

## 赤血球形成における極性輸送制御因子 EHBP1L1 の役割の解明

荻田 聡

大阪大学大学院医学系研究科 細胞生物学教室

### 【研究の背景】

細胞には固有の方向性があり、それを細胞極性という。細胞極性は細胞のみならず組織、個体の機能に重要な役割を持つ。我々は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab8 が腸の上皮細胞の管腔 (apical) 面の形成に重要であることを発見した。その分子機構として EHBP1L1 というタンパク質が Rab8 に結合し、apical 面に向かう小胞の形成に重要であることを解明した。さらに、EHBP1L1 のノックアウト (KO) マウスを作製したところ、生後間もなく死亡した。

### 【目 的】

EHBP1L1 KO マウスが生後間もなく死亡する原因として、貧血および赤血球の脱核異常が示唆されたため、脱核のどの段階で異常が生じるか、さらに脱核がどのような過程をたどり、そのどの段階で EHBP1L1 が重要な役割を解明することを目的とする。

### 【方 法】

EHBP1L1 欠損マウスは CRISPR/Cas9 法で作成した。ヘテロ接合体同士を交配し、産まれたホモ接合体は外見上白みが強いことから同定し、PCR でも遺伝子型を確認した。末梢血はメイギムザ染色で染色。末梢血、胎児肝臓を解離後、FACS で分離し、赤芽球の培養に使用した。核の極性化の観察にはイメージング FACS を使用した。赤芽球はエリスロポエチンなどを用いて分化させ、脱核途中の画分を使用した。赤芽球の免疫染色は Smear Gel 中に赤芽球を包埋後固定し染色した。Rab10, Bin1 のノックダウンには MEDEP-BRC5 細胞 (理研から入手) に shRNA をコードする lentivirus を感染後、薬剤耐性によるスクリーニングを行った。

### 【結 果】

EHBP1L1 KO マウスは貧血を呈し、生後 1 日以内に死亡した。EHBP1L1 KO マウスの末梢血中には有核赤血球が増加すると共に、無核の赤血球も形態に異常を示した。EHBP1L1 KO では脱核直前の赤芽球が増加し、脱核した赤芽球が低下したことから、EHBP1L1 は赤芽球の脱核過程に関与する可能性が高い。イメージング FACS を用いて脱核過程の核の極性化を解析したところ、EHBP1L1 KO の赤芽球は脱核過程の、核の極性化に異常をきたした。脱核中、EHBP1L1 は Rab8 およびその類縁分子である Rab10 と共に recycling endosome に局在した。過去の結果で Rab8 欠損マウスは貧血を示さなかったこと、赤芽球では Rab8 より Rab10 の方が発現が高いことから、脱核には Rab10 の方が重要と考え、Rab10 および EHBP1L1 に結合する Bin1, dynamin の脱核における重要性を調べるため、これらの阻害を行った。MEDEP-BRC5 細胞株で Rab10, Bin1 の遺伝子ノックダウン、dynamin の阻害剤 2 種を投与したところ、脱核効率の低下がみられた。さらに KO マウスでは横紋筋 (大腿四頭筋) においても核の極性化に異常が認められた。

## 【考 察】

EHP1L1 は Rab8 の結合分子として同定され、小腸の極性形成に重要とされたが、本研究により脱核にも重要と判明した。Rab8 と Rab10 は相同性が高いため、Rab8/10 は共に EHP1L1-Bin1-dynamamin 系によって腸、赤芽球、横紋筋の極性形成に関与し、更に広範な細胞種で極性形成に中心的な役割を果たす可能性もある。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

脱核の分子機構を解明することにより、in vitro, in vivo で赤芽球から効率よい脱核を促進することが出来るようになれば、ヒトの輸血用の赤血球の産生や貧血の治療に役立てることが可能となる。また、最近イヌの EHP1L1 遺伝子の突然変異で KO マウス同様の症状(貧血および中心核ミオパチー)を示すことが判明したため、ヒトのミオパチーの原因遺伝子候補となる可能性は高く、将来その診断治療に貢献できる可能性も十分考えられる。

## 【参考・引用文献】

The Rab8 GTPase regulates apical protein localization in intestinal cells.

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

EHP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells.

Nakajo A, Yoshimura SI, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A J Cell Biol 212: 297-306 (2016)