

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32680

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06163

研究課題名（和文）低分子量Gタンパク質R-Rasによる神経管形成制御機構の解析

研究課題名（英文）Molecular mechanism of neural tube formation by the small GTPase R-Ras

研究代表者

大畑 慎也 (Ohata, Shinya)

武蔵野大学・薬学部・講師

研究者番号：00442939

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,500,000円

研究成果の概要（和文）：二分脊椎症などの神経管形成不全は比較的発症頻度の高い神経疾患です。その発症機序を分子レベルで理解することによって診断技術や治療法の開発につながることを期待されます。細胞は細胞外からの様々な刺激にตอบสนองして、その形態や遺伝子発現状態を変化させ、これを細胞内情報伝達といいます。本研究では、細胞内情報伝達のON/OFFを切り替える役割を持つGタンパク質に着目して神経管形成を制御する細胞内情報伝達の分子機構を研究しました。その結果、R-Ras と呼ばれるGタンパク質の一つが、情報伝達のON/OFFに応じて神経管形成不全発症に関わるVangl2を介して神経管形成を制御している可能性を見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経管の形成は、細胞の非対称性（極性）を制御する分子に変異が起こることによって生じることが知られています。これらの分子がどのように外界からのシグナルに応じて機能するのかが不明でした。本研究では、細胞内のシグナル伝達のON/OFFを切り替えるR-Rasという分子が、細胞極性分子と相互作用することによって神経管形成を担うことを明らかにしました。本研究は、神経管形成不全の診断・予防法開発に貢献することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Neural tube dysplasia, such as spina bifida, is a relatively common neurological disorder. Understanding the pathogenesis of the disease at the molecular level is expected to lead to the development of diagnostic techniques and treatment methods. Cells change their morphology and gene expression status in response to various extracellular stimuli, and this is called signal transduction. In this study, we investigated the molecular mechanism of signal transduction that regulates neural tube formation by focusing on the G protein, which is responsible for turning on and off signal transduction. We found that one of the G proteins, called R-Ras, may regulate neural tube formation in response to the ON/OFF of information transmission through Vangl2, which is involved in the development of neural tube dysplasia.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経管形成不全 R-Ras 低分子量Gタンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト神経管形成不全は、10,000 人あたり 3.5 人程度が発症する比較的発症頻度の高い神経疾患であり (Wallingford et al., 2013) その病理発症機序の理解は重要な課題である。神経管は、神経板を構成する細胞が集団的な細胞移動をすることによって形成される。この協調的細胞移動は、進化的に保存された平面細胞極性 (PCP) 制御因子群によって制御されており、これらの遺伝子の変異が神経管形成異常の原因となることが明らかになってきている (Cai and Shi, 2014)。しかし、PCP 因子がどのような分子機構によって制御され、神経管形成に関わるのかについては、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

ゼブラフィッシュは、胚が透明で体外で発生し、かつ遺伝学的操作も容易であることから、神経管形成研究の良いモデル生物である。ゼブラフィッシュの脊髄は、神経板を構成する細胞が集団的な細胞移動を行った後に、正中線に沿った対称細胞分裂を行うことによって形成される。PCP 因子の一つである 4 回膜貫通型タンパク質 Vangl2 の遺伝子に変異を持つ突然変異ゼブラフィッシュでは、細胞集団の移動が遅延するものの、対称細胞分裂の時期は影響されないため、脊椎が左右に二重に形成される (Tawk et al., 2007)。申請者は、神経幹細胞の細胞極性維持に関与する因子を探索する過程で (Ohata et al., 2011) アンチセンスモルフォリノヌクレオチド (AMO) を用いた低分子量 G タンパク質 R-Ras の発現抑制が、*vangl2* 突然変異体と同様の神経管形成異常を引き起こすことを見出した。Ras ファミリータンパク質は、G サイクル (GTP 結合型と GDP 結合型を行き来すること) によって、細胞内情報伝達系経路の ON/OFF を切り替える分子スイッチとして機能する (Satoh and Kajiro., 1992)。本研究では、R-Ras がその G サイクルを通じて Vangl2 をはじめとする PCP 制御因子群と相互作用し、神経管形成を制御する可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

全ての動物実験は、理化学研究所、東京大学、武蔵野大学の動物実験施設利用委員会 (IACUC) の承認を得て行われた。変異ゼブラフィッシュ系統は、pDR274 および pCS2^{ph}SpCas9 プラスミド (Addgene #42250、#51815) を用いた CRISPR/Cas9 法を用いて作製し、ゼブラフィッシュナショナルバイオリソースプロジェクトに寄託した。ノックアウトマウスは、遺伝子トラップ ES 細胞株 (MMRRC、SIGTR ES 細胞株 AK0793) を用いて作出した。条件付きノックアウトベクターの構築には、pEZ FrtLox DT ベクター (Klaus Rajewsky 博士の提供) を用いた。免疫沈降、ウェスタンブロットング等は定法に従って行った (Ohata et al., 2018)。

4. 研究成果

研究代表者が見出した、「AMO を用いたゼブラフィッシュ R-Ras 発現抑制によって、脊髄神経管内腔が左右に 2 つ形成される」という表現型は、AMO 耐性の野生型 *rras* mRNA を注入することによって回復した。この結果から、R-Ras は神経管形成に機能する事が期待された。しかし近年、AMO は標的外効果 (off-target effect) によって p53 依存的細胞死を引き起こすことが報告され (Robu et al., 2007)、上記表現型もこれによって現れた可能性が危惧された。R-Ras 発現抑制胚における神経管形成不全が p53 依存的であるかを検証するために、*rras* AMO と p53 AMO を同時にゼブラフィッシュ胚に注入したが、表現型は抑制されなかった。さらに、Crispr/Cas9 システムを用いて遺伝子破壊ゼブラフィッシュ系統を作出した。5 種類のガイド RNA (gRNA) を作製し、野生型ゼブラフィッシュ胚に注入した。これらのうち 2 種類の gRNA を用いた場合に遺伝子編集が行われることを PCR によって確認し、成魚を得た。これらのゼブラフィッシュの中から、フレームシフトを起こした部位から近い位置で停止コドンが現れる 2 個体を選別し、ゼブラフィッシュ *rras* 変異系統を 2 系統樹立した。しかし、*rras* ヘテロ接合体から得られた *rras* 変異体ゼブラフィッシュでは神経管形成異常は観察されなかった。母性 *rras* が胎生 *rras* の欠損を相補している可能性が考えられた。そこで、*rras* ヘテロ接合体のオスと *rras* ホモ接合体のメスを掛け合わせて *rras* 変異体を得たものの、やはり神経管形成異常は観察されなかった。次に、*rras* 欠損が、*rras2* や *rras3* などの他の遺伝子によって相補された可能性を考え、*rras* 変異体に *rras* AMO を注入する実験を行なった。もし AMO による神経管形成不全が標的外効果であるならば、*rras* AMO を注入した *rras* 変異体でも神経管形成不全が観察されるはずである。しかし、この変異体では神経管形成不全は観察されなかった。以上の結果から、*rras* は神経管形成に関与することが示された。

ゼブラフィッシュの *vangl2* 変異体胚において両側性脊髄表現型が報告されていることから (Tawk et al., 2007) R-Ras と Vangl2 が何らかの相互作用を介して協調的に神経管形成を制御している可能性が考えられた。そこで、R-Ras が Vangl2 と物理的に相互作用するかどうかを決定するために、培養細胞で免疫沈降試験を行った。R-Ras の野生型、恒常的活性化 (GTP 結合) 型である 38V、および 2 つのグアニンヌクレオチド遊離型である 41A および 43N を使用した。R-Ras と Vangl2 を培養細胞で共発現させ免疫沈降を行った。興味深いことに、293T 細胞では、GFP タグ付きヒト Vangl2 (GFP-Vangl2) が HA タグ付きヒト R-Ras と共免疫沈着していた。さらに、この物理的相互作用は、WT または 38 V 変異体で観察されたものと比較して、41A および 43 N R-Ras 変異体でより強くなった。タンパク質複合体を抗 GFP 抗体で免疫沈降させた場合も同様の

結果が得られた。一方、今回の研究では、HA-Ras は、NTDs 患者でも変異している別の PCP タンパク質 Prickle1 とは共沈しなかった。これらの結果は、R-Ras が Vangl2 と物理的に相互作用しており、この結合が特異的であることを示しており、Vangl2 は R-Ras の GTP 結合活性型ではなく、R-Ras の不活性型（GDP 結合型またはグアニンヌクレオチド非結合型）と優先的に相互作用している可能性を示唆している。神経管形成に関与する分子の同定は、NTD の予防や NTD 治療に重要である。本研究では、ゼブラフィッシュの胚性脊髄発生において、R-Ras が神経管形成に関与していることを明らかにした。R-Ras は Vangl2 と協力して、神経管形成を促進するシグナル伝達経路の分子スイッチとして機能している可能性がある。

低分子量 G タンパク質による形態形成という概念をさらに拡大するために、当研究室で単離した低分子量 G タンパク質の機能解析を行った。Arl8 は、機能未知な低分子量 G タンパク質の中で、進化的に最もよく保存されている分子の 1 つあるが、酵母には存在せず、ショウジョウバエや線虫にはその相同因子が存在することから (Okai et al., 2004) 多細胞生物において根幹的な機能を司ると考えられる。マウスは非常によく保存された *ar18a* と *ar18b* というホモログを有する。当研究室では、*ar18b* ノックアウトマウスを用いた解析により、Arl8b が母体から胎児への影響供給 (Oka et al., 2017) および背側神経管形成 (Hashimoto et al., 2019) に関与することを見出した。本研究は、固体発生における低分子量 G タンパク質の生理的役割の理解を拡大するだけでなく、病理発症機構を明らかにすることによって診断・予防法開発に貢献することが期待される。

<引用文献>

1. Wallingford JB, Niswander LA, Shaw GM, Finnell RH.
“ The continuing challenge of understanding, preventing, and treating neural tube defects. ”
Science. 2013 Mar 1;339(6123):1222002. doi: 10.1126/science.1222002.
2. Cai C, Shi O.
“ Genetic evidence in planar cell polarity signaling pathway in human neural tube defects. ”
Front Med. 2014 Mar;8(1):68-78. doi: 10.1007/s11684-014-0308-4.
3. Tawk M, Araya C, Lyons DA, Reugels AM, Girdler GC, Bayley PR, Hyde DR, Tada M, Clarke JD.
“ A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis. ”
Nature. 2007 Apr 12;446(7137):797-800. doi: 10.1038/nature05722.
4. Satoh T, Kaziro Y.
“ Ras in signal transduction. ”
Semin Cancer Biol. 1992 Aug;3(4):169-77.
5. Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA, Ekker SC.
“ p53 activation by knockdown technologies. ”
PLoS Genet. 2007 May 25;3(5):e78. doi: 10.1371/journal.pgen.0030078.
6. Okai T, Araki Y, Tada M, Tateno T, Kontani K, Katada T.
“ Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. ”
J Cell Sci. 2004 Sep 15;117(Pt 20):4705-15. doi: 10.1242/jcs.01347.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Keisuke, Yamaguchi Yoshifumi, Kishi Yusuke, Kikko Yorifumi, Takasaki Kanako, Maeda Yurie, Matsumoto Yudai, Oka Miho, Miura Masayuki, Ohata Shinya, Katada Toshiaki, Kontani Kenji	4. 巻 24
2. 論文標題 Loss of the small GTPase Arl8b results in abnormal development of the roof plate in mouse embryos	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 436 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12687	査読の有無 無
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 Ohata Shinya, Uga Hideko, Okamoto Hitoshi, Katada Toshiaki	4. 巻 501
2. 論文標題 Small GTPase R-Ras participates in neural tube formation in zebrafish embryonic spinal cord	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 786 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.074	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 Oka Miho, Hashimoto Keisuke, Yamaguchi Yoshifumi, Saitoh Shin-ichiro, Sugiura Yuki, Motoi Yuji, Honda Kurara, Kikko Yorifumi, Ohata Shinya, Suematsu Makoto, Miura Masayuki, Miyake Kensuke, Katada Toshiaki, Kontani Kenji	4. 巻 130
2. 論文標題 Arl8b is required for lysosomal degradation of maternal proteins in the visceral yolk sac endoderm of mouse embryos	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 3568 ~ 3577
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.200519	査読の有無 無
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 Ohata Shinya, Alvarez-Buylla Arturo	4. 巻 39
2. 論文標題 Planar Organization of Multiciliated Ependymal (E1) Cells in the Brain Ventricular Epithelium	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Trends Neurosci.	6. 最初と最後の頁 543 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tins.2016.05.004	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 該当する

1. 著者名 Hirota Yuki, Sawada Masato, Huang Shih-hui, Ogino Takashi, Ohata Shinya, Kubo Akiharu, Sawamoto Kazunobu	4. 巻 41
2. 論文標題 Roles of Wnt Signaling in the Neurogenic Niche of the Adult Mouse Ventricular/Subventricular Zone	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Neurochem Res.	6. 最初と最後の頁 222 ~ 230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-015-1766-z	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>上衣腫発症に関わる機能未知遺伝子C11orf95の機能解析と上衣腫治療薬の開発 大畑 慎也 加藤記念バイオサイエンス振興財団 令和元年度年報 印刷中</p> <p>上衣腫発症につながる恒常的NF-β経路活性化の分子機構解明と阻害剤の開発 大畑 慎也 SGHがん研究報告 2019 29:35-38.</p> <p>上衣腫におけるNF-β経路活性化機構の解明 大畑 慎也 安田記念医学財団癌研究助成成果報告集 2018 16:13-15.</p>

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
---------------------------	-----------------------	----