

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860193

研究課題名(和文)新規細胞極性制御タンパク質Morg1の腎上皮組織形成における作用機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for epithelial development in kidney by the novel cell polarity protein Morg1

研究代表者

早瀬 純也 (HAYASE, JUNYA)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40621686

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)：細胞極性は、細胞の運命決定、細胞分化、および上皮細胞等の特殊な細胞集団による組織の形態形成など、多細胞生物の発生過程に必要な不可欠な現象である。上皮細胞の細胞膜は頂端膜と側基底膜に分かれており、頂端膜は体外環境に接し、側基底膜は細胞や細胞外基質に接している。このような頂端-基底極性が適切に形成されることが、上皮組織の形態形成や機能に必要なものである。最近、申請者は上皮細胞極性形成を制御するタンパク質としてMorg1を同定した。しかしながら生体内におけるMorg1の役割は未だ不明な点が多い。本研究では、Morg1欠損マウスを作出し、Morg1がマウスの初期発生過程に必要なであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cell polarization is crucial for development in multicellular organisms including cell fate determination, differentiation, and functions of specific cells, including epithelial cells, that underlie tissue morphogenesis. The plasma membrane of epithelial cells is asymmetrically organized into apical and basolateral domains. The apical membrane, facing the outside, is separated from the basolateral one, which faces neighboring cells and extracellular matrices. Formation of apico-basal polarity is required for both epithelial morphogenesis and function. Recently, we identified Morg1 as a novel epithelial cell polarity protein. However, roles of Morg1 in vivo have remained largely unknown. In this study, we have shown that Morg1 is essential for early embryonic development in mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Morg1

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物は、性質の異なる多様な細胞から構成される。これらの細胞の中には上皮細胞(図 1)、ニューロン、遊走細胞などのように非対称な形態を持つ細胞が存在する。例えば上皮細胞は、体外環境に接する頂端膜(apical 膜)と体内環境に接する側基底膜(basolateral 膜)という性質の異なる細胞膜ドメインからなる(図 1)。このような非対称性、すなわち細胞極性(cell polarity)は細胞固有の機能を発揮するために必要である。上皮細胞においては、上記のような異なる膜ドメインを有することで、消化管での栄養物の吸収や腎尿管での老廃物の排泄といった多細胞生物の個体維持に必須な役割を担うことができる。

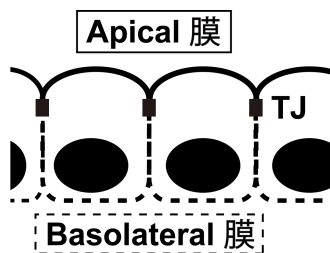


図 1 上皮細胞の構造

細胞極性制御に関わるタンパク質は、性質の異なる細胞極性においても共通の役割を担うことが多く、その中でも Par6 などの Par (partitioning defective) タンパク質群、atypical protein kinase C (aPKC)、および低分子量 G タンパク質である Cdc42 は細胞極性形成の主要制御因子としてよく知られている。Par6 と aPKC は進化的に保存された複合体を形成し、細胞極性制御において必須な役割を担う。上皮細胞においては、Par6-aPKC 複合体は apical 膜に局在し、apical 膜と basolateral 膜の分離、すなわち apico-basal polarity の形成に重要な役割を果たす。

申請者は近年、新規な Par6 結合タンパク質として MORG1 (mitogen-activated protein kinase organizer 1) を同定した。MORG1 は 7 つの WD40 リピートから構成され、タンパク質間相互作用の足場として機能する。申請者はこれまでに、腎尿管由来上皮細胞である MDCK (Mardin-Darby Canine Kidney) 細胞において、MORG1 は Cdc42 と apical 膜に局在する膜タンパク質 Crb3 と協調して、Par6-aPKC 複合体を apical 膜へリクルートし、さらに、apical 膜に安定的に局在させることを明らかにした。このように、MORG1 は Par6-aPKC 複合体の局在を制御する新規な細胞極性制御タンパク質であることが明らかとなったが、MORG1 の生体内での役割は今のところよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

これまでの研究において、申請者は培養細胞 (MDCK 細胞) を用いて MORG1 が上皮細胞極性形成に必要であることを明らかにしてきた。しかしながら、MORG1 が個体レベルでどのように働くかは明らかにされていない。生体内では上皮組織は腎臓のみならず、消化管、気管、肺胞など様々な器官を構成している。また、apico-basal polarity を有する細胞は上皮細胞に限らず、血管を構成する内皮細胞も同様の細胞極性を持つことが知られている。従って、MORG1 は腎上皮組織の発生過程だけでなく、他の器官の上皮組織および血管形成過程に働く可能性が考えられる。そこで、本研究では遺伝子改変技術を用いて MORG1 欠損マウスを作出し、その発生過程を解析する。この解析により、腎上皮組織を始めとした上皮組織形成および血管形成過程における MORG1 の役割を明らかにできると期待される。また、MORG1 はタンパク質間相互作用の足場として働くため、Par6 以外のタンパク質と結合して働くことも考えられる。そこで、マスマスペクトロメトリーを用いた新規 MORG1 結合タンパク質の探索も行い、生体内での MORG1 の機能の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) MORG1 欠損マウスの作出

MORG1 が胎生期の発生過程に必要なかどうかを明らかにするため、コンベンショナルな MORG1 欠損マウスの作出を行った ( )。この MORG1 欠損マウスが胎生致死である可能性も考えられたため、今後の研究で臓器特異的に MORG1 を欠失できるようあらかじめ MORG1 flox マウスを作出した ( )。コンベンショナルな MORG1 欠損マウスの作出には、MORG1 flox マウスを用いた。

MORG1 flox マウスの作出:

MORG1 flox マウス作出のための targeting vector は、MORG1 の 9 つの Exon のうち、Exon 6 から Exon 8 が loxP site で挟まれるよう設計した。この領域を欠失した MORG1 タンパク質は適切な構造を保てなくなるため、タンパク質間相互作用の足場としての機能が喪失すると考えられる。この targeting vector を用いて MORG1 flox マウスを作出した。

コンベンショナルな MORG1 欠損マウスの作出:

で作出した MORG1 flox マウスと EIIA-Cre マウスをかけあわせると、MORG1 を欠失した genome を含むキメラマウスが得られた。このキメラマウスと B6 マウスをかけ合わせることで、allele の一方で MORG1 を欠損するマウス (MORG1<sup>-/-</sup>) を作出することができた。

### (2) MORG1 欠損マウスの解析

Morg1 が胎生期の発生過程に必要なかどうかを明らかにするため、Morg1<sup>+/+</sup>同士のかけあわせを行い、Morg1 欠損マウス (Morg1<sup>-/-</sup>) がメンデル比に従い出生するかどうかを調べた。

Morg1 欠損胎仔 (胎生期 9.5~11.5) の HE 染色を行い、どの組織に異常が見られるかを観察した。

### (3) 新規 Morg1 結合タンパク質の探索

ヒト胎生期の腎臓由来である HEK293T 細胞に Morg1 を過剰発現させ、同タンパク質の免疫沈降を行った。共沈したタンパク質のアミノ酸配列をマスマスペクトロメトリーにより同定し、Morg1 に結合するタンパク質候補を明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1) Morg1 欠損マウスの解析

Morg1<sup>+/+</sup>同士のかけあわせを行い、Morg1 欠損マウス (Morg1<sup>-/-</sup>) が胎生致死であるかどうかを検討した。出生した胎仔の中に、Morg1 欠損マウスを見出すことはできなかった。Morg1 欠損マウスは胎生致死であると考え、time mating を行い、胎生期 9.5 日から 12.5 日の胎仔を観察した。得られた胎仔数は以下の通りである。

胎生	+/+	+/-	-/-	Total
9.5	7 (5.25)	10 (10.5)	4 (5.25)	21
10.5	5 (2.25)	2 (4.5)	2 (2.25)	9
11.5	3 (2.5)	4 (5)	3 (2.5)	10
12.5	5 (4.25)	9 (8.5)	3 (4.25)	17

( ) は期待値

表のように、胎生 9.5 日から 12.5 日にかけては Morg1 欠損マウスを得ることができた。しかしながら、このマウスは胎生 9.5 日の時点で、+/+ や +/- のマウスに比べて明らかに発育が悪かった。胎生 9.5 日以降は Morg1 欠損マウスの発育は見られず、胎生期 10.5 日以降に見られる現象、すなわち後肢芽の出現や中腸ヘルニアの出現、および目の着色は見られなかった。胎生期 12.5 日には死亡した胎仔の吸収が進んでおり、形態を明瞭に観察することはできなかった。一方で、これらの Morg1 欠損マウスはいずれも胎生期 8.5 日から起こる turning は終了しており、大きさは小さいものの、形態は +/+ や +/- マウスと比較して大きな違いは見られなかった。これらの観察結果から、Morg1 欠損マウスは胎生 9 日前後に致死となることがわかった。

胎生期 9.5 日の Morg1 欠損胎仔の組織切片を HE 染色し、全身を観察したところ、明瞭

な組織構築の異常は観察されなかった。今後は各上皮組織の構造をより詳細に観察していく。

本研究の当初の目的では腎上皮組織の形成過程、特に metanephric mesenchyme が上皮化し (epithelialization)、renal vesicle や S-shaped body を形成する過程における Morg1 の役割の解明を目指していた。しかしながら、epithelialization は胎生期 12.5 日に起こるため、今回作出したコンベンショナルな Morg1 欠損マウスでは、この過程における Morg1 の役割を明らかにすることはできなかった。今後は Morg1 flox マウスとネフロン形成極初期に Cre を発現する Pax3-Cre マウスや Six2-Cre マウス等をかけあわせることで、腎臓特異的に Morg1 を欠損させ、より詳細に Morg1 の腎上皮組織形成における役割を解析していく。

### (2) 新規 Morg1 結合タンパク質の探索

Morg1 結合タンパク質候補群の中でも特徴的なものとして、低分子量 G タンパク質 Rho family を活性化する GEF (guanine nucleotide exchange factor) が複数種類単離された。とくにその中の 1 種については非常に高いスコアで以て共沈しており、Morg1 と複合体を形成する可能性が高いと考えられる。今後はこの GEF と Morg1 が実際に結合するかどうか、また、Morg1 によるこの GEF への活性制御が存在するかどうかを明らかにしていく。

また、その他の Morg1 結合タンパク質として、微小管結合タンパク質、および細胞内輸送に関わるタンパク質が多く単離された。このマスマスペクトロメトリーの結果から、Morg1 は細胞内輸送に関わる可能性も考えられる。今後は、vesicle transport における役割も含めて Morg1 の解析を進めて行く。

## 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 1 件)

Satoru Yuzawa, Sachiko Kamakura, Junya Hayase, and Hideki Sumimoto  
Structural basis of cofactor-mediated stabilization and substrate recognition of the  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase  $\alpha$ TAT1  
*Biochem. J.*, 467, 103-113, 2015 <査読あり>

[学会発表](計 3 件)

知識 嘉奈子、鎌倉 幸子、早瀬 純也、住本 英樹  
「百日咳毒素は Gai と Ric-8A の結合を阻害することにより Gai のタンパク質レベルを減

少させる」

第 38 回 日本分子生物学会年会、第 88 回  
日本生化学会大会 合同大会 トーク  
2015 年 12 月 1~4 日  
神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場・神戸  
国際展示場・神戸商工会議所 (兵庫県・  
神戸市)

早瀬 純也、鎌倉 幸子、住本 英樹  
「新規 Par6 結合タンパク質 Morg1 は Crb3 お  
よび Cdc42 と共同して上皮細胞の apical 膜  
identity を確立する」  
第 87 回 日本生化学会大会 シンポジウム  
2014 年 10 月 15~18 日  
国立京都国際会館・グランドプリンスホテル  
京都 (京都府・京都市)

鎌倉 幸子、野村 政壽、早瀬 純也、  
岩切 優子、錦見 昭彦、高柳 涼一、福  
井 宣規、住本 英樹  
「GPCR からの新しいシグナリング経路:白血  
球の遊走制御機構」  
第 87 回日本内分泌学会学術総会 シンポジ  
ウム  
2014 年 4 月 24~26 日  
福岡国際会議場・福岡サンパレス (福岡  
県・福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織 (1)研究代表者

早瀬 純也 (HAYASE, Junya)  
九州大学大学院・医学研究院・特別研究員  
(PD)  
研究者番号: 40621686