

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390050

研究課題名（和文） 細胞の極性を制御する遺伝子の組織、個体での機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of functions of genes involved in cell polarity in vivo

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

研究成果の概要（和文）：細胞極性のメカニズムの解明のため、極性輸送に関与する遺伝子のノックアウト（KO）マウスの作製、解析及び、線虫を用いた新規遺伝子のスクリーニングを行った。前者の成果：Rab8a, bの二重欠損マウスは、線毛形成の異常が予想されたが、そのような表現型が見られなかった。またVAMP7は上皮細胞の極性に重要といわれているが、上皮細胞の極性はKOマウスで正常だった。後者の成果：スクリーニングは終了し、一部の遺伝子についてはKOマウスを作製中である。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of cell polarity, we knocked out genes involved in polarized transport. In addition, we tried to find out novel genes involved in cell polarity using the worm, *C. elegans*. As we found various phenotypes in our knockout mice, we are preparing manuscripts for the analyses of knockout mice. We finished screening of *C. elegans* in search of novel genes. We are now making knockout mice for some of the novel genes now.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2011年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：解剖学、細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞極性、ノックアウトマウス、極性輸送、線虫、Rab8、線毛

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は頂端側（apical）と側底側（basolateral）、神経細胞も軸索と樹状突起という極性を持つことが、組織、器官の正常な発生や、分泌、刺激の伝達等の機能に必須である。極性の形成、維持には、合成された分泌蛋白や膜蛋白が TGN 等で輸送小胞に分配、濃縮された後、apical や basolateral に運ばれる必要がある。この方向性のある輸送を

極性輸送と呼ぶ。極性輸送に関与する蛋白（極性輸送関連蛋白）として低分子量 GTP 結合蛋白質（Rab8）、SNARE 蛋白（Syntaxin3, VAMP7, SNAP23）などが重要であることが知られている。今日まで国内外において、極性輸送関連蛋白の研究は主に MDCK 細胞（腎臓の遠位尿細管由来）などの培養細胞を用い、当該分子の過剰発現や antisense DNA, siRNA 等による発現低下を用いて行われてきた。し

かしこの手法では(1)他の組織、ひいては個体における当該分子の機能が全く分からないこと(2)siRNAでも目的の蛋白を完全には無くすることが出来ないことや、目的分子以外の分子に働く可能性もあること、などの限界がある。更に、(3)極性輸送関連蛋白を欠損する動物の作製、解析は殆ど行われていない。

2. 研究の目的

本研究は極性輸送関連蛋白の組織や個体における、より正確な役割を知るために、極性輸送関連蛋白の時期、組織特異的ノックアウトマウスを作製して解析する。また線虫を用いて極性輸送に関与する新規分子を同定し、極性輸送の分子機構の包括的な解明を行う。

3. 研究の方法

既知の極性輸送関連遺伝子については組織特異的KOマウスを作製し、解析を行う。既にいくつか予期しない表現型が見られたため、極性の解析と合わせてそれらの表現型も解析する。更に新規の極性輸送関連遺伝子を同定するため、腸のapical, basolateralで蛍光を発現する線虫でRNAi libraryを用いたノックダウンを行い、apical, basolateral markerの発現パターンを異常にする遺伝子を同定する。これらの新規遺伝子についてもKOマウスを作製し、機能の種間での保存や哺乳類特異的な役割について解析し、極性輸送の分子機構や組織・個体での極性輸送の役割について包括的に解明する

4. 研究成果

apical方向への輸送に無関係と思われたRab8a欠損マウス(KO)が予想に反しapical方向への輸送に異常を来すことをNatureに示した(Nature 448, 366, 2007)。しかしRab8にはRab8bというRab8aに非常に類似した遺伝子が存在するため、Rab8aとRab8bのダブルKOマウスを作製し、その解析を行った。その結果、ダブルKOマウスではRab8aKOマウス同様、apicalへの輸送が阻害されたが、basolateralへの輸送は阻害されなかった。またRab8は繊毛形成に重要と言われたが、このダブルKOの様々な組織では繊毛形成の異常は見られなかった(論文投稿中)。またapical面の軸索への輸送に重要と言われたVAMP7 KOではそのような表現型を殆ど示さないことも明らかにした(Traffic 12, 1383, 2011)。また他の極性輸送に重要と言われる遺伝子(syntaxin3, SNAP23, PKD1, PKD2, FAPP1, FAPP2など)についてもノックアウトマウスを作製し、その解析を行っている。しかし、これらのKOマウスで細胞極性に異常が見られないものも多いため、他にも重要な蛋白があることが予測される。そのような細胞極性に重要な新規遺伝子を同定する為に、

線虫を用いて腸の極性に異常をもたらす遺伝子のスクリーニングを始め、期間内に終了した。全部で200個以上の細胞極性に重要な遺伝子が同定できたため、これら的一部について既にKOマウスの作製を始めている。更に神経に類似した培養細胞(PC12)を用いて、神経細胞の極性形成に重要と思われる遺伝子の同定も行った(FASEB J. 26, :4662(2012))。他にも共同研究でKOマウスを作製し、その解析結果を報告している(下記5を参照)

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 10 件) 全て査読有

①Mogi 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, Okajima F.

Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of proinflammatory cytokine production in peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 182: 3243-3251; doi: 10.4049/jimmunol.0803466, (2009).

②Sadakata H, Okazawa H, Sato T, Supriatna Y, Ohnishi H, Kusakari S, Murata Y, Ito T, Nishiyama U, Minegishi T, Harada A, Matozaki T.

SAP-1 is a microvillus-specific protein tyrosine phosphatase that modulates intestinal tumorigenesis. *Genes to Cells*, 14: 295-308; doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01270.x, (2009).

③Kato Y, Sugiura T, Nakadera Y, Sugiura M, Kubo Y, Sato T, Harada A, 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 Metabolism and Disposition*, 37: 602-607; doi: 10.1124/dmd.108.023689, (2009).

④Uemura T, Sato T, Aoki T, Yamamoto A, Okada T, Hirai R, Harada R, Mori K, Tagaya M, Harada A.

p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 29: 1869-1881; doi: 10.1128/MCB.01089-08,

(2009).

⑤Tanaka S, Kunii M, Harada A, Okabe S. Generation of cortactin floxed mice and cellular analysis of motility in fibroblasts.

Genesis, 47: 638-646; doi: 10.1002/dvg.20544, (2009).

⑥Akiyama H, Gotoh A, Shin RW, Koga T, Ohashi T, Sakamoto W, Harada A, Arai H, Sawa A, Uchida C, Uchida T.

A novel role for hGas7b in microtubular maintenance: possible implication in tau-associated pathology in Alzheimer disease.

Journal of Biological Chemistry, 284: 32695-32699; doi: 10.1074/jbc.M109.035998, (2009).

⑦Harada A.

Molecular mechanism of polarized transport.

Journal of Biochemistry, 147: 619-624; doi: 10.1093/jb/mvq027, (2010).

⑧Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, Okada T, Sato T, Harada A, Mori K.

Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress.

Molecular Biology of the Cell, 21: 2975-2986; doi: 10.1091/mbc.E09-02-0133, (2010).

⑨Sato M, Saegusa K, Sato K, Hara T, Harada A, Sato K.

Caenorhabditis elegans SNAP-29 is required for organellar integrity of the endomembrane system and general exocytosis in intestinal epithelial cells.

Molecular Biology of the Cell, 22: 2579-2587; doi: 10.1091/mbc.E11-04-0279, (2011).

⑩Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A. The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo.

Traffic, 12: 1383-1393; doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01247.x, (2011).

[学会発表] (計 16 件)

①原田彰宏、佐藤隆史：極性輸送関連分子欠損マウスを用いた細胞極性形成、維持のメカニズムの解明 (解剖学・生理学連携シンポジウム)、日本解剖学会、2009. 3. 30、岡山理科大学

②佐藤真人、佐藤隆史、植村武文、國井政孝、多鹿友喜、村上徹、依藤宏、原田彰宏：細胞極性関連分子 VAMP7 欠損マウスの解析、日本解剖学会、2009. 3. 30、岡山理科大学

③佐藤隆史、佐藤健、佐藤美由紀、平井里香、原田玲子、原田彰宏：細胞極性の維持における Rab8a および Rab8b の役割、日本解剖学会、2009. 3. 30、岡山理科大学

④植村武文、古本奈緒美、佐藤隆史、原田彰宏：細胞極性及び脂質輸送関連タンパク FAPP1, 2 のノックアウトマウスの解析、日本解剖学会、2009. 3. 30、岡山理科大学

⑤原田彰宏：マウスでできること—ノックアウトマウスの作り方と解析について (イブニングレクチャー)、日本細胞生物学会、2009. 6. 2、名古屋国際会議場

⑥原田彰宏：低分子量 GTPase Rab8 の生体における機能について (シンポジウム：招待演者)、日本生化学会、2009. 10. 23、神戸国際会議場

⑦國井政孝、古本奈緒美、佐藤隆史、稲見圭子、原田彰宏：選別輸送関連蛋白 PKD1, PKD2 遺伝子欠損マウスの作製および解析 (ポスター)、日本解剖学会、2009. 3. 29、岩手県民会館

⑧國井政孝、古本奈緒美、佐藤隆史、稲見圭子、原田彰宏：選別輸送関連蛋白 PKD1, PKD2 遺伝子欠損マウスの解析 (ポスター)、日本細胞生物学会、2010. 5. 20、大阪国際会議場

⑨原田彰宏：細胞内極性輸送を司る分子の欠損マウスの神経の解析 (ポスター)、Neuro2010、2010. 9. 2、神戸国際展示場

⑩原田彰宏：上皮細胞の極性と機能における、細胞内極性輸送を司る分子の役割とその欠損による病態 (ワークショップ：招待演者)、BMB2010、2010. 12. 10、神戸ポートピアホテル

⑪原田彰宏：細胞内極性輸送を司る分子を欠損したマウスの作製とその細胞極性の解析 (ポスター)、日本生理学会大会・日本解剖学会合同大会、2011. 3. 30、パシフィコ横浜 (震災のため誌上開催)

⑫原田彰宏：細胞内極性輸送を司る分子の組織・個体における機能の分子細胞生物学的解析（シンポジウム：招待演者、座長）、日本顕微鏡学会、2011. 5. 16、福岡国際会議場

⑬原田彰宏：SNARE 分子のノックアウトマウスにおける神経系の表現型の解析（ポスター）、日本神経科学大会、2011. 9. 16、パシフィコ横浜

⑭原田彰宏：The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo（ポスター）、日本分子生物学会、2011. 12. 16、パシフィコ横浜

⑮原田彰宏、國井政孝、吉村信一郎、上皮細胞の極性輸送を司る分子の欠損マウスの解析（シンポジウム：招待演者）、日本解剖学会、2012. 3. 28、山梨大学甲府キャンパス

⑯國井政孝、原田彰宏：脳の形態形成における小胞輸送関連分子 SNAP23 の機能の解明（口頭発表）、日本解剖学会、2012. 3. 27、山梨大学甲府キャンパス

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

佐藤 健 (SATO KEN)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：30311343

佐藤 隆史 (SATO TAKASHI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：70344934

(3) 連携研究者

()

研究者番号：