

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19590285

研究課題名（和文） Taxilinによる微小管再編成と小胞輸送の機能協関的制御機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of taxilin-dependent co-operative regulation of the rearrangement of the microtubule cytoskeleton and intracellular vesicle transport

研究代表者

白瀧 博通（SHIRATAKI HIROMICHI）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90249962

研究成果の概要：

alpha-taxilinは、蛋白レベルでラットの大脳、精巣、副腎、脾臓、肝臓で高発現していた。SDS-PAGE上の移動度から、alpha-taxilinには脳型と非脳型の少なくとも2つのタイプが存在することが明らかになった。最も強く発現している中枢神経系において、alpha-taxilinは、発生初期の大脳のnestin陽性の神経幹細胞や小脳の外顆粒細胞層の増殖の盛んな細胞に局限して認められたが、発生が進むとalpha-Taxilinは神経細胞に局限して認められるようになり神経膠細胞にはほとんど認めなくなった。以上の点から、alpha-Taxilinは細胞増殖に関与すると共に、神経細胞固有の機能にも関与している可能性が出てきた。さらに、肝細胞癌組織におけるalpha-Taxilinの発現量は、病理学的分化度と相関していた。低分化型肝細胞癌では腫瘍マーカーの一つであるPCNAと共にalpha-Taxilinが強陽性であった。一方、高分化型肝細胞癌ではPCNAと共にalpha-Taxilinは陰性であった。非癌部では、PCNAとalpha-Taxilinは共に陰性であった。このことから、肝細胞癌においてalpha-Taxilinは腫瘍マーカーになりうると共に、その発現量は分化度の指標になる可能性が出てきた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医化学、細胞生物学、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞内小胞輸送、SNARE、微小管、細胞運動、細胞増殖、がん

1. 研究開始当初の背景

現在、予防医学の観点からメタボリックシンドローム関連疾患である糖尿病や高血圧、高脂血症などが社会的に大きくクローズアップされている。しかし、日本人の死因の一

位はまだまだ悪性新生物であることから、がんの新たな診断法や治療法の開発につながる細胞のがん化やがん細胞の浸潤・転移の分子メカニズムを解明することは、現在も医学・生物学的に重要な課題となっている。一方、

細胞内小胞輸送は、細胞増殖における膜の供給や細胞運動における接着分子の運動先進部への輸送などに関与している。細胞の増殖や細胞運動のような動的な細胞機能では、特定の分子が決められた時間に決められた場所に配置されることがこれらの細胞機能の遂行に重要と考えられており、細胞内小胞輸送は、この時間的・空間的に制御された特定分子の細胞内配置に関与している。現在、この細胞内小胞輸送の異常が、細胞のがん化やがん細胞の浸潤・転移に深く関与している可能性が高くなっており、細胞内小胞輸送の制御機構を解明することは、細胞のがん化やがん細胞の浸潤・転移の分子メカニズムの解明につながると考えられている。

細胞内小胞輸送は、小胞のドナー膜からの出芽、アクセプター膜へのトランスロケーションと融合の過程から構成されており、これらの過程を時間的・空間的に制御する分子としてこれまでに Rab 系や SNARE 系、エクソシスト系などの数多くの制御分子が見出されている。さらに、最近、エクソシスト系の Exo70 や SNARE 系関連分子であるシンタチュブリンなどが、小胞の主たる運搬経路である微小管の再編成にも関与していることが明らかになっており、細胞内小胞輸送制御分子が、微小管の再編成をも制御することで特定の分子の細胞内配置を時間的・空間的に制御している可能性が高くなっている。このような状況下、私共は、Rab 系や SNARE 系を中心に小胞輸送の制御機構について解明を行ってきており、数年前に新たな SNARE 系関連分子として alpha-Taxilin を世界に先駆けて見出し、alpha-Taxilin の微小管再編成への関与を示唆する研究成果を得ている。さらに、他の研究者の研究から、脳腫瘍である星状細胞腫において alpha-Taxilin mRNA の発現が亢進していることが明らかになっている。以上の点から、細胞内小胞輸送における alpha-Taxilin の機能と役割を解明することは、細胞内小胞輸送における微小管再編成の機能協同的制御機構の解明につながるだけでなく、細胞のがん化やがん細胞の浸潤・転移の分子メカニズムを細胞内小胞輸送の側面から解明することが出来ると考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

私共は alpha-Taxilin を SNARE 系関連分子として世界に先駆けて見出しているが、細胞内小胞輸送における alpha-Taxilin の機能と役割については未だ不明な点が多い。そこで、まず、alpha-Taxilin の生化学的性状、組織・細胞内分布、微小管形成における機能を解明する。次に、細胞のがん化と alpha-Taxilin の関連を明らかにするために、がん組織における alpha-Taxilin の動態を解明する。

3. 研究の方法

(1) alpha-Taxilin は、細胞内小胞輸送において tethering 因子として機能している p115 の coiled-coil 領域と相同性の高い配列を有している。そこで、alpha-Taxilin が、p115 と同様の生化学的性状を有しているか検討する。

(2) ラットを用いて alpha-Taxilin の組織分布を解析すると共に、細胞株を用いて alpha-Taxilin の細胞内分布を解析する。

(3) alpha-Taxilin の発生段階における発現パターンと発現量の変化を解析する。

(4) 微小管配向における alpha-Taxilin の機能を解析する。

(5) 肝細胞癌における alpha-Taxilin の動態を検討する。

4. 研究成果

(1) alpha-Taxilin は、p115 と同様に平行方向に二量体を形成することが明らかになった。p115 は、輸送小胞とアクセプター膜の間で二量体を形成することにより輸送小胞をアクセプター膜に引き寄せると考えられており、alpha-Taxilin も同様に二量体形成により輸送小胞をアクセプター膜に引き寄せている可能性が高くなった。

(2) 種々のラット組織における alpha-Taxilin の蛋白発現量をウエスタンブロット法にて検討したところ、ほとんどの組織で alpha-Taxilin の発現が認められたが、特に大脳、精巣、副腎、脾臓、肝臓で高発現していた。大脳で発現している alpha-Taxilin は、精巣、脾臓、肝臓で発現している alpha-Taxilin に比べて SDS-PAGE 上の移動度がやや遅かった。このことから、翻訳後修飾の違いかスプライシングの違いかは不明であるが、alpha-Taxilin には脳型と非脳型が存在している可能性が出てきた。なお、精巣では、脳型と非脳型の両方の alpha-Taxilin がほぼ等量発現していた。

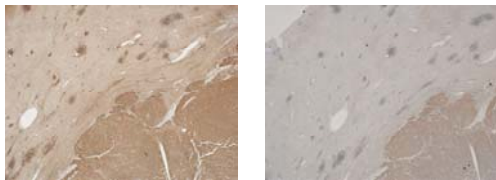
(3) alpha-Taxilin が最も多く発現している大脳において、発生段階における alpha-Taxilin の発現量をウエスタンブロット法にて経時的に検討したところ、発生段階が進むにつれて alpha-Taxilin の発現量が減少した。さらに、発生段階における alpha-Taxilin の中枢神経系における分布を免疫組織染色法にて経時的に検討したところ、大脳では発生初期では神経幹細胞である nestin 陽性細胞に認められた。発生が進むと alpha-Taxilin は神経細胞に局限して認められるようになり神経膠細胞にはほとんど認めなくなった。小脳では発生初期に外顆粒細胞層の増殖の盛んな細胞に alpha-Taxilin は局限して認められた。発生が進むと alpha-Taxilin はプルキンエ細胞に局限して認められるようにな

り神経膠細胞にはほとんど認めなくなつた。以上のことから、alpha-Taxilinは細胞増殖に関与すると共に、神経細胞固有の機能にも関与している可能性が出てきた。

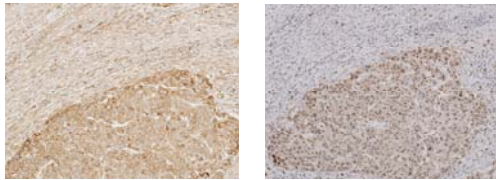
(4) 種々の培養細胞において alpha-Taxilin の発現量を強制的に増加させると微小管配向に異常が認められた。また、alpha-Taxilin はチューブリンポリマーに直接結合した。以上のことから、alpha-Taxilin はチューブリンポリマーとの直接的な結合を介して微小管形成を制御している可能性が高くなった。

(5) 肝細胞癌組織における alpha-Taxilin と腫瘍マーカーの一つである PCNA の発現を免疫組織染色法にて比較検討した。肝細胞癌組織における alpha-Taxilin の発現量は、病理学的分化度と相関していた。低分化型肝細胞癌では PCNA と共に alpha-Taxilin が強陽性であった (図 1)。一方、高分化型肝細胞癌では PCNA と共に alpha-Taxilin は陰性であった (図 2)。非癌部では、PCNA と alpha-Taxilin は共に陰性であった。

図 1 (弱拡大)



(強拡大)



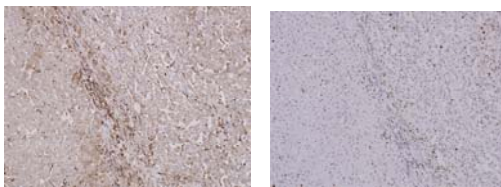
alpha-Taxilin

PCNA

図 2 (弱拡大)



(強拡大)



alpha-Taxilin

PCNA

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 3 件)

- ① Abe H, Kamai T, Shirataki H, Arai K, Yoshida K
High expression of Ran GTPase is associated with local invasion and metastasis of human clear renal cell carcinoma.
Int. J. Cancer, 122, 2391-2397, 2008 (査読 有)
- ② Sakakibara S-I, Nakadate K, Tanaka-Nakadate S, Yoshida K, Nogami S, Shirataki H, Ueda S
Developmental and spatial expression pattern of α -taxilin in the rat central nervous system.
J. Comp. Neurol. 511, 65-80, 2008 (査読 有)
- ③ Itoh M, Nelson CM, Myers CA, Bissell MJ, Rapl integrates tissue polarity, lumen formation, and tumorigenic potential in human breast epithelial cells.
Cancer Res., 67, 4759-4766, 2007 (査読 有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Natsuko Ohtomo, Tomoaki Timiya, Yasushi Tanoue, Yukiko Inoue, Takako Nishikawa, Naoko Watanabe, Hitoshi Ikeda, Masao Omata, Hirromichi Shirataki, and Kenji Fujiwara
Alpha-taxilin, a novel syntaxin-binding protein, is involved in cell proliferation in rat liver.
The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Summer Research Conferences—Liver growth, development and disease
2008 年 8 月 3 日-8 月 8 日
Colorado, USA
- ② 山内忍、中館(田中)佐和子、佐藤幸江、大嶋真由美、白瀧博通
微小管形成における α -Taxilin の役割と作用機構
第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会年会 合同大会
2007 年 12 月 11 日-12 月 14 日
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白瀧 博通 (SHIRATAKI HIROMICHI)

獨協医科大学・医学部・教授
研究者番号：90249962

(2) 研究分担者

伊藤 雅彦 (ITO MASAHIKO)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：70270486

山内 忍 (YAMAUCHI SHINOBU)
獨協医科大学・医学部・助教
研究者番号：70433589

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

富谷 智明 (TOMIYA TOMOAKI)
東京大学大学院医学研究科・助教
大友 夏子 (OHTOMO NATSUKO)
東京大学大学院医学研究科・大学院生