

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650196

研究課題名(和文) 逆向きモーター分子ミオシンVIのコンディショナルノックアウト表現型解析

研究課題名(英文) Phenotype analysis on conditional knockout mice defective of myosin VI

## 研究代表者

米田 幸雄 (Yoneda, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50094454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物に強烈ストレスを負荷すると、PTSD類似の長期的異常行動とともに、脳内海馬においてミオシンVI(Myosin VI)の発現が著明に上昇した。胚性腫瘍細胞のP19細胞に、Myosin VIを強制導入すると細胞の増殖能力が低下したが、神経細胞やアストログリア細胞への分化能力には著変は見られなかった。一方、人工的にMyosin VI発現を抑制すると、P19細胞の増殖能力は亢進したが、分化能力は変化しなかった。生死に関わる強烈ストレスは、脳内Myosin VI発現を上昇させて、その結果神経幹細胞数が低下することが、PTSD様症状発症とその後の海馬萎縮に関与するかもしれない。Myosin VIを標的とするPTSD治療と予防対策が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Severe fatal stress induced long-lasting bidirectional behavioral abnormalities relevant to posttraumatic stress disorder in adult mice, along with upregulation of the transcript and protein for myosin VI (Myo6) only in the hippocampus known to be enriched of proliferating neural progenitor cells. In embryonal carcinoma pluripotent P19 cells endowed to proliferate and differentiate into neuronal and astroglial lineages, stable overexpression of Myo6 attenuated the size and the activities of MTT reduction and BrdU incorporation in neurospheres clustered of proliferating cells. In these stable transfectants, no significant change was seen in the activity to commit and differentiate into neuronal and astroglial lineages. We succeeded in the generation of mice carrying a conditional Myo6 allele flanked by loxP sites, which are useful for generating mice deductive of Myo6 from a particular cell type for future investigation of the role of Myo6 in a variety of plasma cells.

研究分野：分子薬理学

キーワード：ミオシンVI PTSD 神経幹細胞 胚性腫瘍細胞 神経細胞 アストログリア細胞 細胞増殖能 細胞分化能

## 1. 研究開始当初の背景

モータータンパク質は、細胞内で ATP エネルギーを機械的運動に変換する分子群であり、この働きにより細胞の変形や移動、あるいは各種高分子の細胞内輸送が行われる。モータータンパク質には、微小管とアクチンフィラメントを足場とする 2 種類が存在するが、微小管を足場とするものには、マイナス端方向に移動するダイニンと、プラス端方向に移動するキネシンが知られている。これに対して、アクチンフィラメントを足場とするものには、マイナス端あるいはプラス端方向に移動するミオシンが知られている。ミオシンは細胞内の様々な場所に存在し、ATP の加水分解エネルギーを利用してアクチンフィラメント上を移動して、各種小胞やオルガネラだけでなくタンパク複合体や mRNA などの細胞内積荷を輸送する性質を有する。ミオシンは、18 のクラスからなるスーパーファミリーを形成するが、代表的ミオシンであるミオシン II(Myosin II)は、ATP を加水分解しながらアクチンフィラメントのマイナス端からプラス端に向かって移動して、筋収縮に参与する。一方、我々は不安障害の一種である心的外傷後ストレス障害(posttraumatic stress disorders; PTSD)のモデル動物を作製して、精神疾患発症の分子病態の解明に取り組んだ。PTSD は、圧倒的な環境ストレスへの曝露によって生じる神経症の一つであり、その外傷的イベントを反復的に再体験するエピソード、情動麻痺、および気分変動性の全般性過度覚醒を特徴とする。この PTSD モデル動物と正常動物の海馬を用いて、トランスクリプトーム解析を行ったところ、細胞内モータータンパク質の一つであるミオシン 6(Myosin 6)が応答性遺伝子として同定された。

## 2. 研究の目的

細胞内モーター分子であるミオシンスーパーファミリーの一つ Myosin 6 が、PTSD モデル動物海馬において、選択性の高い応答性を示すとの我々の研究成果を基盤とする。同分子 Myosin 6 は他のミオシンファミリータンパク質とは異なり、アクチンフィラメント上をプラス端からマイナス端に移動する唯一の逆向き輸送モーター分子である。この Myosin 6 コンディショナルノックアウトマウス作出に向けて、同フロックスマウス(Myosin 6<sup>lox/lox</sup>)を理化学研究所と共同開発する。同遺伝子改変動物を用いた包括的な脳表現型解析を実施することで、まず脳内における Myosin 6 の生理的意義と病態生理的意義を追究する。将来的には、脳以外の組織における表現型解析を通じて、逆向き輸送モーター分子 Myosin 6 の機能的役割の全貌解明を指向する。

## 3. 研究の方法

基本的には、中枢神経系構築細胞である、神経細胞、アストログリア細胞、ミクログリア細胞、および神経幹細胞それぞれ特異的に、Myosin 6 を欠損させた遺伝子改変動物を作製して、その表現型解析を in vivo および in vitro 実験系により網羅的に実施する。また、パートナータンパク質および細胞内輸送積荷を一斉探索することにより、中枢神経系における Myosin 6 の分子機能情報を獲得し、それら情報を利用しつつ Myosin 6 を中心とするモータータンパク質の各種神経系構成細胞における機能解析を行う。本計画案では、「分子発現-細胞機能-精神活動」という 3 種類のダイナミックな研究計画を実施し、これら解析結果を横断的に融合することにより、逆向き輸送モータータンパク質分子 Myosin 6 と精神疾患発症との関連性を明らかとする。

### < 精神疾患モデル動物におけるモータータンパク質分子群の網羅的発現解析 >

WIRS 負荷モデル動物の海馬において、Myosin 6 の強い発現上昇が認められているため、この特異性(ミオシンサブタイプ特異性や疾患特異性)を検討する。PTSD モデル動物や、統合失調症のモデルマウス(CaMKII $\alpha$ のヘテロ欠損マウス、フェンシクリジン投与マウス)から脳組織を取り出し、哺乳動物にて確認されている各種ミオシン(Myosin 1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 15, 16, 18)の mRNA およびタンパク質発現を、リアルタイム PCR 法あるいはウエスタンブロットング法を用いて検討する。

### < Myosin 6 発現制御に関する解析 >

Myosin 6 の転写レベルでの発現制御メカニズムを検討するために、Myosin 6 遺伝子の promoter 領域の各動物種間(ヒト、サル、マウス、ラット)で保存されている領域を、Luciferase レポーターベクターにクローニングし(Myosin 6 promoter-Luc)、Luciferase assay 系を用いたプロモーター解析を行う。さらに、EMSA 法や ChIP アッセイを行うことにより、特定の転写因子の Myosin 6 プロモーター領域への影響を多角的に解析する。また、同 Myosin 6 プロモーター領域の DNA メチル化状態あるいはヒストンのアセチル化・メチル化状態を、正常マウスと PTSD モデル動物間において、バイサルファイトシークエンシング法や、各種修飾酵素(Dnmt, HAT, HDAC, HMT)に対する抗体を用いた ChIP アッセイにより Myosin 6 の上流シグナルを検証する。

### < Myosin 6 のパートナータンパク質の探索と解析 >

Myosin 6 は、その分子機能の性格上、他の分子との相互作用を介して生理機能を発揮すると考えられる。既にパートナータンパク質の一つとして TLS の同定に至っているが、輸送物質の特異性に必須な Myosin 6 尾部領域(Myosin 6

tail) に相互作用する分子を網羅的に探索し、Myo6 の基本情報を網羅的に獲得する。Myo6<sup>flox/flox</sup>-Cre 交配マウスから単離した各細胞を用いて同様の検討を実施する。特に、精神疾患との関連性の高い神経伝達物質(グルタミン酸・セロトニン・ドパミン)に対する各種細胞膜受容体・トランスポーターの発現プラスミドを構築し、それら分子と Myo6 tail との一对一での相互作用を、免疫沈降法あるいは Yeast two hybrid 法により検討する。また、Myo6 tail と Flag タグを融合させた発現プラスミドを、遺伝子導入装置(Nucleofector)を用いて神経細胞やアストロサイト、あるいは神経幹細胞に遺伝子導入し、導入後 Flag ピーズによる免疫沈降を行い、その後質量分析計 ABI4800plus(MALDI TOF/TOF)を用いて、相互タンパク質を網羅的に解析する。さらに、全脳の cDNA ライブラリーを用いて、Myo6 tail を Bait とした Yeast two hybrid 法による Myo6 のパートナータンパク質の探索を行う。

#### < Myo6 輸送積荷の探索と解析 >

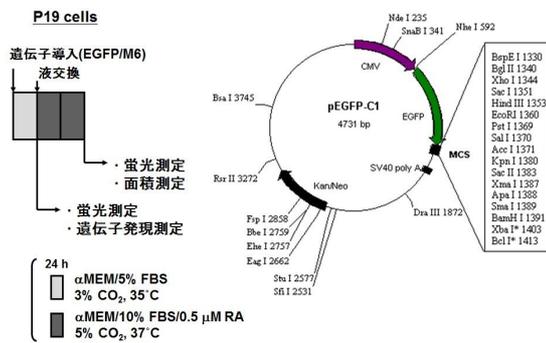
Myo6 は、RNA 結合タンパク質である TLS と相互作用し、各種 mRNA の細胞内輸送に関与すると推察される。本項目では、Myo6 により輸送される積荷 mRNA を網羅的に解析する目的で、Flag-Myo6 の発現プラスミドを導入した初代培養海馬神経細胞からポリソーム画分を採取し、Flag ピーズで免疫沈降させて、その上清中に含まれる RNA を逆転写酵素により cDNA へと変換させ、蛍光色素で標識後、DNA マイクロアレイによる解析を行う。

#### 4. 研究成果

本研究課題は、細胞内モーター分子であるミオシンスーパーファミリーの一つ Myo6 が、PTSD モデル動物海馬において、選択性の高い応答性を示すとの我々の *in vivo* 実験系での研究成果を基盤とする。Myo6 と PTSD のような精神疾患発症との関連性については、まったく未踏の新規研究対象であるが、我々は免疫沈降法による解析の結果、RNA 結合タンパク質である translocated in liposarcoma (TLS) と、Myo6 が直接的にタンパク質タンパク質間で相互作用することを見出した。TLS はヒト粘性性脂肪肉腫の原因遺伝子として同定されたが、神経系では Myo5 と結合し、アクチン安定化タンパク質の Nd1-L mRNA の樹状突起およびスパインへの輸送を促進して、スパイン安定性に寄与するので、その逆向き輸送ベクトルを考えると、Myo6 は TLS のスパインからの搬出に関与する可能性が考えられる。

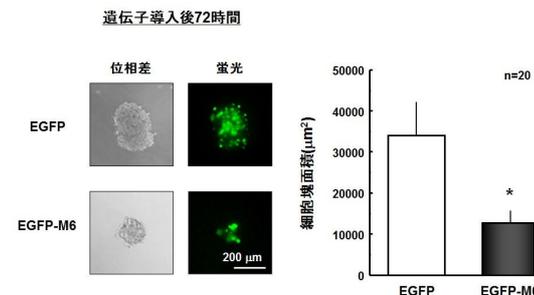
一方、マウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞を用いて、Myo6 の安定過剰発現細胞を樹立した(図 1)。

図 1



さらに、RNA 干渉法を利用して Myo6 発現抑制細胞を作製して、それぞれの Myo6 発現抑制細胞の増殖能と分化能について *in vitro* 実験系にて解析した。その結果、Myo6 安定発現 P19 細胞を浮遊条件で培養すると、細胞増殖能指標である神経塊形成能の低下だけでなく(図 2)、MTT 還元能の抑制がともに観察されたが、細胞傷害の指標である LDH 放出能や PI 染色性にはいずれも著明な変化は認められなかった。

図 2



一方、P19 細胞を浮遊培養後に分散してから、さらに接着条件下で培養すると、神経細胞マーカーである MAP2 およびアストログリア細胞マーカーである GFAP それぞれに陽性を示す細胞群が出現したが、Myo6 の安定強制発現はこれらの細胞分化能には影響を与えなかった。これに対して、siRNA を用いて P19 細胞における Myo6 発現を抑制すると、神経塊形成能および MTT 還元能の著明な増強が誘発されたが、細胞分化能の指標である MAP 陽性細胞数および GFAP 陽性細胞数には著明な変化は観察されなかった。以上の結果から、Myo6 は神経幹細胞の分化能には影響を与えずに、増殖能のみを抑制する遺伝子であることが示唆される。生死に関わるような強烈ストレスは、脳内特定領域の神経幹細胞内 Myo6 発現上昇を介して、同幹細胞増殖能を抑制することが、PTSD 様症状発症とその後に観察される海馬萎縮に関与する可能

性は否定出来ない。また、作出した Myo6 フロックスマウスのゲノム上には、ネオマイシン耐性遺伝子がまだ残存していたが、同マウスと Flippase 過剰発現マウスの交配の結果、ゲノム上のネオマイシン耐性遺伝子の除去が可能となった。今後、特定細胞の Myo6 発現だけを欠損したコンディショナルノックアウトマウスを作出して、Myo6 機能制御を標的とする PTSD 治療と予防の創薬戦略を展開する予定である。

#### 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 27 件)

- [1] Nakazato R, Takarada T, Ikeno S, Nakamura S, Kutsukake T, Hinoi E, Yoneda Y. Upregulation of Runt-Related Transcription Factor-2 through CCAAT Enhancer Binding Protein-Beta Signaling Pathway in Microglial BV-2 Cells Exposed to ATP. *J Cell Physiol* 2015 (in press) DOI: 10.1002/jcp.24988. 査読有
- [2] Takarada T, Nakamichi N, Kakuda T, Nakazato R, Kokubo H, Ikeno S, Nakamura S, Hinoi E, Yoneda Y. Daily oral intake of theanine prevents the decline of 5-bromo-2'-deoxyuridine incorporation in hippocampal dentate gyrus with concomitant alleviation of behavioral abnormalities in adult mice with severe traumatic stress. *J Pharmacol Sci* 2015; 127:292-297. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.12.018. 査読有
- [3] Hinoi E, Iezaki T, Ozaki K, Yoneda Y. Nuclear factor- $\kappa$ B is a common upstream signal for growth differentiation factor-5 expression in brown adipocytes exposed to pro-inflammatory cytokines and palmitate. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452: 974-979. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.09.022. 査読有
- [4] Hinoi E, Iezaki T, Fujita H, Watanabe T, Odaka Y, Ozaki K, Yoneda Y. PI3K/Akt is involved in brown adipogenesis mediated by growth differentiation factor-5 in association with activation of the Smad pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;450:255-260. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.05.108. 査読有
- [5] Nakazato R, Takarada T, Watanabe T, Nguyen BT, Ikeno S, Hinoi E, Yoneda Y. Constitutive and functional expression of runt-related transcription factor-2 by microglial cells. *Neurochem Int* 2014; 74: 24-35. DOI: 10.1016/j.neuint.2014.04.010. 査読有
- [6] Hinoi E, Nakamura Y, Takada S, Fujita H, Iezaki T, Hashizume S, Takahashi S, Odaka Y, Watanabe T, Yoneda Y. Growth differentiation factor-5 promotes brown adipogenesis in systemic energy expenditure. *Diabetes* 2014; 63: 162-175. DOI: 10.2337/db13-0808 査読有
- [7] Fukumori R, Takarada T, Nakazato R, Fujikawa K, Kou M, Hinoi E, Yoneda Y. Selective inhibition by ethanol of mitochondrial calcium influx mediated by uncoupling protein-2 in relation to N-methyl-D-aspartate cytotoxicity in cultured neurons. *PLoS One* 2013; 8: e69718. DOI: 10.1371/journal.pone.0069718 査読有
- [8] Le NQ, Binh NT, Takarada T, Takarada-Iemata M, Hinoi E, Yoneda Y. Negative correlation between Per1 and Sox6 expression during chondrogenic differentiation in pre-chondrocytic ATDC5 cells. *J Pharmacol Sci* 2013; 122: 318-325. DOI:10.1254/jphs.13091FP 査読有
- [9] Takarada T, Kou M, Nakamichi N, Ogura M, Ito Y, Fukumori R, Kokubo H, Acosta GB, Hinoi E, Yoneda Y. Myosin VI reduces proliferation, but not differentiation, in pluripotent P19 cells. *PLoS One* 2013; 8: e63947. DOI:10.1371/journal.pone.0063947 査読有
- [10] Takarada T, Hinoi E, Nakazato R, Ochi H, Xu C, Tsuchikane A, Takeda S, Karsenty G, Abe T, Kiyonari H, Yoneda Y. An analysis of skeletal development in osteoblast-specific and chondrocyte-specific runt-related transcription factor-2 (Runx2) knockout mice. *J Bone Miner Res* 2013; 28: 2064-2069. DOI:10.1002/jbmr.1945 査読有
- [11] Nakamura Y, Hinoi E, Iezaki T, Takada S, Hashizume S, Takahata Y, Tsuruta E, Takahashi S, Yoneda Y. Repression of adipogenesis through promotion of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling by TIS7 up-regulated in adipocytes under hypoxia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2013; 1832: 1117-1128. DOI:10.1016/j.bbadis.2013.03.010 査読有
- [12] Fujita H, Hinoi E, Watanabe T, Iezaki T, Takamori M, Ogawa S, Yoneda Y. Prevention of bone loss after ovariectomy in mice with preferential overexpression of the transcription factor paired box-5 in osteoblasts. *Biol Pharm Bull* 2013; 36: 481-484. DOI:10.1248/bpb.b12-00893 査読有
- [13] Hinoi E, Ochi H, Takarada T, Nakatani E, Iezaki T, Nakajima H, Fujita H, Takahata Y, Hidano S, Kobayashi T, Takeda S, Yoneda Y. Positive regulation of osteoclastic differentiation by growth differentiation factor 15 upregulated in osteocytic cells under hypoxia. *J Bone Miner Res* 2012; 27:

- 938-949. DOI:10.1002/jbmr.1538. 査読有
- [14] Takarada T, Takarada-Iemata M, Takahata Y, Yamada D, Yamamoto T, Nakamura Y, Hinoi E, Yoneda Y. Osteoclastogenesis is negatively regulated by D-serine produced by osteoblasts. *J Cell Physiol* 2012; 227: 3477-3487. DOI:10.1002/jcp.24048. 査読有
- [15] Fujikawa K, Nakamichi N, Kato S, Fukumori R, Hida M, Takarada T, Yoneda Y. Delayed mitochondrial membrane potential disruption by ATP in cultured rat hippocampal neurons exposed to N-methyl-D-aspartate. *J Pharmacol Sci* 2012; 119: 20-29. DOI.org/10.1254/jphs.12034FP 査読有
- [16] Fujita H, Hinoi E, Nakatani E, Yamamoto T, Takarada T, Yoneda Y. Possible modulation of process extension by N-methyl-D-aspartate receptor expressed in osteocytic MLO-Y4 cells. *J Pharmacol Sci* 2012; 119: 112-116. DOI.org/10.1254/jphs.12068SC 査読有
- [17] Fukumori R, Takarada T, Kambe Y, Nakazato R, Fujikawa K, Yoneda Y. Possible involvement of mitochondrial uncoupling protein-2 in cytotoxicity mediated by acquired N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Neurochem Int* 2012; 61: 498-505. 査読有 DOI:10.1016/j.neuint.2012.03.019.
- [18] Takarada T, Nakamichi N, Kawagoe H, Ogura M, Fukumori R, Nakazato R, Fujikawa K, Kou M, Yoneda Y. Possible neuroprotective property of nicotinic acetylcholine receptors in association with predominant upregulation of glial cell line-derived neurotrophic factor in astrocytes. *J Neurosci Res* 2012; 90: 2074-2085. DOI:10.1002/jnr.23101. 査読有
- [19] Takahata Y, Hinoi E, Takarada T, Nakamura Y, Ogawa S, Yoneda Y. Positive regulation by  $\gamma$ -aminobutyric acid B receptor subunit-1 of chondrogenesis through acceleration of nuclear translocation of activating transcription factor-4. *J Biol Chem* 2012; 287: 33293-33303. DOI:10.1074/jbc.M112.344051 査読有
- [20] Takarada T, Nakamichi N, Kitajima S, Fukumori R, Nakazato R, Le NQ, Kim YH, Fujikawa K, Kou M, Yoneda Y. Promoted neuronal differentiation after activation of  $\alpha 4/\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors in undifferentiated neural progenitors. *PLoS One* 2012; 7: e46177. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0046177.
- [21] Takarada T, Kodama A, Hotta S, Mieda M, Shimba S, Hinoi E, Yoneda Y. Clock genes influence gene expression in growth plate

and endochondral ossification in mice. *J Biol Chem* 2012; 287: 36081-36095. DOI:10.1074/jbc.M112.408963. 査読有

- [22] Ogura M, Kakuda T, Takarada T, Nakamichi N, Fukumori R, Kim YH, Hinoi E, Yoneda Y. Promotion of both proliferation and neuronal differentiation in pluripotent P19 cells with stable overexpression of the glutamine transporter slc38a1. *PLoS One* 2012; 7: e48270. DOI:10.1371/journal.pone.0048270. 査読有

〔学会発表〕(計 82 件)

- [1] Yukio Yoneda (2014) Glutamate signaling in bone. Kidney Week 2014, American Society of Nephrology, Nov. 14, Philadelphia (USA)
- [2] 米田 幸雄 (2014) 多様な形質細胞間の神経アミノ酸シグナルの普遍性 日本薬学会第 134 年会, 3 月 27 日, ホテル日航熊本など (熊本県熊本市) 日本薬学会賞受賞講演
- [3] Yukio Yoneda (2013) Molecular pathology of PTSD ISN-APSN Advanced Neuroscience School 24-27 June, Singapore (Singapore)
- [4] Yukio Yoneda (2012) A role of mitochondria in mobilization mediated by NMDA receptors. 2012 Annual Meeting of The Korean Society of Applied Pharmacology, Oct 5, Chunchon (Korea)
- [5] Yukio Yoneda, Takeshi Takarada, Ryo Fukumori, Koichi Fujikawa (2012) Pharmacological profiles of alcohol in acquired NMDAR channels. 2012 ISBRA World Congress, 9-12 September, Sapporo Convention Center, Sapporo (Japan)
- [6] Yukio Yoneda (2012) A role of mitochondria in NMDA neurotoxicity. 10th ISPS, 26-29 June, Ankara (Turkey)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称: 神経変性障害の予防又は治療  
発明者: 米田 幸雄、檜井 栄一、宝田 剛志、高 巳奇  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-166776 号  
出願年月日: 平成 26 年 8 月 19 日  
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田幸雄(YONEDA, Yukio)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：50094454

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：