



ZO-1 Knockout by TALEN-Mediated Gene Targeting in MDCK Cells: Involvement of ZO-1 in the Regulation of Cytoskeleton and Cell Shape

Tokuda, Shinsaku

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6240号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006240>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

ZO-1 Knockout by TALEN-Mediated Gene Targeting in MDCK Cells:

Involvement of ZO-1 in the Regulation of Cytoskeleton and Cell Shape

TALEN を用いた ZO-1 遺伝子のノックアウトによる MDCK 細胞の解析

——ZO-1 の細胞骨格・細胞形状調節における役割の解明——

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

細胞生物学

(指導教員：古瀬幹夫客員教授)

徳田 深作

我々の体は上皮によって表面を覆われており、上皮は外界環境に対するバリアとして機能している。上皮細胞と上皮細胞の間にはタイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置が存在し、細胞間隙を通過する物質の移動を制御している。ZO-1 は最初に同定されたタイトジャンクション構成タンパク質であり、ZO-2, ZO-3 とともに TJ MAGUK ファミリーを形成している。ZO タンパク質はタイトジャンクションのストランドを構成するクローディンや細胞骨格のアクチンと直接結合することが知られており、細胞間接着部位における細胞骨格の調節における役割が示唆されている。しかし、MDCK 細胞において Van Itallie らは、ZO-1 の siRNA による発現抑制（ノックダウン）による細胞間接着部位におけるアクチン・ミオシンの局在や同部位の形状の変化を報告しているが、McNeil らや Aijaz らの MDCK 細胞における ZO-1 ノックダウンによる報告ではこれらの変化は見られておらず、ZO-1 の細胞骨格の調節における役割の詳細は未だに不明である。ノックダウンにおける遺伝子の発現抑制ではその遺伝子の機能を完全になくすことはできず、ノックダウン効率の違いによって残存するタンパク質の発現量に差が生じると考えられ、この発現量の差が上記の報告間での結果の違いの原因の一つとなっていたことが予想される。そこで、本研究では ZO-1 の機能をより詳細に明らかにするため、近年開発された TALEN 法を用いて ZO-1 遺伝子のノックアウトを行い、その機能の解明を試みた。

まず、ZO-1, ZO-2, ZO-3 をノックアウトするための TALEN の DNA コンストラクトを作成し、MDCK 細胞においてノックアウトを試みた。これらの TALEN のコンストラクトを MDCK 細胞にトランスフェクションして免疫染色で観察したところ、一部の細胞で ZO-1, ZO-2, ZO-3 のシグナルの消失が確認され、これらの TALEN コンストラクトによってノックアウトが引き起こされることが確認された。さらに ZO-1 のノックアウト細胞を詳細に観察したところ、細胞間接着部位の形状に変化が認められ、ノックアウト細胞と野生型細胞の間の部位では野生型細胞に対して凸状の曲線状の形状が認められた。

次に、我々は ZO-1 をノックアウトした MDCK 細胞のクローン樹立を試みた。ノックアウト細胞のクローン選択のために、TALEN の DNA コンストラクトのペアを別々の薬剤耐性遺伝子をもつベクターに移し、2 種類の薬剤を一過的に投与してクローン選択を行った。その結果、ZO-1 遺伝子がノックアウトされた MDCK 細胞を 3 クローン樹立することができた。また、これらのクローンの染色体に TALEN が組み込まれていないことが PCR によって確認された。これらの ZO-1 をノックアウトした MDCK 細胞を用いて細胞形状・細胞骨格について解析を行ったところ、ZO-1 ノックアウト細胞では Van Itallie らの報告と一致して細胞間接着部位の形状がより直線状になっており、細胞間接着部位のアクチンの集積が亢進していることが確認された。さらに、ミオシンの局在にはより顕著な変化が認められ、細胞間接着部位においてタイトジャンクションからわずかに離れてミオシンが二列のドット状に配列する特徴的な局在が確認された。このミオシンの変化はこれまでの ZO-1 ノックダウンによる

報告では認められておらず、また ZO-1・ZO-2 のダブルノックダウンによるミオシンの変化と酷似していた。また、ZO-1 ノックアウト細胞では ZO-3 や他のタイトジャンクション構成タンパク質であるオクルディンの細胞間接着部位における局在の減少が認められた。さらに、クローディンの局在にも影響が見られ、クローディン-2 は ZO-1 ノックアウト細胞においてタイトジャンクションにおける局在が減少するのに対し、クローディン-1, クローディン-7 は ZO-1 ノックアウト細胞においてタイトジャンクションへの局在が増加することが確認された。これらの局在変化もこれまでの ZO-1 ノックダウンによる報告では認められていなかった。

次に、マウス ZO-1 の cDNA を用いてレスキュー実験を行った。ZO-1 の発現量の影響を見るためにごく微量の ZO-1 を発現させてその影響を確認したところ、上記のミオシンの変化やオクルディン・クローディンの局在変化は認められなくなった。これらの結果から、これまでの ZO-1 ノックダウンによる解析では残存する微量の ZO-1 がミオシンやクローディンなどの局在に影響を与えたために、本研究の ZO-1 ノックアウト細胞で見られた上記の結果が認められなかったと考えられた。さらに、ZO-1 を過剰発現させてその影響を調べたところ、ZO-1 の過剰発現によって細胞間接着部位に顕著な zigzag 状の形状が形成された。さらに、同部位にアクチンやミオシンの局在の増加が認められた。これまでに Shroom-3, Lulu, Tuba などが細胞間接着部位におけるアクチン・ミオシンの集積を引き起こして張力が亢進させ、同部位に直線状の形状をもたらすことが報告されているが、上記の結果は細胞間接着部位のアクチン・ミオシンの集積が必ずしも同部位に直線状の形状をもたらすわけではないことを示唆すると考えられた。

最後に、ZO-1 のノックアウトがタイトジャンクションの透過性に及ぼす影響について検討を行った。MDCK 細胞のタイトジャンクションはナトリウムイオンを選択的に透過させることが知られている。ZO-1 ノックアウト細胞では、3 クローンのうち 2 クローンはタイトジャンクションのナトリウム選択性の低下が認められたが 1 クローンでは変化が認められなかった。また 4 kDa のデキストランの透過性についても検討を行ったところ、1 クローンで 1.5 倍程度の透過性の増加が認められたのに対し、残りの 2 クローンでは 10 倍以上の透過性の増加が認められた。これらの結果から、ZO-1 のノックアウトはタイトジャンクションにおける比較的大きな分子の透過性の増加を引き起こすことが示唆されたが、ばらつきが大きく確定的な結論を得ることはできなかった。

本研究では、TALEN 法を用いて ZO-1 ノックアウト細胞の樹立に成功し、ZO-1 の細胞骨格・細胞形状における役割について新たな知見を得ることができた。これらの結果は培養細胞におけるノックアウトによる解析の有用性を示しており、今後 ZO-1 以外の分子についてもノックアウトによる解析を進めていく必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2453 号	氏 名	徳田 深作
論 文 題 目 Title of Dissertation	ZO-1 Knockout by TALEN-Mediated Gene Targeting in MDCK Cells: Involvement of ZO-1 in the Regulation of Cytoskeleton and Cell Shape TALEN を用いた ZO-1 遺伝子のノックアウトによる MDCK 細胞の 解析 —ZO-1 の細胞骨格・細胞形状調節における役割の解明—		
審 査 委 員 Examiner	主 査 的 崎 尚 Chief Examiner 副 査 勾 坂 敏 朗 Vice-examiner 副 査 伊 藤 俊 樹 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

ヒトの体は上皮によって表面を覆われており、上皮は外界環境に対するバリアとして機能している。上皮細胞と上皮細胞の間にはタイトジャンクションと呼ばれる細胞間接着装置が存在し、細胞間隙を通過する物質の移動を制御している。ZO-1 は最初に同定されたタイトジャンクション構成タンパク質であり、ZO-2、ZO-3 とともに TJ MAGUK ファミリーを形成している。ZO タンパク質はタイトジャンクションのストランドを構成するクローディンや細胞骨格のアクチンと直接結合することが知られており、細胞間接着部位における細胞骨格の調節における役割が示唆されている。しかし、MDCK 細胞において Van Itallie らは、ZO-1 の siRNA による発現抑制（ノックダウン）による細胞間接着部位におけるアクチン・ミオシンの局在や同部位の形状の変化を報告しているが、McNeil らや Aijaz らの MDCK 細胞における ZO-1 ノックダウンによる報告ではこれらの変化は見られておらず、ZO-1 の細胞骨格の調節における役割の詳細は未だに不明であった。ノックダウン効率の違いが上記の報告間での結果の違いの原因の一つとなっていたと考えられるため、申請者は ZO-1 の機能をより詳細に明らかにするために近年開発された TALEN 法を用いて ZO-1 遺伝子のノックアウトを行い、その機能の解明を試みた。

まず、申請者は ZO-1、ZO-2、ZO-3 をノックアウトするために TALEN の DNA コンストラクトを作成し、MDCK 細胞においてノックアウトを試みた。これらの TALEN のコンストラクトをトランスフェクションした MDCK 細胞では、免疫染色による観察から一部の細胞において ZO-1、ZO-2、ZO-3 のシグナルの消失が確認され、これらの TALEN コンストラクトによってノックアウトが引き起こされることが確認された。さらに ZO-1 のノックアウト細胞の詳細な観察から、細胞間接着部位の形状に変化が認められ、ノックアウト細胞と野生型細胞の間の部位では野生型細胞に対して凸状の曲線状の形状が認められた。

次に、申請者は ZO-1 をノックアウトした MDCK 細胞のクローン樹立を試みた。ノックアウト細胞のクローン選択のために、TALEN の DNA コンストラクトのペアを異なる薬剤耐性遺伝子をもつベクターに移し、2 種類の薬剤を一過的に投与してクローン選択を行った。その結果、ZO-1 遺伝子がノックアウトされた 3 クローンの異なる MDCK 細胞株を樹立するに至った。さらに、これらの ZO-1 をノックアウトした MDCK 細胞株を用いて細胞形状・細胞骨格について解析を行ったところ、ZO-1 ノックアウト細胞では Van Itallie らの報告と一致して細胞間接着部位の形状がより直線状になっており、また、これまでの ZO-1 ノックダウン細胞では見られていなかったミオシンの細胞間接着部位で二列のドット状に配列する特徴的な局在や、ZO-3 やオクルディン・クローディンの局在変化が認められた。そこで申請者は、マウス ZO-1 の cDNA を用いてレスキュー実験を試みた。ZO-1 の発現量の影響を見るためにごく微量の ZO-1 を発現させてその影響を確認したところ、上記のミオシンやオクルディン・クローディンの局在変化が消失した。さらに、ZO-1 を過剰発現によりその影響を調べたところ、ZO-1 の過剰発現によって細胞間接着部位に顕著な zigzag 状の形状が形成された。さらに、同部位にアクチンやミオシンの局在

の増加が認められた。

さらに、申請者は Z0-1 のノックアウトがタイトジャンクションの透過性に及ぼす影響について検討を行った。Z0-1 ノックアウト細胞では、3 クローンのうち 2 クローンはタイトジャンクションのナトリウム選択性の低下が認められたが 1 クローンでは変化が認められなかった。また、デキストランの透過性は 1 クローンで 1.5 倍程度の透過性の増加が認められたのに対し、残りの 2 クローンでは 10 倍以上の透過性の増加が認められた。これらの結果から、Z0-1 のノックアウトはタイトジャンクションにおける比較的大きな分子の透過性の増加を引き起こすことが示唆されたが、ばらつきが大きく確定的な結論を得ることはできなかった。

本研究では、TALEN 法を用いて Z0-1 ノックアウト細胞の樹立に成功し、Z0-1 の細胞骨格・細胞形状における役割について新たな知見を得ることができた。これらの結果は培養細胞におけるノックアウトによる解析の有用性を示しており、今後 Z0-1 以外の分子についてもノックアウトによる解析を進めていく必要があると考えられた。

本研究は、近年開発された TALEN 法を用いて Z0-1 の細胞骨格・細胞形状の調節における役割について新たな知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。