

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590210

研究課題名（和文） 神経特異的ノックアウトマウスを用いた、神経の極性形成に関わる分子の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecules involved in neuronal polarity formation: a study using neuronal specific knockout mice

研究代表者

原田 玲子（HARADA REIKO）

大阪大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：40230718

研究成果の概要（和文）：神経細胞の軸索や樹状突起の形成には様々な蛋白が重要である。本研究では軸索への蛋白輸送に重要と考えられている蛋白 VAMP7 のノックアウトマウスを作成・解析した。VAMP7 ノックアウトマウスでは神経組織に形態学的な異常は認められなかった。しかしノックアウトマウスからの海馬培養細胞では、正常マウスに比して僅かながら軸索伸長の抑制が認められ、VAMP7 が軸索への極性輸送に働くことが示唆された。この結果は細胞内輸送の専門雑誌 Traffic に掲載された。

研究成果の概要（英文）：Various proteins are required in the establishment of neuronal polarity. In this study, we analyzed mice deficient in VAMP7, a protein proposed to be involved in axonal transport. Contrary to expectations, VAMP7 knockout mice displayed similar localization of axonal proteins in the nervous system. However, neurite outgrowth of cultured mutant hippocampal neurons was slightly affected, suggesting that VAMP7 have some role in polarized transport of axonal proteins. This work was published in Traffic, an international journal of intracellular transport.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：神経細胞、極性輸送、軸索伸長、ノックアウトマウス、VAMP7

## 1. 研究開始当初の背景

高等動物では神経細胞や上皮細胞など、極性を持つ細胞が多種存在する。この細胞極性の形成・維持においては、新規に合成された蛋白質をゴルジ体やトランスゴルジ網で分

配して、輸送小胞内に濃縮し、それぞれの極へと輸送する、いわゆる極性輸送の機序が重要である。近年では、極性輸送を制御する因子として低分子量 GTP 結合蛋白質である Rab 蛋白や、数種の SNARE 蛋白等が既に同

定されている（研究連携者による総説：実験医学 21:147-152, 2003）。

神経細胞の極性形成は上皮細胞と関連し、軸索と apical、樹状突起と basolateral への輸送のメカニズムに共通点が見られることが指摘されている（Neuron 20:855-867, 1998、Neuron 37:611-624, 2003）。そして培養神経細胞を用いた研究では、極性輸送に関わる蛋白を抑制すると、神経突起の伸長が抑制されることが報告されている（Rab8a に関しては J Cell Biol 123:47-55, 1993, Syntaxin3 に関しては Nature 440:813-817, 2006, VAMP7 に関しては Mol Biol Cell 14:4207-4220, 2003）（図 1）。しかし、このような極性輸送関連分子の機能は、主に培養細胞株を用いた実験により解析されてきており、高等動物の組織や細胞における生理的な意義はほとんど不明である。

申請者と連携研究者らは、Rab8a ノックアウトマウスの小腸上皮細胞における異常を解析した研究において、培養細胞による従来の研究とは異なる結果を得ている（Nature 448:366-369, 2007）。Rab8a は上皮細胞において basolateral 面への極性輸送の鍵を握る可能性が古くから示唆されていた。しかし我々の研究の結果、Rab8a ノックアウトマウスでは、apical 面に輸送される膜消化酵素やトランスポーター分子の分布の異常など、小腸上皮細胞における apical 面への輸送に重大な欠陥が観察された。

このようにノックアウトマウスの作製・解析により、高等動物個体における分子の役割を明確にすることが可能であることから、極性輸送に関わる蛋白 Rab8a, Syntaxin3, VAMP7 のノックアウトマウスを解析することによって、培養細胞で得られていた従来の結果を検証することは非常に重要である。

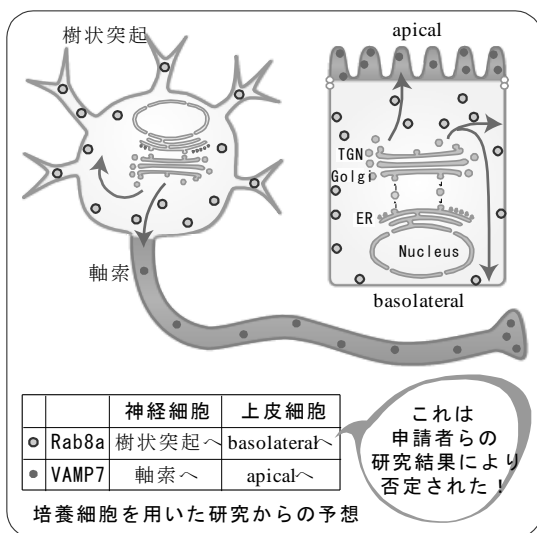


図 1 神経細胞と上皮細胞の極性形成

## 2. 研究の目的

神経細胞の軸索や樹状突起の形成には様々な蛋白が重要である。しかしノックアウトマウスにおいて「軸索のみ」あるいは「樹状突起のみ」が形成される形質は未だ得られていない。

申請者はこれまで細胞骨格蛋白やモーター蛋白の研究に携わったが、これらの蛋白は極性形成に必須ではなかったため、極性形成には他の蛋白（例えば極性輸送に関わる蛋白）が重要ではないかと考えるに至った。そこで本研究においては、極性輸送に関わる蛋白 Rab8a, Syntaxin3, および VAMP7 のノックアウトマウスを解析して、極性輸送と神経細胞の極性形成との関連を解明することを目的とした。

神経細胞の極性輸送に関わる蛋白の多くは上皮細胞等でも重要な役割を有すると考えられる。実際、Syntaxin3 では全身のノックアウトマウスは胎生致死となり、Rab8a では生後 1 ヶ月以内に死亡する。このため本研究では必要に応じて神経特異的ノックアウトマウスを作製する。これらマウスの神経系や神経細胞の極性、発生や機能を解析することにより、極性輸送に関わる蛋白の神経細胞、神経組織および個体における役割が明らかになると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 極性輸送に関与すると考えられる VAMP7 遺伝子が、神経組織の形成・維持や個体の表現型に与える影響を、VAMP7 ノックアウトマウスの神経組織を形態学的に解析することによって解明した。具体的には以下の手法を用いた（図 2）。

① VAMP7 ノックアウトマウスを用いて、神経組織（大脳や小脳など）における組織形成・維持の異常の有無を、通常の組織染色および軸索・樹状突起の蛋白に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を用いて観察した。

② VAMP7 ノックアウトマウスを用いて海馬の神経細胞を初代培養し、軸索や樹状突起の伸長を継続的に観察した。特に Banker の stage III（軸索伸長期）の細胞の割合を継続的に計測した。また、各ステージにおける軸索の長さの詳細な計測も行った。

③ 海馬の初代培養神経細胞に、GFP ラベルした以下の蛋白をアデノウイルスベクターによって導入し、その分布や輸送を観察した。これによって極性輸送の異常の有無を調べた。

(2) 極性輸送に関与すると考えられる Rab8a 遺伝子および Syntaxin3 遺伝子が、神経組織の形成・維持や個体の表現型に与える影響を、全身ノックアウトマウスまたは神経特異的ノックアウトマウスの神経組織を形態学的に解析することによって解明する。

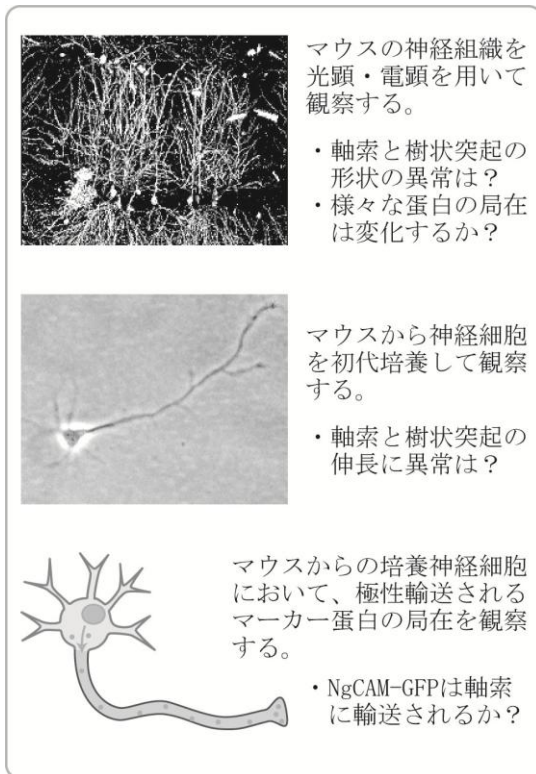


図2 ノックアウトマウスの解析手法

#### 4. 研究成果

(1) VAMP7 遺伝子が、神経組織の形成・維持や個体の表現型に与える影響。

①VAMP7 ノックアウトマウスは正常マウスと比べて、寿命や体重、行動など、個体レベルの目立った異常は認められなかった。

神経組織（大脳や小脳など）における組織形成・維持の異常の有無を、通常の組織染色および軸索・樹状突起の蛋白に対する抗体を用いた免疫蛍光染色を用いて観察した。免疫蛍光染色には以下の抗体を使用した。

- ・軸索の蛋白としては L1, syntaxin1, synaptophysin, GAP43, tau など
- ・樹状突起の蛋白としては mGluR1, AMPA-R, MAP2 など

結果として、通常の組織染色においても、免疫蛍光染色においても、VAMP7 ノックアウトマウスにおいて、大脳や小脳組織に異常は認められなかった（図3）。

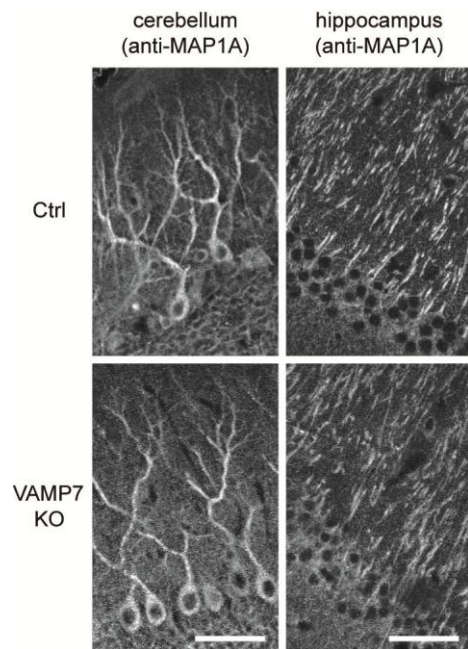


図3 小脳および海馬における MAP1A 蛋白の分布

②VAMP7 ノックアウトマウスを用いて海馬の神経細胞を初代培養し、軸索や樹状突起の伸長を継続的に観察した。特に Banker の stage III（軸索伸長期）の細胞の割合を継続的に計測した。その結果、VAMP7 ノックアウトマウスにおいて、stage III の細胞の割合はどの時点においても正常マウスと有意な差は認められなかった（図4）。さらに詳細に軸索伸長の異常を調べるため、培養3日の長軸索（一視野当たり最も長い軸索）の長さを測定した。その結果、VAMP7 ノックアウトマウスでは正常マウスに比べて15%短くなっていることが示された（正常マウス：241 ± 57 μm(平均±標準偏差)；VAMP7 ノックアウトマウス：206 ± 28 μm(平均±標準偏差)；p = 0.019；Student の t 検定]（図5）。

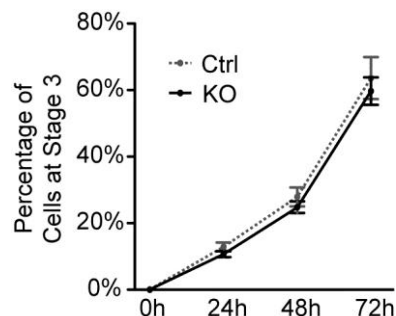


図4 海馬培養細胞における Banker stage 3 細胞の割合

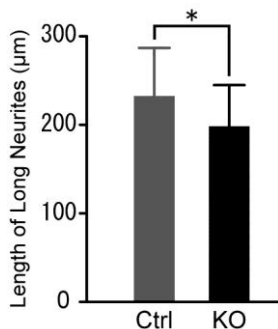


図5 海馬培養細胞における長軸索の長さ

③軸索に輸送されるマーカー (Ng-CAM) および樹状突起に輸送されるマーカー (LDL-R) を GFP ラベルし、海馬の初代培養神経細胞にアデノウイルスベクターによって導入し、その分布や輸送を観察した。その結果、VAMP7 ノックアウトマウスにおいて、極性輸送の異常は認められなかった (図6)。

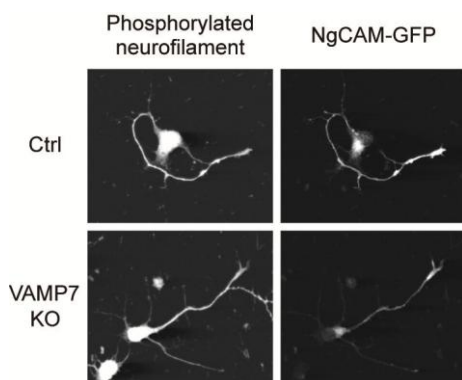


図6 海馬培養細胞における Ng-CAM-GFP の極性輸送

結論: VAMP7は神経細胞において蛋白の軸索への輸送に重要と考えられているが、VAMP7 ノックアウトマウスは予想に反して神経組織に形態学的な異常を認めなかった。しかし VAMP7 ノックアウトマウスからの海馬培養細胞においては、正常マウスに比して僅かながら軸索伸長の抑制が認められ、VAMP7が軸索への極性輸送に働くことが示唆された。この結果は細胞内輸送の専門雑誌「Traffic」に掲載された。

(2) 現在は、極性輸送に重要と考えられる遺伝子 Rab8a と Syntaxin3 が、神経組織の極性の形成・維持に与える影響の解明を、神経特異的ノックアウトマウスを用いて、研究を進めている。他グループの研究において、

Syntaxin3 欠損により神経突起の伸長が抑制されることが報告されているが、私達の神経特異的ノックアウトマウスを用いた解析ではこの報告とは異なる興味ある結果が得られており、現在投稿の準備を行っている。

## 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2件)

①Sato M, Yoshimura S, Hirai R, Goto A, Kunii M, Atik N, Sato T, Sato K, Harada R, Shimada J, Hatabu T, Yorifuji H, Harada A. The role of VAMP7/TI-VAMP in cell polarity and lysosomal exocytosis in vivo. Traffic, 12:1383-1393, 2011. 査読有.

②Uemura T, Sato T, Aoki T, Yamamoto A, Okada T, Hirai R, Harada R, Mori K, Tagaya M, Harada A. p31 deficiency influences endoplasmic reticulum tubular morphology and cell survival. Mol Cell Biol 29: 1869-1881, 2009. 査読有.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 玲子 (HARADA REIKO)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師  
研究者番号: 40230718

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

原田 彰宏 (HARADA AKIHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 40251441