

機関番号：14501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590283  
 研究課題名(和文) Rab13結合蛋白質JRAB/MICAL-L2による細胞極性・接着の制御機構  
 研究課題名(英文) Role of Rab13 binding protein JRAB/MICAL-L2 in regulating cell polarity and adhesion  
 研究代表者 西村 範行 (Nishimura Noriyuki)  
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：00322719

研究成果の概要(和文)： 上皮細胞間の接着装置であるタイトジャンクション(TJ)とアドヘレンスジャンクション(AJ)は、さまざまな刺激に応じてダイナミックに再構築され、生体のホメオスタシスを維持している。これには、TJとAJを構成する接着分子クローディン・オクルディンとカドヘリンの細胞膜への小胞輸送の調節が重要な役割を担っている。研究代表者は、これまでに60以上のメンバーが同定されている細胞内小胞輸送の代表的な制御系であるRabファミリー低分子量G蛋白質(Rab)に注目して、オクルディンの細胞膜へのリサイクリングを制御するRab13-JRAB/MICAL-L2(JRAB)系を同定している。本研究では、酵母Two-hybrid法を用いてJRAB結合蛋白質をスクリーニングすることによって、JRABが細胞膜ではRab13と、エンドソームではRab8と結合してTJとAJの形成を制御することを明らかにした。さらに、Rab13と結合したJRABは、アクチン結合蛋白質アクチニン4を介して細胞膜へ局在することを示した。これらの結果から、JRABは、Rab13、Rab8およびアクチニン4との結合を介して、上皮細胞の極性・接着をコントロールすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： Dynamic rearrangement of epithelial cell junctions, tight junction (TJ) and adherens junction (AJ), is essential to maintain the homeostasis of the organism in response to various stimuli. The transport of integral TJ and AJ proteins, claudins, occludins and cadherins, to and/or from the plasma membrane enables this rearrangement. We previously revealed that Rab13 and JRAB/MICAL-L2 (JRAB) mediated the endocytic recycling of occludin. In the present study, we identified Rab8 and actinin-4 as JRAB-binding proteins by using yeast two-hybrid screening. Rab13 and Rab8 competed with each other for the binding to JRAB and functionally associated with JRAB at the plasma membrane and recycling endosome, respectively. Furthermore, Rab13-bound JRAB was targeted to the plasma membrane through its binding to actinin-4. These results suggest that JRAB regulates epithelial cell polarity and adhesion through its binding to Rab13, Rab8 and actinin-4.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学・医化学一般

キーワード： JRAB/MICAL-L2、Rab13、Rab8、アクチニン4、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション

## 1. 研究開始当初の背景

細胞極性を形成し維持するには、細胞間接着が重要な役割を果たしている。上皮細胞では、細胞間接着装置であるアドヘレンスジャンクション (AJ) およびタイトジャンクション (TJ) が頂端部-基底部軸に沿った極性を形成することによって、方向性を持った物質の分泌・吸収やシグナル伝達を可能にしている。特に TJ は、側基底面の最も頂端側に位置して、細胞間隙のバリアーおよび細胞膜を頂端面と側基底面に分離するフェンスとして働くとともに、多くの細胞極性を制御するシグナル伝達分子を集積しており、細胞極性・接着の制御に必須の役割を果たしている。また、AJ および TJ は、上皮細胞間の強固な結合を担っているが、発生や発癌、癌の浸潤・転移といった過程では、ダイナミックに再編成される。この再編成には、AJ および TJ の接着分子の細胞表面における発現量の調節が重要で、Snail や Twist といった転写因子に加え、細胞膜からのエンドサイトーシスおよび細胞膜へのリサイクリングによる調節が重要だと考えられていた。

Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質 (Rab) は、コート蛋白質、アダプター蛋白質、SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) とともに細胞内小胞輸送の中心的な制御因子である。哺乳動物細胞では、63 以上の Rab のメンバーが同定されており、各 Rab のメンバーは、特定の膜ドメインに局在する。Rab は、GDP と結合した不活性型 (GDP 結合型) または GTP と結合した活性型 (GTP 結合型) として存在する分子スイッチであり、GTP 結合型に特異的に結合する標的蛋白質を介して小胞輸送の選択性および膜ドメインの形成を制御する。多数の Rab 標的蛋白質が同定された結果、各 Rab のメンバーには多数の標的蛋白質が存在し、それらが協調して働くこと、一つの標的蛋白質が、複数の Rab のメンバー (特に同じサブファミリーに属するメンバー) や他の低分子量 G 蛋白質によって共有されることが、明らかになった。さらに、Rab と SNARE、細胞骨格、シグナル伝達とをリンクする Rab 標的蛋白質 (複合体) が多数報告され、Rab の作用を理解するためには、その標的蛋白質に加えて、それらと相互作用する分子 (群) を明らかにし、Rab 標的蛋白質を含む分子複合体の細胞内動態および機能を解明する必要があると考えられるようになってきた。

研究代表者は、TJ の接着分子クローディンおよびオクルディンを積み荷蛋白質のモデルとして、頂端面および側基底面蛋白質との選別という観点から、その輸送経路および制御機構を解析し、クローディンの TGN から細胞膜への輸送およびオクルディンのリ

サイクリングを TJ に局在する Rab13 が制御することを報告していた。さらに、Yeast two-hybrid 法を用いて、上皮細胞の TJ に局在する Rab13 の新規標的蛋白質 JRAB/MICAL-L2 を同定し、Rab13-JRAB 系が、オクルディンのリサイクリングと機能的な TJ の形成を制御することを明らかにしていた。

また、研究代表者とは独立に、Zahraoui らのグループは、Rab13 が上皮細胞における機能的な TJ の形成を制御すること、および GTP 結合型 Rab13 が PKA と結合してその活性を抑制することを、Faden らのグループは、脊髄損傷後に Rab13 の発現が誘導されること、および PC12 細胞における神経様突起形成を Rab13 が制御することを、それぞれ報告していた。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、それまでに Rab13-JRAB 系が上皮細胞の機能的な TJ の形成を制御することを明らかにしていたので、本研究では、JRAB が細胞極性・接着を制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) JRAB の細胞内局在化ドメインの同定

JRAB は、N 末端から順に Calponin homology (CH)、LIM、Coiled-coil (CC) ドメインを有する細胞質蛋白質であるが、極性化したマウス乳腺上皮細胞 (MTD-1A) では主に TJ に局在し、マウス線維芽細胞 (NIH3T3) ではストレスファイバーと共局在した。そこで、JRAB の欠失変異体を系統的に作製し、それらの細胞内局在を解析することによって、TJ およびストレスファイバーへの局在を規定する JRAB のドメインを同定した。

### (2) JRAB 結合蛋白質の単離・同定

JRAB は、Yeast two-hybrid 法を用いて GTP 結合型 Rab13 の結合蛋白質として同定された。本研究では、同様に Yeast two-hybrid 法を用いて JRAB の結合蛋白質を単離・同定した。

### (3) JRAB 結合蛋白質の機能解析

同定した JRAB 結合蛋白質の細胞内局在を解析した。JRAB 結合蛋白質の JRAB との結合ドメインを決定し、JRAB との結合を阻害する変異体を作製した。接着して極性を持った培養上皮細胞は、培地中のカルシウムを取り除くと解離して極性を失うが、培地にカルシウムを添加すると再び接着して極性を持つようになる。このカルシウムスイッチを用いて、上皮細胞極性・接着の形成・分解過程を、そ

の変異体発現細胞、JRAB 結合蛋白質をノックダウンした細胞、およびコントロール細胞の間で比較検討した。リプレATINGした上皮細胞は、時間依存的に AJ および TJ を形成し、細胞極性を確立する。この過程を、TJ のバリア機能を示す TER (transepithelial electrical resistance) の発達として解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) JRAB の細胞内局在化ドメインの同定

JRAB の欠失変異体を系統的に作製し、マウス乳腺上皮細胞 (MTD-1A 細胞) に発現して免疫染色を行って、CH ドメイン、LIM ドメイン、CC ドメインの何れのドメイン構造も持たない欠失変異体 (JRAB-MN) が細胞膜へ特異的に局在することを明らかにした。

##### (2) JRAB 結合蛋白質の単離・同定

JRAB の CH ドメイン、LIM ドメイン、CC ドメイン (JRAB-CC)、および JRAB-MN に結合する蛋白質を同定するために、Yeast two-hybrid 法を用いてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、JRAB-CC に結合する蛋白質として Rab8 を、JRAB-MN に結合する蛋白質としてアクチニン 4 を、それぞれ同定した。

##### (3) JRAB 結合蛋白質の機能解析

アクチニン 4 は、癌細胞における運動能亢進に関与するアクチン細胞骨格系を束状化する蛋白質で、MTD-1A 細胞の頂端側の細胞間接着部位で JRAB と共局在した。JRAB は、アクチニン 4 および Rab13 との間で 3 者複合体を形成し、JRAB とアクチニン 4 の結合は Rab13 の活性化によって促進された。

カルシウムスイッチを用いてオクルディンの細胞膜への輸送を蛍光抗体法で検討すると、アクチニン 4 をノックダウンした細胞では、Rab13、JRAB をノックダウンした細胞と同様に、カルシウム添加後のオクルディンの細胞膜への輸送が抑制された。

MTD-1A 細胞をリプレATINGすると、JRAB は時間依存的に細胞質から細胞膜へリクルートして TJ に集積するが、アクチニン 4 をノックダウンした細胞では JRAB の細胞膜へのリクルートおよび TER の発達の遅延が認められた。

#### 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 10 件)

(1) Nishimura N, Pham TVH, Hartomo TB,

Lee MJ, Hasegawa D, Takeda H, Kawasaki K, Kosaka Y, Yamamoto T, Morikawa S, Yamamoto N, Kubokawa I, Mori T, Yanai T, Hayakawa A, Takeshima Y, Nishio H and Matsuo M. Rab15 expression correlates with retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Oncol. Rep.* 26: 145-151. 2011. (査読有)

(2) Nishimura N and Sasaki T. Rab family small G proteins in regulation of epithelial apical junctions. *Front. Biosci.* 14: 2115-2129. 2009. (査読有)

(3) Kanda I, Nishimura N, Nakatsuji H, Yamamura R, Nakanishi H and Sasaki T. Involvement of Rab13 and JRAB/MICAL-L2 in epithelial cell scattering. *Oncogene.* 27: 1687-1695. 2008. (査読有)

(4) Yamamura R, Nishimura N, Nakatsuji H, Arase S and Sasaki T. The interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 coordinates the assembly of tight junctions and adherens junctions. *Mol. Biol. Cell.* 19: 971-983. 2008. (査読有)

(5) Higashio H, Nishimura N, Ishizaki H, Miyoshi J, Orita S, Sakane A and Sasaki T. Doc2  $\alpha$  and Munc13-4 regulate Ca<sup>2+</sup>-dependent secretory lysosome exocytosis in mast cells. *J. Immunol.* 180: 4474-4484. 2008. (査読有)

(6) Nakatsuji H, Nishimura N, Yamamura R, Kanayama H and Sasaki T. Involvement of actinin-4 in the recruitment of JRAB/MICAL-L2 to cell-cell junctions and the formation of functional tight junctions. *Mol. Cell Biol.* 28: 3324-3335. 2008. (査読有)

(7) Nishimura N, Araki K, Shinahara W, Nakano Y, Nishimura K, Higashio H and Sasaki T. Interaction of Rab3B with microtubule-binding protein Gas8 in NIH 3T3 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 474: 136-142. 2008. (査読有)

(8) Nishimura N and Sasaki T. Cell-surface biotinylation to study endocytosis and recycling of occludin. *Methods Mol. Biol.* 440: 89-96. 2008. (査読無)

(9) Nishimura N and Sasaki T. Identification and characterization of JRAB/MICAL-L2, a junctional Rab13-binding

protein. *Methods Enzymol.* 438: 141-153. 2008. (査読無)

(10) Nishimura N and Sasaki T. Regulation of epithelial cell adhesion and repulsion: role of endocytic recycling. *J. Med. Invest.* 55: 9-16. 2008. (査読無)

[学会発表] (計2件)

(1) 西村 範行、Rab8/13-JRAB/MICAL-L2 complexes control epithelial apical junctions、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会BMB2008、2008年12月9日、神戸

(2) 佐々木 卓也、高次細胞機能発現におけるエキソサイトーシス系 Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の作用機構、第60回日本細胞生物学会、2008年6月30日、横浜

## 6. 研究組織

研究代表者

西村 範行 (Nishimura Noriyuki)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号： 00322719