -チューブリンを混合させ、TIRFによる3色イメージングを行なったところ、Coblは主に微小管上で液-液相分離を起こして「つぶ」を形成し、その「つぶ」からアクチン線維が伸長していく様子が明確に観察された(図2A)。微小管はCoblの液-液相分離を促進することで、Coblのアクチン重合核形成促進作用を増大させると考えられる。

**おわりに**

本研究は、AJCバリア機能にきわめて重要なCRの調整に、微小管により駆動される液-液相分離がかかわっていることを示したはじめての研究である(図2B)。液-液相分離は、非常に短時間に種々のタンパク質を集合させることができ、TJ細胞間バリア機能のような絶え間ない微調整が必要な生体機能の調節機構として、非常に理にかなっている<sup>7)8)</sup>。今後もTJ細胞間バリア機能への液-液相分離のかかわりがさらに解明されていくことを期待しており、ひいては、液-液相分離に対して人為的に介入することで、「上皮バリア操作」がいつの日か可能になることを夢見ている。

## 文献

- 1) Takeichi M : Nat Rev Mol Cell Biol, 15 : 397-410, doi:10.1038/nrm3802 (2014)
- 2) Rodgers LS & Fanning AS : Cytoskeleton (Hoboken), 68 : 653-660, doi:10.1002/cm.20547 (2011)
- 3) Umeda K, et al : Cell, 126 : 741-754, doi:10.1016/j.cell.2006.06.043 (2006)
- 4) Meng W, et al : Cell, 135 : 948-959, doi:10.1016/j.cell.2008.09.040 (2008)
- 5) Kunimoto K, et al : Cell, 148 : 189-200, doi:10.1016/j.cell.2011.10.052 (2012)
- 6) Yano T, et al : EMBO J, 40 : e104712, doi:10.15252/embj.2020104712 (2021)
- 7) Beutel O, et al : Cell, 179 : 923-936.e11, doi:10.1016/j.cell.2019.10.011 (2019)
- 8) Citi S : Curr Biol, 30 : R83-R86, doi:10.1016/j.cub.2019.11.060 (2020)

本記事のDOI : 10.18958/7309-00003-0000546-00

## ● 著者プロフィール ●

**月田和人** : 2013年、京都大学医学部卒業。5年間の臨床業務を経て、'18年より京都大学大学院医学研究科博士課程（臨床神経学、高橋良輔教授）に進学し、'22年、同修了。博士課程では、京都大学にてビッグデータを用いたデータサイエンスを軸にしたドライ研究を行いながら、大阪大学および帝京大学の月田早智子研究室に出向き、上皮細胞を用いたウェット研究を行う。'23年より、京都大学大学院医学研究科臨床神経学特定助教。帝京大学先端総合研究機構特任研究員。今後はドライ研究とウェット研究を融合させたユニークな研究をめざしている。



## 筆頭著者のつぶやき

僕は、父親と母親とも上皮細胞基礎研究者であるという特殊な環境で生まれ育ちました。僕は脳神経内科医なのですが、まだ僕が小さい頃に父親と母親が常に家でも研究の議論をしていたことが忘れられず、「両親の研究を少しでも理解したい」という思いで、全く分野違いの母の研究室の門を叩きました。すると、右も左もわからないまま、まずテーマとして提示されたのが、この「AJCに濃縮する微小管関連タンパク質の機能解析」でした。TIRFの系を立ち上げる部分など、人生で初めての経験ばかりで、論文作成に至るほとんどの行程でつまずき、時間がかかりましたが、本当に周りの方々の助けのおかげでなんとか論文掲載にこぎつけることができました。先に天国に行ってしまった僕の父親はこの論文を読んでなんて言うかな？と思いを馳せています。 (月田和人)

本 pdf は、著者である月田早智子先生ご自身によるサーバーへのアップロード、配布の目的にのみご利用いただけます。

以下の行為はご遠慮ください

- ・ 本 pdf の販売など、直接的な利益を得る目的での利用
- ・ 本 pdf の一部を抜粋、あるいは改変しての利用
- ・ 本 pdf の第三者による配布

書籍名：実験医学 Vol.41 No.13

使用頁：2151～2154 頁

著者名：月田和人，北又 学，田村 淳，月田早智子

発行社：（株）羊土社

発行年：2023 年

© YODOSHA CO., LTD. 2023