

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006 年度～2008 年度  
 課題番号：18590181  
 研究課題名(和文)  
 プロテイン 4.1B 遺伝子欠損マウスを用いた個体レベルでの機能形態変化の研究  
 研究課題名(英文)  
 Morphofunctional studies on the Protein4.1B deficient mouse body  
 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・准教授  
 研究者番号：60293461

## 研究成果の概要：

赤血球膜裏側の血管ずり応力に抗する「膜骨格」構成蛋白プロテイン 4.1B の臓器組織での局在と病態変化を研究した。4.1B は腎臓でナトリウム-重炭酸イオン共輸送体と、さらに副腎髄質ホルモン分泌細胞で膜貫通細胞接着蛋白 TSLC1 と結合していた。また急速凍結による電子顕微鏡 3 次元観察により膀胱上皮傘細胞のダイナミン蛋白による伸縮機構を明らかにした。さらに生体内凍結技法により血管内ヘモグロビン分子構造変化を瞬時に止めて酸素飽和度の分布をラマン顕微鏡で得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

## 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、生体内凍結、共焦点ラマン顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

赤血球は、速度を変化させて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。その膜骨格関連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している。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 に対す

る特異抗体を用いて、正常マウスおよびラットの腎臓、腸管、膵臓、精巣、末梢神経系、副腎における超微形態学的局在を明らかにした。これらの検討より、4.1B および 4.1G は、隣接する細胞および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における 4.1B 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細胞分化に関与すること」を提唱した。一方、細胞接着にはアク

チンなどの細胞骨格が密接に関与することが知られ、4.1Bを含む膜骨格構造が細胞骨格を含む接着装置にどのように組み込まれているのか興味深い。これらの構造を理解するために、個体レベルの生体内機能を明らかにする上で「プロテイン 4.1B 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？」を解析する必要がある。

## 2. 研究の目的

プロテイン 4.1B 遺伝子欠損マウスを作製し、4.1B 発現組織、臓器において、電子顕微鏡観察のための、急速凍結ディープエッチング・レプリカ法、生体内凍結技法を用いて、4.1B の細胞膜裏側での構造および血流を保つ生体での組織構築を3次元的に可視化し、野生型マウスとの比較によって機能形態学的変化を解析すること。

## 3. 研究の方法

### (1) プロテイン 4.1B 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) プロテイン 4.1B 遺伝子欠損マウスの解析

①光学もしくは電子顕微鏡による 4.1B 欠損マウスの形態学的解析  
②4.1B 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 4.1B と関連可能性のある蛋白質の 4.1B 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)

①長時間分解能なリン酸化蛋白の免疫組織化学的解析  
②酸欠による薬剤構造変化を介した酸欠細胞の免疫組織化学的解析  
③共焦点ラマン顕微法による凍結乾燥した生体内物質のマッピング  
④低温下共焦点ラマン顕微法による流動赤血球酸素飽和度の解析

## 4. 研究成果

マウス作成過程がわかるように、年度別(次項(1)~(3))に、経過と得られた成果について記載する。

### (1) 2006年度

① 遺伝子欠損マウスの作製とそのマウスラインの確立を行った。プロテイン4.1B遺伝子欠損マウス作製は、研究の方法3 [I] 1~5を行い、4.1B蛋白の個体での欠損を確認した。当初予定した2006年度計画に達し、この4.1B遺伝子欠損マウスを用いて、報告した細胞・組織・臓器について形態学的変化の解析を開始した。

② 動的機能形態学的解析法の研究として、生体内物質を本来の生きた状態の局在で保持できる生体内凍結技法により試料を作製し免疫組織化学的に解析した。具体的には、マウス網膜における暗順応から光応答した際における、視細胞内ロドプシン蛋白のリン酸化構造変化について、時間分解能を秒単位に高めて解析した。

### (2) 2007年度

① 2006年度より作製した4.1B遺伝子欠損マウスについて、C57BL6マウスへの戻し交配を継続、ヘテロ、ホモマウスの形態・機能変化について検討した。結合蛋白の探索としては、4.1Bのマウス腎臓近位尿細管について検討した。蛋白構造、配列の比較によりナトリウム-重炭酸イオン共輸送体(NBC)蛋白に赤血球イオン交換蛋白Band3との類似部位を見出したため、そのGST融合蛋白を作製して結合能を解析。さらに免疫沈降法を用いて複合体形成を確認。また、細胞直下の4.1ファミリーより一段階下流とも関連するシグナル伝達蛋白である細胞質内蛋白p55に着目して、4.1Bとの複合体形成についても検討した。免疫染色では、NBC, 4.1Bさらにp55は近位尿細管のS1-S2の側基底面に陽性部位を認め、これらの複合体としての局在を明らかにした。これらより、腎臓で4.1Bが電解質の保持に関連する可能性を提唱している。また作製した4.1B欠損マウスにおいても、p55の免疫染色性の減少を確認したが、実際の機能変化については*in vitro*単離尿細管および生体での尿濃縮能を測定したが、野生型と大きな違いは認めず関連蛋白による補填が示唆された。

② さらに4.1ファミリー蛋白を詳細に検討するために、4.1Bと同様の遺伝子工学的手法を用い、4.1G遺伝子に対する欠損マウスの作製に着手した。

③ 顕微鏡学的解析手法の開発として生体内凍結技法を用いた“生きた動物”の解析について、免疫組織化学法および共焦点ラマン顕微鏡法と組み合わせて、時間分解能を高めて解析した。具体的には、これまで困難であった酸素欠乏に陥った肝細胞を酸欠状態で構造変化する薬剤をとらえる免疫組織化学的方法により可視化した。また凍結乾燥法を用いて生体内凍結マウス眼球標本の組織内マッピングを行い、共焦点ラマン顕微鏡による生体物質による組織解析と、顕微鏡像力を明確にした。この過程で生体血管内の赤血球酸素飽和度を直接解析できることを見出し、2008年度の低温下でのラマン解析に発展させた(研究成果(3)③)。

### (3)2008 年度

① 4.1B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、私たちが見出したマウス副腎髄質内分泌細胞における4.1Bの発現と局在について野生型マウスと比較した。4.1Bと結合する細胞膜内蛋白として、細胞膜接着蛋白TSLC1が副腎髄質内分泌細胞に局在し、免疫沈降法で4.1Bとの結合性を見出した。このTSLC1は4.1B欠損マウスでも細胞膜へ局在し、4.1B欠損でも副腎髄質の機能が野生型と大きな違い(表現型)は認めなかった。この部位には4.1ファミリー蛋白である4.1Nの局在も認め、類似蛋白が相互に補填する可能性があり、今後検討が必要である。

② 2007年度より開始した4.1G遺伝子欠損マウス作製について、ベクター作製後、変異ES細胞の選択を継続した。

③ 顕微鏡試料作製のために、電子顕微鏡で3次元観察できる急速凍結技法、ディープエッチング・レプリカ法および生体内凍結技法による形態解析を行った。具体的には、急速凍結ディープエッチング・レプリカ法を用いて、膀胱上皮傘細胞における伸縮に応じるための円盤状液胞の細胞内と細胞膜間の移動のための分子機構として、ダイナミン2蛋白の発現と局在を見出し、さらに薬剤によるその機能阻害での形態変化を解析した。ま

た生体内凍結技法を用いた化学固定や酸素欠乏の影響を減らし時間分解能を高めた解析を応用して、低温下共焦点ラマン顕微鏡法によりヘモグロビン酸素結合状態分子構造のラマン波形分析により、マウス腸管・肝臓内流動赤血球の酸素飽和度に対応したの生体内の状態を保持した試料上でマッピングによる定量解析法を新たに見出した。

### 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 32 件)

1. N Terada, N Ohno, S Saitoh, Y Saitoh, Y Fujii, T Kondo, R Katoh, C Chan, S. N. Abraham, and S. Ohno. Involvement of Dynamin-2 in Formation of Discoid Vesicles in Urinary Bladder Umbrella Cells. *Cell Tissue Res*, *in press* (査読有)
2. 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)
3. 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 793(3):506-15. (査読有)
4. Saitoh S, Terada N, Ohno N, Saitoh Y, Soleimani M, Ohno S. Immunolocalization of phospho-Arg-directed protein kinase-substrate in hypoxic kidneys using in vivo cryotechnique. *Med Mol Morphol*. 2009 42(1):24-31. (査読有)
5. Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Naito I, Ohno S. Permselectivity of blood follicle barriers in mouse ovaries of the mifepristone-induced polycystic ovary model revealed by in vivo cryotechnique. *Reproduction*. 2008 136(5): 599-610. (査読有)
6. Ohno N, Terada N, Bai Y, Saitoh S, Nakazawa T, Nakamura N, Naito I, Fujii Y, Katoh R, Ohno S. Application of cryobiopsy to morphological and immunohistochemical analyses of xenografted human lung cancer tissues and functional blood vessels. *Cancer*. 2008 113(5):1068-79. (査読有)

7. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Ohno S. Application of "in vivo cryotechnique" to detect erythrocyte oxygen saturation in frozen mouse tissues with confocal Raman cryomicroscopy. *J Struct Biol.* 2008 163(2):147-54. (査読有)
8. Saitoh S, Terada N, Ohno N, Ohno S. Distribution of immunoglobulin-producing cells in immunized mouse spleens revealed with "in vivo cryotechnique". *J Immunol Methods.* 2008 331(1-2):114-26. (査読有)
9. Sawanobori E, Terada N, Fujii Y, Higashida K, Nakazawa S, Ohno S. Ultrastructural study of human glomerular capillary loops with IgA nephropathy using quick-freezing and deep-etching method. *Histol Histopathol.* 2008 23(3):297-307. (査読有)
10. Ohno N, Terada N, Saitoh S, Ohno S. Extracellular space in mouse cerebellar cortex revealed by in vivo cryotechnique. *J Comp Neurol.* 2007 505(3):292-301. (査読有)
11. Hemmi A, Osaka S, Sumie O, Nemoto N, Ohno N, Terada N, Fujii Y, Ohno S. Chondrosarcoma with myxoid change: a study using a quick-freezing and deep-etching method. *Ultrastruct Pathol.* 2007 31(4):293-302. (査読有)
12. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Seki G, Komada M, Suzuki T, Yamakawa H, Soleimani M, Ohno S. Interaction of membrane skeletal protein, protein 4.1B and p55, and sodium bicarbonate cotransporter1 in mouse renal S1-S2 proximal tubules. *J Histochem Cytochem.* 2007 55(12):1199-206. (査読有)
13. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Ohno S. Immunohistochemical detection of hypoxia in mouse liver tissues treated with pimonidazole using "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol.* 2007 128(3): 253-61. (査読有)
14. Zhou H, Ohno N, Terada N, Saitoh S, Fujii Y, Ohno S. Involvement of follicular basement membrane and vascular endothelium in blood follicle barrier formation of mice revealed by 'in vivo cryotechnique'. *Reproduction.* 2007 134(2):307-17. (査読有)
15. Ohno N, Terada N, Saitoh S, Zhou H, Fujii Y, Ohno S. Recent development of in vivo cryotechnique to cryobiopsy for living animals. *Histol Histopathol.* 2007 22(11):1281-90. (査読有)
16. Murata S, Nakazawa T, Ohno N, Terada N, Iwashina M, Mochizuki K, Kondo T, Nakamura N, Yamane T, Iwasa S, Ohno S, Katoh R. Conservation and alteration of chromosome territory arrangements in thyroid carcinoma cell nuclei. *Thyroid.* 2007 17(6): 489-96. (査読有)
17. Terada N, Ohno N, Saitoh S, Fujii Y, Ohguro H, Ohno S. Raman microscopy of freeze-dried mouse eyeball-slice in conjunction with the "in vivo cryotechnique". *Microsc Res Tech.* 2007 70(7):634-9. (査読有)
18. Shindo D, Kim JJ, Xia W, Kim KH, Ohno N, Fujii Y, Terada N, Ohno S. Electron holography on dynamic motion of secondary electrons around sciatic nerve tissues. *J Electron Microsc.* 2007 56(1):1-5. (査読有)
19. Uemoto Y, Suzuki S, Terada N, Ohno N, Ohno S, Yamanaka S, Komada M. Specific role of the truncated betaIV-spectrin Sigma6 in sodium channel clustering at axon initial segments and nodes of ranvier. *J Biol Chem.* 2007 282(9):6548-55. (査読有)
20. Zhou D, Ohno N, Terada N, Li Z, Morita H, Inui K, Yoshimura A, Ohno S. Immunohistochemical analyses on serum proteins in nephrons of protein-overload mice by "in vivo cryotechnique". *Histol Histopathol.* 2007 22(2):137-45. (査読有)
21. Li Z, Ohno N, Terada N, Zhou D, Yoshimura A, Ohno S. Application of periodic acid-Schiff fluorescence emission for immunohistochemistry of living mouse renal glomeruli by an "in vivo cryotechnique". *Arch Histol Cytol.* 2006 69(3): 147-61. (査読有)
22. Yang C, Terada N, Ohno N, Fujii Y, Ohno S. Morphological analysis of lamellar structures in mouse type II pneumocytes by quick-freezing and freeze-drying with osmium tetroxide vapor-fixation. *Med Mol Morphol.* 2006 39(2):88-96. (査読有)
23. Fujii Y, Ohno N, Li Z, Terada N, Baba T, Ohno S. Morphological and histochemical analyses of living mouse livers by new 'cryobiopsy' technique. *J Electron Microsc.* 2006 55(2):113-22. (査読有)
24. Ohno N, Terada N, Yamakawa H, Komada M, Ohara O, Trapp BD, Ohno S. Expression of protein 4.1G in Schwann cells of the peripheral nervous system. *J Neurosci Res.* 2006 84(3):568-77. (査読有)
25. Hemmi A, Tabata M, Homma T, Ohno N, Terada N, Fujii Y, Ohno S, Nemoto N. Application of a quick-freezing and deep-etching method to pathological diagnosis: a case of elastofibroma. *J Electron Microsc.* 2006 55(2):89-95. (査読有)

26. Terada N, Ohno N, Murata S, Katoh R, Stallcup WB, Ohno S. Immunohistochemical study of NG2 chondroitin sulfate proteoglycan expression in the small and large intestines. *Histochem Cell Biol.* 2006 126(4):483-90. (査読有)
27. Ohno N, Terada N, Ohno S. Histochemical analyses of living mouse liver under different hemodynamic conditions by "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol.* 2006 126(3): 389-98. (査読有)
28. Li Z, Ohno N, Terada N, Ohno S. Immunolocalization of serum proteins in living mouse glomeruli under various hemodynamic conditions by "in vivo cryotechnique". *Histochem Cell Biol.* 2006 126(3):399-406. (査読有)
29. Terada N, Ohno N, Fujii Y, Baba T, Ohno S. Dynamic study of intramembranous particles in human fresh erythrocytes using an "in vitro cryotechnique". *Microsc Res Tech.* 2006 69(4):291-5. (査読有)
30. Terada N, Ohno N, Ohguro H, Li Z, Ohno S. Immunohistochemical detection of phosphorylated rhodopsin in light-exposed retina of living mouse with in vivo cryotechnique. *J Histochem Cytochem.* 2006 54(4):479-86. (査読有)
31. Terada N, Ohno N, Li Z, Fujii Y, Baba T, Ohno S. Application of in vivo cryotechnique to the examination of cells and tissues in living animal organs. *Histol Histopathol.* 2006 21(3):265-72. Review (査読有)
32. Liao X, Terada N, Ohno N, Li Z, Fujii Y, Baba T, Ohno S. Immunohistochemical study of serum albumin in normal and cadmium-treated mouse testis organs by "in vivo cryotechnique". *Histol Histopathol.* 2006 21(1):35-40. (査読有)

[学会発表] (計8件)

1. Terada N et al. Immunohistochemical study of glutamate in mouse retina with "in vivo cryotechnique" in paraffin-embedded sections. IXth Asia-Pacific Microscopy Conference 2008年11月5日 Jeju, Korea
2. 寺田信生ら 膀胱移行上皮内被蓋細胞におけるダイナミン蛋白の免疫組織細胞化学的検討 日本組織細胞化学会学術集会 2008年10月6日 長崎
3. 寺田信生ら “生体内凍結技法”による生きた動物臓器内機能蛋白分子構造と局在

の解析法 日本臨床分子形態学会 2008年10月3日 福岡

4. Terada N et al. Immunolocalization of dynamin-2 around discoid vesicles in umbrella cells of mouse urinary bladder. XIII International Congress of Histochemistry & Cytochemistry 2008年8月25日 Gdansk, Poland
5. 寺田信生ら 生体内凍結技法による細胞組織内機能分子局在の解析 日本解剖学会全国学術集会 2008年3月27日 大分
6. 寺田信生ら 生体内凍結試料での蛍光グルコース誘導体と共鳴ラマン波形の蛍光およびラマン顕微鏡による低温下解析 日本解剖学会第67回中部支部学術集会 2007年10月13日 名古屋
7. 寺田信生ら 生体内凍結技法による低酸素下マウス肝組織におけるピモニダゾール結合蛋白の免疫組織化学的解析 第48回日本組織細胞化学会総会 2007年9月28日 甲府
8. 寺田信生ら マウス中枢神経系における Protein4.1 (FERM) とPDZドメインを持つ KIAA0316蛋白の免疫細胞化学的解析 第112回日本解剖学会全国学術集会 2007年3月28日 大阪

[図書] (計1件)

Stewart GW, Wilmore SMS, Ohno S, Terada N. Questions of cell shape. In "Neuroacanthocytosis Syndromes II" (ed. Walker RH et al.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2008 115-132.

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

特記すべきことなし

#### 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・  
准教授  
研究者番号：60293461

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし