

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09974

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質シグナルの破綻に起因する網膜疾患の分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of retinal disease caused by the disruption of the signaling pathway involving small GTPases

研究代表者

松田 孝彦 (Matsuda, Takahiko)

兵庫県立大学・理学研究科・客員研究員(研究員)

研究者番号：40313093

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：R-Ras、TC21(R-Ras2)、M-Ras(R-Ras3)は「R-Ras subfamily」に分類される低分子量G蛋白質である。R-Ras subfamilyは細胞増殖、分化、形態形成などにおいて重要な役割を果たすことが知られているが、これまでの研究の大半は培養細胞レベルのものであり、臓器・個体レベルでの機能については殆ど判っていない。本研究ではTC21に焦点を当て、TC21がマウス網膜発生において果たす生理的役割の解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、低分子量G蛋白質TC21を介した細胞内シグナルを人為的に遮断したり増強すると、マウス網膜の発生に異常が出るようになった。この結果から、TC21は網膜発生の重要な制御因子の一つであると考えられる。現時点ではTC21遺伝子の変異に起因するヒト網膜疾患の事例は報告されていないが、今後の研究により、TC21遺伝子の変異とヒト網膜疾患との相関が明らかになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The R-Ras subfamily small GTPases are composed of R-Ras, TC21(R-Ras2), and M-Ras (R-Ras3). Although previous studies using cultured cells (in vitro) showed that they play essential roles in various biological processes, including cell growth, differentiation, and morphogenesis, little is known about their functions at the tissue level in vivo. This study focused on TC21 and tried to elucidate its role in mouse retinal development.

研究分野：分子生物学

キーワード：低分子量G蛋白質 網膜 発生 ゲノム編集

## 1. 研究開始当初の背景

原がん遺伝子として有名な“古典的 Ras”と称される H-Ras, K-Ras, N-Ras の 3 種の低分子量 G 蛋白質は、長年、多くの研究者の注目を集め、その機能が詳細に調べられてきた。一方、150 種類以上のメンバーから成る低分子量 G 蛋白質の中で、古典的 Ras とのアミノ酸配列の相同性が最も高く、性質が非常に似ているのが R-Ras (Ras related protein) subfamily に属する R-Ras, TC21(R-Ras2), M-Ras(R-Ras3) の 3 種である(図 1)。

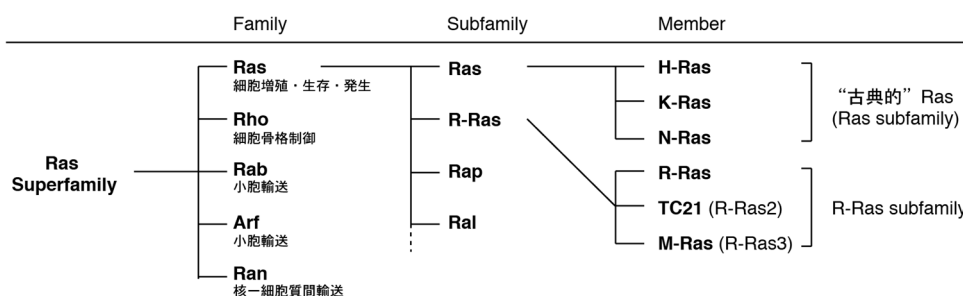


図 1 低分子量 G 蛋白質の分類  
150 種類以上のメンバーの中で、R-Ras subfamily(R-Ras/TC21/M-Ras) は“古典的” Ras と最も類似する。

R-Ras subfamily は古典的 Ras(Ras subfamily)と同様に Raf/MAPK 経路や PI3K/Akt 経路を活性化できる。また、R-Ras subfamily は、培養細胞レベル(*in vitro*)では細胞増殖、分化、形態形成などにおいて重要な役割を果たすことが知られている。特に、大脳由来の神経初代培養を用いた研究により、R-Ras subfamily の 3 分子は、神経細胞の形態形成においてそれぞれが独自に重要な機能を担うことが明らかになっている(総説: 生沼, 生化学 87, 428 (2015))。しかしながら、これまでの研究の大半は培養細胞レベル(*in vitro*)のものであり、臓器・個体レベル(*in vivo*)での機能については殆ど解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、R-Ras subfamily 低分子量 G 蛋白質が中枢神経系の発生において果たす生理的役割を、マウスの臓器・個体レベル(*in vivo*)で明らかにすることを目的とした。そのための第一歩として、マウスの網膜発生に着目し、研究代表者らが報告してきた生体内エレクトロポレーション法(Matsuda *et al.*, *PNAS* 101, 16 (2004); Matsuda *et al.*, *PNAS* 104, 1027 (2007))を用いた生体内での遺伝子操作技術を活用し、マウスの網膜発生において R-Ras subfamily を介した細胞内シグナルが果たす役割の解明を目指した。なお、R-Ras subfamily の 3 分子いずれも網膜で発現していたが、本研究では TC21 の解析に重点を置いた。

## 3. 研究の方法

### (1) TC21 のマウス網膜内での発現パターンの解析

TC21 のマウス網膜内での発現パターンを調べるために、市販の特異的抗体を用いた免疫組織染色を試みたが、使用した市販抗体の感度と特異性が十分ではなく、信頼出来るデータが得られなかった。そこで、研究代表者らが報告した「ゲノム編集技術を活用して内在性蛋白質をタグで標識する技術」(Matsuda & Oinuma, *Sci. Rep.* 9, 11309 (2019); Matsuda & Oinuma, *Mol. Biol. Cell* 30, 2838 (2019))を応用し、タグを特異的に認識する抗体を用いた免疫組織染色により、内在性の TC21 蛋白質の網膜内での発現パターンを解析した。

## (2) TC21 のマウス網膜内での機能解析

活性化型 TC21 変異体遺伝子の強制発現ベクターや、TC21 shRNA ノックダウンベクターを、生体内エレクトロポレーション法を用いてマウス新生仔の網膜に導入し、発生過程の網膜内での機能獲得・機能喪失実験を行った。

## (3)新規の遺伝子発現制御システムの開発

マウス網膜内で R-Ras subfamily の遺伝子機能をより詳細に解析するために、生体内エレクトロポレーション法を用いて細胞に導入した外来遺伝子の発現の ON/OFF 制御システムの開発を試みた。

## 4 . 研究成果

### (1) TC21 のマウス網膜内での発現パターンの解析

ゲノム編集技術を活用して内在性の TC21 蛋白質をエピトープタグで標識し、エピトープタグを認識する抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、マウス網膜切片において内在性の TC21 蛋白質を特異的かつ高感度で検出することが出来た。TC21 は網膜のミュラーグリア細胞に発現しており、その発現パターンから、網膜細胞の発生や機能などへの関与が予想された。

### (2) TC21 のマウス網膜内での機能解析

生体内エレクトロポレーション法を用いて活性化型 TC21 変異体遺伝子をマウス新生仔の網膜で強制発現させたところ、GFP のみを発現させたコントロールの網膜細胞と比較してミュラーグリア細胞の割合が増加していた。一方、shRNA を用いて TC21 の発現をノックダウンすると、未分化網膜前駆細胞から視細胞への分化が抑制された。つまり、TC21 遺伝子の強制発現とノックダウンいずれの場合も網膜細胞の分化に影響を与えることが判った。

### (3) 新規の遺伝子発現制御システムの開発

既存の薬剤依存性遺伝子発現 ON/OFF 制御システムを改良し、精密・迅速・可逆的な遺伝子発現 ON/OFF 制御システムを確立した。さらに、この手法は網膜発生研究に適用でき、この手法を用いることで生体内でのより詳細な遺伝子機能解析が可能になることを示した。

### (4)今後の展望

網膜内での発現パターンと、生体内エレクトロポレーション法を用いた機能獲得・機能喪失実験により、低分子量 G 蛋白質 TC21 がマウス網膜発生の重要な制御因子の一つであると考えられた。TC21 はシグナル伝達分子であることから、網膜発生を制御する「TC21 を介した細胞内シグナルの実体の解明」が今後の課題である。TC21 以外の R-Ras subfamily メンバー (R-Ras, M-Ras) も網膜で発現しているので、これらの網膜内での機能解析も今後の課題として挙げられる。

また、現時点では TC21 遺伝子の変異に起因するヒト網膜疾患の事例は報告されていないが、今後、ヒトを対象にした研究により、TC21 遺伝子の変異とヒト網膜疾患との相関が明らかになる可能性がある。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahiko Matsuda & Izumi Oinuma	4. 巻 9
2. 論文標題 Optimized CRISPR/Cas9-mediated in vivo Genome Engineering Applicable to Monitoring Dynamics of Endogenous Proteins in the Mouse Neural Tissues	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47721-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takahiko Matsuda & Izumi Oinuma	4. 巻 30
2. 論文標題 Imaging Endogenous Synaptic Proteins in Primary Neurons at Single-Cell Resolution Using CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 2838-2855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-04-0223	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 ゲノム編集技術を用いたマウス中枢神経系における内在性蛋白質の蛍光標識と発現動態の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田孝彦、生沼泉
2. 発表標題 精密・迅速・可逆的な遺伝子発現ON/OFF制御システムの開発と神経発生研究への適用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------