

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07014

研究課題名(和文)上皮極性形成システム解明に向けたシステム構成因子の網羅的スクリーニング法の開発

研究課題名(英文)Development of the RNAi screening system for apicobasal polarity factors

研究代表者

本田 尚三 (HONDA, Shozo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：50778206

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文):多細胞生物にとって必須である上皮極性の分子メカニズムを解明するために、現在まで行われてこなかった遺伝子のすべてを解析する網羅的スクリーニング法の開発を行った。まず、すべての遺伝子の発現をそれぞれ抑制することができるsiRNAライブラリを使用するための適切な免疫蛍光染色の条件を確立した。本スクリーニング法は、互いに接着しない特殊な上皮細胞におけるZO-1(細胞間接着装置の構成タンパク)の形態を指標しており、その形態変化を数値として捉えることのできるアルゴリズムを構築した。その後、本スクリーニングを実行した。本研究の成果は、上皮極性を理解するための礎になるものと期待される。

研究成果の概要(英文):Epithelial cells have apicobasal polarity for asymmetric cellular function to maintain homeostasis in the body. Therefore, apicobasal polarity is essential for multicellular organisms. However, the comprehensive molecular system remains to be clarified. I developed a screening system for apicobasal polarity factors using R27 cells that are not capable of forming cell-cell adhesion. I found that R27 cells form apicobasal polarity and the shape of ZO-1, which is component of tight junction, was changed by knockdown of known factors in the cells. Thus, the shape of ZO-1 would be good marker of the state of the apicobasal polarity and would be applied to the screening system. Firstly, I determined appropriate immunofluorescence condition for ZO-1 in 384 well plate. Next, I established an algorithm for the detection and estimation of ZO-1 area that was ensured as acceptable assay. Lastly, I performed the screening using siRNA library and high-throughput image analysis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：上皮細胞 上皮極性 RNAi スクリーニング ZO-1 免疫蛍光染色

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、密に連結することで上皮シートを形成し、生体内部と外環境とを隔てる重要な役割を持つ。上皮細胞は生体内部の恒常性を維持するために、外環境に面するアピカル面と内部の基底膜に面するバソラテラル面で機能やタンパク質の局在が異なる極性を有している(図 1A)。すなわち、極性を持つことで膜輸送の方向もランダムではなく規則性を持たせている(極性輸送)。例えば消化管では、外部から栄養を取り込むトランスポーターはアピカル面に局在し、細胞内ナトリウムイオンを排出する Na⁺/K⁺ATPase はバソラテラル面に局在している。このことから、上皮極性は多細胞生物の生存において必須であり、その破綻はがんをはじめとする様々な疾患の原因となるため、その分子機構解明は生命科学・医学において重要な課題となっている。

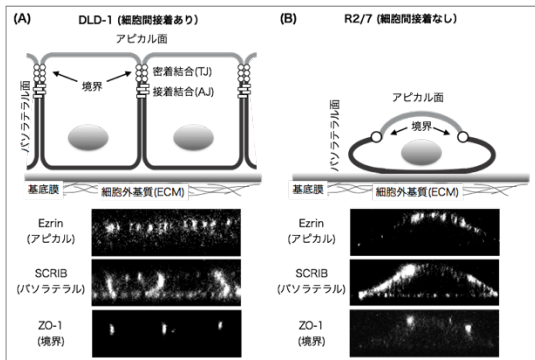


図1. 上皮細胞は極性を有し、細胞間接着装置を境界にアピカルとバソラテラルに分かれる。一方で細胞間接着装置を形成しないR2/7においても極性が形成される。

上皮極性の分子機構は、主に線虫やショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によって明らかにされてきた(Rodriguez-Boulant and Macara, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014)。線虫の非対称分裂の変異体から同定された前後軸の細胞極性に関わる PAR タンパク質に端を発し、多くの関連分子が同定された。それらの分子は進化的に保存されており、上皮極性においても中心的な役割を担っていることが明らかにされた。現在では、PAR-3/aPKC/PAR-6 複合体が CDC42 とともにアピカル・バソラテラル境界を、CRB/PALS1/PATJ 複合体がアピカル面を、DLG/SCRIB/LGL 複合体がバソラテラル面を互いに相互抑制しながら極性を確立・維持するというモデルが提唱されている(Suzuki and Ohno, *J. Cell Sci.* 2006)。しかしながら、上皮シートがロバストな形質を持ち変化を捉える事が困難なことから、現在まで RNAi などを用いた簡便な遺伝子操作による網羅的解析はなされておらず、上皮極性形成システムの包括的理解には至っていない。

その中で代表者は、大腸がん細胞株である DLD-1 の亜株であり、細胞間接着に必須の α -カテニンが欠損し細胞間接着しない R2/7 が単一で上皮極性を形成することを見出した(図 1B)。さらに、TJ の裏打ちタンパク質で

ある ZO-1 を免疫染色すると細胞膜直下にリングのように観察され、極性因子をノックダウン(KD)するとそのリングの大きさ、形状が変化することを見出した(図 2)。よって、R2/7 における ZO-1 のリングの形態から極性の変化を評価できると考え、この独自の評価法を RNAi スクリーニングに利用することによって、上皮極性形成システム構成因子を網羅的に同定できる画期的なシステムになると考えた。

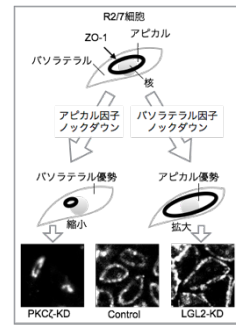


図2. 極性の擾乱に敏感に変化するR2/7のZO-1リングによって極性変化を捉える観察法

2. 研究の目的

本研究は、上皮極性の変化を鋭敏に捉えられる観察法を利用した RNAi スクリーニング法を開発し、上皮極性形成システム構成因子を網羅的に解析し、上皮極性形成システムの包括的な理解を目指す(図 3)。

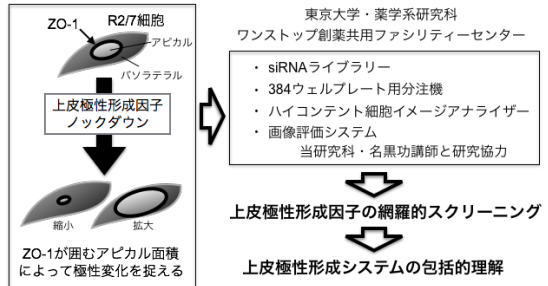


図3. 本研究の概要

3. 研究の方法

(1) 384 ウェルプレートを用いた免疫蛍光染色の条件検討
siRNA ライブラリーは 384 ウェルプレートに分注されているため、それに最適な細胞数、培養期間、固定法を検討した。

(2) ZO-1 の形態変化を検出可能なアルゴリズムの検討
大規模なスクリーニングを行う場合、実験手技による再現性や、プレートのウェル間のばらつきが問題になるので、再現性と感度の高い検出アルゴリズムを構築する必要がある。そこで、コントロールと縮小型の変化を示す CDC42, PARD3, PARD6B, PRKCZ、拡大型の変化を示す LLGL2 をそれぞれ 8 ウェルずつノックダウンし、ZO-1 の免疫蛍光染色を行った。ZO-1 シグナルの検出アルゴリズムを検討し、スクリーニング系の妥当性を評価する指標である Z'-factor を算出することで評価した。

(3) siRNA ライブラリーによる本スクリーニング
自動分注機と自動洗浄機による 384 プレートの染色方法を確立後、siRNA ライブラリーを用いて本スクリーニングを行った。

4. 研究成果

・研究の主な成果

(1) 免疫蛍光染色において 1% PFA, 4% PFA, TCA (氷上) による固定法を検討したところ、ZO-1 シグナルの S/N 比は 1% PFA, TCA, 4% PFA の順番で高かった。しかしながら、1% PFA では染色段階で多くの細胞が剥がれてしまうため、TCA による固定法が最適だと判断した。

個々の細胞の区画を検出するために、細胞質マーカーである GAPDH を同時に染色したところ TCA 固定で問題なく染色できた。細胞数は 1 ウェルにつき約 1500 細胞、培養期間は 3 日間が最適であった。

(2) スクリーニングの検出力を示す Z'-factor は一般的に 0.2 以上でスクリーニング可能な系とされる。代表者は、コントロールと 5 つの極性因子をそれぞれ 8 ウェルずつ KD し、ZO-1 シグナルの面積を数値化し Z'-factor を算出した。その結果、縮小型の 4 因子で 0.5 以上という高い検出力を示した(図 4A)。一方で拡大型である LLGL2 は検出不能であったが、核領域と重なる ZO-1 のみを数値化するアルゴリズムで算出したところ Z'-factor=0.48 となり、拡大型が検出可能となった(図 4B)。さらに、同時に検出した核領域以外の ZO-1 シグナルとの比を算出すれば、拡大型と縮小型の区別が可能になった(図 4C)。よって、縮小型、拡大型ともに検出力のあるスクリーニング系の構築が完了した。

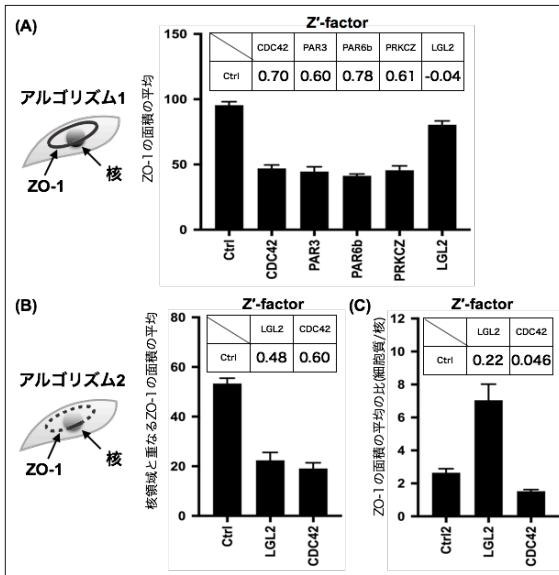


図4.縮小型、拡大型ともに検出可能なスクリーニング系の構築
アルゴリズム1: ZO-1の面積を数値化
アルゴリズム2: 核領域とそれ以外の領域と重なるZO-1を分けて数値化

(3) まず 384 ウェルプレートを用いて、自動分注機と自動洗浄機による細胞播種、免疫蛍光染色を行い、ZO-1 と GAPDH が正常に染色されることを確認した。その後、18,152 遺伝子に対する siRNA が分注された siRNA ライブラリー (計 70 プレート) を用いて、免疫蛍光染色後、自動画像取得装置によって網羅的に画像を取得し (7 視野/ウェル)、同時

に ZO-1 シグナルを検出し、その面積を算出した。

・得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究によって、R2/7 細胞の ZO-1 シグナルを指標とした独自の上皮極性因子のスクリーニング法を確立し、siRNA ライブラリーを用いた本スクリーニングの実行、データの取得まで至った。これは現在まで行われていなかった上皮極性因子の網羅的スクリーニングのさきがけであり、未知の因子の同定を含む上皮極性形成システムの包括的理解への礎となる成果である。

・今後の展望

本研究で得られたデータを統計学的に解析して、縮小型と拡大型、それぞれの候補遺伝子を抽出する。候補遺伝子に対してデータベースを用いたアノテーション解析を行い、上皮極性に関連する遺伝子群やパスウェイなどを抽出する。絞り込んだ候補遺伝子を個々に再度ノックダウンし再現性を確認後、分子生物学的・細胞生物学的・生化学的手法を駆使して機能解析を行い、上皮極性形成システムの包括的理解を目指す。

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 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

本田尚三、名黒功、米村重信
互いに接着しない上皮細胞を用いた上皮極性因子のゲノムワイド RNAi スクリーニング
第3回 メカノバイオロジー学会
2018年3月15日 東京大学 東京

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 尚三 (HONDA, Shozo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：50778206

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()