

令和 3 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02594

研究課題名(和文)細胞の極性を制御する遺伝子の組織、個体での機能とその分子機構の解明

研究課題名(英文)Analyses of the in vivo roles of genes that regulate cell polarity and the elucidation of their molecular mechanism

研究代表者

原田 彰宏 (Harada, Akihiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：赤芽球の脱核の際リソソームと異なる多数の小胞が認められ、EHBP1L1KOマウスと野生型マウスの赤血球細胞膜の間で異なる蛋白質を同定した。EHBP1L1結合蛋白の候補分子同定を同定した。SNAP23結合分子としてVAMP8,syntaxin1Bを同定し、SNAP23、VAMP8、syntaxin1B KD全てでcadherinの細胞表面への輸送が低下した。live imagingにより、VAMP8とcadherinが同じ小胞で輸送されることを示した。新規のRab11結合蛋白RELCHを同定しRELCHはOSBPと結合してコレステロールをTGNへと輸送することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られていなかった赤芽球の脱核における膜輸送の分子機構を明らかにしつつある。これは異なる細胞で普遍的な極性輸送に分子機構があることを示唆する。また効率的に赤血球を作製できれば貧血の治療に役立つ可能性がある。SNAP23のKOマウスで大脳小脳の低形成が生じたため、SNAP23が脳の疾患の原因遺伝子に関与する可能性が示された。またcadherinの細胞膜への輸送経路の解明に寄与出来た。未知の点が多いコレステロール輸送にRab11やその結合分子RELCH、OSBPが関与する結果を得ることが出来た。コレステロールの輸送異常は様々な疾患を生じるため、その治療等に寄与する可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We identified many vacuoles distinct from lysosomes in enucleating erythroblasts. Different sets of proteins were identified between EHBP1L1 KO and WT RBC membranes by massspec. We identified candidate binding proteins for EHBP1L1.VAMP8, syntaxin1B were found to be binding proteins for SNAP23 and their knockdown perturbed the transport of N-cadherin to the plasma membrane of neural progenitor cells. By live imaging, we showed that VAMP8 and N-cadherin were co-migrated in cell processes. We identified novel Rab11 binding protein, RELCH. RELCH binds OSBP and Rab11-RELCH-OSBP complex localized between the recycling endosomes and the trans Golgi network (TGN) and plays a role in cholesterol transport from the recycling endosomes to the TGN.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は、apical 面、basolateral 面という細胞極性を持つ。細胞極性は組織の正常な発生や、分泌等の機能に必須であり、その異常は様々な疾患を生じる。細胞極性の形成、維持には、合成された分泌蛋白や膜蛋白がトランスゴルジネットワーク (TGN) 等で輸送小胞に分配・濃縮後、apical・basolateral 面へ輸送される。この方向性を持つ輸送を極性輸送と呼び、様々な蛋白の関与が知られている。

今日まで極性輸送の研究は、主に培養細胞株に対し、目的分子の過剰発現や siRNA 等による発現低下を用いて行われてきた (EMBO J. 23, 4166; JCB 163, 339 等)。しかしこの手法では (1) 組織や個体での機能が解明できない (2) siRNA では目的分子を完全には無くせない上、目的分子以外に影響を及ぼす可能性がある、などの限界がある。そのため我々は他に先駆けて、様々な極性輸送関連蛋白の遺伝子欠損 (KO) マウスを作成した

前頁に記したような KO マウスの解析結果より、我々は apical 面への輸送が組織やその中の細胞に対して以下のような影響を及ぼすことを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では更に、細胞の apical 面への輸送に関わる既知の蛋白 (syntaxin3, SNAP23 Rab11 等) やその結合蛋白 (EHBP1L1, Rab11BP) を欠損したマウスの作製と解析等を通じて

(1) apical 面への輸送が組織、個体でどのような役割を果たすのか?

(2) apical 面への輸送の分子機構はどうなっているのか?

という問いに対する答えを見出す。

### 3. 研究の方法

研究 1 ~ 3 の 3 つを並行して行った。

(研究 1) Rab8 結合蛋白 EHBP1L1 に関する研究 (研究分担者森脇を中心に行った)

EHBP1L1 の KO マウスでは赤血球の脱核に異常が生じ非常に重篤な貧血を呈した。そこで脱核過程における EHBP1L1 の機能を解析する。更に EHBP1L1 の結合分子を検索し、apical 面への小胞への積み荷の選別・出芽機構について詳細な解析を行った (下記 ~ )

光顕・電顕レベルでの免疫染色による EHBP1L1 の赤血球等の細胞内局在の解明

KO マウスと野生型マウスの赤血球の細胞膜の精製と iTRAQ 法による蛋白の組成の比較

赤血球、上皮細胞等を用いた EHBP1L1 結合蛋白の同定：上皮で候補分子同定済。

(研究 2) apical 輸送に必要な SNARE に関する研究 (研究分担者國井を中心に行った)

syntaxin3, SNAP23 は共に小胞と apical 細胞膜の融合に必要な SNARE 分子である。我々は

小腸特異的 syntaxin3 KO マウス：小腸上皮細胞の増殖亢進

神経特異的 SNAP23 KO マウス：大脳皮質や小脳の顕著な低形成

という表現型を見出したため、下記の研究を行った。

(1) syntaxin3 KO による細胞増殖亢進の分子機構や癌との関連

KO と野生型の小腸で mRNA の種類と発現量を RNAseq や microarray によって比較：KO マウスでどのようなシグナル伝達系が亢進するか?：同定済。

小腸上皮細胞の初代培養で in vivo の現象が再現可能か検証：再現可能なら、初代培養系を用いた過剰発現や shRNA, CRISPR による遺伝子解析が可能：検証中。

(2) SNAP23 は神経幹細胞同士の、脳室に面した (apical 面に相当する) 部位の adherens junction, tight junction 形成への関与が示唆されたため、細胞接着因子を輸送する小胞と細胞膜との融合に関与するという仮説を立ててその検証を行った (下記)

SNAP23 と結合する小胞に局在する v-SNARE 分子を同定し、その v-SNARE 分子を減少させ、SNAP23 KO マウス同様の表現型を示すか検証：候補分子同定済。

神経幹細胞で SNAP23 等を枯渇し細胞接着因子 (cadherin, occludin 等) の細胞表面量の定量および細胞接着因子の細胞内輸送の live imaging による観察：進行中。

(研究 3) 新規の Rab11 結合蛋白に関する研究 (研究分担者吉村を中心に行った)

我々は Rab8 に加え、Rab11 も apical 面への輸送に重要なことを示した。その分子機構を解明するため新規の Rab11 結合蛋白 Rab11BP を同定した。その機能の解析を行った (下記)

GST-pulldown 法等によって Rab11BP の結合蛋白の同定：既に 1 つ同定済。

Rab11BP の結合蛋白の機能解明：現在解析中。

#### 4. 研究成果

(研究1) Rab8 結合蛋白 EHBP1L1 に関する研究 (研究分担者森脇を中心に行った)  
光顕・電顕レベルでの免疫染色による EHBP1L1 の赤血球等の細胞内局在の解明  
赤芽球が脱核する際、赤血球になる領域には多数の小胞が認められ、それらは lysosome とは異なることが判明した。

KO マウスと野生型マウスの赤血球の細胞膜の精製と蛋白の組成の比較  
精製した細胞膜をマスマスペクトル法により KO マウスと野生型マウスの間で異なる蛋白質を複数同定できたため、それらが本当に KO と野生型で量が異なるかどうか、WB で比較する予定である。

赤血球、上皮細胞等を用いた EHBP1L1 結合蛋白の同定：上皮で候補分子同定済みだが、その分子が直接上皮極性に関与する知見がないため、更にその候補分子の結合分子を探索中である、

(研究2) apical 輸送に必須な SNARE に関する研究 (研究分担者國井を中心に行った)  
syntaxin3, SNAP23 は共に小胞と apical 細胞膜の融合に必要な SNARE 分子である。我々は小腸特異的 syntaxin3 KO マウス：小腸上皮細胞の増殖亢進  
神経特異的 SNAP23 KO マウス：大脳皮質や小脳の顕著な低形成  
という表現型を見出したため、下記の研究を行った。

(1) syntaxin3 KO による細胞増殖亢進の分子機構や癌との関連  
KO と野生型の小腸で mRNA の種類と発現量を RNAseq や microarray によって比較：KO マウスでどのようなシグナル伝達系が亢進するか？：同定済。

小腸上皮細胞の初代培養で in vivo の現象が再現可能か検証：syntaxin3 については、初代培養で apical 面のマーカーが細胞内に蓄積することを確認できたため再現可能なことを示すことが出来た。

(2) SNAP23 は神経幹細胞同士の、脳室に面した部位 (apical 面) の adherens junction, tight junction 形成への関与が示唆されたため、細胞接着因子を輸送する小胞と細胞膜との融合に関与するという仮説を立ててその検証を行った (下記)。

SNAP23 と結合する小胞に局在する v-SNARE 分子を同定し、その v-SNARE 分子を減少させ、SNAP23 KO マウス同様の表現型を示すか検証：VAMP8 を同定し、その KD で SNAP23 KD と同じ表現型を示すことが出来た。

神経幹細胞で SNAP23 等を枯渇し細胞接着因子 (cadherin, occludin 等) の細胞表面量の定量および細胞接着因子の細胞内輸送の live imaging による観察：SNAP23, VAMP8, syntaxin1B KD で cadherin の細胞表面への局在量が低下することを示すことが出来た。また live imaging により、VAMP8 と cadherin が同じ小胞構造に乗って輸送されることを示すことが出来た。

(研究3) 新規の Rab11 結合蛋白に関する研究 (研究分担者吉村を中心に行った)  
我々は Rab8 に加え、Rab11 も apical 面への輸送に重要なことを示した。その分子機構を解明するため新規の Rab11 結合蛋白 Rab11BP である RELCH (KIAA1468) を同定し機能解析を行った (下記)。

GST-pulldown 法等によって RELCH の結合蛋白として OSBP を同定した。

Rab11BP の結合蛋白の機能解明：OSBP は TGN に局在し、コレステロール輸送に関与することが知られている。本研究によって、外部から取り込まれたコレステロールがリソソームからリサイクリングエンドソームに輸送された後、Rab11-RELCH-OSBP の複合体が、TGN へとコレステロールを輸送することが判明した。これらの結果をまとめて Journal of Cell Biology に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Venditti R, Masone MC, Rega LR, Di Tullio G, Santoro M, Polishchuk E, Serrano IC, Oikonen VM, Harada A, Medina DL, La Montagna R, De Matteis MA.	4. 巻 218
2. 論文標題 The activity of Sac1 across ER-TGN contact sites requires the four-phosphate-adaptor-protein-1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 783-797
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201812021.	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 該当する
1. 著者名 Matsui S, Sasaki T, Kohno D, Yaku K, Inutsuka A, Yokota-Hashimoto H, Kikuchi O, Suga T, Kobayashi M, Yamanaka A, Harada A, Nakagawa T, Onaka T, Kitamura T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-07033-z	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 -
1. 著者名 Eguchi T, Kuwahara T, Sakurai M, Komori T, Fujimoto T, Ito G, Yoshimura SI, Harada A, Fukuda M, Koike M, Iwatsubo T.	4. 巻 115
2. 論文標題 LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 E9115-E9124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1812196115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aoyagi K, Itakura M, Fukutomi T, Nishiwaki C, Nakamichi Y, Torii S, Makiyama T, Harada A, Ohara-Imaizumi M.	4. 巻 159
2. 論文標題 VAMP7 Regulates Autophagosome Formation by Supporting Atg9a Functions in Pancreatic -Cells From Male Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3674-3688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada A	4. 巻 1
2. 論文標題 A Novel Contact by a Novel Protein Complex Supports Cholesterol Transport to the Endoplasmic Reticulum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 2.51526E+14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2515256418779685	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 -

1. 著者名 Takahara M, Kunii M, Nakamura K, Harada A, Hirano T, Kato Y, Nakayama K.	4. 巻 165
2. 論文標題 C11ORF74 interacts with the IFT-A complex and participates in ciliary BBSome localization.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 257-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy100	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10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 國井政孝、原田彰宏
2. 発表標題 大脳皮質及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 細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 The role of SNAP23 in the brain and the pancreas
3. 学会等名 Gordon conference: molecular membrane biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 Delivery of N-cadherin to the surface of neural stem cells is essential for development of the hippocampus and the cerebellum
3. 学会等名 2019 International Conference of Developmental Biology, Stem Cells and Regenerative Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

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 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shin-ichiro Yoshimura, Akihiro Harada
2. 発表標題 CD2AP binds EHBP1L1
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 The molecular mechanism of cell polarity in various cell types
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 Role of Rab11 in apical transport and non-vesicular cholesterol transport.
3. 学会等名 FASEB conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 A novel contact by a novel protein complex supports cholesterol transport from the recycling endosome to the trans-Golgi network
3. 学会等名 FEBS Golgi meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩野智彦、吉村信一郎、原田彰宏、竹田扇
2. 発表標題 一次繊毛長制御に関わるRab8結合タンパク質の機能解析
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 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 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院 細胞生物学 原田彰宏研究室 <a href="https://www.harada-lab.online/">https://www.harada-lab.online/</a> 大阪大学大学院 医学系研究科 細胞生物学 <a href="http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/">http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/</a>
---

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
研究分担者	吉村 信一郎  (Yoshimura Shinichiro)  (60584521)	大阪大学・医学系研究科・講師   (14401)	
研究分担者	森脇 健太  (Moriwaki Kenta)  (70778068)	東邦大学・医学部・准教授   (32661)	
研究分担者	國井 政孝  (Kunii Masataka)  (80614768)	大阪大学・医学系研究科・助教   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
イタリア	TIGM		