

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860140

研究課題名(和文)上皮極性輸送における新規分子Rab8BPの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a novel Rab8 binding protein on epithelial polarized transport.

研究代表者

吉村 信一郎(Yoshimura, Shin-ichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60584521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：不明であったRab8分子のメカニズムを明らかにした。まず新規分子Rab8BPを同定し、さらにRab8BPに結合する分子を同定した。その分子、Rab8BPIPはオルガネラ膜の湾曲を感知し、その形成を促進することが明らかになった。さらに小腸初代上皮培養細胞に対しRab8BPやRab8BPIPのノックダウンを行ったところ、頂端面方向に輸送されるタンパク質の輸送が特異的に阻害された。これらのことよりRab8-Rab8BP-Rab8BPIPは、これらが局在するリサイクリングエンドソーム上で膜小胞の出芽の前段階である膜の湾曲を形成する過程に機能、さらに頂端面方向の輸送を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Rab8 is involved in the apical transport in epithelial cells, however the molecular mechanism concerning Rab8 has still been obscure. Therefore we have tried to identify the binding protein for Rab8 (Rab8BP), and further we identified Rab8BP interacting protein (Rab8BPIP). Rab8BPIP is thought to be involved in membrane curvature sensing /generating protein, indicating that Rab8-Rab8BP-Rab8BPIP complex mediates the membrane curvature generation prior to the vesicle budding. When Rab8BP and Rab8BPIP were depleted in small intestinal organoids, the transport of apical cargo proteins was specifically inhibited. These data suggest that Rab8-Rab8BP-Rab8BPIP complex facilitate the apical cargo vesicle generation on the endocytic recycling compartment, where the ternary complex is localized.

研究分野：細胞生物学・組織学

キーワード：Rab 極性輸送 上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Rab は低分子量 GTP 結合タンパク質であり、特異的結合タンパク質(エフェクター)を介して細胞内小器官での膜輸送を制御する。我々は Rab8 が上皮細胞における頂端面方向への輸送や一次繊毛形成に重要なことを明らかにした(文献 1,2)。しかしこれまで一次繊毛形成を司る Rab8 のエフェクター分子の同定には成功したが、上皮内極性輸送を司るエフェクター分子の同定には至っていなかった。そこで私は Rab8 が主に機能する組織であるマウス小腸由来の cDNA ライブラリーを自作し、それを用いて酵母ツーハイブリッド法にて Rab8 の新規エフェクタータンパク質遺伝子、Rab8BP を同定した。Rab8BP には Rab8 結合ドメインの他、3 つの既知のドメインが確認されているが、それらは Rab8BP タンパク質分子内のわずか 30%を占めるに過ぎない。残り 70%の機能未知の領域に他のタンパク質が結合する可能性が考えられていた。

## 2. 研究の目的

本研究ではさらに Rab8BP に結合するタンパク質の同定を行い、Rab8 と Rab8BP を中心とした分子機能ネットワークの完全理解を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 小腸で発現、機能する Rab8 エフェクター分子 Rab8BP への結合タンパク質の同定

申請者は現在グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) -Rab8BP を大腸菌に発現、それを精製し、GST-Rab8BP に結合するタンパク質の候補をマウス小腸組織抽出液より GST-pull down 法を用いて同定を試みた。その結果得られたバンドを質量分析により特定を行った。

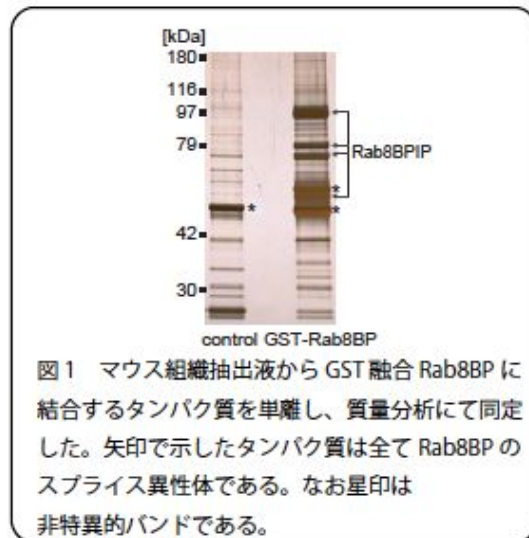
### (2) Rab8BP および新規 Rab8BP 結合タンパク質の細胞、組織及び個体での機能の解析

Rab8BP および新規 Rab8BP 結合タンパク質の細胞での局在をその抗体を用いた間接蛍光抗体法によって明らかにした。また、そ

の遺伝子のノックダウンをマウス小腸上皮の初代培養系について行い、小腸組織での機能を明らかにした。特に Rab8 の KO マウス由来の組織培養系と併せて、小腸での上皮細胞における極性輸送への影響を、各種マーカーを用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) -Rab8BP を大腸菌に発現、それを精製し、GST-Rab8BP に結合するタンパク質の候補をマウス組織抽出液より GST-pull down 法並びに質量分析を用いて同定を行ったところ、特定の新規タンパク質が高いスコアで検出された。ここではそのタンパク質を Rab8BPIP と呼ぶことにする(図 1)。



Rab8BPIP は細胞内小器官の膜を感知し、その形成を促進するドメインとして知られている BAR ドメインを有するタンパク質であり、Rab8-Rab8BP-Rab8BPIP 複合体はそれらが局在する膜構造にて、輸送小胞の出芽に先立ち、膜構造の湾曲を形成していることが示唆される(文献 3)。

(2) 新規タンパク質 Rab8BPIP と Rab8、および Rab8BP と間接蛍光抗体法にて細胞内局在を観察したところ、同一の細胞内小器官に共局在することが確認された。さらなる実験、観察によりこの細胞内小器官はリサイクリングエンドソームであることも明らかになった。mCherry 蛍光タンパク質を融合した各種モデルタンパク質の輸送を観察すると、頂端面細胞膜に輸送されるタンパク質が細胞

膜に到達する前に Rab8 や Rab8BP、Rab8BPIP が局在するリサイクリングエンドソームを通過することが明らかになった。さらに Rab8 や Rab8BP、Rab8BPIP の頂端面細胞膜へのタンパク質輸送への機能を明らかにするために初代小腸培養系の導入を試みた。マウス小腸から陰窩を単離し、これを細胞外マトリックス存在下で3次元培養した。その小腸由来の細胞でできた“袋”(シスト)を間接蛍光抗体法にて側底面、頂端面のマーカーで染色したところ、頂端面がシストの内側、側底面が外側にきれいに極性分布を保ったまま、培養できることが確認された(文献4)(図2)。

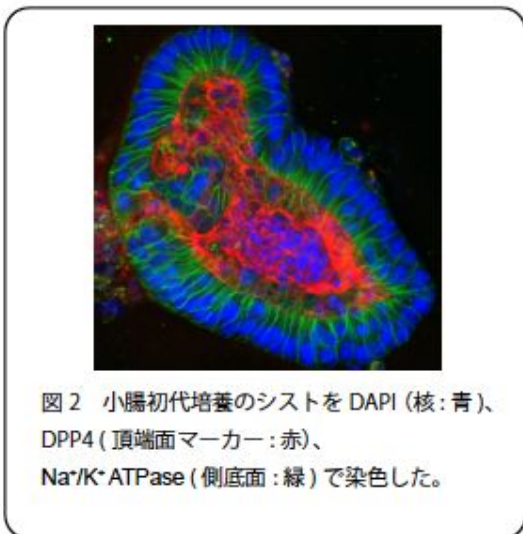


図2 小腸初代培養のシストを DAPI (核:青)、DPP4 (頂端面マーカー:赤)、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (側底面:緑)で染色した。

そこでこの初代小腸培養細胞にレンチウイルスを用いて Rab8BP、Rab8BPIP に対する shRNA を導入して、それぞれのタンパク質発現を抑制し、側底面、頂端面細胞膜の分布を

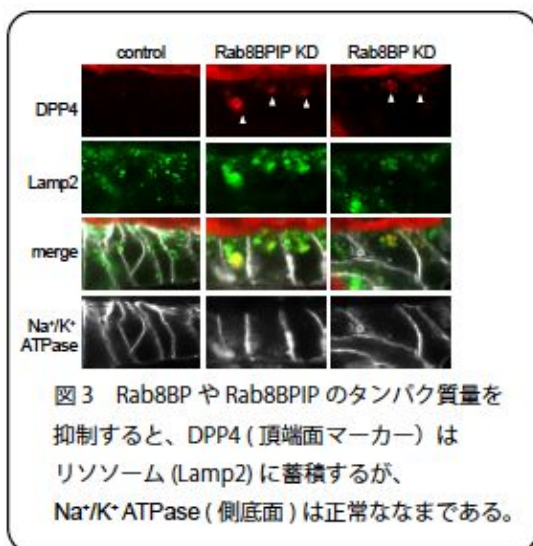


図3 Rab8BP や Rab8BPIP のタンパク質量を抑制すると、DPP4 (頂端面マーカー) はリソソーム (Lamp2) に蓄積するが、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (側底面) は正常なままである。

観察した。その結果、Rab8BP、Rab8BPIP の発現抑制により、頂端面細胞膜タンパク質が細胞内のリソソームに蓄積することが明らかになった(図3)。

この結果は Rab8 不全マウス由来の小腸から得た初代培養細胞においても同様のことが観察された。

以上のことより Rab8 は Rab8BP と Rab8BPIP が小腸上皮細胞内のリサイクリングエンドソーム上で頂端面細胞膜方向への輸送小胞の形成の段階を制御していることが明らかになった。なお、本研究結果は現在投稿準備中である。

#### <引用文献>

1. Yoshimura, S., J. Egerer, E. Fuchs, A.K. Haas, F.A. Barr. 2007. Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation. *J. Cell Biol.* 178:363 - 369. doi:10.1083/jcb.200703047
2. Sato, T., S. Mushiake, Y. Kato, K. Sato, M. Sato, N. Takeda, K. Ozono, K. Miki, Y. Kubo, A. Tsuji, R. Harada, and A. Harada. 2007. The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature.* 448:366-9. doi:10.1038/nature05929.
3. Daumke, O., A. Roux, and V. Haucke. 2014. BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell.* 156:882-92. doi:10.1016/j.cell.2014.02.017.
4. Sato, T., R.G. Vries, H.J. Snippert, M. van de Wetering, N. Barker, D.E. Stange, J.H. van Es, A. Abo, P. Kujala, P.J. Peters, and H. Clevers. 2009. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature.* 459:262-5. doi:10.1038/nature07935.

## 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)

Sbajima 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 localization in the intestine.  
Biol. Open 査読あり、Vol. 4 2014, 89-94

Avriyanti E, Atik N, Kunii M, Furumoto N, Iwano T, Yoshimura S, Harada A.  
Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity.  
Cell Struct Funct. 査読あり、Vol 39, 2014, 61-77

〔学会発表〕(計 2 件)

吉村信一郎  
細胞の極性輸送における細胞内小胞輸送の役割  
第 120 回日本解剖学会・全国学術集会(招待講演) 2015 年 3 月 21 日- 3 月 23 日、神戸  
吉村信一郎、原田彰宏  
新規 Rab8 結合タンパク質が上皮極性輸送二果たす役割  
第 90 回日本解剖学会近畿支部学術集会、2014 年 11 月 29 日、吹田

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉村信一郎 (Shin-ichiro Yoshimura)  
大阪大学・大学院・医学系研究科・助教

研究者番号： 60584521