

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659084

研究課題名(和文)小腸の上皮形成の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of molecular mechanism of small intestine epithelia formation

研究代表者

原田 彰宏 (Harada, Akihiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：apical面への輸送に重要なsyntaxin3(STX3)のKOでは、apical面への輸送と細胞増殖の異常が生じる。そこでその輸送異常の分子機構を解析するため、温度感受性かつ薬剤で発現が上昇する細胞内輸送のマーカ一分子を作成し、それが通常の細胞で正常に機能することを確認した。それを小腸初代培養細胞に導入したところである。また分子機構を調べるため、STX3 f/fマウス小腸の初代培養細胞にCreを導入して培養中である。またCRISPR法でTX3を欠損する腸由来の細胞株を作成し、それが小腸の表現型を再現することを確認したため、この系も用いて分子機構の解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Deficiency in syntaxin3, known to be important in apical transport, caused defects in apical transport and cell proliferation in polarized cells. To know the molecular mechanism of these phenotype, we generated an apical marker protein which is expressed after drug administration. As the marker worked well in cell lines, we induced the gene into primary cultured cells and we will look at the transport after getting sufficient amount of cells. To make model system to examine the molecular mechanism, we introduced Cre recombinase into primary cultured cells and we are expanding the cells now. In addition, we successfully generated intestinal cell lines which lacks syntaxin3 by CRISPR method. As we observed similar phenotype in these cell lines, we are planning to use these cells for elucidation of molecular mechanism of apical transport and cell proliferation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 SNARE

### 1. 研究開始当初の背景

腸管の上皮細胞は陰窩にある幹細胞から分化し、陰窩と絨毛上を1層に覆う。腸の上皮細胞の頂端 (apical) 面と側底 (basolateral) 面という極性は、陰窩や絨毛の形成、維持や腸の機能に必須である。この上皮細胞の極性の形成や維持には、合成された蛋白質、脂質が輸送小胞に分配、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。極性輸送に関与する蛋白 (極性輸送関連蛋白) として多数の蛋白が現在知られている。

今日まで国内外で、極性輸送関連蛋白の機能の解析には主に培養細胞を用いられるため、複雑な腸管の陰窩や絨毛を形成する (管腔形成) の分子機構は不明である。それにも関わらずその解答を得るために必要な、極性輸送関連蛋白を欠損する動物の作製、解析も行われていない。

### 2. 研究の目的

応募者は以前、極性輸送に働く蛋白の管腔形成における機能を解明するため、Rab8 KO マウスを作製・解析した (Nature 448:366,2007)。しかし Rab8 KO マウスの解析では管腔形成の分子機構の解明まで至らなかった。その原因として、極性輸送を司る遺伝子が他にもあるためと想定し、線虫を用いて極性輸送に関与する新規遺伝子を多数同定した。

そこで研究代表者は更にこれらの新規遺伝子の KO マウスを作製すると共に (1) 結合分子を同定して管腔形成の分子機構の解明を行いたい (2) 近年小腸の陰窩や幹細胞を用いて、小腸上皮を再構成する系が開発された (Nature 459:262,2009) ため、この系を用いて生きた上皮細胞中の輸送を直接観察し、更に管腔構造形成への影響を直接解析したいと考えた。

### 3. 研究の方法

既知の極性輸送関連分子 (syntaxin3, SNAP23) KO マウスの解析

**Syntaxin3 小腸特異的 KO の解析**: apical 面への輸送に重要な syntaxin3 の KO では、apical 面への輸送の異常が生じる。そこでその輸送異常の分子機構を解析する。

A. 小腸特異的 KO 由来の腸の初代培養細胞に apical marker をウイルスベクターで導入し、その細胞内輸送をリアルタイムで観察する。

B. syntaxin3 の結合蛋白質を GST-pulldown 法、免疫沈降法、酵母 2 ハイブリッド法で同定し、どのような結合蛋白質 (特に SNARE 蛋白) が結合するかを解明する。

このマウスでは上皮細胞の増殖亢進も観察された。DNA microarray の結果、EGF ファミリーに属する増殖因子の転写亢進が見られたため、どのような分子機構でその遺伝子の発現亢進が生じるか、を下記の方法で解析する。

C. luciferase assay で promoter 内の転写因子結合部位を調べ、その配列などから転写因子候補を推測、同定する。

D. コントロールと KO の小腸から精製した核内の蛋白をマススペクトログラフィーによって比較し、KO で増加している転写因子を同定する。

E. 転写因子が分かれば syntaxin3 の欠損によってそれがなぜ増加するかを、KO の小腸の細胞の光学顕微鏡、電子顕微鏡による観察、初代培養細胞へのマーカーの取り込み等によって解明する。

F. 更に、このマウスが発ガン機構の解明に役立つかを調べたい。

この小腸特異的 KO では上皮細胞の増殖亢進は生じるが、発ガンには至らなかった。

(i) そこでこの KO に発ガン物質 (azoxymethane) を投与して、癌を発症するか調べる。

(ii) また、この KO は villin-Cre という、分化した上皮細胞で Cre recombinase を発現するマウスを用いたため未分化細胞で syntaxin3 を欠損しないことが発ガンしない原因とも考えられる。そのため、Lgr5-CreER という未分化小腸幹細胞で Cre を発現するマウスを用いて小腸幹細胞で syntaxin3 を欠損するマウスを作製し、そのマウスでの発ガンの有無を観察する。

**SNAP23 小腸特異的 KO の解析**: SNAP23 も apical 面への輸送に重要と言われるが、その小腸特異的 KO は出生前後に死亡し、その上皮細胞の形成不全が見られた。syntaxin3 の解析と並行して、その異常の分子機構を syntaxin3 同様に DNA microarray, 小腸の初代培養を用いて解析する。

線虫で同定した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

線虫の腸の RNAi によるスクリーニングによって、腸の上皮細胞の極性に重要な遺伝子を同定した。その結果、蛋白合成、シャペロン、脂質合成に関わる遺伝子に加え、細胞内輸送に関わる遺伝子も数多く同定された。これらの遺伝子には、低分子量 GTP 結合蛋白質に加え、その活性化因子、不活性化因子が含まれた。それらの遺伝子について、現在下記の実験を予定している。

I. これらの遺伝子の組織特異的欠損マウス (floxed mouse) の作製

II. これらの遺伝子産物 (蛋白質) に対する特異的抗体の作製

III. II の抗体を用いて、当該蛋白質の分布を WB、免疫染色で解析し、その後下記の手法によってその機能を解明する。

(1) 小腸特異的な KO マウスの作製 (2) 結合蛋白を GST-pulldown、免疫沈降法、酵母 2 ハイブリッド法で同定し、その蛋白の機能を解明する。

### 4. 研究成果

既知の極性輸送関連分子 ( syntaxin3, SNAP23 ) KO マウスの解析

#### Syntaxin3 小腸特異的 KO の解析

A. KO の腸の初代培養細胞内の apical marker の細胞内輸送をリアルタイム観察 :

Apical marker の construct が完成し、WT の腸での発現に成功した。これから KO の腸への導入を行う。

B - E. マウス個体を用いるのは技術的に困難なため、f/f マウスから樹立した小腸初代培養細胞に Cre recombinase を導入してマウス個体と同じ表現型を再現することを試みている。表現型を再現出来た場合、その細胞を用いて分子機構の解明を行う。更に、初代培養細胞と並行して腸の細胞株である Caco2 細胞に CRISPR/Cas9 法を用いて syntaxin3 を欠損させることに成功した。今後はその細胞も用いて分子機構の解明を進める予定である。

F. 発ガンとの関連について :

(i) この KO に発ガン物質 ( azoxymethane ) を投与して、癌を発症するか ? :

投与の結果、細胞増殖のさらなる亢進は見られたが、癌化は見られなかった。

(ii) Lgr5-CreER マウスを用いた発ガンの有無の観察 : 癌化は見られなかった。

SNAP23 小腸特異的 KO の解析 : 小腸特異的 KO の上皮細胞の異常の分子機構について : Syntaxin3 の解析の終了後行う。

線虫で同定した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

線虫の腸の RNAi によるスクリーニングによって、低分子量 GTP 結合蛋白質やその活性化・不活性化因子が極性に重要と考えられたため、下記の解析を行っている。

I. これらの遺伝子の KO マウスの作製 :

有力な候補である 2 遺伝子については既に KO マウスの作製が終了した。

II. これらの遺伝子産物に対する特異的抗体の作製 : 抗体の作製は終了した。

III. II の抗体を用いて、当該蛋白質の分布を WB、免疫染色で解析し、その後下記の手法によってその機能を解明する。

(1) 小腸特異的な KO マウスの作製 : I 遺伝子について終了し、線虫同様 apical への輸送に重要と判明した。

(2) 結合蛋白の同定と機能の解明 : 現在進行中。

#### 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 2 件 ) 全て査読有

Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A.

Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine.

*Biol. Open.* 2014 Dec 19. pii: BIO20148532. doi: 10.1242/bio.20148532.

Vacca B, Bazellieres E, Nouar R, Harada A, Massey-Harroche D, Le Bivic A.

Drebrin E depletion in human intestinal epithelial cells mimics Rab8a loss of function.

*Hum. Mol. Genet.* 2014 23: 2834-46. doi: 10.1093/hmg/ddt670.

[ 学会発表 ] ( 計 3 件 )

第 36 回日本分子生物学会年会 ( 神戸ポートアイランド ) ( 兵庫県神戸市 ) 1A57 個体レベルでのオルガネラバイオロジー

組織において、細胞内極性輸送を司る分子は細胞の極性や分泌などにどのように関わるか ? ( 2013 年 12 月 3 日 : シンポジウム口演 )  
原田彰宏

第 118 回日本解剖学会全国学術集会 ( 香川、サンポートホール高松、かがわ国際会議場 )  
新規 Rab8 結合タンパク質の機能解明  
吉村信一郎、中條淳博、東川浩子、後藤彩子、渡辺綾子、原田彰宏 ( ポスター : 2013 年 3 月 29 日 )

第 85 回日本生化学会大会 ( 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 ) ( 福岡県福岡市 )  
1S09 Roles of membrane trafficking on the construction of higher organisms  
Roles of membrane trafficking in cell polarity and secretion in model animals  
Akihiro Harada ( 2012 年 12 月 14 日 : シンポジウム口演 )

[ 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 :  
出願年月日 :  
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・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

(2)研究分担者

國井政孝 (KUNII Masataka)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80614768

(3)連携研究者

( )

研究者番号：