

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06812

研究課題名(和文)コンディショナルノック法を用いたNna1の生理機能解析

研究課題名(英文)Physiological analysis of Nna1 using the conditional knock out method

研究代表者

周麗(ZHOU, LI)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：80568410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：プルキンエ細胞死と運動失調を呈する自然発生型ミュータントpcdマウスの原因遺伝子がNna1であることが報告された。Nna1を欠損させるマウスを作って解析した。Nna1 KOマウスは、野生型より体が小さく、3週齢から一列な行動実験から協調運動および運動学習の障害が確認された。組織学的に、小脳萎縮、プルキンエ細胞(PC)と樹状突起の消失が確認された。アポトーシスは、PC層だけではなく、分子層および顆粒細胞層においても検出された。グリアの活性化も見られた。Nna1の機能喪失がpcd表現型を引起し、プルキンエ細胞だけでなく、精巣および網膜のような小脳以外の器官においても細胞死が生じることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定遺伝子Nna1の異常による小脳の機能障害はマウスだけではなく、人間の病気にも指摘されている。ちなみに、最近の臨床研究より、Nna1遺伝子の異常は、知能障害、歩行障害という小脳の病気が報告されている。Nna1 KOマウスを用いて、その病態を解明し、治療法の検討と薬物の開発に活かせばよいと考えられる。今後、症状を緩和する目標として、Nna1 KOマウスに対する治療方法への探索を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mouse was first identified as a spontaneous mutation showing ataxic behavior in an autosomal recessive manner. The causative gene is Nna1. To test whether the carboxypeptidase domain of Nna1 is essential, we generated a conditional allele of Nna1, in which carboxypeptidase domain-encoding exon 21 and 22 are floxed to generate null knockout (KO) mice. Nna1 KO mice showed obvious ataxia with smaller body size than WT. Rotarod test showed dysfunction in motor coordination and disability in motor learning. Cerebellar atrophy, purkinje cell (PC) loss and dendrite disappearance were observed in the cerebellum of Nna1 KO mice. Apoptotic cells were detected not only in the PC layer, but also in the molecular layer and the granule cell layer. Our data indicate that loss-of-function of Nna1 results in the pcd phenotypes and that cell death occur not only in Purkinje cells but in other cell types in the cerebellum and other organs as testis and retina.

研究分野：神経生物学

キーワード：Nna1 Purkinje cell knock out apoptosis ataxia carboxypeptidase domain

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

### 1. 研究開始当初の背景

プルキンエ細胞死と運動失調を呈する自然発生型ミュータントマウスとして知られている pcd (Purkinje cell degeneration)マウスの原因遺伝子が Nna1(nervous system nuclear protein induced by axotomy 1)/CCP1(cytosolic calboxpeptidase 1)であることが2002年に報告された。

### 2. 研究の目的

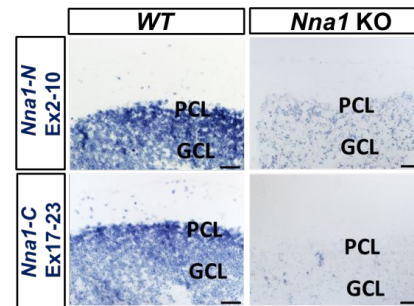
Nna1のC-末端にあるカルボキシペプチダーゼドメインはNna1の機能に必須かどうかを確かめるために、カルボキシペプチダーゼドメインをコードするエクソン21および22をfloxしたマウスを作製した。全身、小脳プルキンエ細胞、小脳顆粒細胞それぞれでCreを選択的に発現するマウスと交配させnullマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスを作出し、解析する。

### 3. 研究の方法

主に行動的と形態学的な手法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

(1) Nna1 KO 脳における Nna1 mRNA および Nna1 タンパク質の損失は、in situ ハイブリダイゼーションおよびウェスタンブロット解析によって確認した(右図)。



(2) 全身 KO マウス(null)は、野生型より体が小さく、行動解析では運動失調と学習障害が見られた(下図 1)。

3 週齢から一列な行動実験から協調運動および運動学

習の障害が確認された。組織解析では小脳全体の萎縮および分子層の縮小が確認され、プルキンエ細胞の消失も多く見られた(下図 2)。したがって、null マウスの表現型が pcd マウスと類似していることが確認された (Zhou et al. J Neurochem. 2018)。

図 1 null マウスの運動学習失調

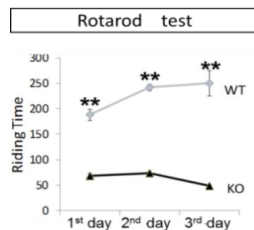
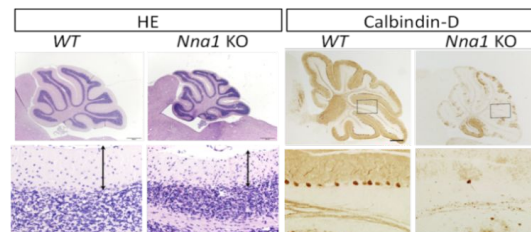
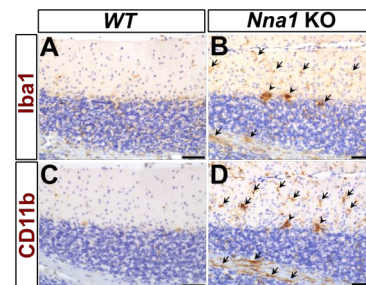


図 2 null マウスの小脳の萎縮とプルキンエ細胞の脱落



アポトーシス関連マーカーは、PC 層だけではなく、分子層および顆粒細胞層においても検出された。ミクログリア細胞の活性化も見られた。(右図)

(3) 小脳の萎縮の原因を調べるために、細胞死の指標である cleavedcaspase-3 の発現を免疫染色で分析した。その結果、アポトーシス細胞は null マウスのプルキンエ細胞層と顆粒細胞層にあることを明らかにした。プルキン



Zhou et al. Fig.5

エ細胞の脱落は生後 3 週齢から始まり、5 - 6 週齢の時にほぼ全部消失に対し、顆粒細胞はちょっと遅れて、4 - 5 週齢からアポトーシスの細胞が出始め、6 - 7 週齢の時にピークを迎える。

(4) 神経細胞死のメカニズムを分析するために、神経細胞死の兆候を示す指標の一つである polyglutamated tubulin (PolyG-tubulin) の発現量をウェスタンブロットで解析したところ、Nna1 null (KO) マウスでは WT マウスの約 1.6 倍であった(図 3)。Tubulin の長さは神経細胞の生死と密に関連する重要な要素である。小胞体(ER)ストレス活性化経路に関連する遺伝子 CHOP を In situ hybridization の手法を用いて調べた結果、3 週齢のマウスの小脳組織において、KO マウスのプルキンエ細胞層に CHOP の陽性シグナルが多数見られた(図 4)。ER ストレス経路の活性化は Nna1 の機能損失の一つの結果と考えられる。

図 3 神経細胞死の指標が上昇

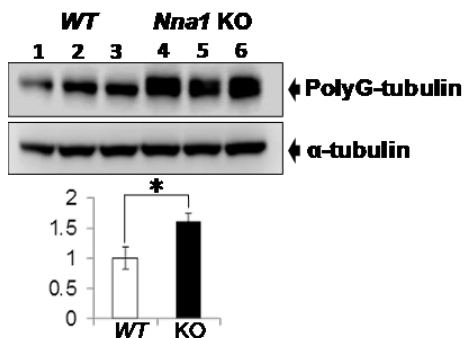
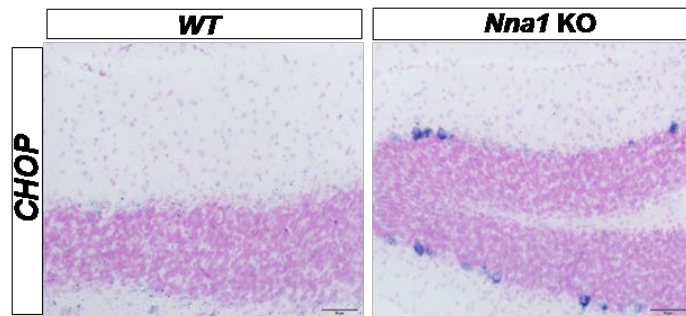


図 4 小胞体(ER)ストレス経路の活性化



今後、細胞死に対する Nna1 の細胞自律神経または非細胞自律神経作用を明らかにするために、現在 Nna1flox マウスをプルキンエ細胞または顆粒細胞特異的な Cre マウスと交配し cKO マウスを作製しており、解析を行っている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Zhou L, Hossain M I, Yamazaki M, Abe M, Rie Natsume L, Konno K, Watanabe M, Sakimura K, Takebayashi H. Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. J Neurochemistry 2018 Nov; 147(4):557-572 査読有

Hyakawa-Yano Y, Suyama S, Nogami M, Koya I, Furukawa T, Zhou L, Abe M, Sakimura K, Takebayashi H, Nakanishi A, Okano H, and Yano M. An RNA-binding protein, QKi5, regulates embryonic neural stem cells through pre-mRNA processing in cell adhesion signaling. Gens&Development. 2017 Sep 15 査読有

Ikeda M, Hossain MI, Zhou L, Horie M, Ikenaka K, Horii A, Takebayashi H. Histological detection of dynamic glial responses in the dysmyelinating Tabby-jimpy mutant brain. Anat Sci Int. 2016 Nov 25 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Zhou Li, Hossain M Ibrahim, Abe Manabu, Natsume Rie, Takebayashi Hirohide, Sakimura Kenji. Deletion of carboxypeptidase domain encoding exons of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes. 2017 第 58 回新潟生化学懇話会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：崎村 建司

ローマ字氏名：Sakimura kenji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。