

氏 名 榊 原 明

学位(専攻分野) 博士(学術)

学位記番号 総研大甲第282号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Possible involvement of phosphorylation of  
occludin in tight junction formation

論文審査委員 主 査 教 授 井本 敬二  
教 授 池中 一裕  
教 授 山岸 俊一  
助 教 授 老木 成稔  
教 授 月田 承一郎(京都大学)

## 論文内容の要旨

Occludin is an integral membrane protein localizing at tight junctions in epithelial and endothelial cells. Occludin from confluent culture MDCK I cells resolved as several (more than 10) bands between 62 and 82kD in SDS-PAGE, of which two or three bands of the lowest molecular mass (Mr) were predominant. Among these bands, the lower predominant bands were essentially extracted with 1% Nonidet P-40 (NP-40), whereas the other higher Mr bands were selectively recovered in the NP-40-insoluble fraction. Alkaline phosphatase treatment converged these bands of occludin both in NP-40-soluble and -insoluble fractions into the lowest Mr band, and phosphoamino acid analyses identified phosphoserine (and phosphothreonine weakly) in the higher Mr bands of occludin. These findings indicated that phosphorylation causes an upward shift of occludin bands, and that highly phosphorylated occludin resists NP-40 extraction. When cells were grown in low calcium medium, almost all occludin was NP-40 soluble. Switching from low to normal calcium medium increased the amount of NP-40-insoluble occludin within 10 min, followed by gradual upward shift of bands. This insolubilization and the band shift correlated temporally with tight junction formation detected by immunofluorescence microscopy. Furthermore, they found that the anti-chicken occludin mAb, Oc-3, did not recognize the predominant lower Mr bands of occludin (non- or less-phosphorylated form), but was specific to the higher Mr bands (phosphorylated form) on immunoblotting. Immunofluorescence microscopy revealed that this mAb mainly stained the tight junction proper of intestinal epithelial cells, whereas other anti-occludin mAbs, which can recognize the predominant lower Mr bands, labeled their basolateral membranes (and the cytoplasm) as well as tight junctions. Therefore, they conclude that non- or less-phosphorylated occludin is distributed on the basolateral membranes, and that highly-phosphorylated occludin is selectively concentrated at tight junctions as the NP-40-insoluble form. These findings suggest that the phosphorylation of occludin is a key step in tight junction assembly.

## 審査結果の要旨

本研究は、膜蛋白質の一つであるオクルディン(occludin)のリン酸化がタイトジャンクション形成に果たす役割を検討したものである。

タイトジャンクションは、上皮細胞や内皮細胞に存在する細胞間接着装置の一つであり、そこでは隣り合う細胞の細胞膜が密着している。その機能としては、細胞間隙を通した物質の透過性を制御する機能と、頂端膜(apical membrane)と測底膜(basolateral membrane)を区切って各機能ドメインを維持するための機能が挙げられる。オクルディンはタイトジャンクションに局在する膜蛋白質の一つであり、様々な組織や細胞株のイムノブロットにおいて移動度の異なる複数のバンドとして認識されることが示されていた。本研究では、まず、培養上皮細胞であるMDCK I 細胞を用いた免疫沈降の手法により、SDS-PAGE上で相対分子量の大きいオクルディン分子がNP-40抽出に耐性であることを見出した。続いて、この免疫沈降物をアルカリホスファターゼ処理することにより、SDS-PAGE上での移動度の変化がリン酸化に起因することを証明した。<sup>32</sup>P-ラベルしたオクルディンを用いてリン酸化アミノ酸分析を行った結果、オクルディンは主としてセリン残基がリン酸化されていた。さらに低Ca<sup>2+</sup>濃度の培地から通常Ca<sup>2+</sup>濃度にスイッチしてタイトジャンクション形成させると、NP-40不溶性画分のオクルディンが有意に増加し、その後、NP-40不溶性画分に取り込まれたオクルディンのリン酸化レベルが上昇した。さらに、それぞれ認識部位が異なる3種類の抗オクルディンモノクローナル抗体(0c-1, 0c-2, 0c-3)のうち0c-3がリン酸化型オクルディン特異抗体であることがアルカリホスファターゼ処理等の手法で明らかになった。これらの抗体を用いてニワトリ小腸の凍結切片を蛍光抗体法により観察すると、リン酸化型オクルディンが選択的にタイトジャンクションに濃縮していた。以上の結果は、リン酸化型のオクルディンがタイトジャンクションに選択的に集まり、NP-40不溶性になっていることを示しており、オクルディンのリン酸化がタイトジャンクションの形成調節に重要な役割を果たしていることを示唆している。タイトジャンクションの調節機構は、医学、生理学的に極めて重要な研究テーマであるが、本研究はこの問題にはじめて分子レベルでアプローチしたものであり、その学術的価値は高く、博士論文として十分に価値のあるものである。

試験結果については、学位論文として提出された研究結果について説明した後、審査委員が研究の内容および周辺の知識について試問を行った。その結果、研究内容の把握、位置づけ、結果の考察、基礎知識ともに、博士号を授与するに十分なレベルにあると判断された。また、学位論文の英語は適正であり、外国語の学力にも問題がないと判断された。これらのことを総合的に判断して合格とした。