

論文内容の要旨

応用生命化学専攻
平成10年度博士課程入学
氏名 奈良井 朝子
指導教官 清水 誠

論文題目

腸管上皮細胞層の透過性を昂進するエノキタケ由来のタンパク質に関する研究

経口摂取された食品由来の栄養素・生理活性成分は、腸管上皮からの吸収を経て生体内で機能を発揮することができる。しかし、その吸収の場となる腸管上皮は、外来性因子の無秩序な生体内への侵入を防ぐ障壁としても非常に重要な役割を担っている。これら腸管上皮の相反する生理機能を決定づけているのは物質透過に対する制御機構である。腸管上皮における物質透過は、1) グルコース、アミノ酸、ジペプチドなどが、上皮刷子縁膜上に発現しているそれぞれに特異的な輸送担体を介して輸送される経路、2) 脂肪酸、脂溶性のビタミンなどが、細胞内に存在する結合タンパク質によって細胞内を運搬される経路、3) タンパク質などの高分子が、小胞を介したトランスサイトシスによって細胞内を透過する経路、4) 水やイオンなど、水溶性低分子が細胞間隙を受動拡散的に透過する経路、といった4つの経路を介して行なわれる。1) ~ 3) の細胞内経路については、それに関わる機能分子本体の解明、その特性や制御機構などに関する研究が多く為されてきた。4) の細胞間隙経路については、近年になって、ミネラルイオンや生理活性オリゴペプチドなどの吸収効率に大きく寄与していることが認識されるようになり、それらの透過制御を担っている細胞間接着装置に関する研究が進んできた。

細胞間接着装置のうち、最も管腔側に存在する tight junction (TJ) は細胞間隙を透過する物質に対してサイズや電荷に基づく選択性を有し、水やイオンにすら容易な透過を許さないバリア機能を発揮している。TJ 構成分子の解明も急速に進んできており、最初に発見された細胞膜貫通型の Occludin の他に、最近になって Claudin というファミリーを形成する膜貫通タンパク質の存在が明らかになった。それらの細胞質側領域と actin 細胞骨格とをリンクすると考えられている ZO タンパク質、更にその近傍には様々なシグナル伝達に関わる因子の存在も示唆され、TJ

機構は未だ完全に解明されていない。薬物吸収促進剤の開発などの分野でも TJ 研究の動向は重視される場所であるが、我々は安全性の高い食品由来の成分から、腸管上皮の TJ の状態、及び TJ 経路を介した食品成分の吸収・透過に影響を及ぼす成分を検索し、その作用機構や生理的役割の解明を通して TJ 調節機構解明の糸口を見い出すことを目的に本研究を行なった。

●腸管上皮細胞層の経上皮電気抵抗(TEER)を低下させるエノキタケ由来タンパク質 (TEER-decreasing protein ; TDP) の精製とクローニング

細胞層の管腔側と基底膜側の間で物質の透過が制限されることで生じる経上皮電気抵抗 (TEER) は、測定法も簡便なことから透過性の指標として広く用いられている。本研究では透過性フィルター上で単層培養したヒト結腸癌由来株化細胞 Caco-2 を小腸上皮細胞層のモデルとして用い、TJ 経路における物質の透過状態の変化を主に TEER によって検出した。

実際の食品成分中から腸管上皮の物質透過性に影響を及ぼす食品成分を食用茸を対象に検索したところ、エノキタケ水抽出試料に TEER 低下活性タンパク質が存在することを見出した。このタンパク質による顕著な細胞膜損傷は認められず、細胞層における lucifer yellow CH (分子量 457) や FITC-dextran (分子量 40,000 と 500,000) の透過性は TEER 低下に伴って上昇した。

DEAE、MonoQ を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーと Superdex 75 を用いたゲルろ過を行ない、SDS-PAGE 上で単一な分子量約 31 kD の活性タンパク質を精製し、これを TEER-decreasing protein (TDP) と名付けた。この TDP は native PAGE によって 3 つの成分に分離され、荷電の異なる 3 種のタンパク質の混合物であることが分かった。3 つのバンドに分かれたこれらをゲル切片から抽出した試料にはいずれも活性が認められた。更に、リン酸化や糖鎖修飾を受けていないこと、3 種のタンパク質は N 末端 13 残基のアミノ酸配列が共通であることから、荷電の違いは一次構造のわずかな差異に起因していると考えられた。

タンパク質の構造と作用機構の関連を解析するため、TDP をコードする cDNA のクローニングを試みた。活性を認めた 3 つの精製タンパク質に共通の N 末端アミノ酸配列を基に作製した混合プライマーを用いた RACE 法により、目的タンパク質をコードすると思われる cDNA 断片を得た。塩基配列の解析からこのタンパク質は 272 アミノ酸として合成され、翻訳後に開始 Met が除去されることが明らかになった。アミノ酸配列より推定される分子量は 30,095 で精製タンパク質のそれとほぼ一致していた。データベース上に今回得られた一次構造と有意に相同性を示す既知タンパク質は見出せなかった (1998 年 3 月 19 日 EMBL/GenBank/DBJ databases に登録 ; ID No. AB012289, CODE No. 2514325A)。一方、本研究で見い出された TDP の精製過程での挙動や分子量などは、以前に報告されたエノキタケ由来の膜孔形成性の溶血タンパク質 flammutoxin (FTX) のそれらと類似していたが、TDP cDNA クローニングと同時期に FTX の cDNA クローニングの報告がなされ、この二つは同一であることが判明した。TDP cDNA をプローブに用いたノーザンやエノキタケのゲノムサザン解析の結果、TDP は単一遺伝子からの転写、翻訳を経て合成されているタンパク質であり、精製によって得られた複数の TDP は翻訳後のプロセッシング等の修飾で生じていることが示唆された。

●腸管上皮細胞層の透過性を昂進する TDP の作用機構

TDP もラット、ヒトの赤血球を溶血させる活性をもつことが確認されたことから、TDP は腸管上皮細胞の細胞膜表面にも膜孔を形成し、それが細胞層の TEER 低下に関与している可能性が考えられた。これを確認するために、TDP を作用させた Caco-2 細胞層を Triton

X-100 で抽出した試料を、FTX の研究者から供与して頂いた抗 FTX 抗血清を用いてウェスタン分析した。その結果、Triton X-100 不溶性画分に TDP を含む約 200 kD に相当する高分子複合体のバンドが検出され、この高分子のバンドの位置は FTX が赤血球膜上で膜孔を形成する 6 分子会合体のそれと類似していた。TDP による TEER 低下が生じるのと同時に高分子複合体が出現し、又同時に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起こることが fura 2 を用いた観察によって認められた。更に、細胞外 Ca^{2+} を EGTA でキレートすると細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が全く検出されなかったことから、TDP によって Caco-2 細胞の膜表面に Ca^{2+} などの水やイオンの流入／漏出を許す膜孔形成が為されていることが示唆された。

TDP が形成する膜孔を介して生じる細胞内 Ca^{2+} の増加は、 Ca^{2+} 依存的な actin 結合タンパク質による切断や重合／脱重合の調節を受ける actin 系細胞骨格に影響を及ぼすことが考えられる。actin filament が TJ を裏打ちしてその構造維持や機能制御に関与していることを考慮すると、actin filament の変化が間接的に TJ のバリア機能を攪乱している可能性がある。そこで FITC-phalloidin を用いて actin filament を蛍光染色してみたところ、正常な細胞層では細胞の輪郭に添って局在する actin ring が、TDP で処理した細胞層では薄く細胞質側へ拡散する傾向が観察された。電子顕微鏡による細胞の側面からの観察では、細胞間隙の大きさに若干の差が生じたものの、tight junction 部位には有意な差がなく、微絨毛の膨張と微絨毛の下の細胞膜直下に actin の束が形成されている点で顕著な変化が認められた。これらのことから TDP によって actin filament に生じる顕著な変化が TJ の機能に及ぼす影響が大きいことが予想された。

次に、上記のような actin 系細胞骨格の変化が TJ や adherens junction (AJ) の構成タンパク質の局在性の変化を生じるかどうか、ウェスタン分析で調べた。その結果、Triton X-100 に対する溶解性の違いで分画した細胞抽出試料の間で、いずれのタンパク質もコントロールと比べて量的な変化は差が認められなかったが、Triton X-100 可溶画分の Occludin にのみ顕著なチロシンリン酸化の増加が検出された。これはタンパク質のリン酸化／脱リン酸化を介するシグナル伝達系が TJ の変化に関与している可能性を示唆している。Occludin のチロシンリン酸化と TDP による TEER 低下との関連性については現在解析中である。

● TDP と腸管上皮細胞との相互作用

TDP が Caco-2 細胞の膜表面と相互作用するために必要な膜成分の検索が、その後の TJ の状態変化に繋がるプロセスの解明に繋がると考え、TDP と結合しうる膜成分あるいは高分子複合体形成に関与する膜成分を調べることにした。

リン脂質とコレステロールで構成されるリポソームは TDP によって破壊されなかったため、TDP が細胞膜上に膜孔を形成するためには脂質以外の成分が重要であると予想された。

一方、TDP の TEER 低下活性及び高分子複合体形成は単糖類の共存では抑制されなかったが、二糖、三糖の共存で抑制された。このことから、細胞膜に表出する糖鎖構造が TDP の結合又は会合にとって重要であることが考えられた。ある種の GPI-anchored protein や glycosphingolipid が膜孔形成性細菌毒素のレセプター様因子になること、これらの膜成分が Triton X-100 に不溶な膜ドメインに多く存在すること、TDP の会合には細胞の膜表面においてある程度の集積を可能にする要因が必要であること、TDP にも比較的多く含まれている芳香族系アミノ酸の Trp, Tyr, Phe が糖のピラノース環と親和性があること、などの点を考慮して、現在、腸管上皮細胞膜の GPI-anchored protein の中に TDP レセプター様因子が存在するかどうか、その検討を進めている。

● TDP の構造活性相関

TDP の hydrophathy plot と 2 次構造予測では、強い疎水性領域と両親媒性領域が見当たらず、TDP が腸管上皮細胞の膜と相互作用して活性を発揮するために重要なアミノ酸や領域の予測が困難であった。そこでクローニングした TDP cDNA 断片を用いて組み換え体や変異体を作製するための大腸菌発現用プラスミドを構築し、タンパク質を発現させて TDP の構造・活性相関の解析を試みた。N 又は C 末端に 6 xHis タグを付加した TDP の活性を調べた結果、TEER 低下活性は C 末端にタグを付加したものだけで認められ、N 末領域は立体構造的に活性発現にとって重要な役割を担っていることが予想された。次にタグを付加しない変異体を作製することにし、N 及び C 末端を数十残基欠損した TDP を発現させて活性を調べた結果、N 末側欠損 TDP は活性を完全に消失するが、C 末端欠損 TDP は欠損アミノ酸配列の大きさに依存的に TEER 低下活性が減少する傾向が認められた。以上の結果から、TDP の活性には N、C 末端の両領域が重要であることが示唆された。そしてこれら全ての発現タンパク質のうち、TEER 低下活性を有するものにおいてのみ Caco-2 細胞の膜上における高分子複合体形成能力が認められた。このことから、TDP による腸管上皮の細胞間隙透過性昂進には膜孔形成が必須な条件であることが確認された。C 末端側の長さの相違が活性の強弱を生むことが観察されたことによって、先述したように精製した TDP 画分に N 末端アミノ酸配列が共通な活性型の TDP が複数混在していた理由として、エノキタケに内在するプロテアーゼなどによるプロセシングの影響が考えられた。尚、TDP のタンパク質当たりの TEER 低下活性は精製の度に大きく変動するが、これも活性の強度を異にする TDP の混合物であるために生じる精製度の問題に起因することが予想された。

●展望

食餌由来のエノキタケ TDP は加熱処理や消化酵素の影響を受けるために、実際の食生活においては、これが消化管に到達して上皮細胞層の細胞間隙透過性を昂進する可能性は低いと思われる。しかし、本研究によって“食餌成分に含まれ、腸管上皮細胞の膜上における膜孔形成を特徴とするようなタンパク質が腸管上皮における栄養素や生理活性成分の吸収を促進する”可能性を示すことができた。TDP のような食品由来の活性タンパク質の性質と細胞層の透過性に及ぼす作用についての更なる知見は、腸管上皮の透過性制御機構の一部を明らかにするものと期待される。又本研究は、同様の性質をもつ細菌由来の毒素タンパク質の作用機構と比較することによって、それらによる下痢などの病態発生の機序の一端を解明する意味で有意義であるとともに、これらの生体にとって好ましくない作用を抑制して生体を防御するための手段やツールの開発にも寄与できると考えられる。

●参考文献

- (1) Watanabe H., Narai A., Shimizu M. (1999) *Eur. J. Biochem.* 262, p.850-857
- (2) 清水 誠、橋本 啓、佐竹 真、奈良井 朝子 (1999) *蛋白質核酸酵素* 44(6), p.874-880