

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07250

研究課題名(和文) 視細胞リボンシナプスの構造と機能における低分子量G蛋白質Arf6経路の役割

研究課題名(英文) Roles of the ADP ribosylation factor pathway in photoreceptor ribbon synapses

研究代表者

阪上 洋行 (Sakagami, Hiroyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ADPリボシル化因子6(Arf6)は、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送やアクチン細胞骨格の再構成を制御する主要な低分子量GTP結合タンパク質である。申請者らは、Arf6活性化制御因子であるBRAG2が網膜の視細胞リボンシナプスにおいてジストロフィン複合体と相互作用を介して局在することを見出し、BRAG2-Arf6経路が視細胞リボンシナプスの形成や維持に機能関与する可能性を明らかにしてきた。本研究は、BRAG2-Arf6経路の個体レベルでの機能を明らかにするために、ゲノム編集法を用いたBRAG2遺伝子欠損マウスの樹立を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のエキソーム解析により、BRAG2は新たな先天性知的障害の原因遺伝子として見出された (Ansar et al., 2019)。BRAG2遺伝子変異患者は、重度の知的障害とともに低身長や視覚障害などの合併を持つ。さらに、ジストロフィンの欠損によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー病の患者は骨格筋の主症状とともに視覚障害を持つ。BRAG2遺伝子欠損マウスの樹立と今後の機能解明により、BRAG2の神経機能解明とともにヒトBRAG2遺伝子変異や筋ジストロフィー病での視覚障害の病態の解明やその治療法の開発に繋がる可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The BRAG2-ADP ribosylation factor 6 (Arf6) pathway is a critical regulator of membrane trafficking and actin cytoskeleton reorganization. We have previously suggested that the BRAG2-Arf6 pathway regulates the formation and maintenance of photoreceptor ribbon synapses downstream of the dystrophin complex (Sakagami et al., 2017). To test this hypothesis at an animal level, we tried to generate BRAG2 knockout mice using the CRISPR/Cas9 system.

研究分野：histology

キーワード：小胞輸送 エンドソーム 低分子量GTP結合タンパク質 発生 網膜 ジストロフィン リボンシナプス

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィー病(DMD)は、ジストロフィン欠損による進行性の筋萎縮・変性を主症状とする X 連鎖性遺伝疾患である。DMD は骨格筋の主症状とともに、網膜電図の異常を伴う視覚障害や認知障害などの中枢神経症状を合併する。患者の平均寿命は飛躍的に伸びるなか、これらの合併症により、患者の生活の質が低下するとともに治療・介護における患者とコミュニケーションの障害など様々な問題が生じつつある。しかしながら、筋障害の病態機序の解明と遺伝子治療の開発が進展する一方、視覚障害や認知障害の病態機序の解明は立ち遅れており、今後解明すべき喫緊の課題である。

網膜の光感受細胞は、シナプス終末にシナプス小胞を係留させた板状の高電子密度の細胞内構造物「リボン」を持ち、明暗刺激に反応して変化する膜電位に応じて、神経伝達物質を持続的に放出する、通常の神経細胞のシナプスとは機能的・構造的に異なる「リボンシナプス」を双極細胞と水平細胞との間に形成する。

ジストロフィン、膜貫通型糖タンパク質のジストログリカンなどのタンパク質複合体を形成し、細胞外基質と細胞骨格系との機能的連結やシグナル伝達の足場として機能することが骨格筋の研究から明らかになっている。ジストロフィン複合体は、網膜の光感受細胞のリボンシナプスにも局在し、細胞外リガンドのピカチュリン分子との結合を介して、シナプス後側の双極細胞が発現する GRP179 と細胞間接着複合体を形成し、リボンシナプスの形成・維持に関与することが明らかになってきた (Sato *et al.*, *Nat. Neurosci.* 2008; Orlandi *et al.*, 2018)。これらの分子の遺伝子欠損マウスが DMD での網膜電図と同様に b 波の減弱を示すことより、ジストロフィン複合体-ピカチュリン- GRP179 の機能的連結の障害による光感受細胞のリボンシナプスの構造・機能異常が DMD の視覚伝導異常の本態であると考えられている。しかしながら、ジストロフィン複合体を介したリボンシナプスの制御機構の全容は未だ不明である。

ADP リボシル化因子 6 (Arf6)は、細胞膜とエンドソーム間の小胞輸送やアクチン細胞骨格の再構築を制御する低分子量 GTP 結合タンパク質で、神経細胞の形態形成やシナプス伝達などの多彩な神経機能に関与する。申請者は、Arf6 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である BRAG2 の網膜での発現解析の過程で、BRAG2 分子がジストロフィン複合体との相互作用を介して光感受細胞のリボンシナプスに局在すること、網膜型ジストロフィン遺伝子欠損マウス (mdx52)において、外網状層での BRAG2 のシナプス局在が著しく障害されることを見出し、光感受細胞のリボンシナプスでのジストロフィン複合体の新たな制御経路としての BRAG2-Arf6 経路の可能性を明らかにしてきた (Sakagami *et al.*, *J. Comp. Neurol.* 2013; *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017)。

2. 研究の目的

このような研究背景のなか自己所見を発展させて、BRAG2 の遺伝子欠損マウスを樹立し、網膜でのシナプス構造・機能解析を行い、網膜光感受細胞のリボンシナプスにおける BRAG2-Arf6 経路の役割と筋ジストロフィー病での網膜症状における機能関与を明らかにすることを本研究の目的として企画実施した。

3. 研究の方法

- (1) BRAG2の遺伝子欠損マウスの樹立:CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集法により、第2エクソンの両端のイントロン領域にgRNAを設計し、常法に従いCas9とともに電気穿孔法により受精卵に遺伝子導入し、BRAG2遺伝子のエクソンを欠失させ、全身型BRAG2の遺伝子欠損マウスの作製を実施した。
- (2) ウエスタンブロット解析：各発達段階の胎児や臓器から粗抽出液を作製し、ウエスタンブロット解析を実施した。
- (3) RT-PCR解析：各発達段階の胎児や臓器から総RNAを抽出し作製した相補的な一本鎖cDNAを用いてRT-PCR解析を実施した。

4. 研究成果

BRAG2の2つのバリエーション(BRAG2a, BRAG2b)に共通のBRAG2遺伝子の第2エクソンの両端のイントロン領域にgRNAを設計し遺伝子欠損マウスを作製した。各遺伝子型マウスは、野生型20%、ヘテロ型49%、ホモ型31% (総数45匹)とメンデル則に従って誕生し、明らかな発育障害などを示さずに成熟期に達し、ホモ型マウスも繁殖可能であった。生後10週齢の脳を用いてウエスタンブロット解析を行った結果、野生型マウスの脳では、90、120、140、170kDa付近の4本のBRAG2抗体と反応するバンドが検出されるのに対して、ホモ型マウス脳では、140と170kDaのバンドは完全に消失するが、90と120kDaのバンドは残存し、さらに95kDa付近に新たなバンドが検出された。さらにRT-PCR法を用いてRNAレベルでの発現を検討した結果、ホモ型マウス脳では、欠失させた第2エクソンを含む遺伝子は検出されないが、BRAG2の中央部あるいはC末部に存在する機能ドメインでSec7領域やPH領域を含む遺伝子は発現していることが明らかになった。以上のことから、BRAG2遺伝子の第2エクソンを欠失させた遺伝子欠損マウスでは、第2エクソンをスキップしたバリエーションが残存あるいは新たに発現しており、タンパク質レベルでの完全なBRAG2欠損マウスではないことが判明した。また、脳や網膜の組織学的構造は、明らかな異常は示さず正常と区別できなかった。

本研究は、BRAG2の網膜光感受細胞のリボンシナプスの形成・維持における役割を明らかにする目的で開始したものであったが、第2エクソンを標的として樹立したBRAG2遺伝子欠損マウスがタンパク質レベルでの完全欠失マウスとはならず、当初の目的を完遂することが残念ながらできなかった。近年のエキソーム解析により、第3染色体上にあるヒトBRAG2遺伝子が先天性知的障害の新たな原因遺伝子として報告された(Ansar et al., 2019)。興味深いことにBRAG2遺伝子に変異を持つ患者は、重度の知的障害と注意欠陥多動障害(ADHD)様の行動障害とともに、低身長や視覚障害などの合併が認められる。BRAG2遺伝子欠損マウスの表現型のさらなる解析により、BRAG2による神経機能とともにヒトBRAG2遺伝子変異の病態の解明や治療法の開発に繋がる可能性が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito A, Fukaya M, Sugawara T, Hara Y, Okamoto H, Yamauchi J, Sakagami H.	4. 巻 159
2. 論文標題 Cytohesin-2 mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent mechanical allodynia through the activation of ADP ribosylation factor 6 in the spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Diseases	6. 最初と最後の頁 105466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.nbd.2021.105466.	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 Masahiro Fukaya, Takeyuki Sugawara, Yoshinobu Hara, Makoto Itakura, Masahiko Watanabe, Hiroyuki Sakagami	4. 巻 40
2. 論文標題 BRAG2a Mediates mGluR-Dependent AMPA Receptor Internalization at Excitatory Postsynapses through the Interaction with PSD-95 and Endophilin 3	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4277-4296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.1645-19.2020	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 Kanta Ibuchi, Masahiro Fukaya, Tetsuro Shinohara, Yoshinobu Hara, Tomoko Shiroshima, Takeyuki Sugawara, Hiroyuki Sakagami	4. 巻 1745
2. 論文標題 The Vps52 subunit of the GARP and EARP complexes is a novel Arf6-interacting protein that negatively regulates neurite outgrowth of hippocampal neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.146905	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 Surang Chomphoo, Hiroyuki Sakagami, Hisatake Kondo, Wiphawi Hipkaeo	4. 巻 122
2. 論文標題 Discrete localization patterns of Arf6, and its activators EFA6A and BRAG2, and its effector PIP5kinase on myofibrils of myotubes and plasma membranes of myoblasts in developing skeletal muscles of mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2020.151513	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 該当する

1. 著者名 178. Kim D, Jung H, Shirai Y, Kim H, Kim J, Lim D, Mori T, Lee H, Park D, Kim HY, Guo Q, Pang B, Qiu W, Kouyama-Suzuki E, Uemura T, Kasem E, Fu Y, Kim S, Tokunaga A, Yoshizawa T, Suzuki T, Sakagami H, Lee KJ, Ko J, Tabuchi K, Um JE.	4. 巻 91
2. 論文標題 Impairs fear memory through upregulation of ribosomal S6K1 signaling in the hippocampus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 821-831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2021.12.016	査読の有無 無
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 Ito A, Fukaya M, Sakagami H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Physiological and pathological roles of the cytohesin family in neurons.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095087	査読の有無 無
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 Tokumitsu H, Sakagami H.	4. 巻 23
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase signal transduction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911025	査読の有無 無
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 Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, Fukushima Y, Du X, Yamashiro K, Hori K, Imamura M, Hoshino M, Yamada M, Araki T, Sakagami H, Takeda S, Itaka K, Ichinohe N, Muntoni F, Sekiguchi M, Aoki Y.,	4. 巻 216
2. 論文標題 Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Prog. Neurobiol.	6. 最初と最後の頁 102288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pneurobio.2022.102288.	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深谷 昌弘, 伊藤諭子, 岡本 浩嗣, 山内 淳司, 阪上 洋行
2. 発表標題 マウス脊髄でのサイトヘジン2-Arf6シグナル経路による代謝型グルタミン酸受容体の局在制御と慢性疼痛における役割
3. 学会等名 第127日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原芳伸, 阪上洋行
2. 発表標題 神経細胞移動における低分子量G タンパク質Arf4 および Arf5 の機能的役割
3. 学会等名 第127日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原芳伸, 阪上洋行
2. 発表標題 細胞神経移動における低分子量G タンパク質Arf4 5 の機能的役割
3. 学会等名 第109回日本解剖学会関東支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷 昌弘, 阪上 洋行
2. 発表標題 海馬興奮性シナプスにおけるBRAG2とendophilin 3の相互作用を介した新たなAMPA受容体輸送調節機構
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷昌弘、森日菜子、阪上洋行
2. 発表標題 BRAG2によるインテグリンの細胞内小胞輸送を介した樹状突起形成機構
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原芳伸、阪上洋行
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質Arf 4 は逆行性小胞輸送を介して神経細胞移動を制御する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅原健之、阪上洋行
2. 発表標題 EFA6A-Arf6シグナルによる細胞内小胞輸送を介した軸索初節の制御機構
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学医学部解剖学(阪上)単位ホームページ
<https://www.med.kitasato-u.ac.jp/lab/sakagami/index.php>
 北里大学医学部解剖学(阪上)単位ホームページ
<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~sakagami/>

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