

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17847

研究課題名(和文)上皮細胞の極性形成における細胞内膜融合関連分子の機能の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of SNARE proteins in the formation of epithelial cell polarity.

研究代表者

國井 政孝(Kunii, Masataka)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80614768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経細胞などの極性細胞がどのように極性を形成するかを解明することを目的とし、細胞内において蛋白質を輸送する小胞と細胞膜との融合に働くSNARE蛋白質であるSNAP23の遺伝子欠損マウス(KOマウス)の解析を行った。神経特異的KOマウスでは大脳や小脳の形成不全が生じ、SNAP23が大脳の形成に必須であることが示唆された。発生中の大脳皮質や小脳においてSNAP23は神経前駆細胞の頂端側に豊富に存在しており、細胞間接着分子であるN-cadherinの頂端膜への局在化に寄与していることが明らかとなった。SNAP23は細胞間接着の制御を介して神経前駆細胞の極性形成に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、SNAP23の機能に関する研究は主に培養細胞レベルで行われてきた。本研究によってSNAP23が細胞の極性形成を通して組織形成へ関与するという知見は培養細胞レベルの解析では得られないものであり、個体レベルでのSNAP23の機能を解析した本研究は学術的に意義のある成果であると考えられる。また、SNAP23 KOマウスの表現型は大脳皮質の形態異常が生じる滑脳症や二分脊椎、小脳の欠損が生じるダンディー・ウォーカー症候群などの疾患と何らかの関連があることも考えられるため、それらの病態解明や治療法の開発につながる可能性を持っていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) are essential for the membrane fusion between transport vesicles and target membranes. One of a SNARE proteins, synaptosomal-associated protein of 23 kDa (SNAP23) is known to be involved in membrane fusion between transport vesicles and the plasma membranes; however, the in vivo function of SNAP23 is largely unknown. To elucidate the function of SNAP23, we generated SNAP23 knockout (KO) mice.

The central nervous system (CNS)-specific KO mice showed severe hypoplasia of cerebral cortex and cerebellum, suggesting that SNAP23 is essential for brain development. In the developing KO brain, neural progenitor cells (NPCs) lost their apico-basal polarity by the disruption of apical junctional complexes (AJCs). We found that SNAP23 is important for the apical membrane localization of an AJC protein, N-cadherin. Our results indicate that SNAP23 play a crucial role in the NPC polarization via the formation of AJC.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 細胞内輸送 SNARE蛋白質 SNAP23 神経発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞や上皮細胞などの極性を持つ細胞では、細胞内で合成された蛋白質が適切な方向へ輸送され、適切な部位へ局在することが極性の形成・維持に重要である。細胞内での蛋白質輸送は脂質膜で包まれた小胞によって行われている。この小胞輸送において、小胞が受容側の膜と融合する際に働く蛋白質として soluble *N*-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 蛋白質が知られている。SNARE 蛋白質は小胞側に局在する v-SNARE と受容膜側に局在する t-SNARE に分類され、これらが複合体を形成することで膜同士を近接させ膜融合を促すと考えられている。現在、哺乳類では 38 種の SNARE 蛋白質が同定されているが、生体内における個々の SNARE の機能に関しては未知の部分が多い。そこで、我々は t-SNARE の一つである synaptosomal-associated protein of 23kDa (SNAP23) に着目した。SNAP23 は広範な組織で発現し主に細胞膜に局在し、ホルモンや消化酵素などの分泌過程に関与することが知られている。最近、我々は膵臓腺房細胞および内分泌腺特異的 SNAP23 遺伝子欠損 (ノックアウト) マウスの解析によって、SNAP23 が膵臓腺房細胞からのアミラーゼ分泌には必須であるが、ランゲルハンス島細胞からのインスリン分泌では逆に抑制的に働いていることを明らかにした (J Cell Biol. 215:1, 2016)。しかしながら、神経細胞や上皮細胞での機能、特に細胞の極性形成への関与といった点はよく分かっていなかった。

2. 研究の目的

組織、個体における SNAP23 の機能を解明するため、組織特異的ノックアウトマウスを作製し、その神経細胞や上皮細胞の極性形成における役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

SNAP23 は全身の様々な組織で発現しているため、全身でのノックアウトマウスは胎生致死となった。そのため、Cre-loxP システムによる組織特異的なノックアウトマウスを作製した。本研究では Nestin-Cre マウスによる中枢神経系特異的ノックアウトマウスを作製し、得られたマウスについて形態学的、細胞生物学的、生化学的解析を行った。

4. 研究成果

中枢神経系特異的 SNAP23 ノックアウトマウスは出生したが、発育遅延や運動機能障害が見られ、生後 3 週頃までに死亡した。生後 2 週令の脳の形態を観察すると、大脳皮質の高度な低形成や小脳の欠損が認められた (図 1)。この結果から、SNAP23 は大脳や小脳の発生において重要な役割を持っていると考えられた。そこで、胎生期の大脳皮質や小脳について更に詳しく解析を行った。抗 SNAP23 抗体を用いた免疫染色から、SNAP23 は神経前駆細胞に豊富に発現していることが判明した。神経前駆細胞は高度な極性を持った細胞で、脳室帯に存在する細胞体から頂端側である脳室壁、基底側である脳軟膜側へ長い突起を伸ばしている。SNAP23 はこの神経前駆細胞において特に頂端側の突起へ多く局在していることが明らかとなった。SNAP23 ノックアウトマウスの大脳皮質や小脳では、この神経前駆細胞の極性が失われており、それに伴って前駆細胞から分化する新生ニューロンの遊走異常や細胞死が生じていることが判明した。神経前駆細胞の極性形成には、頂端側の突起に形成される細胞間接着複合体 (apical junctional complex: AJC) が重要であると知られている。そこで、SNAP23 ノックアウトマウスにおける AJC の形成を解析したところ、頂端側の細胞膜に局在する AJC 構成分子である N-cadherin や ZO-1、Par3 などが減少していることが明らかとなった (図 2)。このことから、SNAP23 ノックアウトマウスの神経前駆細胞では細胞間接着分子の正常な局在化が障害されることで細胞間接着が失われ、極性の消失につながっていると考えられた。

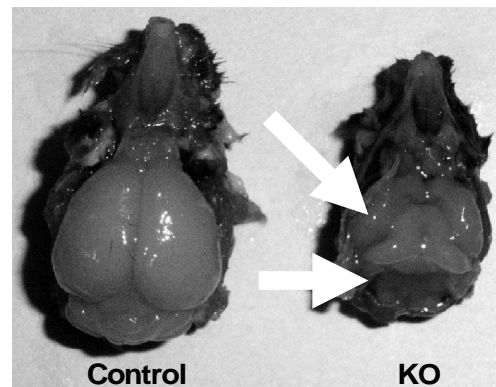


図 1: ノックアウトマウスでは大脳皮質の低形成と小脳の欠損を示す (矢印)

SNAP23 は輸送小胞と細胞膜との融合を促進する SNARE 蛋白質であるため、発生中の大脳皮質や小脳の神経前駆細胞では細胞間接着分子の細胞膜への局在化に関わっていることが推測された。このことを確かめるため、初代培養神経前駆細胞を用いて SNAP23 のノックダウンを行い、細胞間接着に関する解析を行った。まず、細胞同士の接着能を aggregation アッセイで解析したところ、SNAP23 ノックダウン細胞では細胞塊の有意な減少が見られ接着能が減少していることが示唆された。更に、細胞膜表面の膜蛋白質をビオチン化することで細胞膜に局在している N-cadherin の量を検討したところ、SNAP23 ノックダウン細胞でビオチン化 N-cadherin の有意な減少が認められた(図 3)。以上の結果から、SNAP23 が神経前駆細胞において N-cadherin の細胞膜への局在化に働いていることが明らかとなった。N-cadherin の細胞膜への局在化は AJC 形成の開始に重要であることが知られているため、SNAP23 欠損による N-cadherin の局在化の減少が AJC 形成の減少へとつながっていると考えられる。

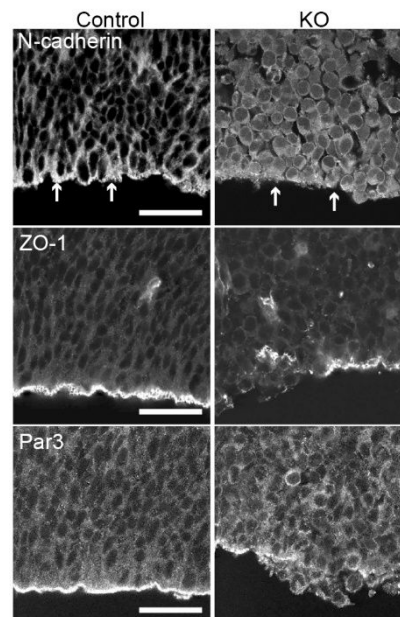


図 2 : 大脳皮質の免疫染色像
ノックアウトマウスでは脳室壁(矢印)で染色が弱く、細胞間接着が失われている。

SNARE 蛋白質による膜融合は、輸送小胞上に局在する vesicle-associated membrane protein (VAMP) と細胞膜上に局在する syntaxin および SNAP の 3 分子が複合体を形成することで促進される。そこで、我々は神経前駆細胞における N-cadherin の頂端膜への局在化がどのように調節されているか解明するため、SNAP23 と共同で働く SNARE 蛋白質の同定を行った。神経前駆細胞の溶解液を用いて抗 SNAP23 抗体による免疫沈降を行い、質量分析によって結合蛋白質の同定を行ったところ、5 種類の SNARE 蛋白質が検出された。これらの SNARE 蛋白質が、N-cadherin の細胞膜局在化に関与するか、初代培養神経前駆細胞を用いて検討した。それぞれの SNARE 蛋白質をノックダウンし、接着能を aggregation アッセイで解析したところ、5 種類の SNARE 蛋白質のうち 1 つの VAMP と syntaxin で接着能が減少することが確認された。これら 2 つの SNARE 蛋白質が N-cadherin の細胞膜局在化に関与するか、ビオチン化による膜局在量を検討したところ、SNAP23 と同様、それぞれのノックダウン細胞でビオチン化 N-cadherin の有意な減少が認められた(図 4)。

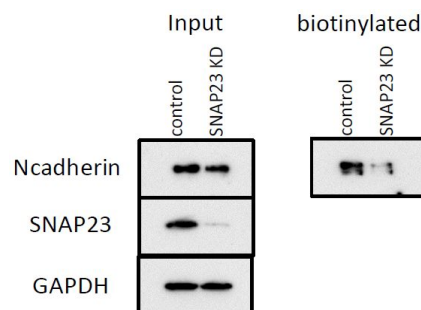


図 3 : SNAP23 をノックダウンした神経前駆細胞では細胞膜に局在する N-cadherin の量が減少する。

また、EGFP 標識した N-cadherin と mCherry 標識した VAMP を共発現した細胞を用いて、N-cadherin の細胞内輸送をライブイメージングで観察したところ、EGFP-N-cadherin と mCherry-VAMP が共局在している小胞が細胞膜方向へ移動していく様子が観察された。以上の結果から、神経前駆細胞においてこれらの VAMP、syntaxin が SNAP23 と共働して、N-cadherin の頂端膜への局在化に機能していることが示唆された。

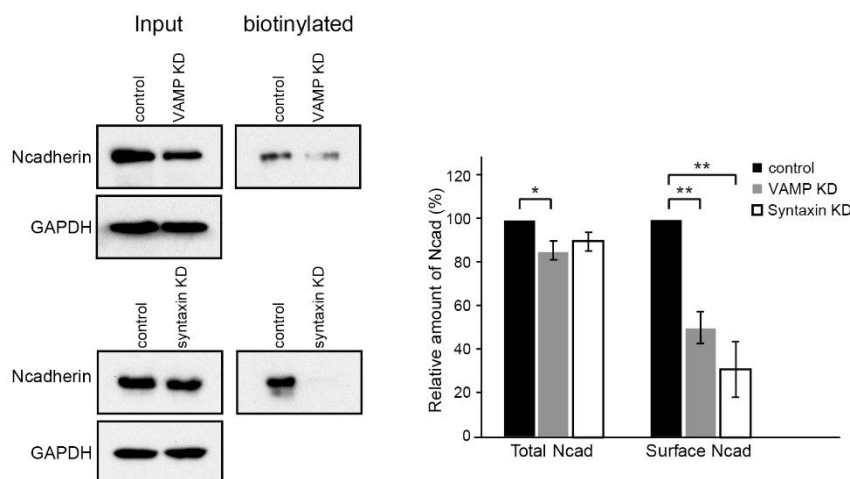


図 4 : SNAP23 と結合する VAMP、syntaxin をノックダウンした神経前駆細胞においても細胞膜に局在する N-cadherin の量が減少した。

更に、これらの SNARE 蛋白質が個体内においても N-cadherin の膜局在化に関与するか確認するため、CRISPR/Cas9 によるノックアウトを行った。Cas9 とそれぞれの SNARE 蛋白質に対する guide RNA を子宮内エレクトロポレーション法によってマウス胎児の大脳皮質に導入し、AJC の形成を解析した。その結果、SNARE 蛋白質がノックアウトされた大脳皮質領域において AJC の消失と神経前駆細胞の形態異常が認められた (図 5)。この結果から、これらの SNARE 蛋白質が個体内の神経前駆細胞においても N-cadherin の細胞膜局在化に関与していることが示唆された。現在、これらの成果を論文にまとめ、投稿中である。

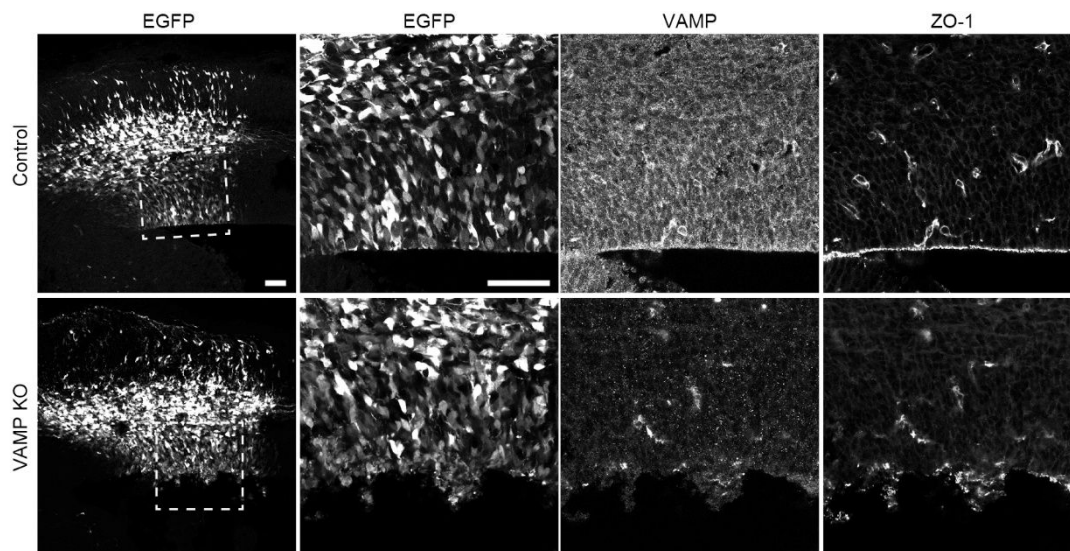


図 5 : 子宮内エレクトロポレーション法による VAMP ノックアウトの結果
VAMP がノックアウトされた領域において ZO-1 の染色も減少し、脳室壁の形態異常が生じた。

本研究ではこのように正常な脳の形態形成に重要な神経前駆細胞の極性形成のメカニズムの一端を個体レベルで解明した。個体を用いて解析することにより、培養細胞レベルの解析では見ることができない結果を得ることができたと考える。今後はさらに神経細胞や腸管上皮細胞などの極性形成における SNARE 蛋白質の役割を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Teoh JJ, Iwano T, Kunii M, Atik N, Avriyanti E, Yoshimura SI, Moriwaki K, Harada A.	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 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.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0175888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0175888.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masataka Kunii, Shin-ichiro Yoshimura, Akihiro Harada
2. 発表標題 Functional analysis of a SNARE protein SNAP23 in mouse brain development.
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井政孝、原田彰宏
2. 発表標題 大脳皮質および小脳の発生における細胞内小胞輸送関連分子の機能解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井 政孝、吉村 信一郎、原田 彰宏
2. 発表標題 神経前駆細胞の極性形成における細胞内小胞輸送関連分子の機能解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國井政孝、原田彰宏
2. 発表標題 大脳皮質および小脳の発生における細胞内小胞輸送関連分子SNAP23の機能解析
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 國井政孝、原田彰宏
2. 発表標題 脳の発生における極性輸送関連分子の役割
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	原田 彰宏 (Harada Akihiro)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究協力者	吉村 信一郎 (Yoshimura Shin-ichiro)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究協力者	森脇 健太 (Moriwaki Kenta)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	