

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15364

研究課題名(和文)上皮細胞における膜蛋白質の新規なapical膜局在化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanisms for apical targeting of transmembrane proteins in epithelial cells

研究代表者

神田 朗 (Kohda, Akira)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10814650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：消化管や腎臓尿管の管腔面を覆う上皮細胞は、栄養物の吸収や老廃物の排泄、微生物感染に対する宿主防御などの生理機能に役割を果たす。上皮細胞がその機能を発揮するためには、上皮細胞に発現する一部の膜蛋白質が上皮細胞特有の細胞膜領域 apical 膜に特異的に局在する必要がある。本研究では、我々が最近見出した制御因子 Nox1BAR が膜蛋白質 NADPH オキシダーゼ (Nox) を apical 膜に特異的に局在させる分子機構を明らかにした。さらに、Nox1BAR は他の膜蛋白質の apical 膜局在にも必要であり、Nox1BAR による局在制御は apical 膜蛋白質に共通する新しい分子機構であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通じて、国内外の研究において長年未解明なままであった「上皮細胞において一部の膜蛋白質はどうして apical 膜に特異的に局在することができるのか」という疑問に対して、部分的ではあるがその答えを得ることができた。上皮細胞の機能を支える分子基盤の理解に繋がるはずである。また、本研究では液-液相分離が apical 膜局在制御に関与することを初めて明らかにすることができ、今後「液-液相分離の視点」から apical 膜局在制御の分子機構について更なる理解が得られることが期待された。

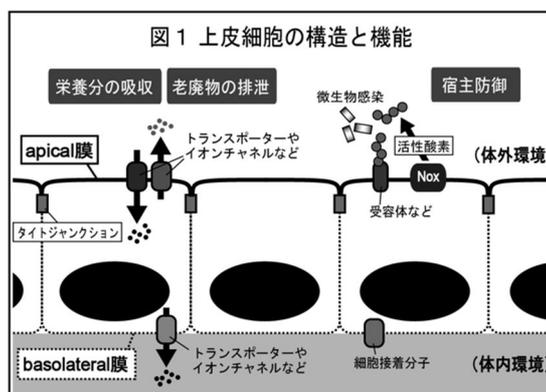
研究成果の概要(英文)：Epithelial cells, covering the luminal surfaces of the most internal organs, play an essential role in various physiological functions, such as transporter function and host defense response against microbial infection. Transmembrane proteins expressed in epithelial cells are specifically localized to epithelial cell-specific plasma membrane domains, apical or basolateral membrane, and thereby contribute to the epithelial physiology. In the present study, we clarified the molecular mechanisms whereby Nox1BAR, a novel regulatory protein that we recently identified, regulates apical targeting of transmembrane protein NADPH oxidases (Nox). Furthermore, we also revealed that in addition to Nox, Nox1BAR is required for the apical localization of other transmembrane proteins, suggesting that apical targeting by Nox1BAR is a common mechanism for apical membrane proteins.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：上皮細胞 apical 膜 NADPH oxidase 膜貫通蛋白質 極性輸送

1. 研究開始当初の背景

消化管や腎臓尿管などの管腔面を覆う上皮細胞は、栄養物の吸収や老廃物の排泄、微生物感染に対する宿主防御など様々な生理機能に役割を果たす。上皮細胞の細胞膜は、タイトジャンクションを境に体外環境に接する apical 膜と体内環境に接する basolateral 膜という2つの異なる膜領域に分かれており、上皮細胞に発現するトランスポーターやイオンチャネル、受容体、細胞接着分子などの膜蛋白質はいずれかの膜領域に特異的に局在する(図1)。この膜蛋白質の apical 膜あるいは basolateral 膜への局在化は、上皮細胞がその機能を発揮するために欠かせない。ところが、膜蛋白質を apical 膜に特異的に局在させる分子機構は未だその多くが未解明なままであり、特に膜蛋白質に直接作用してその局在を制御 (direct) する因子があまり明らかになっていなかった。



活性酸素生成酵素 NADPH oxidase (Nox) ファミリーは、消化管などの上皮細胞において apical 膜に局在し、活性酸素の生成を通じて宿主防御などに役割を果たすことが知られる膜蛋白質である。我々は最近、Nox ファミリーが apical 膜に局在するために必要なアミノ酸配列を同定し、そのアミノ酸配列に BAR ドメイン含有蛋白質が結合することを見出した。(我々の未発表データ：我々はこの新規結合蛋白質を NoxIBAR (Nox-Interacting BAR domain protein) と名付けた) さらに、Nox ファミリーとの相互作用を担う領域を欠く NoxIBAR の変異体を過剰発現させると Nox2 の apical 膜局在が減少したことから、NoxIBAR は膜蛋白質である Nox に直接作用してその apical 膜局在を制御する因子である可能性が考えられた。しかしながら、NoxIBAR がどのような機序で Nox を apical 膜に特異的に局在させるのか、その分子機構は未解明なままであった。また、NoxIBAR による局在制御が Nox 以外の膜蛋白質にも共通する分子機構なのかどうかは明らかになっていなかった。

活性酸素生成酵素 NADPH oxidase (Nox) ファミリーは、消化管などの上皮細胞において apical 膜に局在し、活性酸素の生成を通じて宿主防御などに役割を果たすことが知られる膜蛋白質である。我々は最近、Nox ファミリーが apical 膜に局在するために必要なアミノ酸配列を同定し、そのアミノ酸配列に BAR ドメイン含有蛋白質が結合することを見出した。(我々の未発表データ：我々はこの新規結合蛋白質を NoxIBAR (Nox-Interacting BAR domain protein) と名付けた) さらに、Nox ファミリーとの相互作用を担う領域を欠く NoxIBAR の変異体を過剰発現させると Nox2 の apical 膜局在が減少したことから、NoxIBAR は膜蛋白質である Nox に直接作用してその apical 膜局在を制御する因子である可能性が考えられた。しかしながら、NoxIBAR がどのような機序で Nox を apical 膜に特異的に局在させるのか、その分子機構は未解明なままであった。また、NoxIBAR による局在制御が Nox 以外の膜蛋白質にも共通する分子機構なのかどうかは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上皮細胞において膜蛋白質が apical 膜に特異的に局在するための分子機構を明らかにすることである。我々が最近得た未発表データをもとに、BAR ドメイン含有蛋白質 NoxIBAR に注目して膜蛋白質の局在制御機構の解明を目指す。これまで NoxIBAR が膜蛋白質の apical 膜局在を制御することは知られておらず、本研究を通じて膜蛋白質を apical 膜に局在させる新しい分子機構が明らかになることが期待された。

3. 研究の方法

本研究では、NoxIBAR はどのようにして Nox を apical 膜に局在させるのか、その詳細な分子機構を解明するために、次の A-C の検討を行った。

- 上皮細胞における NoxIBAR の細胞内局在の検討：上皮モデル細胞株 MDCK に NoxIBAR を発現させ、免疫蛍光細胞染色により NoxIBAR の細胞内局在を観察した。
- Nox の局在制御に必要な NoxIBAR の機能・性質の検討：NoxIBAR が持つ機能ドメインに変異を導入した NoxIBAR の変異体を作製し、MDCK 細胞に発現させて Nox の局在解析(膜蛋白質の局在を生化学的に解析する domain-selective biotinylation 法や免疫蛍光染色法)を行った。
- NoxIBAR と共に Nox の局在制御に働く因子の探索：免疫沈降による相互作用解析により、NoxIBAR に結合する因子を探索する。さらに NoxIBAR との結合が認められた因子について、siRNA によるノックダウン等で NoxIBAR による Nox の apical 膜局在制御に必要なかどうかを検討する。

さらに本研究では、NoxIBAR は「Nox 以外の膜蛋白質の apical 膜局在にも必要なのか」や「上皮モデル細胞株 MDCK 以外の上皮細胞でも膜蛋白質の局在制御に寄与するのか」を明らかにするために、次の D と E の検討を行った。

D. NoxIBAR 欠損細胞における Nox 以外の膜蛋白質の局在の検討：NoxIBAR をノックダウンした MDCK 細胞に NoxIBAR が作用しうるアミノ酸配列を持つ膜蛋白質を発現させて、その局在を domain-selective biotinylation 法や免疫蛍光染色法により検討した。

E. MDCK 以外の上皮細胞での NoxIBAR の発現検討：RT-PCR 法により、ヒト結腸癌由来の上皮細胞株 Caco-2 における NoxIBAR の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) NoxIBAR が Nox を apical 膜に局在させる分子メカニズム

Nox の局在制御に必要な NoxIBAR の機能を検討した結果、Nox に直接作用する機能に加えて NoxIBAR が持つ BAR ドメインの機能が必要であることが明らかになった。BAR ドメインは、脂質二重膜を変形させて管状構造を作る機能を有するドメインである。NoxIBAR の BAR ドメインを MDCK 細胞に発現させると apical 膜直下に管状の構造物が形成され、そこに Nox が集積する様子が観察された。一般的に、膜蛋白質は脂質二重膜によって形成される輸送小胞に積載されて細胞内の目的地に運ばれると考えられているが、NoxIBAR は Nox に直接作用して輸送小胞に引き込む受容体の役目を果たすと共に、自らが管状の輸送小胞を形成して Nox を apical 膜へと輸送する可能性が示唆された。

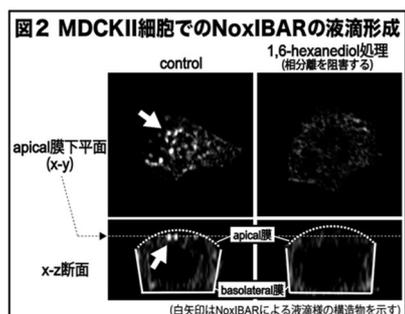
また、NoxIBAR の GAP ドメインの活性（低分子量 G 蛋白質の GTPase 活性を促進する）もまた NoxIBAR が Nox を apical 膜に局在させるために必要であることを明らかにした。さらに、相互作用解析により、2つの新しい NoxIBAR の結合蛋白質を見出した。これらの結合因子の機能を阻害すると、Nox の apical 膜局在が著明に減少した。従って、NoxIBAR による Nox の apical 膜局在化には低分子量 G 蛋白質や NoxIBAR 結合因子の働きが必要であり、これらが NoxIBAR による輸送小胞の形成やその後の apical 膜への輸送に必要である可能性が考えられた。

さらに、NoxIBAR の細胞内局在を観察した結果、NoxIBAR は apical 膜の直下に斑状の構造物を形成することを見出した(図2)。この構造物は、蛋白質の液-液相分離によって形成された液滴と非常によく似ており、液-液相分離を阻害する 1,6-ヘキサジオール処理により有意に消失した(図2)。また、NoxIBAR は液-液相分離をする可能性のある天然変性領域を持つことが予測プログラムにより明らかになった。従って、NoxIBAR は apical 膜直下で液-液相分離をする可能性が示唆された。この NoxIBAR 液滴の一部には Nox が集積しており、天然変性領域の一部を欠く NoxIBAR は Nox を apical 膜に十分に局在させることが出来なかった。NoxIBAR は、液-液相分離による液滴を形成することで、apical 膜直下に Nox を集積させて効率よく apical 膜へ輸送するのかもしれない。

以上のように、本研究では NoxIBAR が Nox を apical 膜へ局在させる分子メカニズム「NoxIBAR は液-液相分離による液滴を形成しながら Nox に直接作用すると同時に、幾つかの制御因子と共に自らが管状の輸送小胞を形成して Nox を apical 膜へと輸送する」を明らかにすることができた。特に、これまでに液-液相分離が膜蛋白質の apical 膜への極性輸送に関わる報告はなく、極性輸送を支える新しい分子メカニズムであることが考えられた。

(2) NoxIBAR は上皮細胞に発現する Nox 以外の膜蛋白質の局在制御にも必要である

NoxIBAR は上皮モデル細胞株 MDCK だけでなく、ヒト結腸癌由来の上皮細胞株 Caco-2 にも発現が認められ、さらに、グアニル酸シクラーゼ C などの膜蛋白質(その細胞質領域に NoxIBAR が作用するアミノ酸配列を持つ)の apical 膜局在に NoxIBAR が必要であることを示すことができた。これらの結果から、NoxIBAR による局在制御は、Nox 以外の膜蛋白質にも共通する分子機構であることが明らかになった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tocan Vlad, Hayase Junya, Kamakura Sachiko, Kohda Akira, Ohga Shouichi, Kohjima Motoyuki, Sumimoto Hideki	4. 巻 297
2. 論文標題 Hepatocyte polarity establishment and apical lumen formation are organized by Par3, Cdc42, and aPKC in conjunction with Lgl	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101354 ~ 101354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.101354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------