



細胞内極性輸送に関わる分子の機能解明

1. はじめに

腸の表面などを覆う上皮細胞は apical (頂端側：腸でいうと内腔に面する側), basolateral (側底側：腸でいうと血管などに面する側) という方向性を持っており, 神経細胞も軸索, 樹状突起という方向性を持っている. この方向性のことを極性と呼んでいる. 細胞の極性は組織形成などの点で発生上非常に重要であると共に, 出来上がった組織の機能にも非常に重要である.

近年, 主に線虫, ハエや MDCK 細胞を用いた研究により, 細胞接着, 特に Par 複合体と極性形成の関係については解明されてきたものの, apical, basolateral に分布するタンパク質のゴルジ体以降での選別, 輸送 (極性輸送) についてはそれほど解明されていない. さらに細胞接着 (特にアドヘレンスジャンクション形成) と極性輸送の関係についても不明な点が多い. 例えば細胞接着が出来てから極性輸送が完成するのか, 細胞接着の形成前に既に極性輸送が重要な役割を果たすのか, 議論のあるところである.

私は現在 apical, basolateral のタンパク質の, トランスゴルジネットワーク (TGN) での小胞への選別, 出芽や, TGN から細胞膜への輸送, 目的地における繫留, 融合 (これらをあわせて極性輸送と総称する) に関与するタンパク質の機能, ひいては極性の形成機構を, ノックアウトマウスを作製することで解明したいと考えて研究を進めている. このミニレビューでは現在 apical, basolateral のタンパク質の選別, 輸送についてどのようなことが判明しているか, 我々の業績も含めて紹介したい.

2. どのような分子が極性輸送の各段階に関与するか (図 1)

1) Sorting (選別)

apical, basolateral への sorting は基本的には TGN で行われ, そこで別々の小胞に乗って運ばれる. そこで TGN に存在し, sorting を行っている分子が当然あると考えられる訳だが, MAL (the myelin and lymphocyte protein) や MAL2 等のプロテオリピドがその一つの候補として考えられている¹⁾. 更に最近では protein kinase D2 (PKD2) が basolateral への輸送 (特に TGN レベルでの basolateral への小胞の sorting) に²⁾, また FAPP2 (phosphatidylinositol-four-phosphate adaptor protein-2) と呼ばれる分子が apical への輸送 (特に TGN レベルでの apical への小胞の sorting) に重要ではないかといわれている³⁾.

2) Transport (輸送)

TGN から細胞膜近くまでの (長距離の) 輸送は微小管依存性, 細胞膜付近での (短距離の) 輸送はアクチン依存性のモータータンパク質によると考えられている. 極性輸送に関わるモータータンパク質は小胞を長距離輸送しなければならないため, 微小管依存性のモータータンパク質である可能性が高い.

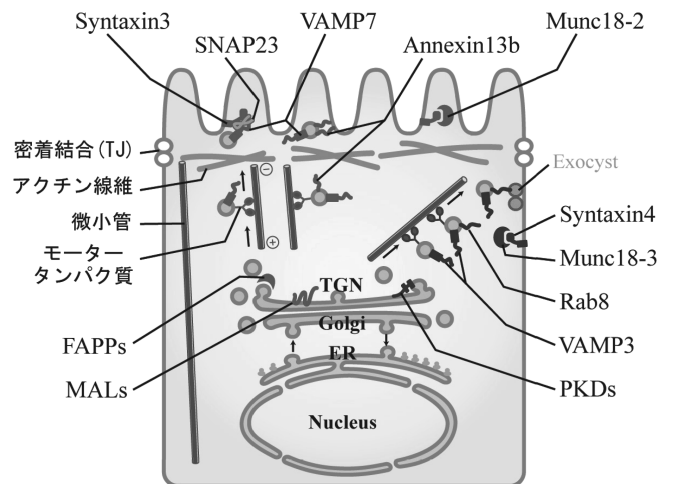


図 1 極性輸送に働くタンパク質

図に記入したようなタンパク質 (apical への輸送は syntaxin3, SNAP23, VAMP7, Munc18-2, Annexin13b, FAPPs, MALs, basolateral への輸送は syntaxin4, VAMP4, Munc18-3, Rab8, PKDs, exocyst 複合体) が極性輸送に重要と考えられている.

3) Tethering (繫留: fusionする目的地に近付いた小胞が融合するまでの間, 目的地付近に留まることを指す)

basolateralの tethering については, 輸送小胞側は Rab8 ないしは Rab13, 細胞膜側は exocyst (Sec5/6/8/10/15, Exo70/84, p106 からなる複合体) が重要と考えられている. Rab8 ないしは Rab13 の酵母の相同分子である Sec4 は exocyst 中の Sec15 と直接結合する⁴⁾. apical の tethering については Rab8 が行っている可能性があるが(後述), annexin13b が行っているという報告もある⁵⁾.

4) Fusion (融合)

apical, basolateral に向かうタンパク質を乗せた小胞と細胞膜の間の融合を指す. SNARE (*N*-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein (SNAP) receptor) 及び SNARE に結合するタンパク質が重要と考えられている⁶⁾.

apical 膜と小胞の融合には syntaxin 3, SNAP23 (synaptosome-associated protein of 23kDa) といった細胞膜側の SNARE, 及び VAMP7 (vesicle-associated membrane protein 7) と呼ばれる小胞側の SNARE などが重要と考えられ, basolateral 膜と小胞の融合には syntaxin 4 といった細胞膜側の SNARE, 及び VAMP3 と呼ばれる小胞側の SNARE などが重要と考えられている⁶⁾.

3. Rab8 の機能について

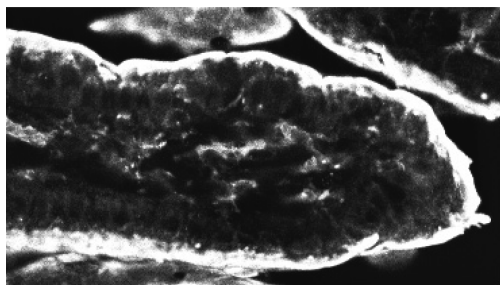
これまで細胞の極性輸送に関与するといわれる分子を紹介したが, これらの分子の同定は比較的早く, これらが本当に細胞の極性輸送に関与するかどうか, 関与するとしても組織や個体での役割が明らかではない. また, 遺伝学の使える (つまり, これらの分子の役割を間違いなく証明できる) 生物 (酵母, ハエ, 線虫, マウス等) でこれらの分子の突然変異体の解析はあまり進んでいない. そこで我々はマウスと線虫を用いてこれらの分子の役割の解明を試みており, 上記の既知の分子の殆どについてノックアウトマウスの作製を終了している. 現在その解析を行っているが, ここではまず既存の分子のノックアウトマウスの解析の最初の例として近年報告した Rab8 の例を紹介したい⁷⁾.

Rab8 は低分子量 GTP 結合タンパク質であり, 酵母で分泌 (exocytosis) に重要な Sec4 の哺乳類の相同分子である. 哺乳類では, GDP 型 Rab8 の発現や, 抗体の微小注入などにより, Rab8 は神経の樹状突起や上皮細胞の basolateral への小胞輸送に重要と考えられてきた^{8,9)}. しかし, これらの研究は主に腎臓尿管上皮由来の MDCK 細胞で調べたもので, 組織や個体での Rab8 の役割は明らかでなかつ

た. またかつて著者は微小管関連タンパク質タウのノックアウトマウスの結果と細胞を用いた結果が大きく異なる経験 (培養神経細胞のアンチセンス DNA で軸索伸長に重要と考えられていたが, ノックアウトマウスの培養神経細胞では軸索伸長に何の異常も見られなかった) をしていたため¹⁰⁾, Rab8 の機能を知るため, Rab8 を欠損するマウスの作成を行った.

Rab8 が本当に basolateral への輸送に必要ななら, そのノックアウトマウスは発生途中に basolateral 側の輸送が異常になり, 極性の変化が生じて胎生致死になると予想できる. そのため我々はコンディショナルノックアウトマウスを作製した. すると Rab8^{-/-}マウス (今後 KO と呼ぶ) は 2 週を少し過ぎてから下痢と体重減少を呈し, 生後 3-4 週間で殆ど死亡した. エクソンの両端のイントロンに loxP を入れた遺伝子座 ('floxed' 遺伝子座と呼ぶ) を両方の遺伝子座に持つ floxed/floxed マウスと, 小腸特異的に Cre を発現する villin-Cre マウスを交配し, 小腸特異的に Rab8 を欠損するマウスを作製した. すると, KO (全身で rab8 を欠損するマウス) 同様の時間経過で死亡することが判明した. このことから Rab8 ノックアウトマウスの死ぬ原因は主に小腸にあることが示唆された. そこで詳細に原因を解明するため, 小腸の形態学的観察を行うと KO の小腸は 1, 2 週齢で大きな変化はなかったが, 3 週齢で微絨毛の短小化が認められた. 更に小腸の apical, basolateral のタンパク質に対する抗体で染色を行うと, 驚くべきことに basolateral のマーカーである LDL 受容体, Na⁺,K⁺-ATPase, E-カドヘリンの分布は KO, WT で大きな差が認められなかった. しかし, apical のマーカーである, DPP4 (di-peptidyl peptidase IV), AIP (alkaline phosphatase), SGLT (sodium-dependent glucose transporter), PepT1 (peptide transporter 1) は細胞内に点状に蓄積した染色が 3 週齢のマウスで大量に認められた (図 2). この細胞内の染色はリソソームのマーカーと共局在するが, ゴルジや TGN のマーカーとは一致しなかった. また, オートファゴソームのマーカーとも一致しなかった. このことからこれらの apical マーカーは apical の細胞膜で減少し, リソソームに蓄積, 分解されることが示唆された. 実際に 2~3 週齢のマウスの小腸のウェスタンブロットを行うと, これらの分子 (apical の細胞膜にある酵素や糖やペプチドのトランスポーター) が減少していることが判明した. そこで我々は単離した小腸でのペプチド及びグルコースの吸収を調べた. その結果, KO ではペプチド, グルコースの両者とも殆ど吸収されていないことが判明した. 更に飢餓の指標で

野生型
マウス



Rab8欠損
マウス

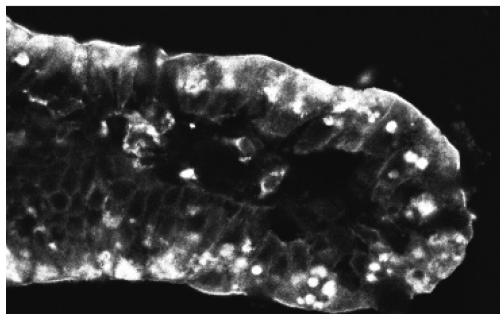


図2 3週齢の野生型マウスと Rab8 欠損マウスの小腸における apical マーカー, DPPIV の分布

DPPIV は野生型では apical の細胞膜に局在するが, Rab8 欠損マウスでは細胞内部に点状に蓄積する。

ある血中ケトン体は3週齢の KO では WT より増加していることが判明した。

以上の結果から, KO では小腸吸収上皮の apical の細胞膜上のトランスポーターやペプチダーゼの分布異常や分解が生じ, これらの分子による栄養の消化や吸収が障害されてマウスが栄養失調をきたし死亡することが明らかとなった。

形態学的な変化を更に詳しく解析するため, 我々は電子顕微鏡による観察を行った。すると3週齢のマウスでは, apical の微絨毛が KO では WT の約3分の1まで短縮していた。さらに細胞の内部に電子密度の高い物質の多い空胞 (vacuole) が大量に見られ, 免疫電子顕微鏡法でそれらの空胞中に DPP4 が存在していることが判明した。また, apical 細胞膜上のその DPP4 の量を定量したところ, 3週齢の KO では WT の約1/3まで低下していることが判明した。更に時折, 微絨毛を内部に持つ空胞 (微絨毛封入体) も存在していた。マウスと同様の知見が Rab8 の小腸の apical マーカーの局在における機能は種間で保存されていることも判明した。

この KO マウスと極めて近い症状 (下痢, 栄養失調) や病理所見 (微絨毛の短縮, 微絨毛封入体) をヒト小児の疾

患である微絨毛封入体病が示すことが分かっている¹¹⁾。そこでこの患者のゲノム DNA で Rab8 遺伝子の突然変異を調べたが見つかることが出来なかった。しかし患者さんの小腸を Rab8 の抗体で染色したところ, 明らかに染色が低下していた。そのため, この疾患の患者さんでは何らかの理由で Rab8 の量が低下し, それが症状に関係することが判明した。

4. おわりに

我々の結果から, Rab8 は apical マーカーの局在に重要であることが判明したが, このように, これまでは Rab8 は basolateral 側への輸送に関与しているというこれまでの常識と大きく異なる結果を得られたこと, ほぼ小腸特異的に異常を生じるといった, 各組織における極性輸送に必要な分子の違いを見られたことには大きな意義があり, 今後の他の分子のノックアウトの解析にも期待できる。実際, 他の極性に関与する分子についても既にノックアウトマウスの解析でこれまでの報告と大きく異なる結果を得ている。更に, これまでに極性輸送に関わる全ての分子が揃ったとは言いがたいため, 現在, 細胞極性, 特に極性輸送に関わる新規分子を同定するため, 線虫の系を用いたスクリーニングも平行して行っており, いくつか興味深い分子を得ることが出来ている (図3)。今後はこれらの分子についてもノックアウトマウスを作製し, 種を超えて保存される細胞極性形成のメカニズムの全容について解明していきたいと考えている。

このように我々の行っているのは非常に基礎的な生物学研究であるが, しかしまたその故に様々な基本的な生命現象に関わったり, その異常により Rab8 のようにヒトの疾患に関わる分子が同定される可能性も高い。現在解析中の他のマウスにおいてもヒトの疾患と関連する表現型が見出されている。

最後に本研究室のスタッフ, 学生さん, テクニシャンの方々, 共同研究を快く引き受けて頂いた研究者, 試料をご提供頂いた研究者の方々に深く御礼申し上げます。

- 1) Schaeren-Wiemers, N., Bonnet, A., Erb, M., Erne, B., Bartsch, U., Kern, F., Mantei, N., Sherman, D., & Suter, U. (2004) *J. Cell Biol.*, 166, 731-742.
- 2) Yeaman, C., Ayala, M.I., Wright, J.R., Bard, F., Bossard, C., Ang, A., Maeda, Y., Seufferlein, T., Mellman, I., Nelson, W.J., & Malhotra, V. (2004) *Nat. Cell Biol.*, 6, 106-112.
- 3) Vieira, O.V., Verkade, P., Manninen, A., & Simons, K. (2005)

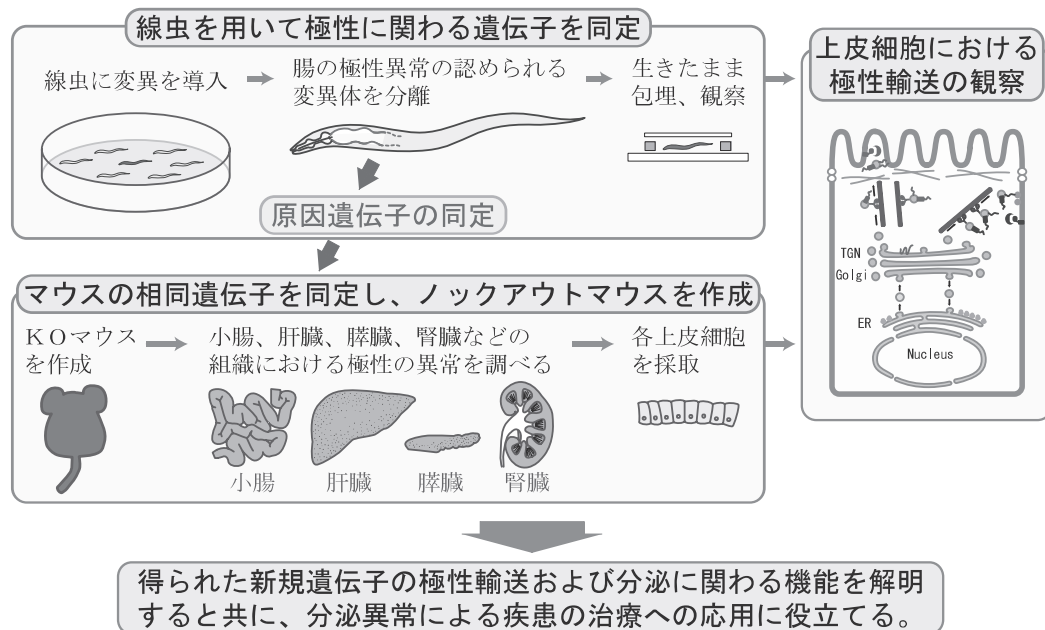


図3 今後の研究計画

細胞の極性形成、維持に関与する新規遺伝子を線虫で同定し、そのダイナミクスを解析すると共に相同遺伝子の欠損マウスを作製して哺乳類でのその遺伝子の機能を解析することで、その遺伝子の種を超えた役割を解明する。

J. Cell Biol., **170**, 521–526.

4) Segev, N. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 500–511.

5) Lafont, F., Lecat, S., Verkade, P., & Simons, K. (1998) *J. Cell Biol.*, **142**, 1413–1427.

6) Mostov, K.E., Verges, M., & Altschuler, Y. (2000) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 483–490.

7) Sato, T., Mushiake, S., Kato, Y., Sato, K., Sato, M., Takeda, N., Ozono, K., Miki, K., Kubo, Y., Tsuji, A., Harada, R., & Harada, A. (2007) *Nature*, **448**, 366–369.

8) Huber, L.A., Pimplikar, S., Parton, R.G., Virta, H., Zerial, M., & Simons, K. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 35–45.

9) Huber, L.A., de Hoop, M.J., Dupree, P., Zerial, M., Simons, K., & Dotti, C. (1993) *J. Cell Biol.*, **123**, 47–55.

10) Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., & Hirokawa, N. (1994) *Nature*, **369**, 488–491.

11) Pecache, N., Patole, S., Hagan, R., Hill, D., Charles, A., & Papadimitriou, J.M. (2004) *Postgrad Med. J.*, **80**, 80–83.

原田 彰宏

(群馬大学生体調節研究所細胞構造分野)

Analyses of molecules involved in intracellular polarized transport

Akihiro Harada (Laboratory of Molecular Traffic, Department of Molecular and Cellular Biology, Institute for Molecular and Cellular Regulation, Gunma University, 3-39-15 Showa, Maebashi, Gunma 371-8512, Japan)

シアノバクテリア概日時計タンパク質 KaiC のリン酸化

1. はじめに

概日リズムは高等動植物から原核生物に至るまで自然界で広く見いだされる約24時間周期の生物リズムである。このリズムは環境の照度や温度などの日周変動に対する直接的な反応として生じるのではなく、内因性の概日時計により駆動されている。1990年代を中心に、様々な生物種において、概日時計遺伝子がクローニングされたのを機に、概日時計の発振メカニズムの研究がさかんに行われているが、その全貌は未だ不明である。本稿では、概日時計研究における唯一の原核モデル生物であるシアノバクテリア概日時計発振機構の研究の現状を、特に時計タンパク質 KaiC のリン酸化に注目して紹介したい。

2. 概日リズムとは？

概日時計は、昼夜の照度や温度の変化などの環境変動をあらかじめ予測し、それに備えることによって効率的に生