

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09741

研究課題名(和文) K0マウスを用いたCaveolin1及びAk2による皮膚発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Spindle orientation control via caveolin1 and Ak2 in skin development

研究代表者

松村 繁 (Matsumura, Shigeru)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：60523511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂軸制御と皮膚発生には重要な相関がある。培養細胞を用いた分裂軸制御因子の探索によって得られたCaveolin1とAk2、Pank2の分裂軸制御における共通の分子機構を仮定し、その解明と皮膚発生への影響についてK0マウスを用いて検証を行った。培養細胞レベルで糖・脂質代謝阻害が分裂軸異常を引き起こすことを見出したが、共通の分子機構の存在は解明に至らなかった。Caveolin1K0での皮膚発生時の細胞分裂軸異常は明らかとなったが、Ak2K0マウスのホモ個体を作成することができなかった。分子機構の解明にはより詳細な代謝解析が必要であろうと思われる。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that spindle orientation control in skin basal cells has a pivotal role in skin development. Caveolin1, Ak2 and Pank2 are candidates, involved in spindle orientation control by our screen in adherent cultured cells. We hypothesized that these genes have a role in a common spindle orientation regulatory pathway, especially in metabolic pathway in sugar and lipids. However, although the inhibition of metabolic pathway resulted in spindle disregulation, we could not find a common pathway behind three candidate genes. We found that spindle misorientation in skin basal cells during embryonic skin development in caveolin1 ko mice. But we could not obtained Ak2 floxed homo mice at last and could not obtain any results if Ak2 regulates spindle orientation in skin development. To elucidate further insights, studies on more detailed analysis in metabolisms should be required.

研究分野：細胞生物学

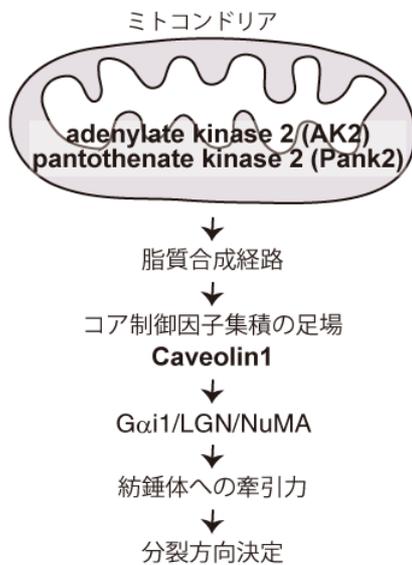
キーワード：細胞分裂軸制御

1. 研究開始当初の背景

皮膚幹細胞の存在する基底層での非対称分裂の制御は多層構造形成に重要であることがマウス皮膚上皮形成において報告されてきた。簡便な培養細胞系を用いた分裂軸制御機構の siRNA スクリーニングを行い、候補遺伝子、Adenylate Kinase 2 (AK2) 及び pantothenate kinase 2 (Pank2) を得た。2 者は共にミトコンドリアに局在しエネルギー代謝に関わる。本研究では、この仕組みを糖/脂質代謝の観点から明らかにしようとした。

これまでに同じスクリーニングの関連候補因子であった caveolin1 が分裂軸制御に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。すなわち Caveolin1 は分裂期細胞膜においてカベオラ様の脂質ドメインを、不均一に局在させる役割を担い、分裂軸制御コア因子の局在制御に重要であることがわかった。そこで Ak2、Pank2 が糖・脂質代謝を通じて分裂期の脂質ドメイン形成に関与するという仮説を立て検証を行った。

仮説 AK2/Pank2による糖・脂質代謝が細胞分裂方向制御因子の足場を生み出す



2. 研究の目的

組織における細胞分裂方向はその細胞運命を方向づける。

集積の足場形成

分裂軸コア制御因子集積位置

分裂軸方向の決定

となる。本研究では、この仕組みを糖/脂質代謝の観点から明らかにする。

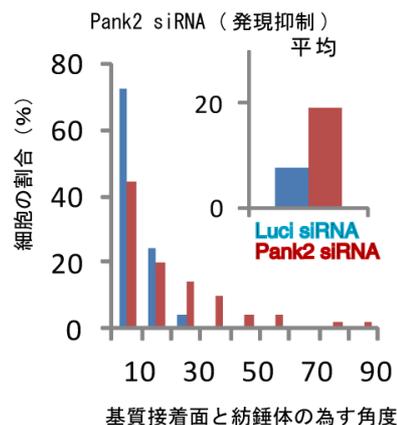
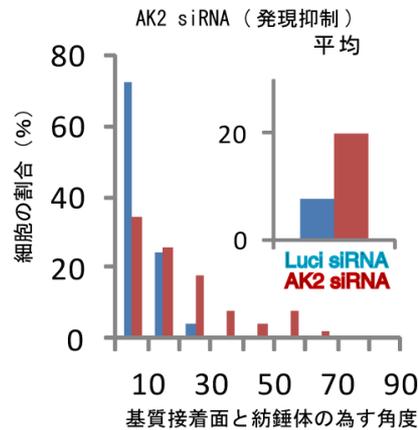
網羅的探索により見出された細胞分裂軸制御因子、Adenylate Kinase 2 (AK2) 及び pantothenate kinase 2 (Pank2) は共にミトコンドリアに局在しエネルギー代謝に関わる。糖代謝・脂質代謝経路と分裂軸制御の関わり、および AK2・Pank2 との関与を解析する。

3. 研究の方法

接着細胞は分裂期において細胞 細胞外基質接着面に対して平行に分裂する。これは、紡錘体軸の方向制御機構の存在を意味する。本研究は、この実験系を用いて分裂軸制御を評価する。候補遺伝子 AK2・Pank2 の発現抑制、糖代謝・脂質代謝経路の阻害剤での分裂軸制御に及ぼす影響を解析する。また Caveolin1KO マウスおよび Ak2KO マウスを用いて胎仔皮膚基底細胞の分裂軸制御と皮膚発生の分子機構を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

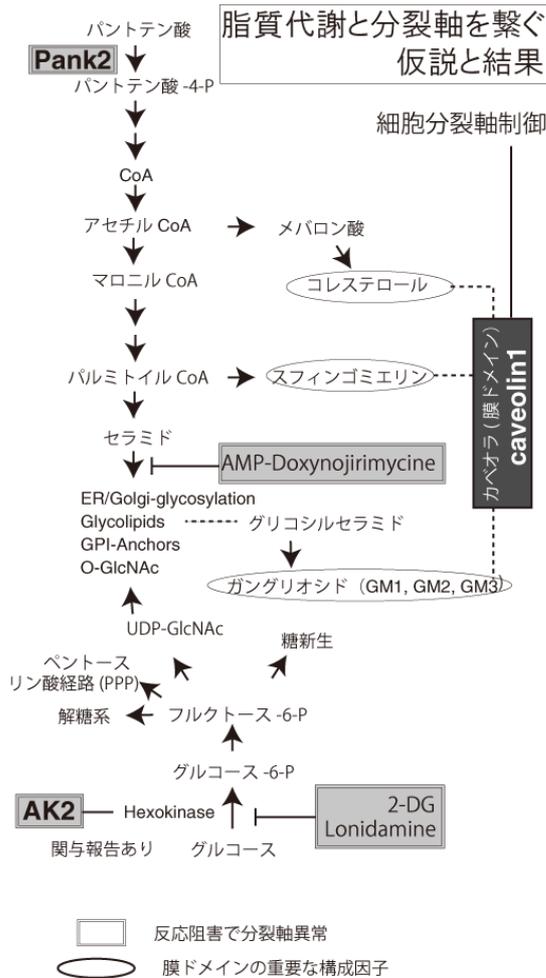
候補遺伝子 AK2 は、 $ATP + AMP \rightleftharpoons 2 ADP$ を触媒するミトコンドリア膜間腔に局在するキナーゼである。もう1つの候補遺伝子 Pank2 はパントトン酸リン酸化酵素であり補酵素 CoA 生合成経路の初段階を触媒する。Ak2 及び Pank2 の発現抑制は、分裂軸異常を引き起こした。



糖代謝を 2DG (糖取込阻害) 及び Lonidamine (Hexokinase 阻害剤) による糖代謝経路を阻害によっても分裂軸異常が観察された。セラミドに糖を添加し糖脂質合成の初段階の阻害剤 AMP-Doxynjirimycin 処理によっても同様で

あった。しかし経路を組み合わせた検証を行ったが糖代謝経路と AK2、Pank2 の分裂軸制御に共通機構があるという強い証拠は得られなかった。

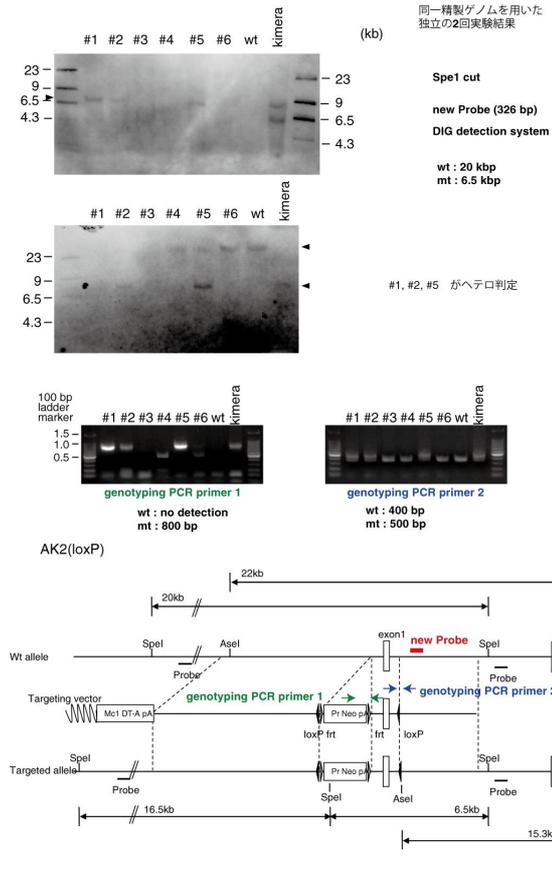
また、これらの分裂軸異常において、Caveolin1 の局在は偏局在を失っていたが、タンパク質量の変化はなかった。一方で、ミトコンドリアの膜電位の阻害剤を用いた場合にも分裂軸異常が見られた。恐らくミトコンドリアの代謝経路が関与していると思われるが、仮説のように単純ではないのかもしれない。あるいは分裂期での制御なのか分裂期に入る前の間期での制御なのか時空間的な解析を必要とするのかもしれない。



培養細胞による脂質制御の表現形が安定しなかった為、生体の解析にシフトして研究を行った。AK2 の flox マウスのホモ個体作出を試みたが、通常交配では得られず、PCR 法や qPCR 法、サザン等の検出方法の改善を試みたが、結果に変化はなかった。体外受精法も試みたが、ホモ個体は得られなかった。AK2 の KO マウスは既に胎生致死である。floxed ES 細胞選択ように組み込まれた Neo の発現が AK2 の発現阻害している可能性が考えられた。

そこで Flp マウスとの交配によって Neo を飛ばそうとしたが、なぜか飛ばせなかった。そこで PCR 断片のシーケンスにより FRT 配列に変異がはいっていないか確かめたが、異常は認められなかった。Flp マウスを新たに理研よりもらい繰り返したがやはり飛ばせなかった。

一方で、Caveolin1 KO の胎仔基底細胞の分裂軸を解析したところ、分裂軸の異常が認められた。しかし、Caveolin1 KO マウスは正常に発育し、体毛も正常であることから、Caveolin1 欠損による分裂軸異常が皮膚発生を完全に阻害するわけではないことがわかった。分裂軸の制御機構の全容解明にはさらなる研究が必要であると考えられる。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者

松村 繁 (Matsumura Shigeru)

名古屋大学・医学系研究科

・特任講師

研究者番号： 60523511

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()