

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25年 5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591141

研究課題名（和文） Brap 遺伝子は Ras-MAPK 症候群の原因遺伝子か？モデルマウスと遺伝子解析

研究課題名（英文） Brap gene can be one of causal genes of the Ras-MAPK syndromes.

研究代表者

浅田 穰 (ASADA MINORU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：60366755

研究成果の概要（和文）：

BRAP の生物学的意義を明らかにするために、brap の遺伝子改変マウスを作製した。マウスは胎生致死であり、BRAP 分子の発生発達過程における重要な役割が示唆された。Brap が Ras-ERK 経路の活性化に関与するか、BRAP 欠損によってどのような変化がこのマウスに現れるか、胎生期のマウスから胎児線維芽細胞を作製し解析したところ、BRAP を欠損すると ERK のリン酸化の亢進が観察された。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the biological significance of BRAP gene, brap targeting mice were generated. Brap null mice revealed embryonic lethal, which indicates Brap has essential role for developmental process. Whether Brap could be involved in Ras-MAPK pathway, mouse embryonic fibroblasts from brap mutant mice were analyzed. Phosphorylation of ERK was upregulated in brap deficient cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：遺伝・先天異常学

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患である神経線維腫症1型(NF1)、

ヌーナン症候群、レオパード症候群、心臓・顔面・皮膚(CFC)症候群とコストロ症候群は表現型を共有しており、総称して

Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous (NCFC) 症候群と呼ぶ。これらは常染色体優性遺伝形質を示す。現在までに報告されている原因遺伝子はすべて Ras-MAPK 経路の分子の機能獲得型か、負の制御因子(NF1、SPRED1)の機能欠損型である。我々は細胞分化に伴い、細胞周期制御因子 p21 の細胞内局在を規定する分子として Brap2 を同定した。その Brap2 は Ras-ERK(MAPK) 経路の活性化の閾値を制御する分子として機能すると最近報告され、それを支持する報告も出てきた (Matheny & White, JBC, 2009)。Ras-ERK 経路の負の制御因子としての Brap2 の機能欠損は神経-心臓-顔面-皮膚 (NCFC) 症候群の新たな原因になり得ると考えた。本研究の目的は NCFC 症候群の原因遺伝子として Brap2 遺伝子の解析を行うこと。2 つの方向から研究をすすめる。臨床的に NCFC 症候群と診断され、既知の Ras-ERK 経路構成分子遺伝子に変異のない患者において、Brp2 遺伝子変異解析を行う。また、我々は brap2 ノックアウトマウス作製を開始しヘテロマウスを作製した。このマウスにおいて NCFC 症候群様の表現型を観察できないか解析する。さて、我々は乳がん抑制遺伝子 BRCA1 に結合する分子としてクローニングされた BRAP2 分子が細胞周期阻害分子 p21Cip1/WAF1(p21) の核移行シグナル (NLS) に結合し、p21 の核移行を阻害し細胞質に保持する分子であることを明らかにした (Asada et al, MCB, 2004)。我々は以前、核内で細胞周期を停止するように機能する p21 分子の新たな機能として、p21 は免疫細胞の細胞質において酸化ストレスによるアポトーシス誘導に対し抵抗性を獲得させる (Asada et al, EMBO J, 1999)、また発生期の網膜神経では細胞質において p21 は Rho キナーゼの活性を抑制することにより神経細胞の突起伸展を促す (Tanaka et al, JCB, 2002) ことを報告した。次に核内分子 p21 が細胞質に発現するようになるメカニズムの解明に取り組んだ。その結果、p21 の細胞質局在を決定する分子として BRAP2 を同定した。その生物学的意義を探るために、brap2 遺伝子改変マウスを作製している。Brp2 が Ras-ERK 経路の活性化に関与するという状況証拠が提示されたため、本研究を開始しようとした。brap2 遺伝子改変マウスが疾患モデルマウスとなる場合は治療法の確立の研究に役立つ。患者検体において変異が見られなかった場合でも、Ras-ERK 経路の活性化経路の負の影響を観察できた場合は Brap 分子の本症候群への関与を否定することにはならないと考える。

2. 研究の目的

常染色体優性遺伝形質を示す Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous (NCFC) 症候群は、Ras-MAPK 症候群とも呼ばれ、Ras-ERK(MAPK) 経路の恒常的活性化を示す。我々は Brap2 遺伝子改変マウスを作製し、解析中に Ras-ERK 経路の恒常的活性化を見出した。NCFC 症候群の原因遺伝子として brap2 遺伝子変異をもつ患者がいるのではないかと考えた。また、Brp2 遺伝子改変マウスが NCFC 症候群の疾患モデルマウスとならないか、さらには治療法の確立に利用できないか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

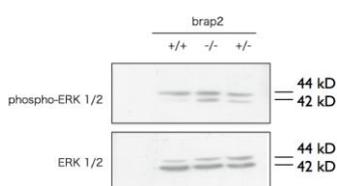
(1) Gene trap 法により brap2 をターゲッティングした ES 細胞より、キメラマウスを作製し、さらにヘテロマウスを得た。ノックアウトマウス作製を試みたところ、brap2 遺伝子のホモ欠損マウスは胎生致死であることが判明した。また、胎齢 8~9 日においては、野生型、ヘテロ、ホモ欠損のすべての遺伝子型が観察される。野生型、ヘテロ、ホモ欠損の胎仔サンプルより MEF を樹立し Ras-ERK 経路の活性化の程度に差があるかどうか解析した。

(2) ヘテロマウスの表現型に Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous 症候群の表現型が見られないか、野生型マウスと比較検討する。また、神経、心臓、顔面、皮膚のそれぞれの組織で、Ras-ERK 経路の活性化に brap2 遺伝子座の影響がないか解析する。組織よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットにより Ras-ERK 経路の分子の発現解析、および ERK キナーゼ活性の比較を行った。

(3) Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous 症候群患者における brap2 遺伝子変異解析 Brap2 遺伝子改変マウスの解析により Ras-ERK 経路の活性化に brap2 ヘテロ欠損の影響が見られた場合、Neuro-Cardio-Facial-Cutaneous 症候群患者の治療を行っている所に協力を求め、患者検体の遺伝子変異解析を実施する。Brp2 遺伝子は 12 番染色体に位置し、12 のエクソンよりなり、サイズは 47kb である。メッセンジャーRNA は約 2kb である。遺伝子変異解析の手順として、コーディング領域の欠損の有無、点突然変異の有無を解析する。検体として血液サンプルが得られる場合、RT-PCR による発現レベルの解析や、不死化細胞の樹立も試みる。

4. 研究成果

(1) 野生型、ヘテロ、ホモ欠損の胎仔サンプルよりMEFを樹立しRas-ERK経路の活性化の程度に差があるかどうか解析した。MEF細胞よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットによりRas-ERK経路の分子の発現解析、またERKキナーゼ活性の測定を行った。その結果、brap2の遺伝子欠損はRas-ERK(MAPK)経路を恒常的に活性化することが示唆された。



(2) ヘテロマウスの表現型にNeuro-Cardio-Facial-Cutaneous症候群の表現型が見られないか野生型マウスと比較検討した。特徴的顔貌、心奇形、骨格異常などを観察したが、野生型マウスと明確な区別がつかなかった。また、行動における違いも観察できていない。また本マウスは、更なる評価を行うためにバッククロスを継続中である。

(3) 成長したマウスの組織においてRAS-ERK経路の活性化を解析した。骨髄などの造血組織、脳組織のいくつかで野生型マウスの組織と比べ、ヘテロマウスにおいてはERKのリン酸化亢進がみられた。その結果、Ras-MAPK経路の活性化が起こっていることが示唆され、Ras-MAPK症候群の新たな原因遺伝子となる可能性は残されたと考える。

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 8 件)

1. Kobayashi K, Ikeda Y, Asada M, Inagaki H, Kawada T, Suzuki H. Corticosterone facilitates fluoxetine-induced neuronal plasticity in the hippocampus. PLoS ONE 2013;8(5):e63662. 査読有

2. Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S, Autoimmune

Lymphoproliferative Syndrome Like Disease With Somatic KRAS Mutation. Blood. 2011; 117: 2887-90. 査読有

3. Atsumi Y, Fujimori H, Fukuda H, Inase A, Shinohe K, Yoshioka Y, Shikanai M, Ichijima Y, Unno J, Mizutani S, Tsuchiya N, Hippo Y, Nakagama H, Masutani M, Teraoka H, Yoshioka K. Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. PLoS One. 20116(8):e23432. 査読有

4. Mizutani S, Takagi M. Autoimmune phenomena in Noonan syndrome; a possible link with RALD. Blood. e-letter. 2010 Dec 1. 査読有

5. Ikeda Y, Yahata N, Takahashi H, Koeda M, Asai K, Okubo Y, Suzuki H. Cerebral activation associated with speech sound discrimination during the diotic listening task: An fMRI study Neurosci. Res. 67(1):65-71, 2010. 査読有

6. Kobayashi K, Ikeda Y, Sakai A, Yamasaki N, Haneda E, Miyakawa T, Suzuki H. Reversal of hippocampal neuronal maturation by serotonergic antidepressants. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 107(18):8434-8439, 2010. 査読有

7. Isoda T, Ford A, Tomizawa D, van Delft F, De Castro DG, Mitsuiki N, Score J, Taki T, Takagi M, Morio T, Saji H, Greaves M, Mizutani S. Immunologically silent cancer clone transmission from mother to offspring. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009;106(42):17882-5. 査読有

8. Honda M, Takagi M, Chessa L, Morio T, Mizutani S. Rapid diagnosis of ataxia-telangiectasia by flow cytometric monitoring of DNA damage-dependent ATM phosphorylation. Leukemia. 2009;23:409-14. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 穰 (ASADA MINORU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：60366755

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

水谷 修紀 (MIZUTANI SHUKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60126175

池田 裕美子 (IKEDA YUMIKO)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：10386154