

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07340

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質R-Rasによるガイダンス因子シグナル統合の分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the signal integration mechanism on R-Ras family small GTPase in axonal guidance

研究代表者

生沼 泉 (Oinuma, Izumi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：40452297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2つのプロジェクトを目的として挑んだ。1つは、R-Rasサブファミリーのうち、TC21の神経細胞における形態制御、特に、樹状突起スパインの形成に関するシグナル経路の解明である。もう1つは、神経細胞内の内在性の蛋白質局在を明らかにすべく、ゲノム編集法で分化後神経細胞内の蛋白質のラベリングを行い、可視化するという技法の開発を目的に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれの最終目標は、損傷を受けた中枢神経細胞から再び神経繊維伸長させ、機能的神経回路を再構築することである。近年、損傷した脳神経組織に幹細胞から作出した神経細胞を移植するというアプローチからの再生医療研究が精力的に進められている。しかしながら、最近の知見で、神経損傷時に一部の神経細胞は一定期間生存を維持していることが明らかになってきている。従って、移植に依らずとも、神経細胞に備わっている内在性の神経伸長能力を賦活化させることで、損傷神経細胞が新たな神経回路を構築することができ、機能回復につながる可能性があると考え、損傷神経細胞に対する遺伝子置換操作による神経再生を目指し、研究に挑んだ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed two experimental projects. The first project is elucidation of TC21 function on formation of dendritic spine. The second project is labelling endogenous synaptic protein within post mitotic neurons using CRISPR/Cas to visualize dynamics of the endogenous proteins.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索 低分子量G蛋白質 細胞骨格 ゲノム編集 軸索ガイダンス 樹状突起 スパイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低分子量 G 蛋白質は神経細胞の形態形成および維持に重要な役割をしている蛋白質である。その中でも、R-Ras ファミリー G 蛋白質は細胞の骨格や分化に重要な役割を果たしている。しかしながら、それら R-Ras ファミリー G 蛋白質 (R-Ras, TC21, M-Ras) の下流のシグナル伝達経路は明らかではない。また、それらの蛋白質の結合分子に関する情報も乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、2つのプロジェクトを目的として挑んだ。1つは、R-Ras サブファミリーのうち、TC21 の神経細胞における形態制御、特に、樹状突起スパインの形成に関するシグナル経路の解明である。もう1つは、神経細胞内の内在性の蛋白質局在を明らかにすべく、ゲノム編集法で分化後神経細胞内の蛋白質のラベリングを行い、可視化するという技法の開発を目的に取り組んだ。

3. 研究の方法

1) TC21 の神経細胞における形態制御

初代培養神経細胞をラット海馬より調製し、それに対して TC21 の shRNA や各過剰発現ベクターを導入し、樹状突起スパインの数やサイズを評価した。さらに、TC21 のエフェクターの候補分子として、afadin に着目し、afadin と TC21 の機能相関についても同様の手法を用いて検討した。

2) ゲノム編集法による分化後神経細胞における神経細胞内の蛋白質のラベリング

われわれの最終目標は、損傷を受けた中枢神経細胞から再び神経繊維伸長させ、機能的神経回路を再構築することである。近年、損傷した脳神経組織に幹細胞から作出した神経細胞を移植するというアプローチからの再生医療研究が精力的に進められている。しかしながら、最近の知見で、神経損傷時に一部の神経細胞は一定期間 (少なくとも1ヶ月間) 生存を維持していることが明らかになってきている。従って、移植に依らずとも、神経細胞に備わっている内在性の神経伸長能力を賦活化させることで、損傷神経細胞が新たな神経回路を構築することができ、機能回復につながる可能性があると考え、損傷神経細胞に対する遺伝子置換操作による神経再生を目指し、侵襲性の低い電気パルスを利用した遺伝子置換 (遺伝子書き換え) 操作を実現させるべく、電気パルス条件の検討のための研究に挑んだ。

4. 研究成果

1) TC21 の神経細胞における形態制御

まず、胎生期から成体までのマウス脳を、RT-PCR を用いて解析した。その結果、TC21 の mRNA は神経細胞が発達する間、持続して発現していることがわかった。次に、*in situ* hybridization 法をもちいて脳における発現部位の解析を行った。すると、大脳皮質の皮質層や海馬のアンモン角など神経細胞が多く存在している部位に強いシグナルが認められた。また、胎生期から成体までのラット脳や海馬初代培養神経細胞での発現の変化を解析したところ、樹状突起の成熟やスパインの形成が起こる時期で非常に強い発現が認められた。そこで、樹状突起が成熟する時期の培養神経細胞に常時活性型変異体 TC21 を過剰発現させ、その表現型を解析した。その結果、常時活性型変異体 TC21 を過剰発現させることにより、樹状突起から伸びるフィロポディアの数の増加が観察された。次に、TC21 に特異的な shRNA を作成し、内在性の TC21 に RNA 干渉を用いたノックダウンを行った。その結果、樹状突起のフィロポディアの数が減少した。また、このノックダウンによる効果は shRNA 耐性ミュータントである res-TC21 を発現させることによって抑制された。また、スパイン形成期のラット海馬神経細胞においては、野生型 TC21 を過剰発現させることで、スパインの増加が見られ、内在性の TC21 を、RNA 干渉を用いてノックダウンすることで、スパインの減少が見られた。以上の結果より、神経細胞において TC21 は樹状突起で将来スパインになるようなフィロポディアの形成や維持に、またスパインへの成熟の関与が示唆される。さらに、TC21 による樹状突起スパインの形成を担う下流の分子の探索も行った。その結果、過去に R-Ras の結合分子として同定されている afadin が TC21 と結合し、樹状突起スパインの形成を担っていることが明らかとなった。

2) ゲノム編集法による分化後神経細胞における神経細胞内の蛋白質のラベリング

遺伝子治療への技術応用のためには、組み換え効率を高め、生体内において分化後神経細胞での相同組み換えを可能とする必要がある。我々は、電気パルス法を用いた相同組み換えと蛋白質標識の至適化の検討を行うことで、マウス成体の中枢神経組織である大脳皮質において、分化後神経細胞における相同組み換えに成功した[論文 1]。大脳皮質脳神経ネットワークの破綻は様々な疾患に繋がる。大脳皮質内の神経細胞に対する直接的な遺伝子治療技術の開発は、各種難治性疾患の治療基盤の確立となる。以上から、我々はまず、大脳皮質神経細胞を直接操作し、相同組み換えを行うことを試みた。我々は、哺乳類モデル動物としてマウスを用い、妊娠 14.5 日齢の子宮内に居るマウスに対して、大脳皮質内に対する直接的な遺伝子導入を行った。条件検討の結果、電気パルスを用いた「電気細孔法」を用い

た遺伝子導入により、母体から出産された各仔において大脳皮質特異的に神経細胞での遺伝子導入を確認し、体細胞への直接的遺伝子導入を確認した。また、この遺伝子導入操作を施した仔は、通常通り哺乳され正常な発生過程を辿った。

この技法を用い、実際に分化後神経細胞における相同組み換えに挑戦した。学習や記憶に関係する遺伝子である *PSD-95* に着目し、マウス *PSD-95* 遺伝子座をターゲットとした相同組み換えによる蛋白質標識を目的とし、ノックインコンストラクトを構築した。このコンストラクトおよび遺伝子導入細胞を確認するための発現ベクターコンストラクトを妊娠 14.5 日齢の母体マウス子宮内に居るマウス 1 匹 1 匹に対して、電気細孔法を用い同時に導入し、生後 2 ヶ月まで通常通り母親の下で哺乳・保育した後に、仔を組織化学および Western Blot 法により解析することにより、狙った遺伝子領域での相同組み換えを検証した。検討の結果、一部の神経細胞で相同組み換えが起こったことで発せられる緑色蛍光を確認でき、さらにこの緑色蛍光タンパク質が内在性の *PSD-95* タンパク質に意図した通りに融合されていることを、Western Blot 法で確認した。以上の成果から、マウス生体において、電気パルス法を用いて遺伝子置換を引き起こすことに成功した。また、同様の技法は大脳皮質組織のみならず、網膜組織においても適応されることが明らかになり、確立した系の普遍性の裏付けも得られた。今後、網膜および大脳皮質神経細胞の遺伝性変性疾患への治療応用が期待される。

さらに、初代培養神経細胞においても、電気パルス法を用いた遺伝子置換の条件検討を行った。遺伝子治療の汎用性の向上のためには、各タンパク質をコードする遺伝子の C 末側のみならず、N 末側への遺伝子置換操作を可能とある必要があり、われわれは、N 末側へのノックイン技術の確立を目的として、神経伸長に促進的に働くアクチン制御因子の lamellipodin (*Lpd*) に着目し、ラット *Lpd* 遺伝子座の N 末側への緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のノックインのための条件を検討した。プロモーター領域を含まれる可能性を極力排除し、相同組み換えが起こらない限り緑色蛍光タンパク質が発現しないようにした。設計したコンストラクトをラット大脳皮質神経細胞に導入し、試験管内で培養した。神経細胞内で相同組み換えが起こり、*Lpd* 遺伝子の N 末側に EGFP が融合されているかどうかを、細胞から抽出したゲノム DNA サンプルに対する RT-PCR 法を用いて確認した。PCR 法による検討の結果、相同組み換えが起こり、神経細胞内在性の *Lpd* 遺伝子座のゲノム配列に EGFP が融合されていることが確認できた。この結果から、従来から実施されている C 末側のみでなく、homology arm の長さを工夫することで、targeting vector からの意図しない発現を起こすことなく、意図した相同組み換え下での遺伝子融合産物の発現を可能とすることができることがわかった。この技法は、様々な神経伸長因子をターゲットとすることで、今後、神経損傷モデル系での神経再生への利用応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohama D, Matsuda T, Oinuma I.	4. 巻 1692
2. 論文標題 Differential regional and subcellular localization patterns of afadin splice variants in the mouse central nervous system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 74-86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda T, Namura A, Oinuma I.	4. 巻 689
2. 論文標題 Dynamic spatiotemporal patterns of alternative splicing of an F-actin scaffold protein, afadin, during murine development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 56-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.gene.2018.12.020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 Spatio-temporally regulated alternative splicing of an actin scaffold afadin is necessary for proper cortical layer 2/3 neural circuit formation
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会(Neuroscience2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生沼泉
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質R-Rasがシグナルハブとして指揮する多彩な細胞機能
3. 学会等名 大阪大学生命科学研究科研究交流会(FBSコロキウム)（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 アクチン足場蛋白質afadinはNeuropilin-1と直接結合し、脳梁軸索の軸索間接着を介した束化を制御する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松田孝彦、大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 マウス中枢神経系における細胞骨格制御因子afadinの2種類のスプライスバリエントの発現・局在差異の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生沼泉
2. 発表標題 アクチン足場タンパク質のスプライシングの時空間制御が担う神経回路構築
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生沼泉
2. 発表標題 神経発達を担うアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間制御
3. 学会等名 神経発達・再生研究会（生理学研究所研究会）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生沼泉
2. 発表標題 脳梁軸索回路構築はセントラルドグマのレベルで規定される
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 アクチン足場蛋白質 afadin の選択的スプライシングが脳梁軸索の束化を時空間的に制御する
3. 学会等名 次世代脳冬のシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生沼泉
2. 発表標題 アクチン足場分子の選択的スプライシングの時空間制御が担う脳梁軸索ガイダンスの新概念
3. 学会等名 次世代脳冬のシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田彩、松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 軸索分岐制御因子afadinのアイソフォームの脳神経系での発現の時空間的差異の検証
3. 学会等名 第64回生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 軸索形態制御因子afadinの2つのアイソフォームの大脳皮質神経回路構築における生理機能の解明
3. 学会等名 第64回生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名村有紗、松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 細胞骨格制御因子afadinの神経特異的スプライスバリエントの産生機構解明の試み
3. 学会等名 第64回生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 大脳皮質神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質 afadin の2つのアイソフォームの発現時期と機能の検証
3. 学会等名 第57回生命科学夏の学校(生化学若い研究者の会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名村有紗、松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 神経細胞の形態形成を担うafadinの選択的スプライシングを制御する因子の探索
3. 学会等名 第57回生命科学夏の学校(生化学若い研究者の会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大浜大揮、生沼泉
2. 発表標題 マウス大脳皮質2/3層神経細胞の発達における長短2つの afadin アイソフォームの機能差異
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 名村有紗、松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 アクチン足場タンパク質afadinの2つのスプライスパリアントの発現差異の解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap https://researchmap.jp/7000008636/ 個人ホームページ http://homepage1.canvas.ne.jp/izumi/

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考