

令和元年5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07348

研究課題名(和文) Rab10の上皮極性輸送における役割

研究課題名(英文) The role of Rab10 in 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・講師

研究者番号：60584521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： Rab10に結合する機能未知のタンパク質を酵母ツーハイブリッド法を用いて同定した。当該分子はトランスゴルジネットワーク(TGN)及びリサイクリングエンドソーム(RE)に局在した。またRab10のKO細胞にPI4Kの阻害剤を処理すると、TGNおよびRE膜からの離脱が認められた。このことより当該分子はRab10およびPI(4)P、あるいはPI(4,5)P2、PI(3,4,5)P3のいずれかに依存してTGN及びRE上に局在することが予想される。しかしながら当該分子をKDした結果、当該分子は上皮極性輸送に限定した機能ではなく、より普遍的な輸送経路を制御する分子であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回同定した分子は全く解析がされていないものであった。その機能の一旦を明らかにしたことは、研究コミュニティへの大きな貢献であると考えている。本研究は細胞内輸送のメカニズムの全貌を明らかにするという壮大なプロジェクトのほんの一部であるが、このような研究の積み重ねにより細胞とは、そして生命とは何かという問いに答えることができるのである。

研究成果の概要(英文)： We identified a novel Rab10-binding protein with yeast two hybrid methods. The Rab10-binding protein was localized on the trans-Golgi Network (TGN) and the recycling endosome (RE). Rab10-BP rapidly dissociated from TGN and RE membrane upon PI4K inhibitor, PAO treatment, suggesting that the association of Rab10-BP to the organelles were depend on either PI(4)P, PI(4,5)P2, or PI(3,4,5)P3. Rab10-BP-KD revealed that the molecule function is not only for the polarized traffics.

研究分野：細胞生物学 生化学

キーワード：Rab membrane traffic

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Rab10 は細胞内のリサイクリングエンドソーム (RE) に局在し、トランスゴルジネットワーク (TGN) から送られてきた輸送タンパク質を細胞膜や細胞外など適切な場所を選別する役割が知られている。特に線虫やショウジョウバエにおいては上皮細胞において RE から側底面方向の輸送に機能することが示唆されているが哺乳動物細胞ではその役割について不明であった。

### 2. 研究の目的

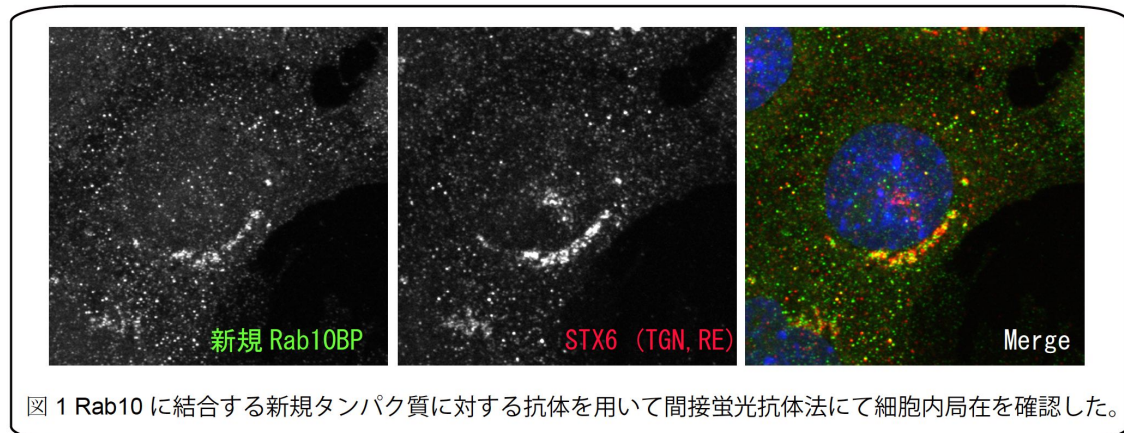
本研究では Rab10 の哺乳動物由来の上皮細胞での極性輸送への関与を明らかにし、他の Rab10 類似分子 (Rab8 や Rab13 など) との機能的差異を詳細に記述することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) Rab10 に結合する機能未知のタンパク質を、酵母ツーハイブリッド法を用いて同定した。
- (2) 同定したタンパク質に対する抗体を作製し、その抗体を用いて間接蛍光抗体法を行った。
- (3) 当該分子をノックダウンして、細胞内輸送および細胞極性形成・維持における役割を明らかにした。

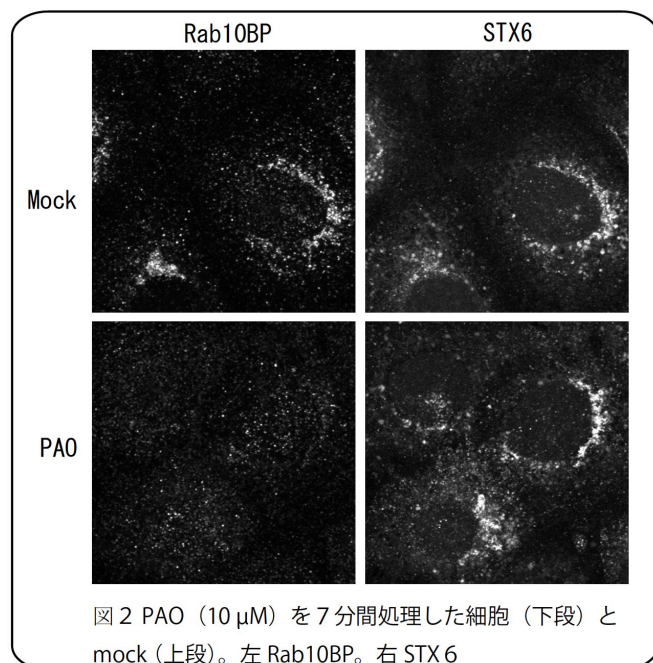
### 4. 研究成果

Rab10に結合する機能未知のタンパク質を酵母ツーハイブリッド法により同定した。まずその分子に対する抗体を作製し、間接蛍光抗体法を行ったところ、TGN及びREに局在することを明らかにした(図1)。またRab10以外の哺乳類のRabタンパク質(約60種類)について当該分子との



結合を酵母ツーハイブリッド法及びGSTプルダウンアッセイにより検証したところ、Rab10以外の分子への結合は確認できなかった。このことから当該分子はRab10特異的な結合分子と考えられる。さらにRab10のノックアウト細胞にフォスファチジルイノシトール-4リン酸キナーゼの

阻害剤であるPAOを処理すると、コントロールに比べて明らかなTGNおよびRE膜からの離脱が認められた(図2)。このことより当該分子はRab10およびフォスファチジルイノシトール-(4)リン酸、あるいはフォスファチジルイノシトール-(4,5)2リン酸、あるいはフォスファチジルイノシトール-(3,4,5)3リン酸のいずれかに依存してTGN及びRE上に局在することが予想される。さらに当該分子に結合するタンパク質の機能を明らかにするため、免疫共沈降反応により相互作用する分子の同定を行い、数種類の有



力な候補を得ることができた。これら候補分子に対する抗体を作製し、さらにエピトープタグを付加したcDNAを発現してそれぞれの細胞内局在を観察したところ、Rab10と同様にTGN及びREに局在することが確認された。さらにその遺伝子をノックダウンすると、一部分泌タンパク質や膜タンパク質に輸送速度の低下が見られた。しかしながら、超端面方向および側底面方向への選択性は確認されなかった。よってRab10の新規結合分子は上皮極性輸送に選択的に機能する分子ではなく、より普遍的な機能をTGN及びREで発揮することが分かった。今後は本研究を進展させ、今回同定されたタンパク質分子の詳細な機能を明らかにしたい。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Sobajima T., Yoshimura S<sup>1</sup>., Maeda T., Miyata H., Miyoshi E., and Harada A<sup>1</sup>. The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. *J Cell Biol.* 2018 Mar 7. pii: jcb.201709123. doi: 10.1083/jcb.201709123. [Epub ahead of print] (<sup>1</sup>共同責任著者) 査読あり
2. Teoh, J. J., Iwano, T., Kunii, M., Atik, N., Avriyanti, E., Yoshimura, S., Moriwaki, K., and Harada, A. (2017) BIG1 is required for the survival of deep layer neurons, neuronal polarity, and the formation of axonal tracts between the thalamus and neocortex in developing brain. *PLoS One.* **12**, e0175888 査読あり
3. Kunii, M., Ohara-Imaizumi, M., Takahashi, N., Kobayashi, M., Kawakami, R., Kondoh, Y., Shimizu, T., Simizu, S., Lin, B., Nunomura, K., Aoyagi, K., Ohno, M., Ohmuraya, M., Sato, T., Yoshimura, S., Sato, K., Harada, R., Kim, Y. J., Osada, H., Nemoto, T., Kasai, H., Kitamura, T., Nagamatsu, S., and Harada, A. (2016) Opposing roles for SNAP23 in secretion in exocrine and endocrine pancreatic cells. *J. Cell Biol.* **215**, 121-138 査読あり

### 〔学会発表〕(計 7件)

1. Joint meeting of the 51<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society of the Developmental Biologist & the 70<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society for Cell biology. 6月, 2018. 東京都.  
EHBP1L1 binds CD2AP  
Shin-ichiro Yoshimura
2. 第116回 日本解剖学会総会・全国学術集会. 3月, 2018. 東京都.  
新規 Rab11 結合タンパク質の解析  
吉村信一郎、傍嶋智明、原田彰宏
3. 第1回オルガネラゾーン研究会. 3月, 2018. 東京都  
Rab タンパク質とその制御因子、結合因子が司る細胞内膜輸送.  
吉村信一郎

4. 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 3 月, 2017. 長崎市.

The molecular function of a novel Rab8-binding protein in polarized transport.

Shin-ichiro Yoshimura, Atsuhiko Nakajo and Akihiro Harada

大阪大学歯学部セミナー招待講演. 11 月, 2016. 吹田市.

Characterization of Rabs, RabGAPs, RabGEF and Rab effector proteins.

Shin-ichiro Yoshimura

5. 第 68 回日本細胞生物学会・第 11 回日本ケミカルバイオロジ－学会. 合同学会. 6 月, 2016. 京都市.

Analysis of a novel Rab8-binding protein.

Shin-ichiro Yoshimura and Akihiro Harada

6. 第 198 回久留米大学分生研セミナー. 4 月, 2016. 久留米市.

Characterization of Rabs, RabGAPs, RabGEF and Rab effector proteins.

吉村信一郎

〔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:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原田 彰宏

ローマ字氏名：Akihiro Harada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。