

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790226

研究課題名（和文） 上皮細胞の極性形成における細胞内物質輸送の分子機構の解明

研究課題名（英文） The molecular mechanism of membrane transport on the polarized epithelial cells.

研究代表者

吉村 信一郎（YOSHIMURA SHINICHIRO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60584521

研究成果の概要（和文）：

上皮極性輸送の分子機構を明らかにする目的で、頂端面輸送の機能する Rab8 タンパク質に結合するタンパク質の探索を行い、Rab8BP を得た。Rab8BP は新規タンパク質であり、その機能を解析するために RNA 干渉法を用いて Rab8BP をノックダウンしたところ、Rab8 の細胞内局在に異常が見られた。よって Rab8BP は Rab8 の適切な細胞内局在化に必要な分子であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We identified a novel effector protein for Rab8, namely Rab8BP using yeast two-hybrid method. Rab8BP was co-localized with Rab8 in intracellular compartments. When Rab8BP was knocked-down by RNAi, the localization of Rab8 was altered. The results suggest that Rab8BP regulates the activity of Rab8 by helping its proper localization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：Rab8

## 1. 研究開始当初の背景

腸や腎臓等の上皮細胞の極性は上皮組織の構造と機能に必須であるが、その極性の形成維持には細胞内での方向性のある小胞輸送（極性輸送）が重要である。極性輸送は頂端面への輸送と側底面への輸送の 2 種類に大別されるが、申請者等は低分子量 GTP 結合タンパク質の Rab8 が頂端面方向への輸送や一次繊毛形成に重要なことを明らかにした。また Rab8 は特異的結合タンパク質（エフェクター）を介して極性輸送を制御する。これまでに申請者らは一次繊毛形成に重要な Rab8 のエフェクター分子の同定に成功していたが、極性輸送を司るエフェクター分子は未同定であった。

## 2. 研究の目的

上皮極性輸送の分子機構を探るために Rab8 の新規エフェクター分子の同定を行い、その分子の解析を Rab8 とともにを行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)当初は GST-Rab8 タンパク質とマウス小腸抽出液を用いて GST プルダウン法による Rab8 結合タンパク質の同定を試みたが良好な結果が得られなかったためにマウス小腸由来の cDNA ライブラリーを用いた酵母ツーハイブリッド法に切り替えて実験を行った。

(2) 得られたタンパク質に対する抗体を作製し、イムノブロット及び間接蛍光抗体法による発現や局在の解析を行った。

(3) 得られたタンパク質(Rab8BP)をRNA干渉法にてノックダウンしてRab8の局在や細胞内膜輸送への影響を解析した。

(4) Rab8BPに結合する新規タンパク質の同定をGSTプルダウン法を用いて試みた。

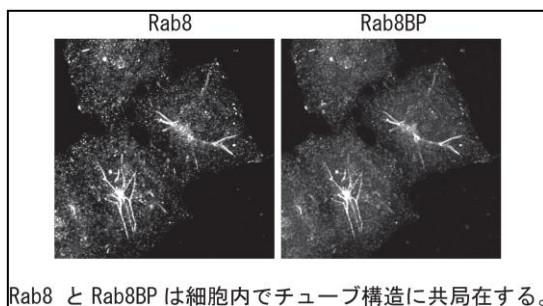
#### 4. 研究成果

(1) 新規 Rab8 結合分子、Rab8BP の同定。

私達はまずマウス小腸由来の cDNA ライブラリーを自作し、それを用いて Rab8 の活性型変異体に特異的に結合する分子を酵母ツーハイブリッド法にて探索を行った。得られたクローンのうち多くは既知の Rab8 結合タンパク質であったが約 200 クローンのうち 4 分子は全く未解析の未知のタンパク質をコードする遺伝子であった。私達はこれに Rab8BP と名前を付けて以下の解析を行った。

(2) Rab8BP の組織分布および細胞内局在の解析

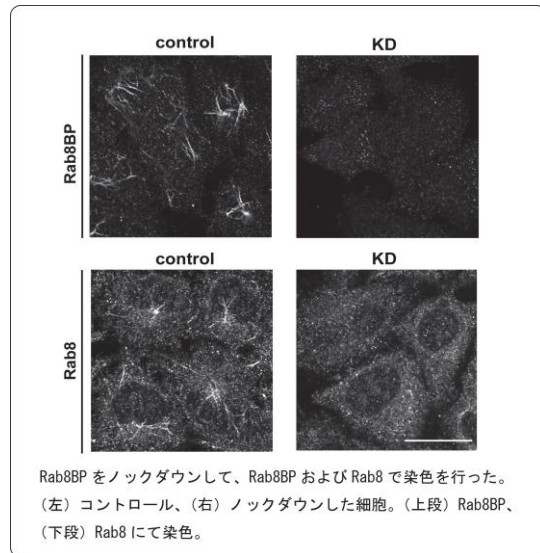
Rab8BP に対する特異的抗体を作製し、イムノブロットによってマウス組織における組織分布を確認したところ肺、および小腸に多くの発現が確認された。また各種培養細胞における Rab8BP の発現を調べたところ、HeLa 細胞において特に多くの発現が確認された。そこで HeLa 細胞内における局在を間接蛍光抗体法を用いて観察したところ、チューブ状の膜構造に局在し、内在性の Rab8 と共局在した。



(3) Rab8BP の機能解析

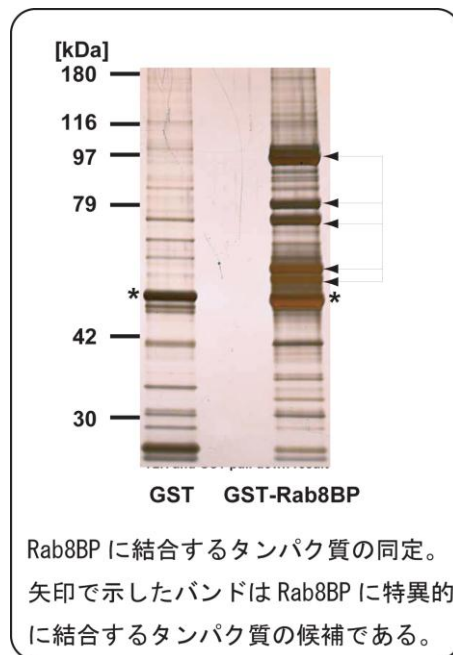
Rab8BP の機能を理解するために、HeLa 細胞内の Rab8BP を siRNA によりノックダウンし、Rab8BP の機能を解析した。まず Rab8 の局在を観察したところ Rab8 の分布に異常が観察された。すなわちチューブ構造に局在する Rab8 が細胞質に拡散した染色像に変化した。

次に各種モデル積み荷(cargo)タンパク質を用いてエキソサイトーシスやエンドサイトーシスへの影響を解析したが、大きな変化は観察されなかった。今後は極性が維持されたモデル細胞を用いて同様の輸送解析をすることが課題となる。



(4) 新規 Rab8BP 結合タンパク質の同定。

Rab8BP の分子内部には非常に特徴的なアミノ酸配列を有した部位がある。私達はその部位に別のタンパク質が結合することを想定して、その同定を試みた。まず Rab8BP のその部位の GST 融合タンパク質を作製し、これとマウス組織抽出液を用いて GST プルダウンアッセイを行った。その結果、特異的に結合するタンパク質が銀染色にて確認された。現在はこれを質量分析装置を用いて同定を行っているところである。



これらの結果より、Rab8BP は Rab8 の細胞内チューブ構造への局在化、および安定化に機能することが明らかになった。Rab8 は小腸上皮細胞において頂端膜への輸送を制御することが明らかになっている。Rab8BP は肺や小腸といった上皮が発達した組織に多く発現していることから Rab8 の上皮極性輸送における機能を制御する分子である可能性が強く示唆される。今後は Rab8BP に結合するタンパク質の同定と解析を通して、さらに小腸上皮細胞等適切なモデルを用いることにより、Rab8 と Rab8BP の極性輸送における分子機構の深部の理解が進むと考えられる。

## 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 3 件)

(1) Y. Hashimoto, K. Muramatsu, M. Kunii, S. Yoshimura, M. Yamada, T. Sato, Y. Ishida, R. Harada, A. Harada.

Uncovering genes required for neuronal morphology by morphology-based gene trap screening with a revertible retrovirus vector. **FASEB J.** (2012) Epub ahead of print.

(2) A. Linford, S. Yoshimura, R. Nunes Bastos, L. Langemeyer, A. Gerondopoulos, D. J. Rigden, F.A. Barr.

Rab14 and its exchange factor FAM116 link endocytic recycling and adherens junction stability in migrating cells. **Dev Cell.** 5 (2012) 952-66.

(3) A. Longatti, C.A. Lamb, M. Razi, S. Yoshimura, F.A. Barr, and S.A. Tooze.

TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11 and ULK1 positive recycling endosome **J. Cell Biol.** (2012) 197 659-75.

(4) M. Sato, S. Yoshimura, R. Hirai, A. Goto, M. Kunii, N. Atik, T. Sato, K. Sato, R. Harada, J. Shimada, T. Hatabu, H. Yorifuji, A. Harada.

The Role of VAMP7/TI-VAMP in Cell Polarity and Lysosomal Exocytosis in vivo. **Traffic.** (2011) 12 1383-93.

(5) H. L. Zenner, S. Yoshimura, F. A. Barr, C. M. Crump.

Analysis of Rab GTPase-Activating Proteins Indicates that Rab1a/b and Rab43 Are Important for Herpes Simplex Virus 1 Secondary Envelopment. **J Virol** 85 (2011) 8012-21.

(6) D. Bem, S. Yoshimura, R. Nunes-Bastos, F. C. Bond, M. A. Kurian, F. Rahman, M. T. Handley, Y. Hadzhiev, I. Masood, A. A. Straatman-Iwanowska, A. R. Cullinane, A. McNeill, S. S. Pasha, G. A. Kirby, K. Foster, Z. Ahmed, J. E. Morton, D. Williams, J. M. Graham, W. B. Dobyns, L. Burglen, J. R. Ainsworth, P. Gissen, F. Müller, E. R. Maher, F. A. Barr, I. A. Aligianis.

Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. **Am J Hum Genet** 88 (2011) 499-507.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 吉村信一郎  
Rab とその調節因子によるメンブレントラフィックの制御

第117 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
会期：2012 年3 月26 日～28 日

(2) 吉村信一郎  
Rabタンパク質の一次繊毛形成への役割

繊毛研究会2011  
会期：2011年6月29日

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 信一郎 (YOSHIMURA SHINICHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60584521

### (2) 研究協力者

中條 淳博 (NAKAJO ATSUHIRO)

大阪大学・医学部医学科4 回生

(3)連携研究者

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