

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401
研究種目：挑戦的研究(萌芽)
研究期間：2019～2022
課題番号：19K22514
研究課題名(和文)細胞種を超えて保存される極性形成機構の解明

研究課題名(英文)basolatera

研究代表者

原田 彰宏(Harada, Akihiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRab8やRab8結合タンパク質の各組織での解析から、小腸上皮細胞の極性機構は赤芽球、T細胞、腎足細胞の極性形成機構と共通性があるが、腎尿管上皮細胞の極性機構とは異なる可能性があることを示した。その機構「Rab8依存性極性機構」が小腸の上皮細胞など上記の細胞種における極性の形成や維持に普遍的に働くことを示す以下の結果を得た。1.Rab8,10がこれらの細胞で発現が高い。2.Rab8やその結合タンパク質が細胞のリサイクリングエンドソーム(RE)に共同在する。3.赤芽球でこれらをノックダウンすると脱核効率が低下した。これらのデータをまとめて論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞極性の形成維持機構が上皮細胞の極性のみならず、赤芽球や骨格筋の核の極性移動にも関与していることが明らかになったことで、極性には共通の分子機構があることが初めて明らかになった。これは細胞極性の分子機構の共通性を初めて示したことで学術的意義は高い。また、Rab8/10結合タンパク質EHBP1L1のノックアウトマウスやRab10のノックダウンによって赤芽球の脱核効率が低下することからEHBP1L1やRab10が脱核に重要であることが明らかとなった。この研究からEHBP1L1、Rab10のagonistが脱核効率を上げて赤芽球産生を促進できる可能性が判明し社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：From the analysis of Rab8 and Rab8-binding proteins in various tissues, we found that the polarization mechanism of small intestinal epithelial cells has commonalities with those of erythroblasts, T cells, and renal podocytes and different from the one in renal tubules. We showed that the mechanism "Rab8-dependent polarity mechanism" works universally in the formation and maintenance of polarity in the above-mentioned cell types such as epithelial cells of the small intestine by the following observations. 1.Rab8 and 10 are highly expressed in these cells. 2. Rab8 and its binding proteins co-localize to cellular recycling endosomes (RE). 3. Knockdown of these in erythroblasts decreased the enucleation efficiency. These data were compiled and published in a paper.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 脱核

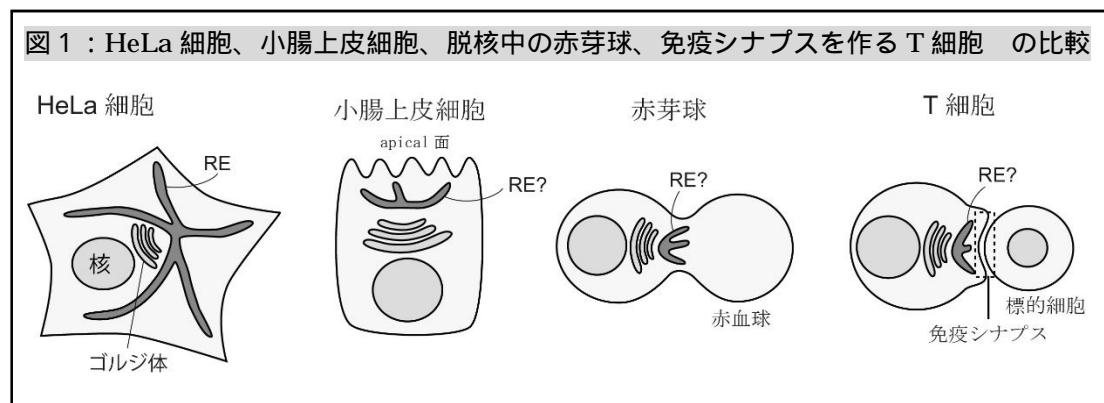
1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は明らかな方向性(極性)を持つが、上皮細胞以外にも極性を持つ細胞は存在する。これら異なる種類の細胞間での細胞極性の分子機構の普遍性は何となく想定されてはきたが、根拠が乏しかった。しかし我々は、Rab8 やその結合分子の解析をする中で、小腸の極性形成機構が小腸とは全く形態が異なる血球系等の極性形成機構と共通する可能性がある一方、腎臓尿管上皮の極性形成機構と異なる可能性が高いという以下1~4の証拠を得た。

(1) Rab8 KO マウスでは小腸の上皮細胞には apical 面のタンパク質の分布異常が見られたが、腎臓の上皮細胞では殆ど異常が見られない (*Nature* 2007)。

(2) 我々が同定した、Rab8 結合タンパク質 EHP1L1 は小腸や肺などで発現が高いが、腎臓では殆ど発現していない (*JCB* 2016)。

(3) EHP1L1 の KO マウスは小腸の極性に異常を示すと共に、赤芽球の脱核効率が顕著に低下し無核赤血球の数が激減する。つまり小腸上皮細胞の極性形成機構が、赤芽球の脱核(極性を持つ核の排除過程)という別種の細胞の極性形成過程(図1)と共通する可能性がある。



(4) 更に EHP1L1 の結合蛋白として我々が腸由来の細胞から同定した CD2AP (JBC 2023) は、T 細胞で発現する CD2 分子の細胞質ドメインに結合し、CD2 を免疫シナプス(T 細胞が抗原提示細胞などと情報交換するために特異的な接着構造)に極性を持って集積させるために必要なことが知られている。更に CD2AP は apical 面に局在する膜貫通タンパク質や、腎臓の糸球体の足細胞の尿を濾過する膜を形成する膜貫通タンパク質の細胞質ドメインにも結合し、CD2AP の KO マウスでは糸球体の濾過膜が正常に形成されないため、尿中のタンパク質が濾過されず尿中に漏出することが知られている。

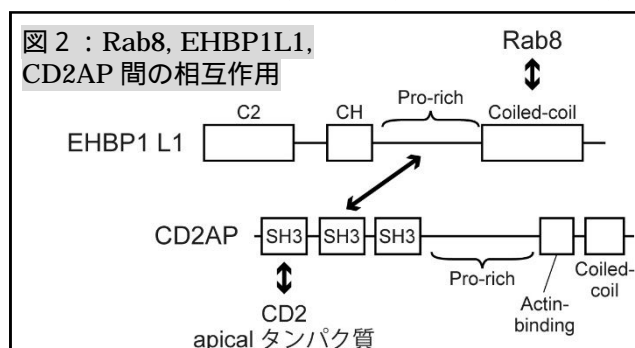
これらの結果を踏まえ、更に細胞種間の極性形成維持機構の普遍性を支持する解析を行うため、本研究を構想するに至った。

2. 研究の目的

上皮細胞は apical (頂上) 面と basolateral (側底) 面といった決まった方向性(極性)を持つ。しかし上皮細胞以外にも極性を持つ細胞は存在するが、それらの細胞の極性(形成維持)の分子機構と上皮細胞の極性の分子機構は共通であろうか? そのような「細胞極性の分子機構の細胞種間における普遍性」は何となく想定されてはきたが、根拠が乏しかった。

我々は Rab8 や Rab8 結合タンパク質 EHP1L1、EHP1L1 結合タンパク質 CD2AP (図2) の、各組織での量、細胞内局在、ノックアウト(KO)マウスの解析から、小腸上皮細胞の極性機構は赤芽球、T 細胞、腎臓足細胞の極性形成機構と共通性があるが、腎臓尿管上皮細胞の極性機構とは異なる可能性を提示している。

我々はここでその共通機構を「Rab8 依存性極性機構」と呼び、これが、小腸の上皮細胞、赤芽球、T 細胞、腎臓の足細胞など、多くの種類の細胞における極性の形成や維持に普遍的に働くことを実証することを本研究の目的とした。



3. 研究の方法

上記仮説にはまだ証拠が不十分であるため、本仮説を更に補強する証拠を得る必要があった。そのため下の(1)~(3)を行った。研究は大学院生2名が主体となり、申請者は一部の研究の遂行と指導監修を行った。

- (1) Rab8, EHBP1L1, CD2AP の発現が小腸、赤芽球、T細胞、足細胞で共に高いかどうか？
- (2) Rab8, EHBP1L1, CD2AP が細胞内で同じ細胞小器官(リサイクリングエンドソーム: RE)に存在するか？更に apical 面に局在するタンパク質の細胞内輸送を可視化し、Rab8, EHBP1L1, CD2AP が局在する部位(RE)を通過するか？
- (3) Rab8, EHBP1L1, CD2AP の KO マウスが共通する表現型を示すか？

4. 研究成果

A. (1)~(3)についての成果をまず述べる。

(1) Rab8, EHBP1L1, CD2AP の発現が小腸、赤芽球、T細胞、足細胞で共に高いかどうか？
→小腸、赤芽球、T細胞でこれらの発現が高いことを RNAseq, WB などによって確認した。

(2) Rab8, EHBP1L1, CD2AP が細胞内で同じ細胞小器官(リサイクリングエンドソーム: RE)に存在するか？更に apical 面に局在するタンパク質の細胞内輸送を可視化し、Rab8, EHBP1L1, CD2AP が局在する部位(RE)を通過するか？

→Rab8, Rab8 の類縁分子である Rab10, EHBP1L1 が細胞内で RE (CD71 が染まる部位) に局在することを確認した(図3)。CD2AP については染色に使えるよい抗体がなかったため、観察できなかった。

(3) Rab8, EHBP1L1, CD2AP の KO マウスが共通する表現型を示すか？

→Rab8 KO マウスは以前の報告通り、EHBP1L1 KO マウスのような貧血の症状は示さなかった。赤芽球では Rab8 の類縁分子である Rab10 が Rab8 よりも多く発現しており、赤芽球の細胞株でノックダウンを行ったところ、脱核効率の低下を示した。また CD2AP のノックダウンでは脱核効率に異常がなかったが、Bin1 のノックダウンや dynamin 阻害剤で脱核効率が低下したことから、赤芽球では Rab10→EHBP1L1→Bin1→dynamin という系が脱核に必要な膜輸送に関与していると考えられる。

B. イヌの EHBP1L1 遺伝子の異常で貧血と中心核ミオパチーを示すことが近年報告された。並行して我々も EHBP1L1 KO マウスで骨格筋の核の極性が低下することを発見した(次ページの図4)。

以上の EHBP1L1 の機能と分子機構をまとめて、22年度末に *Blood Advances* に報告した。

図3 A. EHBP1L1 は RE のマーカーである CD71 と共局在する(矢印) C. EHBP1L1 は Rab10 と共局在する(矢印)

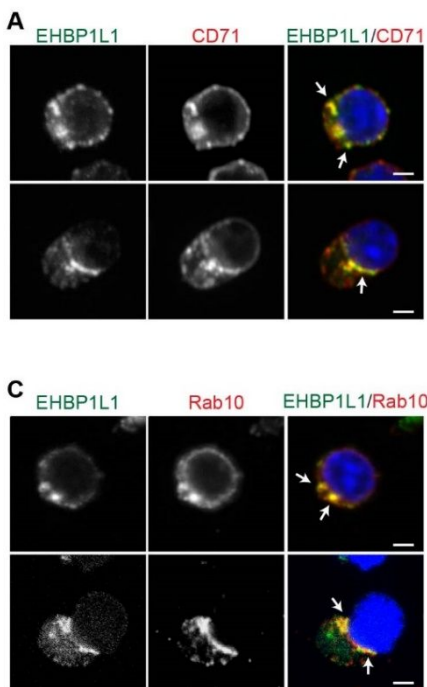


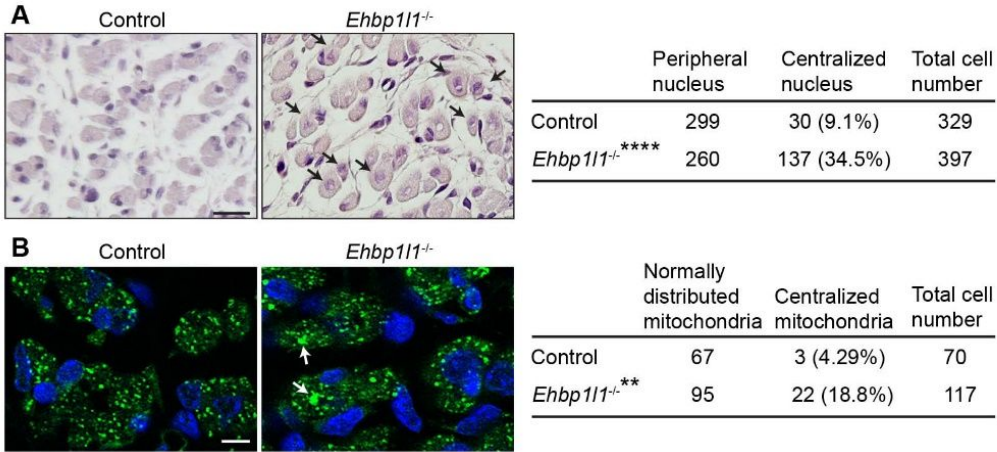
図 4

A 左：EHBP1L1 KO マウスの骨格筋では核が細胞の中心に局在する（矢印）

A 右：細胞の中心に局在する核を持つ細胞の割合

B 左：EHBP1L1 KO マウスの骨格筋ではミトコンドリアが細胞の中心に局在する（矢印）

B 右：細胞の中心に局在するミトコンドリアを持つ細胞の割合



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 M Kitano, Y Kizuka, T Sobajima, M Nakano, K Nakajima, R Misaki, S Itoyama, Y Harada, A Harada, E Miyoshi, N Taniguchi	4. 巻 296
2. 論文標題 Rab11-mediated post-Golgi transport of the sialyltransferase ST3GAL4 suggests a new mechanism for regulating glycosylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100354	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 Ji Wu, Kenta Moriwaki, Tatsuya Asuka, Ritsuko Nakai, Satoshi Kanda, Manabu Taniguchi, Tatsuki Sugiyama, Shin-ichiro Yoshimura, Masataka Kunii, Takashi Nagasawa, Naoki Hosen, Eiji Miyoshi, Akihiro Harada	4. 巻 7
2. 論文標題 EHBP1L1, an apicobasal polarity regulator, is critical for nuclear polarization during enucleation of erythroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2022008930	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田彰宏、傍嶋智明、吉村信一郎
2. 発表標題 リサイクルエンドソームと TGN との間のコンタクトサイトを介した、Rab11-RELCH-OSBP 複合体によるコレステロール輸送
3. 学会等名 日本細胞生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 Roles of Rabs for apical transport, ciliogenesis, and diseases: lessons from knockout mice.
3. 学会等名 International seminar at National Taiwan University (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Harada
2. 発表標題 The molecular mechanism of cell polarity and its impact on clinical research
3. 学会等名 International seminar at Konkuk University, Korea (招待講演)
4. 発表年 2019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
<https://www.harada-lab.online/>
 大阪大学大学院 細胞生物学 原田彰宏研究室
<https://www.harada-lab.online/>

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	呉 際 (Wu Ji)		

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
---------	---------