

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501	研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011	
課題番号：21590214	
研究課題名（和文）	膜骨格蛋白 Protein 4.1 ファミリー遺伝子欠損マウスの機能形態解析
研究課題名（英文）	Morphofunctional analyses on the Protein4.1-family gene deficient mouse
研究代表者	
	寺田 信生 (TERADA NOBUO)
	山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員
	研究者番号：60293461

研究成果の概要（和文）：

一連の膜骨格蛋白 4.1 ファミリーの研究に見出したマウス末梢神経系シュワン細胞ミエリンのシュミット・ランターマン切痕 (SLI) における 4.1G 膜骨格蛋白複合体について、4.1G 遺伝子欠損マウスを作製して検討した。シグナル蛋白 MPP6 は 4.1G で免疫沈降され、4.1G 欠損神経で蛋白発現量は激減し、4.1G が MPP6 の SLI への局在化と蛋白産生を制御する役割が考えられた。一方接着分子 CADM4 の 4.1G 欠損神経での SLI 局在消失により、4.1G の CADM4 膜内輸送局在化への役割が明らかとなった。さらに高月齢の 4.1G 欠損神経における SLI 円錐台の高さが、野生型と比較して優位に減少することより、4.1G 蛋白複合体の SLI の形態形成への関与がわかった。今回見出した SLI の 4.1G-MPP6-CADM4 複合体が、末梢神経線維での外力緩衝機構が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

We describe that the 4.1G colocalized at SLI with a member of the membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), and an immunoglobulin superfamily-cell adhesion molecule, CADM4. In 4.1G-knockout mice, both MPP6 and CADM4 were mostly localized in cytoplasm near Schwann cell nuclei, indicating abnormal protein transport. SLI shape was altered in aged 4.1G-knockout mouse nerves compared to that of wild-type mice, indicating functional significance of CADM4 for adhesion. Another immunoprecipitation experiment revealed that MPP6 was interacting with 4.1G. These findings indicate that the 4.1G has a specific role in targeting of MPP6 and CADM4 to the SLI, and the novel 4.1G-MPP6-CADM4 membrane skeletal complex probably maintains the structure of SLI as a reservoir against external mechanical forces.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計 機関番号
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：分子形態学、プロテイン 4.1、膜骨格、免疫組織化学、凍結技法、細胞接着

1. 研究開始当初の背景

赤血球は、血管内を流動して全身に酸素を運搬するために、赤血球膜裏側に「膜骨格」という網目構造を形成して、外力に対抗している。その膜骨格を構成する蛋白の一つであるプロテイン 4.1 は、網目を形成するスペクトリン-アクチンと細胞膜内貫通蛋白質と結合すると考えられている。このプロテイン 4.1 は 4 つのファミリー蛋白 (4.1R, 4.1G, 4.1N, 4.1B) をもつが、私たちは 4.1B と 4.1G に着目して、正常マウスおよびラットの臓器における超微形態学的局在を明らかにしてきた。これらの検討より、4.1B および 4.1G は、隣接する細胞や間質との接着に関与する可能性が考えられ、種々の細胞分布が変化する変異マウスモデルにおける 4.1 の発現、局在をもとに、「プロテイン 4.1 蛋白が各臓器で組織形成時の接着機能を介した組織構築に関与すること」を提唱した。これらの構造の個体レベルでの生体内機能をさらに明らかにする上で「プロテイン 4.1 が生体に必須であり、機能形態学的変化を個体レベルでもたらすのか？」を解析することが必要となった。このために 2006-2008 年にわたっては、4.1B の遺伝子欠損マウスを作製して個体レベルでの機能形態変化を研究した。今回、同様の遺伝子操作による分子生物学的手法を用いて 4.1G 欠損マウスを作製して検討することにした。

2. 研究の目的

プロテイン 4.1G 遺伝子欠損マウスを作製し、4.1G が発現する組織-臓器において、顕微鏡試料における構造や形態形成などの機能への役割について野生型マウスとの比較によって明らかにすること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 4.1G 遺伝子欠損マウス作製

- ①マウスゲノム DNA からのクローニング。
- ②ターゲティングベクターの構築。
- ③相同組換え ES 細胞作製。
- ④インジェクションとキメラマウス作製。
- ⑤F1 ヘテロマウス作製とジャームライントランスミッション確認。
- ⑥交配によるホモマウスを得る。

(2) 4.1G 遺伝子欠損マウス解析

- ①光学もしくは電子顕微鏡による 4.1G 欠損マウスの形態学的解析。
- ②4.1G 欠損臓器、組織における膜骨格構造の接着装置にからむ微細構造解析。
- ③蛋白発現組織、臓器における 4.1G と関連可能性のある蛋白質の 4.1G 欠損マウスにおける発現と局在変化の解析。

(3) 新たな顕微鏡試料作製と解析法の試み (生体内凍結技法との融合)

4. 研究成果

4.1G 遺伝子欠損 (変異) マウス作製を完了 (遺伝子、蛋白レベルで欠損を確認)。欠損マウスの C57BL6J 系統への戻し交配も行い、私たちが見出した精巣と末梢神経系における野生型マウスとの変化を検討した。

(1) 精巣における 4.1G および 4.1B の役割
マウス精巣において、4.1G が精粗細胞に発現して CADM1 と結合していることを免疫沈降法と免疫染色により明らかにした。しかし 4.1G 欠損マウスさらに 4.1B とのダブルノックアウトマウスにおいても、精子形成に関して野生型と大きな変化を認めないこと、また CADM1 の局在があることより、4.1G と CADM1 は結合するがその輸送や局在に必須な働きをもつわけではないことが分かった。(論文 14) このことは次に述べる末梢神経系では CADM1 ファミリーである CADM4 の局在が必須であることと比較して、臓器によって 4.1 ファミリー蛋白への依存度が異なることがわかった。

(2) 末梢神経系における 4.1G の役割

膜骨格蛋白 4.1 ファミリーの研究に見出した、マウス末梢神経系のシュワン細胞ミエリンにあるシュミット・ランターマン切痕 (SLI) における 4.1G が形成する膜骨格蛋白複合体について遺伝子欠損マウスを作製して解析した。マウス末梢神経系における 4.1G の、MPP6 と CADM4 蛋白との新規複合体を見出した。MPP6 は、細胞骨格の輸送蛋白や微小管に関わるシグナル蛋白と考えられているが、作製した 4.1G 欠損マウス坐骨神経ではこの蛋白発現量は激減し、4.1G が MPP6 の SLI への局在化と同時に蛋白産生を制御する役割が考えられた。一方 CADM4 は、細胞膜内接着分子であり 4.1G 欠損マウス坐骨神経で SLI への局在が消失することより、4.1G による CADM4 の膜内輸送～局在化の役割が明らかとなった。さらに 4.1G 欠損マウスの表現型として、高月齢の 4.1G 欠損マウス坐骨神経における SLI 円錐台の高さについて、野生型と比較して優位な減少を認めたことより、4.1G 蛋白複合体が SLI の形態形成に関与することがわかった。(論文 1, 4) この形態変化による機能変化については、伸展などストレス耐性の実験系を今後解析する必要がある。赤血球において 4.1G のファミリー蛋白 4.1R が欠損すると溶血性貧血というストレスに脆弱な赤血球への変化を考慮すると、今回見出した SLI での 4.1G-MPP6-CADM4 複合体が、末梢神経系の神経線維にある外力に対する緩衝分

子機構であることが示唆される。

なお腸管神経叢にある無髄神経線維のシュワン細胞突起に 4.1G が局在することも確認して発表した。この役割については現在結合蛋白を含めて検討を継続している。

(3) 凍結技法を用いた顕微鏡試料作製法研究成果の(1)と(2)にあげた臓器においても凍結技法を用いた形態や免疫組織化学的な検討を行ったが、それに加えて生体の状態をそのまま保持した解析法について検討した。量子ドットは蛍光消退がきわめて少ないナノ粒子であるが、これを血管注入したあとに生体内凍結して切片作製を行うことで、秒単位での血流分布が解析できることを発表した(論文9)。また低分子生体物質のアミノ酸は従来の固定・脱水過程で容易に溶出してしまうが、生体内凍結—凍結置換固定を用いることで組織切片内にそのまま保持して免疫染色によって解析できることを発表した(論文20)。このような凍結技法による共同研究についても、次項の論文リストにあるように発表し、今後の膜骨格蛋白複合体の解析にも応用できると考えている。

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 20 件)

(1) Kondo T, Nakazawa T, Terada N, Nakazawa K, Kawasaki T, Mochizuki K, Yamane T, Ohno S, Katoh R. Unusual thyroid carcinoma with excessive extracellular hyaline globules: a case of "hyalinizing papillary carcinoma". *Hum Pathol.* 2012 43(6):932-8 (査読有)

(2) Ivanovic A, Horresh I, Golan N, Spiegel I, Sabanay H, Frechter S, Ohno S, Terada N, Möbius W, Rosenbluth J, Brose N, Peles E. The cytoskeletal adapter protein 4.1G organizes the internodes in peripheral myelinated nerves. *J Cell Biol.* 2012 196(3):337-44. (査読有)

(3) Saitoh Y, Terada N, Saitoh S, Ohno N, Jin T, Ohno S. Histochemical analyses and quantum dot imaging of microvascular blood flow with pulmonary edema in living mouse lungs by "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol.* 2012 137(2):137-51. (査読有)

(4) Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Komada M, Saitoh S, Peles E, Ohno S. Essential function of protein 4.1G in targeting of

membrane protein palmitoylated 6 into Schmidt-Lanterman incisures in myelinated nerves. *Mol Cell Biol.* 2012 32(1):199-205.

(査読有)

(5) Bai Y, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Nakazawa T, Nakamura N, Katoh R, Ohno S. Differential distribution of blood-derived proteins in xenografted human adenocarcinoma tissues by in vivo cryotechnique and cryobiopsy. *Med Mol Morphol.* 2011 44(2):93-102. (査読有)

(6) Bai Y, Wu B, Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Ohno S. Histological study and LYVE-1 immunolocalization of mouse mesenteric lymph nodes with "In Vivo Cryotechnique". *Acta Histochem Cytochem.* 2011 44(2):81-90. (査読有)

(7) Shi L, Terada N, Saitoh Y, Saitoh S, Ohno S. Immunohistochemical distribution of serum proteins in living mouse heart with In vivo cryotechnique. *Acta Histochem Cytochem.* 2011 44(2):61-72. (査読有)

(8) Chen J, Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Ohno S. Immunolocalization of membrane skeletal protein, 4.1G, in enteric glial cells in the mouse large intestine. *Neurosci Lett.* 2011 488(2):193-8. (査読有)

(9) Terada N, Saitoh Y, Saitoh S, Ohno N, Jin T, Ohno S. Visualization of microvascular blood flow in mouse kidney and spleen by quantum dot injection with "in vivo cryotechnique". *Microvasc Res.* 2010 80(3):491-8. (査読有)

(10) Saitoh Y, Terada N, Saitoh S, Ohno N, Fujii Y, Ohno S. Three-dimensional reconstruction of living mouse liver tissues using cryotechniques with confocal laser scanning microscopy. *J Electron Microsc.* 2010 59(6):513-25. (査読有)

(11) Shimo S, Saitoh S, Terada N, Ohno N, Saitoh Y, Ohno S. Immunohistochemical detection of soluble immunoglobulins in living mouse small intestines using an in vivo cryotechnique. *J Immunol Methods.* 2010 361(1-2):64-74. (査読有)

(12) Ohno S, Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Fujii Y. Significance of "in

vivo cryotechnique” for morphofunctional analyses of living animal organs. *J Electron Microsc.* 2010 59(5):395-408. (査読有)

(13) Ohno S, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Saitoh Y, Fujii Y. In vivo cryotechniques for preparation of animal tissues for immunoelectron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2010 657:167-79. (査読有)

(14) Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Komada M, Kubota H, Ohno S. Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. *Reproduction.* 2010 139(5):883-92. (査読有)

(15) Saitoh Y, Terada N, Saitoh S, Ohno N, Fujii Y, Ohno S. Histochemical approach of cryobiopsy for glycogen distribution in living mouse livers under fasting and local circulation loss conditions. *Histochem Cell Biol.* 2010 133 (2):229-39. (査読有)

(16) Hemmi A, Osaka S, Sunagawa K, Kikuchi K, Ohno N, Terada N, Fujii Y, Ohno S, Nemoto N. Extraskeletal myxoid chondrosarcoma: a study using a quick-freezing and deep-etching method. *Med Mol Morphol.* 2009 42(3):180-4. (査読有)

(17) Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Fujii Y, Kondo T, Katoh R, Chan C, Abraham SN, Ohno S. Involvement of dynamin-2 in formation of discoid vesicles in urinary bladder umbrella cells. *Cell Tissue Res.* 2009 337(1):91-102. (査読有)

(18) Terada N, Ohno N, Saitoh S, Saitoh Y, Ohno S. Immunoreactivity of glutamate in mouse retina inner segment of photoreceptors with in vivo cryotechnique. *J Histochem Cytochem.* 2009 57(9):883-8. (査読有)

(19) Bai Y, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Nakazawa T, Nakamura N, Katoh R, Ohno S. Immunolocalization of serum proteins in xenografted mouse model of human tumor cells by various cryotechniques. *Histol Histopathol.* 2009 24(6):717-28. (査読有)

(20) Ohno N, Terada N, Komada M, Saitoh S, Costantini F, Pace V, Germann PG, Weber K, Yamakawa H, Ohara O, Ohno S. Dispensable

role of protein 4.1B/DAL-1 in rodent adrenal medulla regarding generation of pheochromocytoma and plasmalemmal localization of TSLC1. *Biochim Biophys Acta.* 2009 1793(3): 506-15. (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

(1) 寺田信生、齊藤百合花、大野伸彦、齊藤成、大野伸一：マウス末梢神経線維シュミットーランターマン切痕における膜骨格 4.1G-MPP6-Src 蛋白複合体形成の検討。第 71 回日本解剖学会中部支部地方会、2011、10 月 15 日、名古屋大学。

(2) 齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、大野伸一：生体内凍結試料での生きたマウス肺胞中隔の形態変化と肺血行動態の可視化法。第 71 回日本解剖学会中部支部学術集会、2011、10 月 15 日、名古屋大学。

(3) Y Saitoh, N Terada, S Saitoh, S Ohno : Imaging of microvascular blood flow in living mouse lungs injected with quantum dots by “in vivo cryotechnique”. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011、3 月 28 日、パシフィコ横浜 会議センター。

(4) N Terada, Y Saitoh, S Saitoh, N Ohno, S Ohno : Essential protein 4.1G function for recruitment of MPP6 into Schmidt-Lanterman incisures of mouse sciatic nerves. 第 88 回日本生理学会大会/第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011、3 月 28 日、パシフィコ横浜 会議センター。

(5) Z Huang, N Terada, Y Saitoh, J Chen, S Ohno : Immunohistochemistry of Activation-specific changes of Angiotensin II receptors in living mouse cerebellum with in vivo cryotechnique. 日本解剖学会第 70 回中部支部学術集会、2010、10 月 16 日、じゅうろくプラザ (岐阜県)。

(6) J Chen, N Terada, N Ohno, S Saitoh, Y Saitoh, S Ohno : Immunohistochemistry of protein 4.1G in enteric peripheral nervous tissues of mouse large intestine by “in vivo cryotechnique”. 日本解剖学会第 70 回中部支部学術集会、2010、10 月 16 日、じゅうろくプラザ(岐阜県)。

(7) 齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、藤井靖久、大野伸一：生体内凍結技法によるマウス肝組織試料の傷害肝細胞識別と 3 次元の再構築像への解析応用。日本解剖学会第 70 回

中部支部学術集会、2010、10月16日、じゅうろくプラザ(岐阜県)。

(8) 寺田信生、齊藤百合花、齊藤成、大野伸一：生体内凍結技法によるQ-dot注入マウス各臓器内微小血管の血行動態解析法。日本解剖学会第70回中部支部学術集会、2010、10月16日、じゅうろくプラザ(岐阜県)。

(9) 齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、大野伸一：共焦点レーザー走査型顕微鏡による生体内凍結マウス肝組織試料の3次元再構築像。第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010、3月28日、岩手県民会館、岩手水産会館、岩手医科大学。

(10) 寺田信生、齊藤成、齊藤百合花、大野伸一：生体内凍結技法により“生きた動物”の形態像と物質局在を探る。第115回日本解剖学会総会・全国学術集会、2010、3月28日、岩手県民会館、岩手水産会館、岩手医科大学。

(11) 白 玉勤、寺田信生、大野伸彦、齊藤成、齊藤百合花、大野伸一：生体内マウス腸間膜リンパ節の形態学のおよび免疫組織化学的解析法。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(12) 呉宝、白玉勤、寺田信生、齊藤成、齊藤百合花、大野伸一：生体内凍結技法によるマウス胸腺組織における種々血清蛋白の免疫組織化学的解析法。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(13) 寺田信生、大野伸彦、齊藤成、齊藤百合花、大野伸一：マウス曲精細管セルトリ支持細胞—精子発生細胞間接着における膜骨格プロテイン4.1Gの蛋白複合体形成機序。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(14) 齊藤成、寺田信生、齊藤百合花、藤井靖久、大野伸一：生体内凍結技法による正常および酸欠マウス腎近位尿管の電子顕微鏡的解析。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(15) 志茂聡、齊藤成、寺田信生、齊藤百合花、大野伸一：生体内凍結技法によるマウス小腸粘膜における免疫グロブリンの免疫組織化学的解析。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(16) 齊藤百合花、寺田信生、齊藤成、藤井靖久、大野伸一：クライオ生検法による生き

たマウス肝組織内グリコーゲン分布の光顕組織化学的検討。日本解剖学会第69回中部支部学術集会、2009、10月10日、浜松医科大学。

(17) 寺田信生、大野伸彦、齊藤成、齊藤百合花、藤井靖久、大野伸一：膀胱上皮被蓋細胞における円盤状液胞形成へのダイナミン2蛋白分子の機能解析。第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009、3月28日、岡山理科大学。

(18) 白玉勤、寺田信生、大野伸彦、齊藤成、齊藤百合花、大野伸一：生体内凍結技法によるマウス腸間膜リンパ節の組織像とLYVE-1の免疫組織細胞化学的解析。第114回日本解剖学会総会・全国学術集会、2009、3月28日、岡山理科大学。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 信生 (TERADA NOBUO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・医学研究員

研究者番号：60293461

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし