

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770160  
 研究課題名（和文） 上皮、神経細胞における極性形成維持機構の解析  
 研究課題名（英文） Investigation of mechanisms for the maintenance of cell polarity in epithelial and neuronal cells.  
 研究代表者  
 佐藤 隆史（SATO TAKASHI）  
 群馬大学・生体調節研究所・助教  
 研究者番号：70344934

研究成果の概要：細胞極性の維持には、蛋白質を各々の細胞膜領域へと運ぶ極性輸送が必須である。今までに作製した様々な極性輸送制御分子のKOマウスのうち、Rab8aKOマウスは小腸上皮細胞のapicalへの輸送に異常が現れ、微絨毛萎縮症との関連も示唆された。本研究では、Rab8aに類似したRab8bの機能の解明のため、Rab8b欠損マウスと、Rab8aとRab8bの両方を欠損するマウスの解析を行った。また、apical輸送におけるRab8aの分子機序解明のため、Rab8aと他のapical輸送関連分子の間での相互作用の検討も行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	800,000	0	800,000
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	690,000	3,790,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Rab8、上皮細胞、遺伝子欠損マウス、極性、トランスポーター

#### 1. 研究開始当初の背景

上皮細胞や神経細胞などの非対称な構造（極性）を持つ細胞では、タンパクや脂質成分の異なる2つの細胞膜領域に隔てられ、それぞれの領域が固有の役割を果たすことで正常な機能を維持している。この細胞極性の維持には、合成された蛋白質を別々の小胞に振り分けて各々の細胞膜領域へと運ぶ極性輸送

が必須である。小胞輸送を制御する分子としては、小胞の移動に関わるモーター分子や膜同士の融合に関わるSNAREの機能が重要視されてきたが、近年これらに加え、低分子量GTP結合タンパク質であるRabの分子機能が特に注目されている。

Rabは、一次構造の類似した低分子量GTP結合タンパクのファミリーであり、特定の細胞内輸送経路の輸送小胞の膜に局在し、それぞ

れの働きを制御している。Rab の分子機能は多種のエフェクター分子との相互作用を介して発揮されるが、それら多くは、特定の SNARE やモーター分子など小胞輸送に不可欠な分子であることが明らかになっている。このように、小胞輸送の各過程に寄与する分子との相互作用により、目的地への輸送を正しく制御するカギとしての Rab の役割がしだいに明確にされつつある。極性輸送においては Rab8a が、上皮細胞の apical, basolateral という 2 つの細胞膜領域のうちの basolateral 側への輸送の制御に重要であることが古くから指摘されていた。更に、この Rab8a に極めて構造の類似した Rab8b という分子が高等動物に存在することが明らかとなり、この分子も Rab8a 同様、極性輸送に何らかの役割を果たす可能性も大いに期待された。しかし現在まで Rab の機能については、培養細胞や下等生物を用いた実験により研究されてきたものの、高等動物の組織や個体において如何なる生理的な重要性を持つかについては、ほとんどが不明であった。

## 2. 研究の目的

1 で述べたような背景を受け、研究代表者は群馬大学に赴任以降、様々な極性輸送関連分子のノックアウト (KO) マウスの作製や解析を行ってきたが、なかでも Rab の機能に特に着目し、上皮細胞の極性輸送における重要性が示唆されていた Rab8a の KO マウスの作製と表現型の解析を行った。Rab8a の KO マウスは生後間もない時期に死亡した。詳細の結果、小腸の微絨毛の顕著な委縮や、細胞膜の apical 面の膜消化酵素やトランスポーター分子の分布の異常など、消化管上皮細胞の apical 面への輸送に重大な欠陥が観察された。これらの異常により、Rab8aKO マウスは小腸上皮の異常による栄養摂取障害により死に至ったものと考えられた。以上のような高等動物の個体レベルでの Rab8a 分子の重要性は、KO マウスの作製以前は全く未知であり、研究代表者らの研究で初めて明確となった (*Nature* 448: 366-369, 2007)。更に、この

マウスと同じ症状を呈するヒトの微絨毛萎縮症の患者の小腸で Rab8a の量の減少が見られ、Rab8a とこの病気の関連も示唆された。Rab8 群には、Rab8a に極めて類似した Rab8b という分子が各種臓器に存在する。Rab8b が Rab8a の機能の代償を行う可能性も考えられたため、本研究では、Rab8a 同様に Rab8b 欠損マウス並びに Rab8a, b 両方を欠損するマウスの作製と解析を行うことにした。更に先で述べたように、研究代表者がこれまでの研究で明らかにしてきた、消化管上皮細胞の極性輸送における Rab8a の機能は、未知の重要なエフェクター分子との相互作用により発揮されるものと推察される。そこで本研究では、消化管上皮細胞において極性輸送における Rab8 の機能を仲介するエフェクター分子の同定を試みることにした。

## 3. 研究の方法

### (1) Rab8bKOマウスの表現型の解析

すでに作製済みの Rab8bKO マウスは、出生後正常に発育したため、このマウスの組織の異常の有無を組織の HE 染色により詳細に解析した。更に長期間飼育による観察で、加齢に伴う生理的異常の有無を検討した。

### (2) Rab8a, Rab8bを同時に欠損する 2重遺伝子欠損 (ダブルKO) マウスの作製

現在までに作製が完了している Rab8aKO のヘテロ接合体 (Rab8a<sup>+/-</sup>) と Rab8bKO のヘテロ接合体 (Rab8b<sup>+/-</sup>) を交配させ、双方の遺伝子の 2重ヘテロ接合体同士を交配させてダブル KO マウス (Rab8a<sup>-/-</sup>, Rab8b<sup>-/-</sup>) を作製した。生まれた産仔の遺伝子型を PCR により同定し、ダブル KO マウスが出生可能かどうか、Rab8a 単独の KO マウスとの表現型の差異が見られるかなどを検討した。次に、消化管や腎臓、脳などの組織において、上皮細胞や神経細胞の極性マーカーの異常の有無を抗体染色により検討した。

### (3) Rab8aと他のapical輸送関連分子の間での相互作用の検討

apical 側への小胞輸送に関わる分子である

t-SNARE やモーター分子と、Rab8 分子自体の結合、並びに Rab8 に結合することが分かっている分子を介する相互作用を免疫沈降法により検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Rab8bK0マウスの表現型

Rab8bK0 マウスは出生後正常に発育したため、6 か月、12 か月、18 か月の各期間飼育した Rab8bK0 マウスの 12 臓器を組織染色したが、特にその構造に異常は確認されなかった。更に、18 か月飼育後の Rab8bK0 マウスの脳、腎臓、小腸における極性マーカーの分布を調べたが、特にその局在に異常は見られなかった。これらの結果より、Rab8b 単独の機能は極性輸送並びに生理機能に必須でないと考えられた。

##### (2) Rab8a, Rab8bを同時に欠損する 2 重遺伝子欠損 (ダブルK0) マウスの表現型

両 K0 マウスの系統を交配させ、ダブル K0 マウスを作製して解析した。その結果、出生したマウスの中から Rab8a, Rab8b 両者を欠損したダブル K0 マウスが確認され、Rab8a, Rab8b 両者を認識する抗体によるウェスタンブロットでも両者の欠損が確認できた。すなわち、作製したダブル K0 マウスは出生可能と考えられ、マウスの発生段階では Rab8 群の機能は必ずしも必要ではないと結論された。一方、出生後の解析では、ダブル K0 マウスは、Rab8a を欠損するため栄養失調で死亡し、Rab8a 単独の K0 マウスよりもさらに早期に死亡することが明らかとなった。これらのことより、他のいずれかの臓器で Rab8a, Rab8b の機能の代償が起きている可能性が考えられたため、ダブル K0 マウスの脳、腎臓、小腸において極性マーカーなどの分布の異常の有無を光学顕微鏡を用いて詳細に検討している。

##### (3) Rab8aと他のapical輸送関連分子の間での相互作用

apical 側への小胞輸送にかかわる可能性のある分子として t-SNARE やモーター分子も

数種同定されている。また今までに、何種かの Rab 分子と結合する MICAL 分子群や synaptotagmin-like protein (Slp) 分子群の一部がこれらの分子にも相互作用することが報告されていた。そこで Rab8a と MICAL 分子群や Slp 分子との相互作用を免疫沈降法により検討し、これらの一部が Rab8a と相互作用することを確認した。更に、最近我々の知見を元に他の研究グループが、微絨毛萎縮症の原因遺伝子として Rab8a に結合するモーター蛋白である MyosinVb を同定した (Nat. Genet. 40, 1163, 2008)。これらの結果を基に、Rab8a を中心とした apical 小胞輸送の制御分子基盤を本研究同様の方法を用いて今後詳細に解析していく。

#### 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 9 件)

- ① Uemura T, Sato T (共筆頭著者), Aoki T, Yamamoto A, Okada T, Hirai R, Harada R, Mori K, Tagaya M, and Harada A.: p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. *Mol. Cell. Biol.* 29: 1869-1881, 2009. 査読有
- ② Mogi C, Tobo M, Tomura H, Murata N, He XD, Sato K, Kimura T, Ishizuka T, Sasaki T, Sato T, Kihara Y, Ishii S, Harada A, and Okajima F.: Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 182: 3243-3251, 2009. 査読有
- ③ Sadakata H, Okazawa H, Sato T, Supriatna Y, Ohnishi H, Kusakari S, Murata Y, Ito T, Nishiyama U, Minegishi T, Harada A, and Matozaki T.: SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that modulates intestinal tumorigenesis. *Genes Cells*

14: 295-308, 2009. 査読有

- ④ Kato Y, Sugiura T, Nakadera Y, Sugiura M, Kubo Y, Sato T, Harada A, and Tsuji A.: Investigation of the role of oligopeptide transporter PEPT1 and sodium/glucose cotransporter SGLT1 in intestinal absorption of their substrates using small GTP-binding protein Rab8-null mice. *Drug Metab. Dispos.* 37: 602-607, 2009. 査読有
- ⑤ Hashimoto Y, Muramatsu K, Uemura T, Harada R, Sato T, Okamoto K, and Harada A.: Neuron-specific and inducible recombination by Cre recombinase in the mouse. *Neuroreport* 19: 621-624, 2008. 査読有
- ⑥ Muramatsu K, Hashimoto Y, Uemura T, Kunii M, Harada R, Sato T, Morikawa A, and Harada A.: Neuron-specific recombination by Cre recombinase inserted into the murine *tau* locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370: 419-423, 2008. 査読有
- ⑦ Yamamoto K, Sato T (共筆頭著者), Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, Harada A, and Mori K.: Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev. Cell* 13: 365-376, 2007. 査読有
- ⑧ Sato T, Mushiake S, Kato Y, Sato K, Sato M, Takeda N, Ozono K, Miki K, Kubo Y, Tsuji A, Harada R, and Harada A.: The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells. *Nature* 448: 366-369, 2007. 査読有
- ⑨ Fujio K, Sato M, Uemura T, Sato T, Sato-Harada R, and Harada A.: 14-3-3 proteins and protein phosphatases are not reduced in tau-deficient mice. *Neuroreport* 18: 1049-1052, 2007. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 佐藤隆史、細胞極性の維持におけるRab8aおよびRab8bの役割、第114回日本解剖学会総会、2009.3.28、岡山
- ② 佐藤隆史、Rab8は小腸上皮におけるアピカル蛋白の局在と微絨毛の維持に必須である、第60回日本細胞生物学会大会、2008.6.30、横浜
- ③ 佐藤隆史、極性輸送制御因子Rab8は、離乳後の小腸吸収上皮細胞apical蛋白の局在と栄養吸収機能に必須である、第113回日本解剖学会総会、2008.3.28、大分
- ④ 佐藤隆史、極性輸送制御因子Rab8は、離乳後の小腸吸収上皮細胞apical蛋白の局在と栄養吸収機能に必須である、第30回日本分子生物学会年会、2007.12.12、横浜

[その他]

ホームページアドレス

<http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 隆史 (SATO TAKASHI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：70344934