

氏 名 Nguyen, Thanh Phuong

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2465 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 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6条第1項該当

学位論文題目 Dissecting the roles of tight junction membrane proteins in  
mechanical resistance of apical junctions

論文審査委員 主 査 久保 義弘  
生理科学コース 教授  
古瀬 幹夫  
生理科学コース 教授  
西田 基宏  
生理科学コース 教授  
米村 重信  
徳島大学 大学院医歯薬学研究部 教授

# Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Nguyen, Thanh Phuong

Title:

## **Dissecting the roles of tight junction membrane proteins in mechanical resistance of apical junctions**

Epithelia cover our body's outer surface and internal compartments' inner surface. Epithelia serve as a barrier to protect the entire body from the external environment. Epithelia are constantly exposed to mechanical stress, internally and externally. Thus, epithelial cells must resist that stress to preserve tissue integrity, by forming intercellular junctions, including tight junctions (TJs), adherens junctions (AJs), and desmosomes. TJs and AJs together are often called “apical junctions”. Among them, it is widely accepted that AJs are critical for tension regulation via mechanical coupling with actin cytoskeleton, and desmosomes provide strong cell-cell adhesion across cells via linkage to intermediate filaments. Unlike those, the specific impact of TJs on mechanical resistance has remained unclear for a long time, due to technical limitations to specifically and completely perturb TJs. Our group has recently established the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) II cell lines that specifically and completely disrupt TJ structure and function, making the cells a decent model to analyze how TJs depletion causes subsequent defects in epithelial integrity. By utilizing this model system, I investigated whether and to what degree TJ proteins contribute to epithelial integrity against mechanical stress.

Here I report that spontaneous breakages of apical junctions were observed in epithelial MDCK II cells depleted of two types of TJs-associated integral membrane proteins claudin and JAM-A (claudins/JAM-A KO cells), which lack entire TJs. Cell-cell junction morphology was visualized by apical junction marker ZO-1, which showed sharp and continuous staining at the apical region of cell-cell contacts in control MDCK II cells. In contrast, ZO-1 staining in claudins/JAM-A KO cells displayed peculiar discontinuous staining at apical junctions, and large ZO-1 gaps were occasionally seen, suggesting that apical junction integrity was disrupted.

To investigate how these junction breakages arose in claudins/JAM-A KO cells, I examined apical junction dynamics in claudins/JAM-A KO cells to compare with that in MDCK II cells. Live-cell imaging revealed that junction breakages, marked by the loss of GFP-tagged ZO-1, occurred concomitantly with the loosening of circumferential

actin bundles, suggesting a strong spatial-temporal correlation between junction breakages and actomyosin disorganization. I further investigated whether actomyosin plays a causal role in junction breakages in claudins/ JAM-A KO cells, and observed that pharmacological perturbation of actin polymerization indeed enhances the junction breakage phenotype, pointing out that actin cytoskeleton plays critical roles in the apical junction integrity dependent on claudin and JAM-A.

Structure-function analysis of claudin and JAM-A suggested that they preserve apical junction integrity in two pathways. First, claudin and JAM-A form trans-interactions across cells most likely to physically strengthen apical junctions. Second, claudin and JAM-A mechanically couple apical junctions to actin cytoskeleton via TJ-associated cytoplasmic scaffolding protein ZO-1. These results suggested the mechanical coupling between neighboring cells through claudin and JAM-A. I next focused on ZO-1, an intermediate linker connecting claudin and JAM-A to actin cytoskeleton. Super-resolution stimulated emission depletion imaging to evaluate the conformational change of ZO-1 showed that in the presence of claudin and JAM-A, ZO-1 molecules were oriented with the N-terminus toward the plasma membrane and the C-terminus toward the cytoplasm, and ZO1 undergoes a conformational change to unfold its structure. In contrast, although ZO-1 molecules in claudins/JAM-A KO cells showed similar orientation to those in MDCK II cells, the distance between the N-terminus and C-terminus of ZO-1 was shortened, indicating that ZO-1 prefers “less-stretched” conformation. This suggests that claudin and JAM-A support apical junction integrity by regulating the conformational change of ZO-1.

Further depletion of another IgG-like domain-containing adhesion molecule CAR in claudins/JAM-A KO cells exaggerated the junction breakages phenotype, with various large ZO-1 gaps observed. Claudins/JAM-A/CAR KO cells also displayed a more random orientation of ZO-1, with the N-terminus no longer exclusively localized to membrane-proximal regions but were also found at the membrane-distal regions facing inward the cytoplasm. This indicates that CAR, together with claudin and JAM-A, supports the apical junction integrity and regulates the nanometer-scale ordering of ZO-1.

In conclusion, my study demonstrated that TJ membrane proteins, including claudin, JAM-A, and CAR, coordinately regulate the mechanical resistance of apical junctions in epithelial cells.

Results of the doctoral thesis defense

## 博士論文審査結果

<sup>Name in Full</sup>  
氏名 Nguyen, Thanh Phuong

<sup>T i t l e</sup>  
論文題目 Dissecting the roles of tight junction membrane proteins in mechanical resistance of apical junctions

上皮組織の力抵抗性には上皮に特徴的な細胞間結合のうちアドヘレンスジャンクション(AJ)とデスモソームの役割が広く知られているが、タイトジャンクション(TJ)の寄与はこれまでに知られていない。最近、出願者の所属研究室では、典型的な培養上皮細胞であるMDCK細胞から、TJの膜タンパク質であるクローディングファミリー分子(Cldn)とJAM-Aを欠失させることにより、TJを特異的かつ完全に欠く上皮細胞(Cldn/JAM-A KO細胞)を樹立した。出願者 Nguyen, Thanh Phuong氏はこの細胞を用いて、上皮細胞の力抵抗性におけるTJの役割に関する本研究を進めた。

出願者は、まずTJの裏打ちタンパク質であり、TJ・AJを含むapical junction complex(AJC)のマーカーであるZO-1の蛍光免疫染色を行った。その結果、ZO-1が、MDCK細胞においては細胞間接着部位に連続的に分布するのに対し、Cldn/JAM-A KO細胞においては細胞間接着部位に濃縮するものの、局所的にその分布が不連続になることを見出した。この現象をさらに詳しく解析するため、ZO-1-GFPをMDCK細胞とCldn/JAM-A KO細胞に安定的に発現させ、その動態をタイムラプス観察した。その結果、MDCK細胞では細胞が分裂・移動に伴って力学的負荷を受けてもZO-1-GFPの連続的な分布が常に保たれたのに対し、Cldn/JAM-A KO細胞では細胞が大きく伸展した際にZO-1-GFPの局在が一過的に消失することが明らかとなった。

また、このZO-1-GFPの消失が同じ領域のアクチン繊維の消失を伴うことが観察された。そこで、細胞間接着部位の力学と深く関係するアクチン繊維の主要な制御因子で、ミオシンの活性化を制御すると共にLIMK依存的にアクチン繊維の重合を制御するRhoAのシグナル伝達経路に注目してさらに解析した。それぞれの経路に特異的な阻害剤をCldn/JAM-A KO細胞に与えたところ、LIMK阻害剤およびアクチン阻害剤でZO-1の不連続性が増強されたが、ミオシン阻害剤ではこのような効果は認められなかった。以上の結果から、上皮細胞のAJCの力抵抗性にTJタンパク質であるCldnとJAM-A、及び細胞間接着部位のアクチン繊維が寄与していることが示された。

次に、CldnとJAM-AがAJCの力抵抗性を制御する仕組みを明らかにするために、Cldn/JAM-A KO細胞に、CldnおよびJAM-Aの種々の変異体を発現させることにより構造機能連関を解析した。その結果、AJCの力抵抗性にはCldn、JAM-Aの細胞外領域を介した細胞間相互作用と細胞内領域を介したZO-1等の裏打ちタンパク質との相互作用の両方が必要であることが明らかとなった。

ZO-1はN末端領域を介してCldn、JAM-Aと結合すると共に、C末端領域を介してアクチン繊維と相互作用する。近年、ZO-1が細胞の張力に応答して構造変化を起こすことが

報告されている。そこで、Cldn、JAM-A による AJC の力抵抗性と ZO-1 の構造変化の関連を明らかにするために、N 末端と C 末端に異なるタグを付加した ZO-1 を、MDCK 細胞あるいは Cldn/JAM-A KO 細胞に発現させ、STED 顕微鏡を用いて ZO-1 の N 末端と C 末端の位置を計測した。その結果、MDCK 細胞では ZO-1 が伸びた構造をとっているのに対し、Cldn/JAM-A KO 細胞では閉じた構造をとっていることが明らかになった。

Cldn/JAM-A KO 細胞においても ZO-1 の N 末端は膜直下に局在していたことから、Cldn・JAM-A 以外に ZO-1 の N 末端と相互作用する膜タンパク質の存在が示唆された。そこで、TJ の膜タンパク質で ZO-1 との相互作用が報告されている CAR に着目し、Cldn/JAM-A/CAR KO 細胞を樹立した。ZO-1 の分子構造を解析したところ、MDCK 細胞や Cldn/JAM-A KO 細胞では常に ZO-1 の N 末端側が細胞膜直下に向かって配向していたのに対し、Cldn/JAM-A/CAR KO 細胞ではこのような ZO-1 分子の配向性が失われた。また、Cldn/JAM-A KO 細胞に比して AJC の不連続性が増強していた。

本研究において、TJ の膜タンパク質である Cldn、JAM-A、CAR が協調的に上皮細胞の AJC の力抵抗性を制御することが、十分な実験結果に基づいて明確に結論され、また、その過程に ZO-1 分子の構造変化が関与する可能性が強く示唆された。本研究は、上皮の力抵抗性のメカニズムに関する重要な分子細胞生理学的意義を有するものである。以上の理由から、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると全員一致で判断した。