

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390046

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)Analyses of genes involved in cell polarity in tissues and animals in situ

研究代表者

原田 彰宏 (Harada, Akihiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：Rab8a,b, PKD1,2, FAPP2 ノックアウト(KO)マウスの解析結果を論文で発表した。Syntaxin3小腸特異的KOについてはCRISPR法による培養細胞でのKOも用いて解明中である。SNAP23膵臓特異的KOマウスについてはインスリン分泌亢進の分子機構の解明を終了し論文投稿中。Rab8a結合分子の同定と、apical輸送への関与機構をほぼ解明し論文準備中。apical markerの輸送機構の解明については、Apical markerのモデル分子を作成し正常な腸の初代培養細胞に導入した。線虫等で同定した新規の極性輸送関連遺伝子について既にKOマウスを作成し解析中。

研究成果の概要(英文)：We published papers containing analyses of Rab8a,b, PKD1,2, and FAPP2 knockout mice. We finished analysis of pancreas-specific SNAP23 knockout mice and identified molecular mechanism for increased insulin secretion in these mice. The results were summarized and submitted to a journal. We are analyzing the molecular mechanisms underlying phenotypes of syntaxin3 knockout mice by generating KO cell lines by CRISPR/Cas9 method. For identifying molecular mechanism of apical transport, we discovered a Rab8a binding protein and its role for apical transport. For monitoring the transport of apical proteins, we generated a model protein and introduced it into cultured intestinal organoids. We found out novel candidate molecules for apical transport using *C. elegans*. We generated knockout mice lacking these molecules and analyzing their phenotypes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞極性 極性輸送 ノックアウトマウス apical

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は頂端面 (apical)、側底面 (basolateral)、神経細胞も軸索、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り、その形態の破綻はがんや糖尿病などの疾患にもつながる。この細胞の極性の形成、維持には、合成された分泌蛋白や膜蛋白が TGN (トランスゴルジネットワーク) 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。極性輸送には、低分子量 GTP 結合蛋白質、SNARE 蛋白などが重要であることが知られていたが、これらの蛋白の研究はこれまでは主に培養細胞を用い、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)他の組織や個体での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せないことや、目的分子以外の分子に働く可能性もあること、などの限界があった。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おらず、我々がかつて細胞の basolateral への輸送に関わるとされていた Rab8a が apical への輸送に関与することを示した (Nature 448, 366, 2007)。

2. 研究の目的

上記の体験から、代表者は細胞極性に重要とされる蛋白の正確な役割を知るためにはこれらの蛋白を個体レベルで欠損させて再検討する必要があると考えた。本研究では最新のマウス分子遺伝学と蛋白質工学を用いて、組織中の細胞の極性輸送の分子機構とその破綻による疾患病態の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) 現在まで作製した既知の極性輸送関連分子欠損マウスの解析

2) apical 面への輸送の分子機構の解明

3) 線虫で同定した新規の極性輸送関連分子の組織特異的欠損マウスの作製と解析の3つを行う。

1) 現在まで作製した既知の極性輸送関連分子欠損マウスの解析

I. Rab8a,b KO 及び DKO の解析

II. Syntaxin3 小腸特異的 KO の解析

III. SNAP23 膵臓特異的 KO の解析

IV. PKD1,2KO の解析

2) apical 面への輸送の分子機構の解明

I. Rab8a 結合分子の探索とその機能の解明

II. syntaxin3 結合分子の探索と機能の解明

III. 腸の初代培養法を用いた apical marker の輸送の解明

3) 線虫で同定した新規の極性輸送関連分子

の組織特異的欠損マウスの作製と解析

I. これらの遺伝子の組織特異的欠損マウスの作製

II. これらの遺伝子産物 (蛋白質) に対する特異的抗体の作製

III. WB にてどの組織を解析すべきか調べ、その後、機能を解明する。

4. 研究成果

1) 現在まで作製した既知の極性輸送関連分子欠損マウスの解析

I. Rab8b KO 及び Rab8ab DKO の解析

IV. PKD1,2KO の解析

については既に論文 (下記 3, 4, 5, 8, 11) で公表した。他にも FAPP2 KO の解析結果を論文 6 で報告した。

II. Syntaxin3 小腸特異的 KO の解析

増殖因子の発現上昇の原因を CRISPR/Cas9 によって培養細胞の KO を行うことで解明中である。

III. SNAP23 膵臓特異的 KO の解析

外分泌の低下と内分泌の亢進の原因の分子機構の解明を殆ど終了し、現在論文を投稿中である。

2) apical 面への輸送の分子機構の解明

I. Rab8a 結合分子の探索とその機能の解明

結合分子の同定と、apical への輸送の分子機構をほぼ解明し、論文投稿準備中である。

II. syntaxin3 結合分子の探索と機能の解明

技術的困難さから、まだ結合分子は同定できていない。

III. 腸の初代培養法を用いた apical marker の輸送の解明

Apical marker のモデル分子を作成できたため、正常な腸の初代培養細胞にレンチウイルスで導入し、これからその輸送を追跡する。

3) 線虫等で同定した新規の極性輸送関連分子の組織特異的欠損マウスの作製と解析

I. 組織特異的欠損マウスの作製

いくつかの遺伝子について既にマウスを作成し、現在その異常を解析している。

II. これらの遺伝子産物 (蛋白質) に対する特異的抗体の作製

既に抗体を作成し、WB, IF で使用可能であることを確認した。

III. WB にてどの組織を解析すべきか調べ、その後、機能を解明する。

全身での KO マウスは致死のため、腸特異的 KO マウスで解析中である。

既に Rab11 の腸特異的 KO マウスの解析結果については、論文 1 で報告した。

他に細胞極性に重要な遺伝子について解析結果を論文 2, 7, 9, 10 で報告した。

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 11 件) 全て査読有

1. Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A. Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine. *Biol. Open* (2014) pii: BIO20148532. doi: 10.1242/bio.20148532.

2. Saegusa K, Sato M, Sato K, Nakajima-Shimada J, Harada A, Sato K. Caenorhabditis elegans chaperonin CCT/TRiC is required for actin and tubulin biogenesis and microvillus formation in intestinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 25:3095-3104. (2014) doi: 10.1091/mbc.E13-09-0530.

3. Vacca B, Bazellieres E, Nouar R, Harada A, Massey-Harroche D, Le Bivic A, Drebrin E depletion in human intestinal epithelial cells mimics Rab8a loss of function. *Hum. Mol. Genet.* 23:2834-2846 (2014) doi: 10.1093/hmg/ddt670.

4. Nur Atik, Kunii M, Erda Avriyanti, Furumoto N, Inami K, Yoshimura S, Harada R, Harada A. The Role of PKD in Cell Polarity, Biosynthetic Pathways, and Organelle/F-actin Distribution *Cell Struct. Funct.* 39: 61-77 (2014), <http://dx.doi.org/10.1247/csf.13020>

5. Sato T, Iwano T, Kunii M, Matsuda S, Mizuguchi R, Jung Y, Hagiwara H, Yoshihara Y, Yuzaki M, Harada R, Harada A. Rab8a and Rab8b are essential for several apical transport pathways but insufficient for ciliogenesis. *J. Cell Sci.* 127: 422-431. (2014) doi: 10.1242/jcs.136903.

6. D'Angelo G, Uemura T, Chuang C-C, Polishchuk E, Santoro M, Ohvo-Rekila H, Sato T, Di Tullio G, Varriale A, D'Auria S, Daniele T, Capuani F, Johannes L, Mattjus P, Monti M, Pucci P, Williams R L, Burke J E, Platt F M, Harada A, De Matteis M A. Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* 501: 116-120 (2013), doi:10.1038/nature12423

7. Takasuga S, Horie Y, Sasaki J, Sun-Wada G H, Kawamura N, Iizuka R, Mizuno K, Eguchi S, Kofuji S, Kimura H, Yamazaki M, Horie C, Odanaga E, Sato Y, Chida S, Kontani K, Harada A, Katada T, Suzuki A, Wada Y, Ohnishi H, Sasaki T. Critical roles of type III phosphatidylinositol phosphate kinase in murine embryonic visceral endoderm and adult intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 1726-1731. (2013) doi: 10.1073/pnas.1213212110.

8. Subramanian VS, Subramanya SB, Ghosal A, Marchant JS, Harada A, Said HM. Modulation of

Function of Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) by Rab8a in Intestinal Epithelial Cells: Studies Utilizing Caco-2 Cells and Rab8a Knockout Mice. *Dig Dis Sci*. 58: 641-649. (2013) doi: 10.1007/s10620-012-2388-9.

9. Kawamura N, Wada S, Aoyama M, Harada A, Takasuga S, Sasaki T, Wada Y. Delivery of Endosomes to Lysosomes via Microautophagy in the Visceral Endoderm of Mouse Embryos. *Nat. Commun.* 3:1071 (2012).

10. Hashimoto Y, Muramatsu K, Kunii M, Yoshimura S, Yamada M, Sato T, Ishida Y, Harada R, Harada A. Uncovering genes required for neuronal morphology by morphology-based gene trap screening with a revertible retrovirus vector. *FASEB J*. 26:4662-4674 (2012) doi: 10.1096/fj.12-207530.

11. Sakamori R, Das S, Yu S, Feng S, Stypulkowski E, Guan Y, Douard V, Tang W, Ferraris RP, Harada A, Brakebusch C, Guo W, Gao N. Cdc42 and Rab8a are critical for intestinal stem cell division, survival, and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* 122: 1052-1065 (2012) doi: 10.1172/JCI60282,.

〔学会発表〕(計 15 件)

2014 (平成 26) 年度

第 66 回日本細胞生物学会大会 (奈良県新公会堂、東大寺総合文化センター)(奈良県奈良市)

Rab1 の GM130 結合とその生理的意義

石田竜一、安永卓生、山本章嗣、中山和久、吉村信一郎、原田彰宏、中村暢宏
(6月12日：一般口演 2D-1030)

第 66 回日本細胞生物学会大会 (奈良県新公会堂、東大寺総合文化センター)(奈良県奈良市)

膜外分泌、内分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解明

國井政孝、吉村信一郎、高橋倫子、小林雅樹、佐藤隆史、川上良介、根本知己、河西晴郎、北村忠弘、佐藤健、原田彰宏 (6月12日：ポスター-2P-10)

第 37 回日本神経科学大会 (パシフィコ横浜) (神奈川県横浜市)

Analyses of neuronal and epithelial cell polarity of mice lacking genes involved in polarized transport

Akihiro Harada (9月13日：ポスターP3-068)

第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会、第 92 回日本生理学会大会 合同大会(神戸国際会議場・展示場)(兵庫県神戸市)

細胞の極性形成における細胞内小胞輸送の

役割
吉村信一郎(シンポジウム MS6-1:2015年3月22日)

2013(平成25)年度

第65回日本細胞生物学会大会(ウインクあいち)(愛知県名古屋市)
表現型を正常に戻すことが可能なレトロウイルスベクターを用いた、形態によるスクリーニングによる神経細胞の形態形成に必要な遺伝子の同定
原田彰宏(6月20日:ポスター2P-42)

Neuro2013(国立京都国際会館)(京都府京都市)
表現型を復帰することが可能なレトロウイルスベクターを用いた神経細胞の形態形成に必要な遺伝子の同定
原田彰宏(6月21日:口演 O3-6-1-1)

第36回日本分子生物学会年会(神戸ポートアイランド)(兵庫県神戸市)
組織において、細胞内極性輸送を司る分子は細胞の極性や分泌などにどのように関わるか?(12月3日:シンポジウム口演 1A57-5)
原田彰宏

第119回日本解剖学会全国学術集会(自治医科大学キャンパス)(栃木県下野市)
新規 Rab8 結合タンパク質の上皮極性輸送における役割
吉村信一郎、中條淳博、東川浩子、岩野智彦、渡辺綾子、後藤彩子、原田彰宏(シンポジウム S5-5:3月27日)

第119回日本解剖学会全国学術集会(自治医科大学キャンパス)(栃木県下野市)
大脳皮質の形成における細胞内膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解析
國井政孝、岩野智彦、原田彰宏(ポスター 3P-056:3月29日)

2012(平成24)年度

第45回日本発生生物学会、第64回日本細胞生物学会合同大会(神戸ポートアイランド)(兵庫県神戸市)
Function of a t-SNARE protein SNAP23 in insulin secretion from pancreatic beta-cell
Masataka Kunii, Noriko Takahashi, Masaki Kobayashi, Mica Ohara-Imaizumi, Takashi Sato, Shin-ichiro Yoshimura, Ken Sato, Reiko Harada, Shinya Nagamatsu, Haruo Kasai, Tadahiro Kitamura, Akihiro Harada(ワークショップ口演 WS1a-5:5月30日、ポスター(P2-040):5月31日)

第35回日本神経科学大会(名古屋国際会議場)(愛知県名古屋市)
細胞内極性輸送に関わる遺伝子の欠損マウスの神経細胞の極性形成について

原田彰宏、國井政孝、吉村信一郎(9月19日:ポスターP2-c13)

第35回日本分子生物学会年会(福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)(福岡県福岡市)
表現型を復帰することが可能なレトロウイルスベクターを用いた、形態によるスクリーニングによる神経細胞の形態形成に必要な遺伝子の同定(12月11日:ポスター1P-0555)
原田彰宏

第85回日本生化学会大会(福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)(福岡県福岡市)
Roles of membrane trafficking in cell polarity and secretion in model animals
Akihiro Harada(12月14日:シンポジウム口演 1S09-4)

第118回日本解剖学会全国学術集会(サンポートホール高松、かがわ国際会議場)(香川県高松市)
新規 Rab8 結合タンパク質の機能解明
吉村信一郎、中條淳博、東川浩子、後藤彩子、渡辺綾子、原田彰宏(ポスター2P-G058:3月29日)

第118回日本解剖学会全国学術集会(サンポートホール高松、かがわ国際会議場)(香川県高松市)
膵β細胞からのインスリン分泌における膜融合関連分子 SNAP23 の機能の解明
國井政孝、吉村信一郎、高橋倫子、小林雅樹、今泉美佳、佐藤隆史、佐藤健、永松信哉、河西春郎、北村忠弘、原田彰宏(ポスター 3P-H113:3月30日)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ：

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

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

吉村信一郎 (YOSHIMURA Shin'ichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60584521

國井政孝 (KUNII Masataka)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80614768

(3)連携研究者

なし