

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370084

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスを用いた哺乳類セブチン系の生理機能の探索と解析

研究課題名(英文) Exploration of physiological functions of mammalian septins with genetically engineered mouse lines

研究代表者

木下 専 (Kinoshita, Makoto)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30273460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)：重合性GTPaseセブチンは微小管やアクチンと同様に進化的に保存された細胞骨格であり、足場、拡散障壁、アダプターなどとしての多機能性が示唆されるが生理機能には不明な点が多い。1) SEPT7ノックアウトマウスを樹立・解析したところ、セブチンがHDAC6による脱アセチル化を介して微小管の安定性を負に制御することにより、樹状突起と軸索の発達を促進することを見出した。2) parkinによるユビキチン化の基質であり、パーキンソン病で凝集体を形成するSEPT4をマウスに慢性過剰発現するトランスジェニックマウスを樹立・解析すると、軽度な行動変化はみられたが、細胞学的変化や神経変性はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Septins are evolutionarily conserved polymerizing GTPases like the major cytoskeletal nucleotide-binding proteins of tubulins and actins, however, their physiological functions in metazoans are largely unknown. To address this: 1) We have established a line of conditional SEPT7 knockout mice and uncovered that septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. 2) We established prion-promoter-driven SEPT4 transgenic mice and uncovered that chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. These and other findings, in addition to mouse lines and a set of reagents created in this study, will help understand cellular/molecular mechanisms of septin functions in relation to other cytoskeletal systems in physiologically relevant contexts.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：セブチン アクチン 微小管 細胞骨格 細胞表層 アセチル化 神経突起 シナプス伝達

1. 研究開始当初の背景

酵母からヒトまで保存された重合性 GTPase セプチンは、アクチンや微小管と協調して細胞形態制御に関与する一方、多様な膜蛋白質の局在や機能を規定する拡散障壁や足場を形成する。しかし、その多機能性とサブユニット間の機能重複のために、特に哺乳類での細胞機能、生理機能、病態との関連には不明な点が多い。

1) 2) 代表者らを含む複数の研究グループにより、神経突起の成長にはチューブリンとセプチンという2つのGTP結合タンパク質の重合体が必要であることが示されていた。しかし、これらの細胞骨格系が協働しているのか、協働しているとすればどのようなメカニズムによるのかは全くわかっていなかった。

3) 常染色体劣性若年性パーキンソン病 PARK2 では、ユビキチンリガーゼ Parkin の機能喪失から、ドーパミン神経細胞死に至るまでの病態プロセスは未だ解明されていない。有力な仮説として、Parkin によるユビキチン化を介した分解を免れた基質の蓄積が神経毒性をもつことが提唱されている。Parkin の基質として少なくとも2つのセプチン (SEPT4 とそのホモログ SEPT5) が知られている。孤発性を含めたパーキンソン病の共通病態はドーパミン神経の選択的な変性と脱落であるが、その際、細胞質内に特徴的な凝集体 Lewy 小体が形成される。その主成分 α -シヌクレインも Parkin の基質であるが、当グループでは SEPT4 が副成分の1つとして Lewy 小体に共凝集していることを報告した。一方、海外のグループはウィルスベクターにて SEPT5 を過剰発現させたラットのドーパミン神経が急速に脱落することを示したが、セプチン過剰発現の慢性的な影響は検討されていなかった。

2. 研究の目的

1) 2) 独自に樹立した *Sept7* コンディショナル・ノックアウトマウスを活用して、*in vivo* と *in vitro* の実験系を相補的に活用し、個体・細胞・蛋白質レベルでセプチンおよび関連分子ネットワークを解析する。*Sept7-null* 欠損マウスでは予想外の知見が得られることも期待されるため、重要な所見については *in vitro* 系ないし分子レベルでの検証を通じてセプチン系の作用メカニズムを解析する。

3) SEPT4 を中枢神経系全域で発現するトランスジェニックマウスを作製・解析することで、神経系全体におけるセプチンの過剰発現の慢性的な影響を検討する。

3. 研究の方法

1) *in vivo* でのセプチン機能解析

培養細胞セプチンの RNAi で示された樹状突起形成異常の妥当性と分子メカニズムを生理的条件下で検証する。*Sept7-floxed* マウス胎児に *in utero* 電気穿孔法で Cre リコンビナーゼを発現させて *Sept7-null* 欠損ニューロンをキメラ状に作製し、セルソーターで分取して蛋白質レベルの異常を定量的に解析する。軸索投射も含めたニューロン形態を蛍光顕微鏡で半定量的、定性的に解析した。

2) *in vitro* でのセプチン機能解析

Sept7-floxed マウス胎児由来の初代培養大脳皮質ニューロンに電気穿孔法により Cre リコンビナーゼを発現させて *Sept7-null* 化し、従来 RNAi 法で解析されてきた神経突起伸長におけるセプチン系の役割を厳密に検証する。異常フェノタイプの背景にある分子メカニズムを生化学的手法、薬理学的手法などを用いて探索した。

3) *Sept4* の最大の遺伝子産物である SEPT4^{54kDa} をプリオン・プロモーターによって中枢神経系全域で発現するトランスジェニックマウスを作製・解析した。予想される神経変性の検出を組織学的・生化学的に行うのと同時に、予想外のフェノタイプに対してはバイアスがかからず検出感度の高い機能的スクリーニングとして系統的行動解析を施行した。

4. 研究成果

1) 2) 神経突起の成長には、チューブリンとセプチンという2つのGTP結合タンパク質の重合体が必要である。しかし、これらの細胞骨格系が協働しているのか、協働しているとすればどのようなメカニズムによるのかはわかっていない。本研究では、周産期マウスの大脳皮質ニューロンでセプチン重合体の必須サブユニット SEPT7 をノックダウンあるいはノックアウトすると微小管が過剰にアセチル化され、大脳半球間および皮質脊髄路の軸索投射と樹状突起形成が阻害されることを示した。初代培養ニューロンを用いた *in vitro* 実験により、SEPT7 の欠乏が過剰アセチル化を介して微小管の過剰安定化ないし成長遅延をもたらすことを示した。SEPT7 欠乏の表現型と α -チューブリン脱アセチル化酵素 HDAC6 の薬理的阻害の表現型の類似性や両者の物理的相互作用などから、HDAC6 の酵素活性ではなく、アセチル化チューブリンとの結合に SEPT7 が必要であることがわかった。以上およびその他の所見から、セプチンが HDAC6 による微小管脱アセチル化の物理的足場として働くことで、微小管の安定化を神経突起成長に最適なレベルに抑制制御していることが示唆された。以上から、ユビキタスに存在する2つの細胞骨格系が、神経発生過程においては HDAC6 を介して共役されていることが明らかになった。(Nature

3) 組織学的、生化学的方法により α -シヌクレインを含む SEPT4 関連タンパク質と黒質線条体のドーパミン神経におけるドーパミントランスポーターの発現量を解析したが、Sept4^{fl} と野生型間に有意差を認めなかった。このことから、慢性的な SEPT4 の過剰だけでは、マウス脳において神経変性のプロセスを引き起こさず、パーキンソン病の病態仮説の説明には不十分であった。しかし、複数の行動試験において Sept4^{fl/fl} マウスの自発運動量が一貫して減弱し、社会的行動が異常であるという予想外の表現型が系統的行動解析により明らかにされた。以上その他の結果から、パーキンソン病、統合失調症、双極性障害患者の死後脳で共通にみられるセプチンの異常が、これら神経疾患患者の行動異常の一因である可能性が示唆された。(Molecular Brain 2013)

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5件)

Ageta-Ishihara N, Yamakado H, Morita T, Hattori S, Takao K, Miyakawa T, Takahashi R, Kinoshita M. Chronic overload of SEPT4, a parkin substrate that aggregates in Parkinson's disease, causes behavioral alterations but not neurodegeneration in mice. *Molecular Brain* 6:35, 2013.
<http://www.molecularbrain.com/content/6/1/35>

Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. *Nature Communications* 4:2532, 2013.
<http://www.nature.com/ncomms/2013/131011/ncomms3532/full/ncomms3532.html>

Yoshida A, Yamamoto N, Kinoshita M, Hiroi N, Hiramoto T, Kang G, Trimble WS, Tanigaki K, Nakagawa T, Ito J. Localization of septin proteins in the mouse cochlea. *Hearing Research* 289, 40-51, 2012.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378595512001013>

Hagiwara A, Tanaka Y, Hikawa R, Morone N, Kusumi A, Kimura H, Kinoshita M.

Submembranous septins as relatively stable components of actin-based membrane skeleton. *Cytoskeleton* 68, 512-525, 2011.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.20528/full>

Yanagida A, Iwaisako K, Hatano E, Taura K, Sato F, Narita M, Nagata H, Asechi H, Uemoto S, Kinoshita M. Downregulation of the Wnt antagonist Dkk2 links the loss of Sept4 and myofibroblastic transformation of hepatic stellate cells. *BBA-Molecular Basis of Disease* 812, 1403-1411, 2011.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911001414>

[学会発表](計22件)

June 27-29, 2011, Kinoshita M. Probing physiological roles of septins in neurons and glia. Symposium 5 "Cytoskeleton" The 63rd Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology (Sapporo, Japan)

平成23年8月6日 木下 専 「ドーパミン神経伝達と変性におけるセプチン細胞骨格の役割」第51回 脳の医学・生物学研究会

平成23年8月23日 木下 専 「遺伝子改変マウスを用いたセプチン細胞骨格系の神経機能と病態へのアプローチ」文部科学省科研費補助金 新学術領域研究 包括脳ネットワーク 夏のワークショップ

平成23年9月18日 Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M. "Ultrastructural localization analysis of the septin cytoskeleton/ scaffold system in mammalian brain." 第34回日本神経科学大会

平成23年9月21日 木下 専 「細胞突起の機能的組織化・区画化を支えるスカフォールド系の生理的意義の解析」第84回日本生化学会大会シンポジウム

平成23年9月26日 Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septin-dependent microtubule regulation in neurite outgrowth. シンポジウム「ニューロンとグリアにおけるセプチン細胞骨格の機能解明に向けたアプローチ」第54回 日本神経化学学会大会

November 12-16, 2011, Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. Septin-dependent microtubule regulation required for axon and dendrite elongation. Society for Neuroscience Annual Meeting (Washington, D.C.)

平成 23 年 11 月 21 日 Ageta-Ishihara N, Kinoshita M. 「小脳バグマングリア突起における Cdc42-Cdc42ep4-septin パスウェイの生化学的・機能的解析」第 2 回 神経科学と構造生物学の融合研究会

平成 23 年 11 月 30 日 Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M. “Ultrastructural localization analysis of the septin cytoskeleton /scaffold system in mammalian brain” 生理研研究会 「電子顕微鏡機能イメージングの医学・生物学への応用：3D イメージングの最先端」

平成 24 年 1 月 8 日 真野 善有、栗田浩之、深澤有吾、上田（石原）奈津実、重本隆一、木下 専 「電子顕微鏡連続切片像から 3 次元再構築した樹状突起棘の定量解析」定量生物学の会 第 4 回年会

平成 24 年 5 月 22 日 服部頼都、猪原匡史、岡本洋子、北村彰浩、長谷佳樹、綾木 孝、木下 専、大石直也、福山秀直、伊東秀文、高橋良輔 「SIRT1 による脳虚血耐性機構に関する検討」第 53 回日本神経学会学術大会

January 22, 2013. Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M. Immuno-EM 3D reconstruction analysis of septin subunits in the cerebellum. Frontiers in Structural Physiology Symposium.

March 15, 2013. Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M. Immuno-EM 3D reconstruction analysis of the septin family GTPases which constitute the membrane skeleton in neurons and glia. The 14th International Membrane Research Forum.

June 25, 2013. Kurita H, Fukazawa Y, Ageta-Ishihara N, Shigemoto R, Kinoshita M. Differential clustering of septin subunits beneath specific perisynaptic membrane domains in the cerebellar cortical neurons and glia. The 6th international neural microcircuit conference.

平成 24 年 7 月 6 日 木下 専 「包括脳支援制度を活用した CDC42-CDC42EP-セプチン系の神経機能の探索」生命科学系 3 分野支援活動（がん、ゲノム、脳）合同シンポジウム 生命科学・医学の発展を支える研究基盤の未来

平成 24 年 9 月 21 日 石原奈津実、木下 専 Septin-dependent microtubule regulation required for the outgrowth of axons and dendrites” 第 35 回日本神経科学大会 公開

シンポジウム「神経突起の形成とリモデリングを制御する新規メカニズムと普遍原理」

平成 24 年 12 月 12 日 石原奈津実、木下 専 “Septins facilitate neurite outgrowth through HDAC6-mediated microtubule deacetylation” 第 35 回日本分子生物学会年会

平成 24 年 12 月 15 日 永津真司、築地仁美、木下 専、三澤日出巳、山中宏二 「遺伝性 ALS モデルにおける SIRT1 の関与」日本生化学会年会

平成 25 年 11 月 2 日 木下 専 「セプチン細胞骨格の破綻を伴う精神・神経疾患病態モデルの作製と解析」第 11 回神経科学研究会

December 14, 2013. Ageta-Ishihara N, Miyata T, Ohshima C, Watanabe M, Sato Y, Hamamura Y, Higashiyama T, Mazitschek R, Bito H, Kinoshita M. Septins promote dendrite and axon development by negatively regulating microtubule stability via HDAC6-mediated deacetylation. 50th ASCB Annual Meeting.

平成 26 年 2 月 24 日 木下 専 「生理学研究所共同研究制度を活用したセプチンおよび関連遺伝子欠損マウスの行動解析」生理学研究所 行動・代謝分子解析センター行動様式解析室 研究会

平成 26 年 3 月 31 日 木下 専 「遺伝子改変マウスの認知/行動異常から見えてきた脳内セプチン系の多彩な機能」京都大学分子生体統御学セミナー

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kinoshitalabnagoya/>

http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20131011_sci.pdf

6．研究組織

(1)研究代表者

木下 専 (KINOSHITA, Makoto)

研究者番号：30233460

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし