

機関番号：12102
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2009～2010
課題番号：21710219
研究課題名（和文） タイトジャンクション制御における新規受容体・シグナル伝達解析とその応用
研究課題名（英文） Analysis on a novel receptor/signaling pathway regulating tight junction and its application
研究代表者
南雲 陽子（NAGUMO YOKO）
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：70373339

研究成果の概要（和文）：

カプサイシンが腸管上皮細胞タイトジャンクション(TJ)を可逆的に開放し、物質の透過性を増すことが示された。私は本知見を難吸収性物質の吸収改善等に应用するため、TJ 開閉機構解析を行った。以前の検討で明らかにしていた、カプサイシン刺激により活性化する Cofilin を中心として解析を進めた。その結果、Cofilin の上流に存在すると考えられる候補タンパク質や、Cofilin が直接作用するアクチン細胞骨格とそれに付随するタンパク質群の変動を明らかにすることができた。またカプサイシンにより透過性が上昇する物質についても知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

We previously found that capsaicin induces tight-junction (TJ) opening accompanied with cofilin activation in intestinal Caco-2 cells. In order to clarify the mechanism underlying the TJ opening action of capsaicin, I analyzed upstream and downstream of cofilin. As a result, I found proteins suggested to function leading to cofilin activation. In addition, I demonstrated that actin cytoskeleton, that is a direct target of cofilin, is remodeling together with some other proteins. I also investigated molecules which permeability is increased by capsaicin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学生物

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：タイトジャンクション、コフィリン、生理活性

1. 研究開始当初の背景

腸管吸収には主に二つの経路が存在する。一つは特異的なトランスポーターを介して細胞膜を横切って運ばれる細胞内経路であり、もう一つは主に親水性分子や低脂溶性薬剤の吸収に使われていると考えられている、細胞と細胞の間をすり抜ける**細胞間経路**である（下図）。この細胞間経路を介した物質の透過性に重要なのが、腸管上皮**タイトジャンクション (Tight Junction: TJ)**である。腸管上皮TJは体外からの異物の侵入を防ぐバリア機能を担う一方で、難吸収性物質の低吸収の一因でもある。このためTJを介した吸収亢進システムの開発は、低バイオアベイラビリティ薬剤の適用範囲を広げ、患者のQuality of Lifeの向上に繋がる。しかしながらTJの開閉の詳細な分子機構やその制御法は明らかになっていない。

2. 研究の目的

腸管上皮モデル系を用い、トウガラシの辛味成分である**カプサイシンが可逆的にTJを開放し、物質の透過性を増す**ことが示された (Isoda, H. *et al.*, *Cytotechnology* **36**, 155-161 (2001))。私はこのカプサイシンの作用が腸管吸収促進剤として応用可能であると考え、その作用機構解析を行ってきた。その結果、カプサイシン刺激により細胞内Ca²⁺濃度の上昇が見られること、TJの開放にはアクチン結合タンパク質であるCofilinの脱リン酸化が関与していることを明らかにした (Nagumo, Y. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **355**, 520-525 (2007))。しかしながら上記現象がTJを開く機構については依然不明である。そこで本研究はカプサイシンが腸管上皮モデルの物質透過性を上昇させる点に着目し、TJ開放シグナル伝達機構の総

括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

これまでに明らかになっている四点、1) カプサイシン刺激、2) Ca²⁺イオンの流入、3) Cofilin 脱リン酸化によるアクチン骨格変動、及び4) TJ 開放の、詳細な解析を行うとともに、相互の関係を結ぶ分子機構を解明することが必要になる。そこで、I) 腸管上皮細胞におけるカプサイシン認識/Ca²⁺イオン流入の解析：TRPV1 様分子についての基礎研究、II) Cofilin の脱リン酸化につながるシグナル伝達経路の解明、III) アクチン骨格変動に伴う TJ 構成タンパク質変動解析、の研究を平行して行った。

4. 研究成果

平成21年度は I) については TRPV1 様分子を培養細胞に導入する検討を行いその発現を確認した。II) については、阻害剤を用いた検討により Cofilin の上流に存在すると考えられる因子を探索した。III) については、TJ 構成タンパク質を免疫蛍光染色し、顕微鏡で各タンパク質の局在変動を追跡した。以上の解析から TJ 開放シグナル伝達機構解明につながる糸口を見出せた。

また一連の検討を行う上で問題であった、Caco-2 細胞がトランスフェクションされづらく、単層状に培養するのに時間がかかる点、TER による透過性測定が煩雑である点の解決を検討した。より培養時間の短い MDCK 細胞を用い、蛍光ラベルした透過物質による透過性測定系を作り、カプサイシンによる透過性上昇の確認を行い、測定法の簡便化に成功した。これにより透過性が上昇する物質の特性についても知見を得た。

平成22年度は各機構の連携について重

点的に解析を進めた。まず、昨年度の I)~II) の解析により得られた Cofilin 脱リン酸化に関与する候補分子を遺伝子導入する実験等を行い、Cofilin の脱リン酸化に関与するポテンシャルを確認した。III) のアクチン骨格変動については、アクチンの状態変化に着目した解析により、骨格変動と Cofilin の働きを結びつける結果が得られた。また TJ 構成タンパク質変動解析については、これまでの二次元平面での観察に加え、細胞の極性を反映する三次元での観察を行った。その結果、TJ 構成タンパク質とアクチンの新たな変動を見出すことができた。昨年度～上記の解析を考えあわせることにより、アクチン状態変化及び TJ 構成タンパク質変動が TJ 開放＝物質透過性上昇に関係する可能性が示された。そこで TJ 構成タンパク質について詳細な解析を行ったところ、新たな知見を得ることができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

下記の発表論文は、全て査読有り。

- 1) Dana FARATIAN, Annelien ZWEEMER, Yoko NAGUMO, Andrew SIMS, Morwenna MUIR, Michael DODDS, Peter MULLEN, InHwa UM, Charlene KAY, Max HASMANN, David J. HARRISON, Simon P. LANGDON, Trastuzumab and pertuzumab produce changes in morphology and estrogen receptor signaling in ovarian cancer xenografts revealing new treatment strategies. *Clin. Cancer Res.*, in press.
- 2) Takumi CHINEN, Yu OTA, Yoko NAGUMO, Hiroshi MASUMOTO, Takeo

USUI, Construction of multidrug-sensitive yeast with high sporulation efficiency. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, in press.

- 3) Takumi CHINEN, Yoko NAGUMO, Tsubasa WATANABE, Takamichi IMAIZUMI, Masatoshi SHIBUYA, Takao KATAOKA, Naoki KANO, Yoshiharu IWABUCHI and Takeo USUI, Irciniastatin A induces JNK activation that is involved in caspase-8-dependent apoptosis via the mitochondrial pathway, *Toxicol. Lett.*, **199**, 341-346 (2010)
- 4) Simon P. LANGDON, Dana FARATIAN, Yoko NAGUMO, Peter MULLEN, David J. HARRISON, Pertuzumab for the treatment of ovarian cancer, *Expert Opin. Biol. Ther.* **10**, 1113-1120 (2010).
- 5) Tsubasa WATANABE, Takamichi IMAIZUMI, Takumi CHINEN, Yoko NAGUMO, Masatoshi SHIBUYA, Takeo USUI, Naoki KANO and Yoshiharu IWABUCHI, Syntheses and biological evaluation of irciniastatin A and the C1-C2 alkyne analogue, *Org. Lett.* **12**, 1040-1043 (2010).
- 6) Yoko NAGUMO, Dana FARATIAN, Peter MULLEN, David J. HARRISON, Max HASMANN, Simon P. LANGDON, Modulation of HER3 Is a Marker of Dynamic Cell Signaling in Ovarian Cancer: Implications for Pertuzumab Sensitivity, *Mol. Cancer Res.* **7**, 1563-1571 (2009).

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 塩原 智子、南雲 陽子、韓 峻奎、礪田 博子、臼井 健郎、Capsaicinによるtight junction解放に関わる細胞接着部の構造解析、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学（京都府）
- 2) 知念 拓実、南雲 陽子、片岡 孝夫、渡辺 翼、今泉 貴充、澁谷 正俊、叶 直樹、岩 渕 好治、臼井 健郎、Irciniastatin AによるJNK長期活性化とアポトーシス誘導、日本農芸化学会、2011年3月27日、京都女子大学（京都府）
- 3) 南雲 陽子、機能分子を身近に役立てるために、筑波大学生命環境科学研究科シンポジウム、2010年3月7日、筑波大学（茨城県）
- 4) 南雲 陽子 他、Anti-HER2 antibody sensitivity in ovarian cancer、筑波大学若手イニシアチブ国際シンポジウム、2010年11月8日、筑波大学（茨城県）
- 5) 南雲 陽子 他、Anti-HER2 antibody sensitivity in ovarian cancer、日本がん分子標的治療学会、2010年7月7、8日、タワーホール船橋（東京都）
- 6) 知念 拓実、南雲 陽子、渡辺 翼、今泉 貴充、澁谷 正俊、叶 直樹、岩 渕 好治、臼井 健郎、Irciniastatin A/psymberin の作用機構解析、日本農芸化学会、2010年3月29日、東京大学（東京都）
- 7) 南雲 陽子他、抗HER2抗体の卵巣がんへの応用、日本薬学会、2010年3月28日、岡山コンベンションセンター（岡山県）
- 8) 南雲 陽子、抗HER2抗体の卵巣がんへの応用、日本動物細胞工学会、2009年7月25日、つくば国際会議場（茨城県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南雲 陽子 (NAGUMO YOKO)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・

助教

研究者番号：70373339