

課題番号 47

上皮細胞におけるアクチン重合因子フォルミンの機能に関する研究

[1] 組織

代表者：東 智仁
(福島県立医科大学)
対応者：堀内 久徳
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

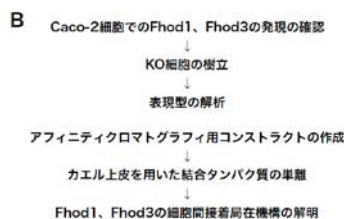
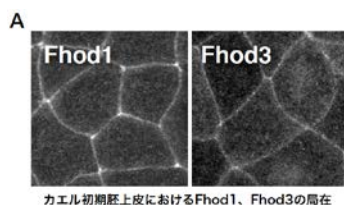
上皮細胞は発生過程の管腔構造の基本的な構造をかたちづくるのに重要な役割を果たしている。本研究は、上皮細胞の形態を決定するアクチン細胞骨格の制御因子であるフォルミンの機能を解明することを目的としている。

以下に、研究活動状況の概要を示す。

本研究に関する打ち合わせは、本研究を開始する前の 2017 年 11 月 22 日に代表者の東が加齢研を訪問した際に行った。

具体的には、15 種類知られているフォルミンの中で、上皮細胞の細胞間接着に強く局在することが示されている (Higashi T et al., MBC, 2018) Fhod1 と Fhod3 について、細胞間接着や上皮形態の制御における機能を解析する。具体的には、

- ・培養上皮細胞である Caco-2 細胞を用いて Fhod1/Fhod3 をノックアウトする
- ・カエル初期胚でライブイメージングを行う
- ・Fhod1/Fhod3 結合因子を in vitro で単離することを計画した。

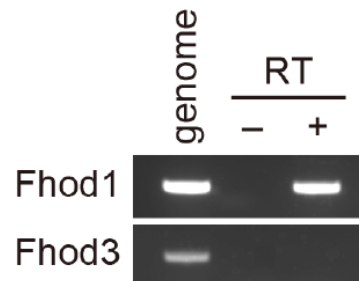


[3] 成果

(3-1) 研究成果

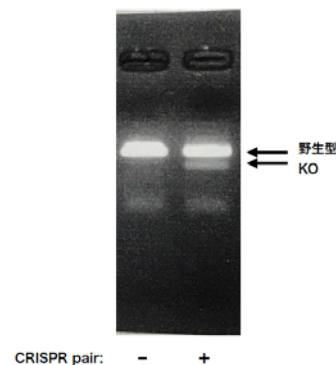
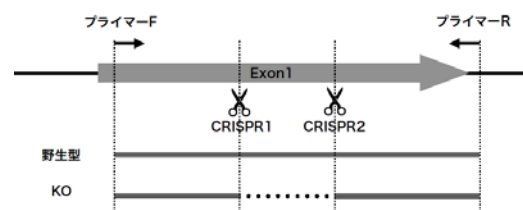
本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1に、培養上皮細胞Caco-2細胞を用いて、RT-PCR法によりFhod1とFhod3の発現の確認を行った。その結果、Fhod1は十分な量が発現しているが、Fhod3の発現量はFhod1と比べて著しく低いことがわかった。



Fhod1, Fhod3のcoding regionにプライマーを設計し、Caco-2から単離したゲノムDNAと、調製したcDNAライブラリをテンプレートとしてPCR。Fhod1のみの発現が検出された。

次に、CRISPR/Cas9法を用いてFhod1をノックアウトしたCaco-2細胞株を樹立することを試みた。



Fhod1を標的とするCRISPR pairを一過性に発現したCaco-2細胞のゲノムに対し、Fhod1遺伝子領域を増幅した。CRISPR pairを一過性に発現すると、一部の細胞で欠失が生じ、Fhod1遺伝子がノックアウトされていることがわかった。

現在、上記 CRISPR pair を導入した Caco-2 細胞から、KO 細胞のクローンを単離し、その表現型を解析しているところである。

また、カエル初期胚でのライブイメージングは、福島医大においてアフリカツメガエルの飼育施設、および、マイクロインジェクションの設備を構築中であり、来年度初頭には、実験の準備が整う予定である。

Fhod1 結合因子の単離のため、アフィニティクロマトグラフィに用いるベクターを構築した。今後は、このベクターを用いてリコンビナントタンパク質を精製し、カエル初期胚が材料として利用できるようなればアフィニティクロマトグラフィを実行する予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、培養細胞とアフリカツメガエル初期胚を用いて上皮細胞の細胞間接着を研究してきた福島医大の東と、生化学的解析を得意とする加齢研の堀内研究室の間で相互に技術的な交流ができた。将来、結合タンパク質を単離できれば、その細胞機能、生体での機能解析をさらに共同して進めていきたい。

[4] 成果資料

現時点ではなし。