

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570159

研究課題名(和文) クラスリン依存性小胞輸送の制御機構解明 ノックアウトマウスの利用

研究課題名(英文) Figure of true clathrin-dependent intracellular vesicle transport

研究代表者

渡邊 利雄 (Watanabe, Toshio)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60201208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：『真のクラスリン依存性の細胞内小胞輸送の姿』を提示することを目指し、ノックアウトマウスを用いてArf1, CALM, SMAPの詳しい解析を行った。Arf1 KOマウスは胚性致死で、従来の他のファミリーによる相補は見られなかった。詳しい解析のためにArf1 KO MEF細胞を樹立した。CALM KOマウスの目の色の薄さを発見し、メラニンの蓄積にCALMが関与している可能性を見出した。取り込まれたc-kitチロシンキナーゼ型受容体の分解にCALMが必要なことを発見した。SMAP1, SMAP2二重が胚性致死である原因を探り、E7.5日胚でアポトーシスが起きていることを発見した。

研究成果の概要(英文)：With the aim to present a "figure of true clathrin-dependent intracellular vesicle transport", a detailed analysis of Arf1, CALM, and SMAP was performed using a knockout mouse. Arf1 KO mice is embryonic lethal, thus there was no complementation with other family members. For detailed analysis, Arf1 KO MEF cells were established. We discover the pale eye color of the CALM KO embryos, thus CALM is found likely to be involved in the accumulation of melanin. CALM is also found to be involved in to degradation of the up-taken c-kit tyrosine kinase receptor. Mice doubly-deficient in the Arf GAPs SMAP1 and SMAP2 exhibit embryonic lethality.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞輸送 Arf1 CALM SMAP1 SMAP2

1. 研究開始当初の背景

クラスリン依存性の細胞内小胞輸送は、細胞膜・エンドソーム・トランスゴルジ網間の細胞内物流機構を担う重要な輸送系で、様々な研究が行われている。今回注目している因子のクラスリン依存性小胞輸送での機能に関しては、従来の細胞株を用いた過剰発現やノックダウンの実験から我々の研究成果も含めて多くの結果が得られている。現在の研究はこれらの結果に基づいて行われている。加えて、CALM や SMAP を含めて他の小胞輸送関連遺伝子の多くは白血病の原因遺伝子であるキメラ遺伝子の構成単位でもあることから、クラスリン依存性の細胞内小胞輸送の異常と白血病との関連も注目されているが、肯定的・否定的な結果が報告されている。このように、各因子の働きに関しては培養細胞でのノックダウンの解析から大筋が判明しているとされていた。しかし我々は従来の報告には解決すべき問題点があると考えていた。たとえば報告によって機能が異なる (CALM) 例があることや、そもそも生理機能の個体レベルでの解析が一切ないことから、申請者はノックアウトマウスを作製して、これらの結果の検証と個体レベルでのクラスリン依存性の細胞内小胞輸送の果たす生理機能を解明しようと考え、数年前に研究をスタートさせノックアウトマウスの作成を行ってきた。これまで申請者が受けた科学研究費補助金により作製したノックアウトマウスでの我々の予備的な解析 (一部は分子生物学会、細胞生物学会にて発表) から、従来の結果を見直すべきであるとの観点が明瞭に表れてきた。すなわち、ノックダウンとノックアウトの結果間での相違が多数出てきている。たとえば、Arf1 はノック

アウトでは胚性致死の著しい効果が見られる。なお Arf1 は小胞体・ゴルジ体・トランスゴルジ網間のクラスリン非依存性小胞輸送にも関与するとされている。また、SMAP1、SMAP2、Arf6 はノックダウンで小胞輸送に効果があるがノックアウトでは個体レベルと細胞レベルで効果なしとなっている。しかしながら、SMAP1 と SMAP2 の二重欠損体では胚性致死という著しい異常が見られている。CALM はノックダウンではトランスフェリンの輸送に異常はないが、ノックアウトでは取り込み低下と極度の貧血を呈する。これらの結果は、Arf1, CALM, SMAP に関する従来の定説を再考する必要性を示している。最近になって他のクラスリン依存性小胞輸送因子に関しても同様な結果が報告され始めており、ノックアウトマウスでの小胞輸送因子解析の重要性が示されつつある。

2. 研究の目的

クラスリン依存性の細胞内小胞輸送は、細胞膜・エンドソーム・トランスゴルジ網間の細胞内物流機構を担う重要な輸送系である。これらクラスリン依存性の細胞内小胞輸送で重要な Arf1、SMAP1,2、CALM に注目して、自作したノックアウトマウスを用いた解析から、各遺伝子の生理機能と作用する反応ポイントを解明する。特に従来の結果と我々の結果との矛盾点を明らかにして、『真のクラスリン依存性の細胞内小胞輸送の姿』を提示することを目指す。さらに、白血病キメラ遺伝子 CALM-AF10 をモデルに、クラスリン依存性の細胞内小胞輸送の異常と白血病発症を含む病態との関連を探る。

3. 研究の方法

(1) <ノックアウトマウスの解析> Arf1 は E3.5 胚の培養で欠損の効果を解析する。加えて、詳しい解析と細胞樹立のためにコンディショナルノックアウトマウスを作る。CALM は貧血に加えて、原因遺伝子とされているアルツハイマー病との関連から脳の異常の有無も検討し関与を調べる。SMAP1, SMAP2 は二重ノックアウトマウスの E8 胚の組織解析を行い異常の原因を探る。

(2) <細胞レベルでの解析> Arf1 欠損細胞を樹立する。樹立した CALM 欠損 MEF 細胞で、CALM のスプライシングアイソフォームの機能の差を検証する。エンドソームと TGN 網間での CALM 欠損の効果を蛍光免疫染色等で解析する。SMAP1, SMAP2 は二重欠損細胞の樹立と解析を行う。

(3) <白血病キメラ遺伝子 CALM-AF10 の解析> クラスリン依存性小胞輸送と白血病発症の関係を改変キメラ遺伝子の造血細胞移植等で検討する

4. 研究成果

(1) <ノックアウトマウスの解析> Arf1 は E3.5 胚の培養では欠損の効果が見られなかった。Arf1 KO 胚が胎生致死であることを主な発表論文として公表した。加えて、詳しい解析と細胞樹立のためにコンディショナルノックアウトマウスを完成させた。CALM は貧血であることを主な発表論文として公表したが、大規模ゲノム解析から原因遺伝子とされているアルツハイマー病との関連で脳の異常の有無も検討し、CALM 欠損により γ -secretase のエンドサイトーシスが低下すること、即ち CALM の活性低下はアルツハイマー症のリスク軽減となることを示し、主な発表論文として公表した。SMAP1, SMAP2

は二重ノックアウトマウスの E8 胚の組織解析を行い、アポトーシスが引き起こされていることを発見し、公表論文の準備に入っている。

(2) <細胞レベルでの解析> Arf1 コンディショナルノックアウトマウスから樹立した Arf1 cKO MEF 細胞に Cre を導入してクロニング後に Arf1 KO MEF 細胞株を樹立し Arf1 欠損細胞を樹立した CALM 欠損 MEF 細胞で、CALM のスプライシングアイソフォームの機能の差がないことを確認した。エンドソームと TGN 網間での CALM 欠損の効果を蛍光免疫染色等で解析し、細胞内へ取り込まれた後の c-kt 受容体の輸送に関与することを明らかにし、主な発表論文として公表した。SMAP1, SMAP2 は二重欠損細胞の樹立に成功し、主な発表論文として公表した SMAP1 KO MEF 細胞での SMAP2 KD の結果を基に、トランスフェリンと c-kit のエンドサイトーシス、取り込まれてから輸送を解析したが、予想に反して SMAP1 KO との差は見られなかった。

(3) <白血病キメラ遺伝子 CALM-AF10 の解析> クラスリン依存性小胞輸送と白血病発症の関係を改変キメラ遺伝子の造血細胞移植等で検討し、CALM の核外排出配列 NES に依存した全く新しい白血病発症機構を発見し主な発表論文として公表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

Hayashi K, Momoi Y, Tanuma N, Kishimoto A, Ogoh H, Kato H, Suzuki M, Sakamoto Y, Inoue Y, Nomura M, Kiyonari H, Sakayori M, Fukamachi K, Kakugawa Y, Yamashita Y, Ito S, Sato I, Suzuki A, Nishio M, Suganuma M, Watanabe T and Shima H. (2015) Abrogation of protein phosphatase 6 promotes skin

carcinogenesis induced by DMBA.

Oncogene in press. (査読有)

Hayakawa N, Ogoh H, Sumiyoshi M, Matsui Y, Nishikawa S, Miyamoto K, Maede Y, Kiyonari H, Suzuki M, and Watanabe T. (2014) The *ADP-ribosylation factor 1* gene is indispensable for mouse embryonic development after implantation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 453, 748-753. (査読有)

Rai S, Tanaka H, Taniguchi Y, Suzuki M, Ogoh H, Tanimura A, Matsui K, Yokota T, Oritani K, Tanabe K, Watanabe T., Kanakura Y, and Matsumura I. (2014) Clathrin assembly protein CALM Plays a Critical Role in KIT Signaling by Regulating Its Cellular Transport from Early to Late Endosomes in Hematopoietic Cell.

PLoS ONE, DOI: 10.1371/journal.pone.0109441. (査読有)

Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Watanabe T., Tomita T, and Iwatsubo T. (2014) Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase.

Nature Communications, DOI: 10.1038/ncomms4386. (査読有)

Suzuki M, Yamagata K, Shino M, Aikawa Y, Akashi K, Watanabe T., and Kitabayashi I. (2014) Nuclear export signal within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia.

Cancer Science, 105, 315-323. (査読有)

Funaki T, Kon S, Tanabe K, Natsume W, Sato S, Shimizu T, Yoshida N, Wong WF, Ogura A, Ogawa T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Mochida K, Endoh K, Yomogida K, Fukumoto M, Horai R, Iwakura Y, Ito C, Toshimori K, Watanabe T., and Satake M. (2013) The Arf GAP SMAP2 is necessary for organized vesicle budding from the Trans-Golgi-network and subsequent acrosome formation in spermiogenesis.

Molecular Biology of the Cell, 24, 2633-2644. (査読有)

Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T., Funaki T, Won WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, Ogawa S, Nakamura T, and Satake M. (2013) *SMAP1* deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia.

Journal of Clinical Investigation, 123,

1123-1137. (査読有)

Suzuki M, Tanaka H, Tanimura A, Tanabe K, Oe N, Rai S, Kon S, Fukumoto M, Takei K, Abe T, Matsumura I, Kanakura Y, and Watanabe T. (2012) The mouse clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization.

PLoS ONE 7(2): e31854. (査読有)

[学会発表] (計 19 件)

Shunsuke Kon, Naoko Minegishi, Kenji Tanabe, Toshio Watanabe, Tomo Funaki, Daisuke Sakamoto, Yudai Higuchi, Hiroshi Kiyonari, Katsutoshi Asano, Manabu Fukumoto, Masahi Sanada, Seishi Ogawa, Takuro Nakamura, Masanobu Satake. SMAP1 Small Arf GAP1 deficiency disrupts receptor trafficking and is a predisposing factor for myelodysplastic syndrome in mice. Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology. 2012 年5月29日 神戸。口頭。

原華苗、今井恵理、鈴木麻衣、昆俊介、田邊賢司、船木智、佐竹正延、松居靖久、渡邊利雄：SMAP (Small Arf GAP) 1,2 両遺伝子欠損胚は致死である。第 35 回日本分子生物学会年会。2012 年 12 月、博多。

鈴木麻衣、田中宏和、松村到、金倉謙、北林一生、渡邊利雄：CALM-AF10 融合遺伝子の CALM による白血病発症と赤血球造血への役割個体レベルのがん研究ワークショップ。2013 年 2 月、大津。口頭。

鈴木麻衣、篠実花、相川祐規子、田中宏和、松村到、金倉謙、北林一生、渡邊利雄：CALM-AF10 の CALM 部分はどのように白血病発症へ関与するか。第 17 回 造血器腫瘍研究会。2013 年 2 月、宮崎。口頭。

小河穂波、鈴木麻衣、丹賀直美、篠実花、相川祐規子、北林一生、渡邊利雄：AF10 コンディショナルノックアウトマウスの作製。第 17 回 造血器腫瘍研究会。2013 年 2 月宮崎。口頭。

鈴木麻衣、篠実花、相川祐規子、渡邊利雄、北林一生：Nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for

CALM-AF10-mediated leukemic transformation. 第 36 回日本癌学会。2013 年 10 月 横浜。口頭。

住吉麻実、原華苗、小河穂波、鈴木麻衣、昆俊介、田邊賢司、佐竹正延、田沼延公、島礼、渡邊利雄：SMAP (Small Arf GAP) 1, 2 両遺伝子欠損MEF細胞株の樹立。第36回日本分子生物学会年会。2013年12月 神戸。

生田優希、早川夏姫、小河穂波、鈴木麻衣、阿部高也、清成寛、相沢慎一、渡邊利雄：小胞形成開始因子の Arf1 conditional ノックアウトマウスの作製。第 36 回日本分子生物学会年会。2013 年 12 月 神戸。

早川夏姫、生田優希、小河穂波、住吉麻実、原華苗、鈴木麻衣、渡邊利雄：小胞形成開始因子 Arf1 を欠損した胚盤胞の in vitro 培養下での増殖解析。第 36 回日本分子生物学会年会。2013 年 12 月 神戸。

松平竜之、田邊賢司、渡邊利雄、田口友彦、新井洋由：SMAP2 はリサイクリングエンドソームからゴルジ体への物質輸送を制御する。第 36 回日本分子生物学会年会。2013 年 12 月 神戸。

齋藤眞理子、山形和恒、鈴木麻衣、相川祐規子、小河穂波、渡邊利雄、田代文夫、北林一生：MLL 転座関連白血病における AF10 の役割。第 36 回日本分子生物学会年会。2013 年 12 月 神戸。

小河穂波、鈴木麻衣、相川祐規子、山形和恒、北林一生、渡邊利雄：AF10 欠損が引き起こす造血系と血管・リンパ管系の異常の発見。第 17 回 造血器腫瘍研究会。2014 年 2 月東京。口頭。

山形和恒、齋藤眞理子、鈴木麻衣、相川祐規子、小河穂波、渡邊利雄、北林一生：急性骨髄性白血病における AF10 の役割。第 17 回 造血器腫瘍研究会。2014 年 2 月、東京。口頭。

住吉麻美、早川夏姫、小河穂波、西川紗織、鈴木麻衣、昆俊介、佐竹正延、田邊賢司、田沼延公、島礼、渡邊利雄：GTP 脱リン酸化酵素の ARF とその活性化因子 SMAP の欠損マウス解析。

山形和恒、齋藤眞理子、鈴木麻衣、相川祐規子、勝本拓夫、小河穂波、渡邊利雄、北林一生：MLL 融合遺伝子関連白血病発症におけ

る AF10 の役割。第 73 回日本癌学会、2014 年 9 月 27 日、横浜。

鈴木 麻衣、篠 実花、相川 祐規子、渡邊利雄、北林 一生：CALM-AF10 の白血病誘導にはCALMが有する核外移行シグナルの機能が必須である。第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 18 日、京都。

金津 邦彦、渡邊 利雄、岩坪 威、富田 泰輔：遺伝学的アルツハイマー病予防因子 *PICALM*/*CALM* が病態形成に寄与する分子機構の解明。第 87 回日本生化学会大会 シンポジウム、2014 年 10 月 18 日、京都。

住吉麻実、小河穂波、早川夏姫、鈴木麻衣、松居靖久、渡邊利雄：SMAP(Small Arf GAP) 1, 2 両遺伝子欠損胚は致死でアポトーシスを起こしている。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜

鈴木 麻衣、山形 和恒、齋藤 眞理子、渡邊利雄、北林 一生：融合遺伝子による白血病幹細胞の制御機構。第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ、2014 年 11 月 27 日、横浜

[図書] (計 1 件)

渡邊利雄 「史上最強図解 これならわかる！分子生物学」ナツメ社 2013 年 5 月 8 日初版発行、287 頁。

[産業財産権]

該当せず。

[その他]

いくつかの研究成果を大学の HP にて公表した。

アルツハイマー病発症を予防する因子 CALM の機能を解明

<http://www.nara-wu.ac.jp/news/H25news/20140303.htm>

従来の理解を覆す新規の「白血病」発症機構を発見

<http://www.nara-wu.ac.jp/news/H25news/20>

140228/20140228.htm

不明であった皮膚がんを抑え込む機構を解明

<http://www.nara-wu.ac.jp/news/H26news/20>

141209/20141209.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 利雄 (WATANABE, Toshio)

奈良女子大学・研究院・自然科学系・教授

研究者番号：60201208