

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08148

研究課題名(和文)従来型解析にバイオインフォマティクスデータを取り入れた新規長鎖遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of novel genes by incorporating bioinformatics into conventional methods

研究代表者

増田 知之(MASUDA, TOMOYUKI)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70372828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高等脊椎動物の神経軸索は、生体内の軸索誘引および軸索反発因子によって適切なターゲットまで辿り着く。報告者らは、2つの新規長鎖遺伝子がコードする分泌型分子(mF1およびmF2)が、軸索ガイダンスに重要な役割を果たしていることを見出した。本研究では、バイオインフォマティクスによって、各々の分子のドメイン構造を決定したのち、遺伝子機能予測法を駆使して受容体候補分子を抽出した。さらに、*in situ*ハイブリダイゼーション法によって、マウス胎仔におけるmF1およびmF2 mRNAの発現部位を明らかにするとともに、部位特異的変異導入法を用いて、軸索ガイダンスにおける機能ドメインを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経の軸索を反発する分子についてはこれまでに多くの報告がある。しかしながら、軸索反発因子と比較して、軸索誘引因子に関する報告は極めて少ない。DRGの神経軸索を誘引する分子メカニズムを解明できれば、世界に先駆けた発見となり、神経科学における意義は大きい。また、DRG軸索は神経損傷の好発部位である末梢神経の感覚線維を構成している。DRG軸索を誘引・反発する因子は、神経損傷および神経変性疾患に対する治療剤としての適応が可能であり、臨床研究および神経再生治療にも大きな影響を及ぼしうる。

研究成果の概要(英文)：Axons in higher vertebrates can reach the appropriate targets by attractive and repulsive axonal guidance cues *in vivo*. We found that two novel secretory molecules (mF1 and mF2) play an important role in axonal guidance. In this study, we determined the domain structures of each molecule by bioinformatics, and then selected candidate receptor molecules using our prediction methods of gene function. In addition, we identified the expression regions of mF1 and mF2 mRNA in mouse embryos by *in situ* hybridization, and determined the functional domains in axonal guidance using site-directed mutagenesis methods.

研究分野：神経解剖学

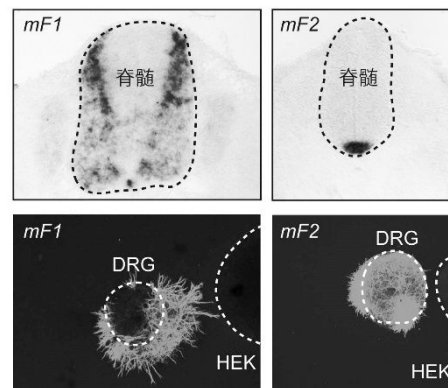
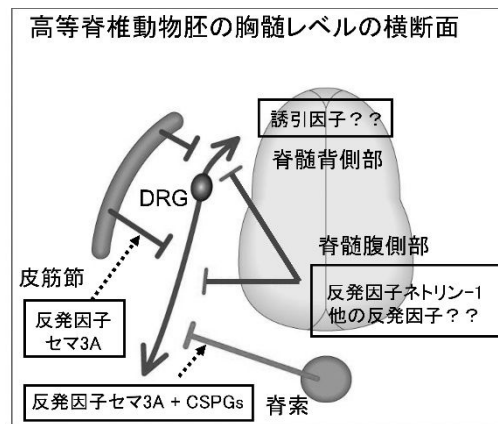
キーワード：細胞・組織 軸索ガイダンス バイオインフォマティクス 末梢神経 神経変性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発生初期、脊髄神経節細胞 (DRG) は中枢と末梢に向けて軸索を伸ばすが、その制御機構は不明であった。報告者らは、脊索等の非標的組織から出る軸索反発因子と脊髄背側部から出る軸索誘引因子がこのガイダンス機構に関与することを明らかにしたが、その実体の多くは判っていない (右上図)。

そこで報告者らは、かずさ DNA 研究所のマイクロアレイを用いて遺伝子のスクリーニングを行い、分泌型分子をコードし、DRG の神経軸索を誘導する可能性のある遺伝子を選出した。そのうち 2 個の機能不明な長鎖遺伝子を *mF1* (*mouse Fukushima 1*) および *mF2* と命名し (特許申請後に、NCBI の Official Symbol を公開予定)、その発現部位と機能を調べた。 *in situ* ハイブリダイゼーション法によって、両遺伝子のマウス胎仔脊髄での発現を調べたところ、*mF1* 遺伝子は脊髄背側部に、*mF2* 遺伝子は脊髄底板に強い発現がみられた (右中図)。次に、組織培養法によってこれらのコードする分子の機能を調べた結果、*mF1* は DRG 軸索を誘引、*mF2* は DRG 軸索を反発する活性を有することが示唆された (右下図)。



2. 研究の目的

2 つの新規長鎖遺伝子 (*mF1* と *mF2*) がコードする分泌型分子の神経系での作用機序を明らかにすることが本研究の目的である。そのために、(i) バイオインフォマティクス解析データに基づき、*mF1* および *mF2* がコードする分泌型分子のドメイン構造、機能部位および受容体候補分子を予測する、(ii) 従来の解析方法を駆使して、各分子の機能部位を検証するとともに、受容体候補分子の絞り込みを行う。

3. 研究の方法

(1) *in situ* ハイブリダイゼーション法

mF1・*mF2* 両遺伝子のマウス胚頭頸部における発現状況を、*in situ* ハイブリダイゼーション法によって調べた。

(2) バイオインフォマティクスによる解析

バイオインフォマティクスによる解析で、各分子のドメイン構造を決定した、次に新規に開発した遺伝子機能予測法によって、各遺伝子が、どのような生命事象と相関性が高いか調べた。さらに、同予測法によって各分子と相互作用を有する膜型分子を予測し、受容体候補分子を抽出した。

(3) 遺伝子導入実験

各分子の機能候補ドメインをコードする遺伝子にミューテーションを入れた欠損体を作製した。これらの欠損体を HEK 細胞およびアデノ随伴ウイルスベクターに導入し、*in vivo* および *in vitro* での神経軸索の挙動を解析した。

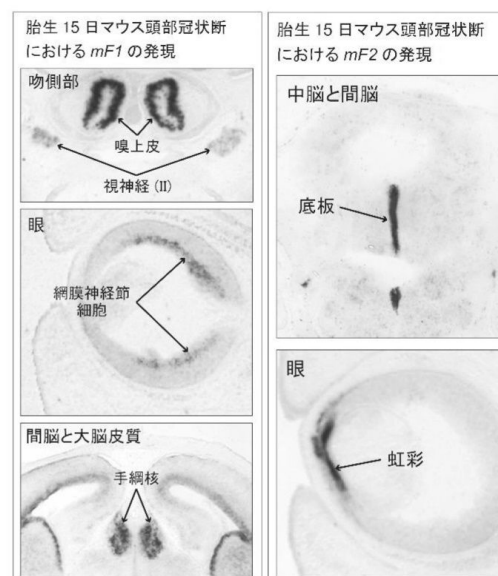
(4) *mF1* および *mF2* 受容体候補分子の絞り込み

上述の受容体候補分子をコードする遺伝子の cRNA プローブを作製し、発生期の DRG における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法にて検証した。

4. 研究成果

(1) 胎生期マウスの頭頸部における発現

mF1 および *mF2* のマウス胚の頭頸部における発現を、*in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。*mF1* mRNA は嗅上皮・視神経に発現していた (右図)。一方で、*mF2* mRNA は虹彩および間脳の底板に発現していた (右図)。

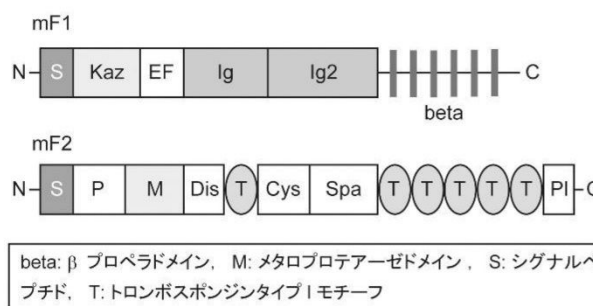


(2) ドメイン構造と機能の予測、ならびに受容体候補分子の抽出

バイオインフォマティクスで、各分子のドメイン構造を決定した(右上図)、次に、新規に開発した遺伝子機能予測法から得られた結果を遺伝子ネットワーク・パスウェイ解析 (ingenuity canonical pathways) にかけてところ、*mF1* が神経軸索ガイダンス事象に対して高い相関性を示すことが明らかとなった(右下表)。

さらに、同予測法を用いて、各遺伝子と高い相関を持つ膜型分子を予測し、その中から胎生期のDRGに発現する可能性のある分子を抽出した。

その他の結果については、後日公表可能となった際に再提出し、公表する。



Ingenuity Canonical Pathways	$-\log(p\text{-value})$
Axonal Guidance Signaling	18.600
Molecular Mechanisms of Cancer	16.500
Signaling by Rho Family GTPases	14.400
p38 MAPK Signaling	11.200
G-Protein Coupled Receptor Signaling	11.000
Integrin Signaling	11.000
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	10.500
Glucocorticoid Receptor Signaling	10.200
p53 Signaling	10.000
Protein Ubiquitination Pathway	10.000
ERK/MAPK Signaling	9.880
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	9.430
RhoGDI Signaling	9.330
IL-6 Signaling	9.210
Wnt/ β -catenin Signaling	9.070
Huntington's Disease Signaling	9.040

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Kazuhiro Ishii, Kiyotaka Nemoto, Nobuaki Iwasaki, Tohoru Takeda, Tomoyuki Masuda, Yasuyuki Shibata, Akira Tamaoka. (2019) Decreased regional cerebral blood flow in patients with diphenylarsinic acid intoxication. *European Journal of Neurology* 26 (1), 136–141. DOI: 10.1111/ene.13783 (査読有)

Tomoyuki Masuda, Kazuhiro Ishii, Yukio Morishita, Nobuaki Iwasaki, Yasuyuki Shibata, Akira Tamaoka. (2018) Hepatic histopathological changes and dysfunction in primates following exposure to organic arsenic diphenylarsinic acid. *The Journal of Toxicological Sciences* 43 (5), 291–298. DOI: 10.2131/jts.43.291 (査読有)

R. Koike, T. Amemiya, T. Horii, M. Ota. (2018) Structural changes of homodimers in the PDB. *Journal of Structural Biology* 202 (1), 42–50. DOI: 10.1016/j.jsb.2017.12.004 (査読有)

Tomoyuki Masuda, Kazuhiro Ishii, Tomohiro Nakayama, Nobuaki Iwasaki, Yasuyuki Shibata, Akira Tamaoka. (2018) High-sensitivity quantitative analysis reveals the non-linear relationship between the dose and deposition of diphenylarsinic acid in the rat central nervous system following its subchronic exposure. *Neurotoxicology and Teratology* 65, 26–33. DOI: 10.1016/j.ntt.2017.12.004 (査読有)

Tomoyuki Masuda, Kazuhiro Ishii, Yasuo Seto, Tomoko Hosoya, Ryuta Tanaka, Tomohiro Nakayama, Nobuaki Iwasaki, Yasuyuki Shibata, Akira Tamaoka. (2017) Long-term accumulation of diphenylarsinic acid in the central nervous system of cynomolgus monkeys. *Archives of Toxicology* 91 (8), 2799–2812. DOI: 10.1007/s00204-016-1928-z (査読有)

Shintaro Minami, George Chikenji, Motonori Ota. (2017) Rules for connectivity of secondary structure elements of proteins: Two-layer $\alpha\beta$ sandwiches. *Protein Science* 26 (11), 2257–2267. DOI: 10.1002/pro.3285 (査読有)

Yuko Yoshimura, Chihiro Ishikawa, Haruki Kasegai, Tomoyuki Masuda, Masaaki Yoshikawa, Takashi Shiga. (2017) Roles of 5-HT1A receptor in the expression of AMPA receptor and BDNF in developing mouse cortical neurons. *Neuroscience Research* 115, 13–20. DOI: 10.1016/j.neures.2016.09.008 (査読有)

Tomoyuki Masuda, Junko Itoh, Takuya Koide, Yasushi Tomidokoro, Yosuke Takei, Kazuhiro Ishii, Akira Tamaoka. (2017) Transforming growth factor- β 1 in the cerebrospinal fluid of patients with distinct neurodegenerative diseases. *Journal of Clinical Neuroscience* 35, 47–49. DOI: 10.1016/j.jocn.2016.09.018 (査読有)

Motonori Ota, Mitsunori Ikeguchi, Akinori Kidera. (2016) Itinerary profiling to analyze a large number of protein-folding trajectories. *Biophysics and Physicobiology* 13, 295–304. DOI: 10.2142/biophysico.13.0_295 (査読有)

Divya Shaji, Takayuki Amemiya, Ryotaro Koike, Motonori Ota. (2016) Interface property

responsible for effective interactions of protean segments: Intrinsically disordered regions that undergo disorder-to-order transitions upon binding. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478 (1), 123–127. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.082 (査読有)

Ryotaro Koike, Shuichi Takeda, Yuichiro Maeda, Motonori Ota. (2016) Comprehensive analysis of motions in molecular dynamics trajectories of the actin capping protein and its inhibitor complexes. *Proteins* 84 (7), 948–956. DOI: 10.1002/prot.25043, 20160416 (査読有)

Motonori Ota, Hideki Gonja, Ryotaro Koike, Satoshi Fukuchi. (2016) Multiple-localization and hub proteins. *PLoS ONE* 11, e0156455. DOI: 10.1371/journal.pone.0156455 (査読有)

Masaaki Yoshikawa, Tomoyuki Masuda, Azusa Kobayashi, Kouji Senzaki, Shigeru Ozaki, Shin Aizawa, Takashi Shiga. (2016) Runx1 contributes to the functional switching of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) from neurite outgrowth promoting to suppressing in dorsal root ganglion. *Molecular and Cellular Neuroscience* 72, 114–122. DOI: 10.1016/j.mcn.2016.02.001 (査読有)

Yuuki Ogihara, Tomoyuki Masuda, Shigeru Ozaki, Masaaki Yoshikawa, Takashi Shiga. (2016) Runx3-regulated expression of two Ntrk3 transcript variants in dorsal root ganglion neurons. *Developmental Neurobiology* 76 (3), 313–322. DOI: 10.1002/dneu.22316 (査読有)

Masaaki Yoshikawa, Mizuki Hirabayashi, Ryota Ito, Shigeru Ozaki, Shin Aizawa, Tomoyuki Masuda, Kouji Senzaki, Takashi Shiga. (2015) Contribution of the Runx1 transcription factor to axonal pathfinding and muscle innervation by hypoglossal motoneurons. *Developmental Neurobiology* 75 (11), 1295–1314. DOI: 10.1002/dneu.22285 (査読有)

[学会発表](計 21 件)

Kazuhiro Ishii, Junko Itoh, Tomoyuki Masuda, Yasushi Tomidokoro, Naruhiko Sahara, Takeshi Ikeuchi, Akira Tamaoka. Altered expression of total and phosphorylated tau by organic arsenic compounds. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018 年 5 月 24 日, ロイトン札幌, 札幌(北海道).

Tomoyuki Masuda, Kazuhiro Ishii, Nobuaki Iwasaki, Akira Tamaoka. Hepatic histopathological changes and dysfunction in humans and nonhuman primates following exposure to organic arsenic diphenylarsinic acid. 第 123 回日本解剖学会全国学術集会, 2018 年 3 月 30 日, 日本医科大学・日本獣医生命科学大学武蔵境キャンパス, 武蔵野(東京).

Tomoyuki Masuda, Kazuhiro Ishii, Nobuaki Iwasaki, Akira Tamaoka. Hepatic histopathological changes following subchronic administration of diphenylarsinic acid to cynomolgus monkeys. 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2017 年 9 月 23–24 日, 愛媛大学重信キャンパス, 東温(愛媛).

増田知之, 谷口雅彦, 佐久間千恵, 石井一弘, 八木沼洋行. マウス成体脳における 5 型セマフォリンの発現様式. 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2017 年 9 月 23–24 日, 愛媛大学重信キャンパス, 東温(愛媛).

川口将史, 真喜屋宏美, 川崎能彦, 増田知之, 土佐靖彦, 倉谷滋, 村上安則. カメの脊髄神経 - ボディプランの改変が神経系に及ぼす影響 -. 第 88 回日本動物学会富山大会シンポジウム, 2017 年 9 月 21 日, 富山県民会館, 富山(富山). (シンポジウム講演)

T. Masuda, K. Ishii, T. Hosoya, R. Tanaka, T. Nakayama, N. Iwasaki, Y. Shibata, A. Tamaoka. Non-proportional accumulation of diphenylarsinic acid in the central nervous system following subchronic administration to rats. XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017), 2017 年 9 月 18 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

K. Ishii, T. Masuda, J. Itoh, T. Koide, Y. Tomidokoro, Y. Takei, A. Tamaoka. Transforming growth factor- β 1 levels in the cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative diseases. XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017), 2017 年 9 月 17 日, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

増田知之, 谷口雅彦, 佐久間千恵, 石井一弘, 上田秀一, 川野仁, 小林和人, 武井陽介, 八木沼洋行. 5 型セマフォリンのマウス成体脳での発現および末梢神経系での機能の解析. 第 122 回日本解剖学会全国学術集会, 2017 年 3 月 28 日, 長崎大学坂本キャンパス, 長崎(長崎).

石井一弘, 増田知之, 伊藤順子, 小出拓也, 富所康志, 武井陽介, 玉岡晃. 神経変性疾患患者の髄液における TGF- β 1 濃度と臨床マーカーとしての可能性. 第 35 回日本認知症学会学術集会, 2016 年 12 月 2 日, 東京国際フォーラム, 千代田区(東京).

増田知之, 谷口雅彦. セマフォリン 5 ファミリーの発現様式と軸索ガイダンスにおける機能. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2016 年 9 月 3 日, 杏林大学井の頭キャンパス, 三鷹(東京).

吉川雅朗, 増田知之, 小林梓, 尾崎繁, 松川睦, 今田正人, 相澤信, 志賀隆. BMP4 シグナルが調節する脊髄神経節ニューロンの神経突起伸長と CGRP 発現における転写因子 Runx1 の役割. 第 121 回日本解剖学会全国学術集会, 2016 年 3 月 29 日, ビッグパレットふくしま, 郡山(福島).

増田知之. 時間は無い, 金も無い, もう若くない…ないない尽くしの中で実践する神経科学研究法. 第 121 回日本解剖学会全国学術集会シンポジウム, 2016 年 3 月 28 日, ビッグパレットふくしま, 郡山(福島). (シンポジウム講演)

川口将史, 渡邊愛己, 真喜屋宏美, 長島寛, 川崎能彦, 増田知之, 土佐靖彦, 倉谷滋, 村上安則. 羊膜類体幹部における脊髄神経形成過程の発生プログラムの進化. 第 121 回日本解剖学会全国

学術集会シンポジウム, 2016年3月28日, ビッグパレットふくしま, 郡山(福島)。(シンポジウム講演)

吉村由祐子, 石川千尋, 増田知之, 志賀隆. セロトニン神経系のグルタミン酸受容体発現における役割. 日本解剖学会関東支部第103回学術集会, 2015年11月7日, 慶応義塾大学日吉キャンパス, 横浜(神奈川県).

Masaaki Yoshikawa, Shigeru Ozaki, Tomoyuki Masuda, Mutsumi Matsukawa, Masato Imada, Shin Aizawa, Takashi Shiga. Roles of Runx1 transcription factor in axonal projection of mouse embryonic hypoglossal motoneurons. 2015 Annual Meeting, Society for Neuroscience, 2015年10月21日, McCormick Place, Chicago, IL(イリノイ州), USA.

増田知之, 谷口雅彦. セマフォリン 5A は感覚性の末梢神経線維に対して誘引・許容性の作用を有している. 第26回日本末梢神経学会学術集会, 2015年9月18-19日, ホテルブエナビスタ, 松本(長野).

Yuko Yoshimura, Takashi Shiga, Tomoyuki Masuda. Roles of 5-HT1A receptor in the mRNA expression of AMPA receptor and BDNF in embryonic cortical neurons. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月30日, 神戸国際会議場, 神戸(兵庫).

Chihiro Ishikawa, Tomoyuki Masuda, Takashi Shiga. 生後発達期のセロトニンとセロトニン 1A 受容体が不安やうつにおける脳の発達に与える影響. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月29日, 神戸国際会議場, 神戸(兵庫).

Masaaki Yoshikawa, Shigeru Ozaki, Tomoyuki Masuda, Mutsumi Matsukawa, Masato Imada, Shin Aizawa, Takashi Shiga. Roles of Runx1 transcription factor in tongue muscle innervation by mouse embryonic hypoglossal neurons. 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28日, 神戸国際会議場, 神戸(兵庫).

増田知之. 神経変性疾患原因遺伝子の同定とNGS. NGS現場の会第4回研究会, 2015年7月2-3日, つくば国際会議場, つくば(茨城).

- ⑳ Tomoyuki Masuda, Chie Sakuma, Shuichi Ueda, Takashi Shiga, Hiroyuki Yaginuma, Masahiko Taniguchi. Semaphorin 5A is a permissive and attractive guidance cue for dorsal root ganglion axons in higher vertebrate embryos. 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN), 2015年6月3-4日, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan.

[図書] (計1件)

増田知之. TAG-1. 日本神経科学学会脳科学辞典編集委員会, 脳科学辞典, 2016.
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/TAG-1>, DOI: 10.14931/bsd.6825

[産業財産権]

出願状況 (計1件)

1. 感覚性の末梢神経線維の伸長又は誘引促進剤, 神経疾患又は損傷の治療剤及び足場デバイス
発明者: 増田知之
権利者: 国立大学法人筑波大学
種類: 特許
番号: 特願 2015-200550
出願年月日: 2015年10月8日
国内外の別: 国内

取得状況 (計1件)

1. 感覚性の末梢神経線維の伸長又は誘引促進剤
発明者: 増田知之, 石井一弘
権利者: 国立大学法人筑波大学
番号: 特許第 6278524 号
登録年月日: 2018年1月26日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.masudatomoyuki.com/>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

太田 元規 (OTA, motonori)

名古屋大学・情報学研究科・教授

研究者番号: 40290895