

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06478

研究課題名(和文) 精神神経疾患における新規mTOR相互作用因子の機能解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of novel mTOR-interacting protein

研究代表者

葛西 秀俊 (Kasai, Hidetoshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：40403232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者がmTOR新規相互作用分子として同定したFlightless-I (Flii)の機能解析を行った。Fliiは細胞骨格制御タンパク質として知られているが、神経系における機能は不明であった。そこで、大脳皮質特異的Fliiコンディショナルノックアウトマウスを作製した。このマウスの脳形態を調べた結果、胎生期の神経前駆細胞のアポトーシスおよび異所化によって、大脳皮質が萎縮することが明らかとなった。大脳皮質の萎縮および異所化は活性化型mTORを発現したトランスジェニックマウスにおいても観察されることから、FliiはmTORシグナルに関連して大脳皮質発生に関与していることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTORシグナルは、がんや結節性硬化症、自閉症、神経編疾患など、ヒトの多様な疾患に深く関与していることが知られており、その発症メカニズムや治療法が深く研究されている分野である。本研究では大脳皮質における新規のmTOR相互作用因子として同定されたFliiの機能解析を遺伝子改変マウスを用いて行った。Fliiノックアウトマウスの表現型は、mTORシグナルが過剰に活性化したマウスと類似している。このことから、学術的にはこれまで十分明らかではなかった神経系におけるmTORシグナルの機能に迫ることができ、社会的にはヒトの疾患のメカニズムの解明や治療戦略に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I analyzed mTOR protein complex extracted from the mouse cerebral cortex by mass spectrometry, and identified the novel mTOR-interacting protein, Flightless-I (Flii). Flii is known as the cytoskeleton-regulating protein, but little is known about its function in the central nervous system.

We generated dorsal telencephalon-specific Flii conditional knockout mice (Flii cKO) by CRISPR/Cas9 system. The histological analysis revealed the atrophy of the cerebral cortex in Flii cKO mice, probably due to the apoptotic cell death of cortical progenitor cells during embryonic period. These phenotypes were also observed in the transgenic mice expressing active mTOR in the dorsal telencephalon. Therefore, Flii involved in the brain development, and may have relationship with the mTOR signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：mTOR Flightless-I knockout mice

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

mTOR (mammalian target of rapamycin) は細胞のエネルギー代謝の中核分子であり、mTORC1 および mTORC2 と呼ばれる異なる 2 つのタンパク質複合体として機能する。mTORC1 は成長因子やアミノ酸などに応答して活性化し、タンパク質合成やオートファジーを介して細胞成長やエネルギー恒常性など様々な細胞機能を制御している。また、mTORC1 シグナルの異常な活性化は、がんや糖尿病など様々なヒトの疾患で見出されている。中枢神経系においては、結節性硬化症・神経変性疾患・自閉症・てんかんといった社会的にも非常に関心の高い精神神経疾患との関連が示唆されている。

申請者はこれまでの研究で、時間的・空間的に mTORC1 の活性を制御することができるトランスジェニック (Tg) マウスを樹立し、大脳皮質における mTORC1 シグナルの機能解析を行った。その結果、胎生期における mTORC1 の活性化は神経前駆細胞のアポトーシスに伴う小頭症を引き起こした一方、成熟期の活性化は巨脳症・てんかん・神経変性疾患様の症状を発症した。このことから、mTORC1 シグナルは脳の発達段階によって全く異なる機能を持ち、その違いが多様な神経疾患を引き起こす基盤となっていることを明らかにすることができた (Kassai et al., Cell Rep., 2014)。

### 2. 研究の目的

活性化型 mTOR Tg マウスは結節性硬化症および神経変性疾患のモデル動物として有用であることから、これらの疾患の病態メカニズムを明らかにするために、質量分析によって mTOR 相互作用因子を網羅的に解析した。その結果、Flightless-I (Flii) およびそのパートナー分子である Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 (Lrrfip1) を同定することができた。Flii および Lrrfip1 は細胞骨格制御に関連するタンパク質であることが示唆されているが、全身性の Flii ノックアウトマウスは胎生致死となるため、個体レベルでの解析はほとんど行われてこなかった。そこで、申請者はゲノム編集技術によって Flii 遺伝子に loxP 配列をノックインし、Cre-loxP 組換えによって部位特異的に Flii 遺伝子をノックアウトすることができるマウスを作製した。本研究ではこのマウスを用いて、大脳皮質特異的 Flii コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製し、神経機能および mTOR 関連疾患の発症における Flii の役割を明らかにすることを旨とする。

### 3. 研究の方法

#### 大脳皮質における Flii ノックアウトマウスの作製

Flii 遺伝子に loxP を導入したノックインマウスおよび Flii ヘテロノックアウトマウスを Emx1-cre マウス (Kassai et al., Eur. J. Neurosci., 2008; Kassai et al., Cell Rep., 2014) と交配することによって大脳皮質特異的 Flii cKO マウスを作製する。次に、得られた Flii cKO マウスの大脳皮質よりタンパク質抽出液を調製し、抗 Flii 抗体を用いたウエスタンブロットによって Flii が欠損しているかどうかを検証する。その結果、Flii の欠損が確かめられた上で、Flii の機能解析を下記の両面から行う。

#### 大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの行動解析

神経機能における Flii の役割を明らかにするために、大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの行動解析を行う。体外受精によって週齢を揃えたオスマウスを用いて、複数のテストバッテリーによって、Flii の神経機能が行動レベルに与える影響を解析する。

#### 大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの組織学的解析

Flii は細胞骨格の制御に関連していることが示唆されていることから、大脳皮質特異的 Flii ノックアウトマウスは、成熟期における脳の形態および発生期における神経細胞の移動などに異常が見いだされる可能性がある。そこで、大脳皮質特異的 Flii ノックアウトマウスの脳切片を作製し、神経細胞や細胞骨格のマーカーで免疫組織染色を行うことによって、形態の異常を観察する。これらの解析を通して、Flii の大脳皮質の形態形成における寄与を明らかにする。

## 4. 研究成果

### 大脳皮質における Flii ノックアウトマウスの作製

Flii 遺伝子に loxP を導入したノックインマウス (Flii<sup>lox</sup>) および Flii ヘテロノックアウトマウス (Flii<sup>+</sup>) を Emx1-cre マウス (Kassai et al., Eur. J. Neurosci., 2008; Kassai et al., Cell Rep., 2014) と交配することによって大脳皮質特異的 Flii cKO マウス (Flii<sup>lox/-</sup>; Emx1<sup>cre/+</sup>) を作製した。コントロールマウスとして、Flii<sup>lox/+</sup>; Emx1<sup>cre/+</sup> (Flii control) を以降の実験で用いた。

Flii の発現を検証するために、大脳皮質および小脳よりタンパク質抽出液を調製し、抗 Flii 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、Flii cKO マウスの大脳皮質において Flii の発現の低下が認められた (図 1)。終脳領域での Flii の発現低下は in situ hybridization によっても確認することができた。

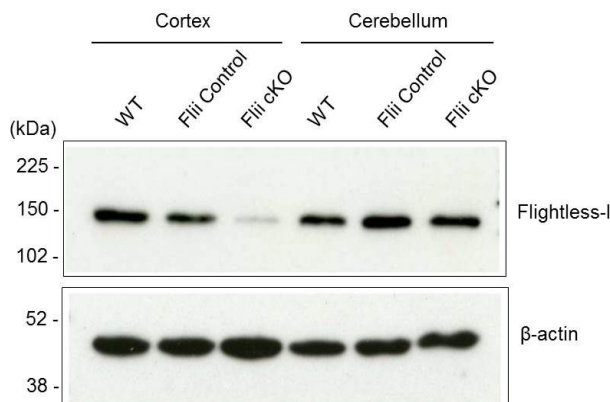


図 1 マウス脳における Flii タンパク質の発現解析

### 大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの行動解析

神経機能における Flii の役割を明らかにするために、大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの行動解析を行った。体外受精によって週齢を揃えた Flii control および Flii cKO マウスを作製した。これらのマウスを複数のテストバッテリーに供した。テストバッテリーは、オープンフィールド試験・Y 字迷路試験・高架式十字迷路試験・社会的相互作用試験・プレパルス抑制実験・ロータロッド試験・恐怖条件付け学習試験・モリス水迷路試験の一連の行動解析を行った。いずれの試験においても Flii control と Flii cKO マウスとの間で有意な差は認められなかった。

### 大脳皮質特異的 Flii cKO マウスの組織学的解析

Flii cKO マウスの脳を固定し、組織学的に形態を観察した。その結果、Flii cKO マウスは Flii control マウスと比較して大脳皮質が萎縮していることが明らかとなった。この萎縮は胎生期の Flii cKO マウスでも観察された。一方で、大脳皮質の層構造には Flii cKO マウスにおいても大きな異常は観察されなかった。

次に、Flii cKO マウスにおいて大脳皮質が萎縮した原因を調べた。胎生 12.5 日齢のマウス脳切片を抗 cleaved caspase 3 抗体によって免疫染色を行った。その結果、Flii cKO マウスにおいて cleaved caspase 3 陽性細胞が多数検出された。このことから、Flii cKO マウスにおける大脳皮質の萎縮は、胎生期の神経前駆細胞の過剰なアポトーシスが原因であることが示唆された。さらに、胎生期の脳切片を抗 Pax6 抗体を用いて染色し、神経前駆細胞の局在を解析した。Flii control マウスにおいては Pax6 陽性の神経前駆細胞は大脳皮質の脳室側に局在していたのに対して、Flii cKO マウスではその局在が乱れていることが明らかとなった (図 2)。

Flii cKO マウスで観察された神経前駆細胞のアポトーシスおよび異所化は、大脳皮質において mTOR を恒常的に活性化したマウスにおいても観察された。このことから、Flii は大脳皮質の発生過程において mTOR シグナルに関与している可能性が考えられた。

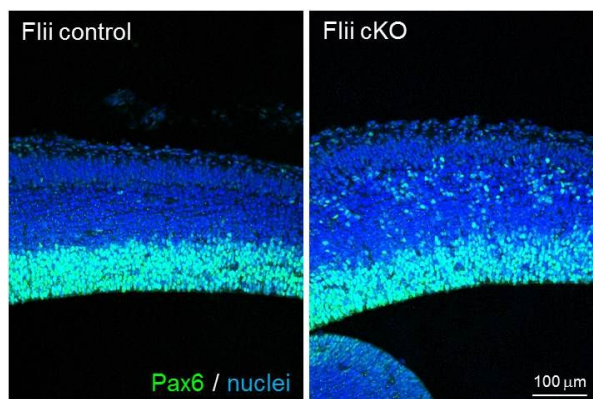


図 2 Flii cKO マウスにおける神経前駆細胞の異所化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokoi N, Fukata Y, Okatsu K, Yamagata A, Liu Y, Sanbo M, Miyazaki Y, Goto T, Abe M, Kassai H, Sakimura K, Meijer D, Hirabayashi M, Fukai S, Fukata M.	4. 巻 37
2. 論文標題 14-3-3 proteins stabilize LGI1-ADAM22 levels to regulate seizure thresholds in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 110107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.110107	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 Kawarada L, Fukaya M, Saito R, Kassai H, Sakagami H, Aiba A.	4. 巻 595
2. 論文標題 Telencephalon-specific Alkbh1 conditional knockout mice display hippocampal atrophy and impaired learning.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 1671-1680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14098	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 Toyoda Y, Takada T, Miyata H, Matsuo H, Kassai H, Nakao K, Nakatochi M, Kawamura Y, Shimizu S, Shinomiya N, Ichida K, Hosoyamada M, Aiba A, Suzuki H	4. 巻 117
2. 論文標題 Identification of GLUT12/SLC2A12 as a urate transporter that regulates the blood urate level in hyperuricemia model mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proc. Natl.Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 18175-18177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2006958117	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 Kurano M, Tsukamoto K, Shimizu T, Kassai H, Nakao K, Aiba A, Hara M, Yatomi Y	4. 巻 69
2. 論文標題 Protection Against Insulin Resistance by Apolipoprotein M/Sphingosine-1-Phosphate.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 867-881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2337/db19-0811	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 Yusuke Sakai, Hidetoshi Kassai, Hisako Nakayama, Masahiro Fukaya, Tatsuya Maeda, Kazuki Nakao, Kouichi Hashimoto, Hiroyuki Sakagami, Masanobu Kano, Atsu Aiba	4. 巻 9
2. 論文標題 Hyperactivation of mTORC1 disrupts cellular homeostasis in cerebellar Purkinje cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38730-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科・疾患生命工学センター・動物資源学部門  
<http://lar.cdbim.m.u-tokyo.ac.jp/index.html>

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