

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04668

研究課題名(和文)細胞の極性を制御する遺伝子の組織、個体での機能の解明

研究課題名(英文)Elucidation of functions of genes regulating cell polarity in vivo.

## 研究代表者

原田 彰宏 (Harada, Akihiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：SNAP23の膵臓特異的欠損マウスでは、膵外分泌腺の分泌低下とインスリン分泌の亢進が見られJCBに論文発表した。SNAP23の神経特異的欠損マウスでは大脳皮質と小脳の顕著な低形成が見られた(投稿準備中)。Rab11aの欠損マウスもapical面への輸送異常を示し、その解析結果を報告した。腸の上皮細胞の極性に必要な遺伝子を多数同定し、その中のRab1、及びArfの活性化因子BIG1の欠損マウスを作製し後者の解析結果を論文に発表した。syntaxin3, Rab1a, 1b, 11bは欠損マウスの作製解析中である。Rab8, Rab11の新規結合タンパク質を同定し共にJCBに論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：SNAP23 pancreas-specific knockout (KO) mice showed decreased and increased secretion of amylase and insulin, respectively, which was published in JCB. Brain-specific SNAP23 KO mice showed defects in both cerebral and cerebellar cortex, which is being prepared for publication. We showed defects in apical transport in Rab11a KO mice, which was published in Biology Open.

We identified many genes involved in cell polarity. Two of them, Rab1a and BIG1, an activator of Arf, was knocked out in the mice and the results of BIG1 KO mice was published in Plos One. Other genes, such as Rab1, 11b, syntaxin3 were already knocked out and being analyzed. In addition, we identified novel binding proteins for Rab8 and Rab11. We analyzed their roles in vitro and in vivo and the results were published recently in JCB.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 極性輸送 Rab SNARE

## 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、頂端面 (apical)、側底面 (basolateral) 神経細胞も、軸索、樹状突起という方向性(極性)を持つ。この極性が、組織、器官の正常な発生や、分泌、刺激の伝達等の機能に必須であり、その異常はガンなど様々な疾患を引き起こす。この細胞の極性の形成、維持には、合成された分泌蛋白や膜蛋白がトランスゴルジネットワーク (TGN) 等で輸送小胞に分配、濃縮された後、apical や basolateral に運ばれる必要がある。この方向性のある輸送を極性輸送と呼ぶ。極性輸送には、低分子量 GTP 結合蛋白質、SNARE 蛋白などが重要であることが知られている。しかし、これらの蛋白の研究はこれまでは主に培養細胞で行われ、組織や個体における役割が明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

研究 1) 既知の極性輸送関連分子 KO マウスを用いた極性輸送の分子機構の解析

研究 2) 線虫等で同定した新規の極性輸送関連分子 KO マウスの作製と解析

を行い、これらの研究によって、極性輸送の分子機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

研究 1 について：期間内に syntaxin3 KO、SNAP23 KO、Rab11a KO マウスについて特に解析が進んでいるため、これらのマウスについて下記の解析を中心に行った。

(1) syntaxin3：小腸特異的 KO マウスで Rab8a 同様 apical への輸送の異常と細胞増殖亢進が見られたため、極性輸送の分子機構、極性輸送と細胞増殖の関係について解析する。

(2) SNAP23：膵臓特異的 KO マウスで内分泌は亢進し、外分泌は低下するという相反する現象が見られた。また神経特異的 KO マウスで大脳皮質や小脳の著しい低形成が見られたため、その原因について解析する。

(3) Rab11a KO マウス：apical への輸送に異常が見られたため、その解析を行っている。さらに機能未知の Rab11 結合蛋白を同定したため、その機能を解析する。

研究 2 について：線虫の腸で多数同定した、apical, basolateral 面の形成に関わる細胞内輸送関連の遺伝子の中で低分子量 GTP 結合蛋白に関連する遺伝子 (特に低分子量 GTP 結合蛋白質の Rab1, 及び Arf1 活性化因子 BIG1) の KO マウスの作製と解析を行う。それと並行して Rab8, Rab11 に結合する機能未知の蛋白を同定しているため、これらの KO マウスが完成次第、速やかにその解析に移る。更にこれら機能未知の蛋白の極性輸送における役割を初代培養細胞などを用いて解析する。

## 4. 研究成果

1. 現在まで作成した既知の極性輸送関連分子欠損マウスの解析について

syntaxin3 小腸特異的欠損マウスの解析：apical 面への輸送に重要といわれる syntaxin3 の欠損マウスでは apical 面への輸送の異常を認めると同時に上皮細胞の増殖亢進が見られた。DNA microarray の結果、EGF 様の成長因子の転写亢進が見られたため、その原因を解析した。

SNAP23 欠損マウスの解析：syntaxin3 と同様に apical 面への輸送や分泌に重要と考えられる SNAP23 の膵臓特異的欠損マウスでは、膵外分泌腺の分泌の顕著な低下と内分泌腺のインスリン分泌の亢進が見られたため、それを論文発表した (JCB 2106)。SNAP23 の神経特異的欠損マウスでは大脳皮質と小脳の顕著な低形成が見られたため、その原因を解析中であり近々投稿する予定である。

Rab11a, Rab11b の欠損マウスの解析：Rab11a の欠損マウスの解析は既に報告したが (Biol. Open 2014)、Rab11a には Rab11b という類縁分子があるため、共に欠損させないと Rab11 の機能の解明が出来ない。現在 Rab11b 欠損マウス作製のベクターを作製している。

その他の既知の極性輸送関連分子について

PKD (protein kinase D) KO マウス  
PKD は basolateral 面への輸送に重要とされてきたが、その神経での機能を解明する生田目 PKD1,2 の double KO マウスを作製し、神経の解析を行い論文発表した (Neurosci. Res. 2015)

他にも共同研究として、Rab8 が West Nile virus の細胞内輸送 (JBC 2016) や Wnt pathway に関与すること (Development 2015)、VAMP7 の insulin 分泌への関与 (Diabetes 2016) 等を報告した。

2. 新規の極性輸送関連分子の組織特異的欠損マウスの作製と解析

線虫の腸を用いた RNAi screening によって腸の上皮細胞の極性に必要な遺伝子の同定を行い、多数の小胞輸送に関わる遺伝子を同定した。その中の低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rab1) 及び Arf の活性化因子 BIG1 について欠損マウスを作製解析した。後者については、神経系の異常を示し、その解析結果を論文に発表した (Plos One 2017)。前者については、Rab1a, Rab1b の 2 つの遺伝子があるため、その欠損マウスを作製し、解析を行っているところである。

Rab8 が apical 面への輸送に重要ということが KO マウスの解析によって判明したため、Rab8, 11 に対する結合蛋白質の同定を行った。Rab8 については機能未知のタンパク質 EHBP1L1 が Rab8 に結合することを解明し、Rab8-EHBP1L1-Bin1 が apical 面への輸送に重要なことを示してその結果を論文に発表した (JCB 2016)。

Rab11 については、結合蛋白として機能未知

の蛋白質 RELCH を同定し、Rab11-RELCH-OSBP の複合体がリサイクリングエンドソームから TGN への小胞を介さないコレステロール輸送に関与することを示し、その結果を論文に発表した (JCB 2017)。

#### 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 12 件) 全て査読有

1. Sobajima T, Yoshimura SI, Maeda T, Miyata H, Miyoshi E, Harada A. The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution.

**J Cell Biol.** 2018 Mar 7. (published online) pii: jcb.201709123.  
doi: 10.1083/jcb.201709123. (2018)

2. Ishikawa T, Toyama T, Nakamura Y, Tamada K, Shimizu H, Ninagawa S, Okada T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Aoyama E, Takigawa M, Harada A, Mori K. UPR transducer BBF2H7 allows export of type II collagen in a cargo-and developmental stage-specific manner

**J Cell Biol.** 216:1761-1774.  
doi: 10.1083/jcb.201609100. (2017)

3. Teoh JJ, Iwano T, Kunii M, Atik N, Avriyanti E, Yoshimura SI, Moriwaki K, Harada A.

BIG1 is required for the survival of deep layer neurons, neuronal polarity, and the formation of axonal tracts between the thalamus and neocortex in developing brain.

**PLoS One.** 12:e0175888.  
doi: 10.1371/journal.pone.0175888. (2017)

4. Burikhanov R, Hebban N, Noothi SK, Shukla N, Sledziona J, Araujo N, Kudrimoti M, Wang QJ, Watt DS, Welch DR, Maranchie J, Harada A, Rangnekar VM.

Chloroquine-Inducible Par-4 Secretion Is Essential for Tumor Cell Apoptosis and Inhibition of Metastasis.

**Cell Rep.** 18(2): 508-519.  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.051. (2017)

5. Parry DA, Smith CE, El-Sayed W, Poulter JA, Shore RC, Logan CV, Mogi C, Sato K, Okajima F, Harada A, Zhang H, Koruyucu M, Seymen F, Hu JC, Simmer JP, Ahmed M, Jafri H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ.

Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta.

**Am. J. Hum. Genet.** 99(4): 984-990.  
doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.020. (2016)

6. Kunii M, Ohara-Imaizumi M, Takahashi N, Kobayashi M, Kawakami R, Kondoh Y, Shimizu T, Simizu S, Lin B, Nunomura K, Aoyagi K, Ohno M, Ohmuraya M, Sato T, Yoshimura SI, Sato K, Harada R, Kim YJ, Osada H, Nemoto T, Kasai H, Kitamura T, Nagamatsu S, Harada A.

Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells.

**J. Cell Biol.** 215: 121-138.  
doi: 10.1083/jcb.201604030 (2016)

7. Aoyagi K, Ohara-Imaizumi M, Itakura M, Torii S, Akimoto Y, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Kishimoto T, Kawakami H, Harada A, Takahashi M, Nagamatsu S. VAMP7 Regulates Autophagy to Maintain Mitochondrial Homeostasis and to Control Insulin Secretion in Pancreatic  $\beta$ -Cells.

**Diabetes** 65: 1648-59.  
doi: 10.2337/db15-1207 (2016)

8. Hayashi Y, Nishimune H, Hozumi K, Saga Y, Harada A, Yuzaki M, Iwatsubo T, Kopan R, Tomita T.

A novel non-canonical Notch signaling regulates expression of synaptic vesicle proteins in excitatory neurons.

**Sci. Rep.** 6: 23969.  
doi: 10.1038/srep23969 (2016)

9. Kobayashi S, Suzuki T, Kawaguchi A, Phongphaew W, Yoshii K, Iwano T, Harada A, Kariwa H, Orba Y, Sawa H.

Rab8b Regulates Transport of West Nile Virus Particles from Recycling Endosomes.

**J. Biol. Chem.** 291: 6559-68.  
doi: 10.1074/jbc.M115.712760.(2016)

10. Nakajo A, Yoshimura SI (co-first and co-corresponding author), Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A

EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells.

**J. Cell Biol.** 212: 297-306.  
doi: 10.1083/jcb.201508086 (2016)

11. Das S, Yu S, Sakamori R, Vedula P, Feng Q, Flores J, Hoffman A, Fu J, Stypulkowski E, Rodriguez A, Dobrowolski R, Harada A, Hsu W, Bonder EM, Verzi MP, Gao N.

Rab8a vesicles regulate Wnt ligand delivery and Paneth cell maturation at the intestinal stem cell niche.

**Development** 142: 2147-62.

doi: 10.1242/dev.121046. (2015)

12. Avriyanti E, Atik N, Kunii M, Furumoto N, Iwano T, Yoshimura SI, Harada R, Harada A.

Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity.

**Neurosci. Res.** 95: 12-20.

doi: 10.1016/j.neures.2015.01.007.(2015)

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 青柳共太、今泉美佳、板倉誠、鳥居征司、岸本琢磨、西脇知世乃、中道洋子、秋元義弘、原田彰宏、高橋正身、永松信哉 (ワークショップ)

VAMP7 はオートファジーによるミトコンドリア恒常性維持機構を介して膵β細胞からの第2相インスリン分泌を制御する

第67回細胞生物学会大会

2015年6月30日 (東京都江戸川区)

2. 傍嶋智明、吉村信一郎、岩野智彦、國井政孝、渡辺雅彦、Nur Atik、虫明聡太郎、森井英一、小山佳久、三善英知、原田彰宏 (ポスター)

Rab11a は小腸において apical 腸タンパク質の局在を制御する

第67回細胞生物学会大会

2015年7月1日 (東京都江戸川区)

3. Akihiro HARADA (ポスター)

Functions of genes involved in polarized transport in neuronal polarity

第38回日本神経科学大会

2015年7月29日 (兵庫県神戸市)

4. 原田彰宏 (ポスター)

細胞内極性輸送を司る遺伝子の in vivo における機能

BMB2015

2015年12月2日 (兵庫県神戸市)

5. 國井政孝、原田彰宏 (ポスター)

大脳皮質における SNARE 分子の機能の解析

第121回日本解剖学会総会全国学術集会

2016年3月29日 (福島県郡山市)

6. 佐藤隆史、岩野智彦、國井政孝、松田信爾、水口留美子、Yongwook Jung、萩原治夫、吉原吉浩、柚崎通介、原田玲子、原田彰宏 (ポスター)

細胞内極性輸送と繊毛形成における Rab8a, b の協調的機能の解明

第121回日本解剖学会総会全国学術集会

2016年3月29日 (福島県郡山市)

7. Akihiro HARADA (ポスター)

In vivo functions of genes involved in polarized transport

American Society for Cell Biology (ASCB) Annual Meeting

2016年12月15日 (San Diego, CA, USA)

8. Shin-ichiro YOSHIMURA, Akihiro HARADA (シンポジウム)

The molecular function of Rab8 in polarized transport

第68回細胞生物学会大会

2016年6月15日 (京都府京都市)

9. 原田彰宏 (シンポジウム)

極性細胞の極性輸送における局域

第89回日本生化学会大会

2016年9月27日 (宮城県仙台市)

10. 國井政孝、原田彰宏 (ポスター)

膵臓からの消化酵素およびインスリン分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能と阻害化合物の検討

第112回日本解剖学会総会・全国学術集会

2017年3月30日 (長崎県長崎市)

11. 岩野智彦、原田彰宏 (ポスター)

一次繊毛長制御に関わる Rab8 結合タンパク質の機能解析

第112回日本解剖学会総会・全国学術集会

2017年3月30日 (長崎県長崎市)

12. Akihiro HARADA (poster)

EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical transport in polarized epithelial cells.

Gordon Research Conference 'Cell Polarity Signaling'

2016年6月12-17日 (Mount Snow, VT USA.)

13. Akihiro HARADA (talk and poster)

Roles of Rab8, 10, and 11 for apical transport, ciliogenesis, and microvillus inclusion disease.

FASEB conference 'GTPases in Trafficking, Autophagy and Disease'

2016年9月18-23日 (West Palm Beach, Florida, USA)

14. Akihiro HARADA (talk and poster)

The molecular mechanism of apical transport in the mouse intestinal epithelial cells: The role of Rabs and their binding proteins

EMBO conference 'Cell polarity and membrane dynamics'

2017年6月6日 (San Feliu de Guixols, Spain)

15. 國井政孝、原田彰宏 (口演、ポスター)  
消化酵素及びインスリン分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能解明と新規結合化合物の検討  
第 69 回細胞生物学会大会  
2017 年 6 月 13 日 (宮城県仙台市)

16. Masataka KUNII and Akihiro HARADA (ポスター)  
'The role of SNAP23 in secretion'  
Gordon Research Conference 'Molecular Membrane Biology' Regulation of Ways of Communication - From Molecules to Organisms  
2017 年 7 月 17-18 日 (Proctor Academy, Andover, NH, USA)

17. Sobajima, TOMOAKI, Shin-ichiro YOSHIMURA and Akihiro HARADA (ポスター)  
'Rab11a GTPase regulates apical protein localization and microvilli formation in the intestine.'  
Gordon Research Conference 'Molecular Membrane Biology' Regulation of Ways of Communication - From Molecules to Organisms  
2017 年 7 月 19-20 日 (Proctor Academy, Andover, NH, USA)

18. 原田彰宏 (シンポジウム)  
上皮細胞の極性輸送の分子機構とその過程に  
関与する細胞小器官内選別輸送ゾーンの重要性  
ConBio2017  
2017 年 12 月 6 日 (神戸国際会議場)

19. 岩野智彦 (ポスター)  
一次繊毛長制御に関わる Rab8 結合タンパク質の機能解析  
第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学  
2018 年 3 月 28 日 (東京都武蔵野市)

20. 吉村信一郎 (ポスター)  
新規 Rab11 結合タンパク質の解析  
第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会  
日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学  
2018 年 3 月 28 日 (東京都武蔵野市)

21. 國井政孝 (ポスター)  
神経前駆細胞の極性形成における細胞内小胞輸送関連分子の機能解析  
第 123 回 日本解剖学会総会・全国学術集会  
日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学  
2018 年 3 月 29 日 (東京都武蔵野市)

22. 原田彰宏 (シンポジウム)  
哺乳類の上皮細胞極性における輸送役割  
第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28 日  
サンポートホール高松、高松シンボルタワー  
2018 年 3 月 28 日 (香川県高松市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 彰宏 (HARADA Akihiro)  
大阪大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：40251441

### (2) 研究分担者

吉村 信一郎 (YOSHIMURA Shin-ichiro)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：60584521

國井 政孝 (KUNII Masataka)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：80614768

岩野 智彦 (IWANO Tomohiko)  
山梨大学・大学院総合研究部・助教  
研究者番号：10442930

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )