

令和元年6月5日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07296

研究課題名(和文) 組織特異的遺伝子欠損法を用いた神経変性疾患における小胞輸送機構関与の検証

研究課題名(英文) Examination of involvement of vesicle transport mechanism in neurodegenerative disease using tissue specific gene deletion method

研究代表者

渡邊 利雄 (Watanabe, Toshio)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60201208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Arf1を神経細胞でのみ欠損させたマウスは離乳後に後肢の運動障害を伴って死亡する。小脳の顆粒細胞数減を明らかにした。Arf1欠損細胞での倍加時間の増加と細胞周期とを解析できるFucci発現細胞株の作製に成功した。Arf1, 6のT, Bリンパ球での組織特異的な欠損を誘導したところ、免疫機構の異常(成熟異常や抗体分泌異常など)を見出した。Arf1&6欠損MEF細胞作製に向けたマウス作出に成功した。SMAP1&2欠損細胞では二重欠損特異的にBMPシグナルの活性低下の遅延(活性の持続)を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、「神経変性疾患を小胞輸送異常が引き起こす疾患」として捉えすことの妥当性が、小胞形成開始因子として細胞で良く解析されてきたArf1を用いてマウス個体レベルで示されたことは学術的に大きな意義がある。逆を考えれば、Arf1の活性化薬剤は神経変性疾患の予防や治療に応用できるかもしれないという社会的な意義も求められる。さらに、免疫をつかさどるT細胞、B細胞でのArf1の重要性を発見したことは、免疫系における新しいArf1機能の解明を期待させ、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要(英文)：A mouse lacking Arf1 only in neurons dies shortly after weaning with movement disorder of the hind limbs. We clarified the decrease in the number of granule cells in the cerebellum. We succeeded in creating a Fucci-expressing cell line capable of analyzing the doubling time and cell cycle in Arf1-deficient MEF cells. When tissue-specific deletion of Arf1 and/or 6 in T and B lymphocytes were induced, abnormalities in the immune mechanism (such as abnormal maturation and abnormal antibody secretion) were found. We succeeded in generating mice for the preparation of Arf1 & 6 double-deficient MEF cells. In the SMAP1 & 2 double-deficient cells, we found that the signal loss is specifically delayed in the activity of the BMP signal (duration of the activity).

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：小胞輸送 ARF 神経特異的欠損 細胞増殖遅延 BMPシグナル亢進

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患における初期の顕著な症状に小胞輸送の配送センターである「ゴルジ体の断片化」が見られることから、「神経変性疾患を小胞輸送異常が引き起こす疾患」として捉えなおそうとする新しい機運が見られる。小胞輸送制御因子 Arf 研究の第一人者 Richard Kahn は、「小胞輸送と神経変性疾患発症機構との関連は小胞輸送研究の今後の第一級の課題だ」としているが、いまだ研究成果は少ない。一例として神経変性疾患の一つであるアルツハイマー症の病理所見のアミロイド沈着によるアミロイド斑の生成は、クラスリン依存性小胞輸送に依存し、大規模な遺伝子 SNP 解析から、クラスリン集合因子の CALM が発症リスク因子候補として注目を浴び、アルツハイマー症を「クラスリン依存性小胞輸送が引き起こす疾患」として捉えなおそうとする新しい機運が見られ、小胞輸送と神経変性疾患発症機構との関連が注目されていた。

2. 研究の目的

小胞輸送制御因子 Arf の神経系での機能解析は成体レベルでほとんどなされていない。ゴルジ体やミトコンドリアの維持・機能に重要とされている Arf1 の誘導性欠損マウスを用いて「Arf1 の神経幹細胞特異的欠損マウスでは進行性の運動失調が見られ、離乳後マウスは死亡する」結果を得ており、解析に格好の位置にいた。そこで我々の研究成果と上述の神経変性研究の背景とをもとに、「神経変性疾患における小胞輸送機構の関与の存在」を解明するために、神経組織特異的遺伝子欠損マウス (Arf1, Arf GAP の SMAP1,2) およびそこから作製した培養細胞系を用いて、個体レベル・細胞レベルでの関与の解明が研究の目的である。

3. 研究の方法

「小胞輸送異常が引き起こす神経変性疾患」の実態解明の研究目的達成に向けて、以下の3つの研究方法により解明を目指した。(1)Arf1、Arf1&6 を神経幹細胞でのみ欠損させたマウスで見られる異常の原因を探り、脳神経レベルで神経変性が見られるかを組織レベルで検討する。(2)Arf1 調節因子(不活性化因子)の SMAP1&2 を神経幹細胞でのみ欠損させたマウスでの「離乳以降存在する個体が見られない」という異常の原因を検討する。(3)Arf1, Arf1&6, SMAP1&2 欠損細胞で、神経細胞との関連がある因子の小胞輸送異常を神経幹細胞のスフェア培養、異常マウスの神経細胞とする MEF 細胞での解析から探索する。

4. 研究成果

以下に示す、当初の計画に沿った結果と、当初の計画から広がる形での成果とを挙げることに成功した。

(1)Arf1 を神経細胞でのみ欠損させたマウスに見られた離乳後の後肢の運動障害とその結果死亡する原因の解明：先端モデル動物支援プラットフォームの協力で小脳の顆粒細胞数が少ないという異常を明らかにした。しかしながら、共同研究者の研究室移動等の予期せぬ出来事が妨げとなり、この小脳の顆粒細胞数の減少が、直接に後肢の運動障害とマウスの死亡につながる異常であるかの検証まではできていない。死亡原因解析のために、特に既に判明している Arf1 欠損 MEF 細胞での倍加時間の増加に着目して突破口を開きたい。細胞周期をライブの蛍光映像で解析できるように Piggy Bac 法を用いた細胞周期依存的に蛍光タンパク質を発現する Fucci 発現細胞株の作製に成功している。今後細胞周期と増殖遅延との詳細な解析を行える。未着手である神経幹細胞のスフェア培養は、適当な共同研究者を探している。

(2) Arf1, 6 調節因子の SMAP1, 2 を神経系で特異的に欠損させたマウスでの異常の有無の検討: SMAP1, 2 を神経系で特異的に欠損させたマウスは離乳期以降も正常に生存しまだ異常は見られていない。解析対象を神経系との類似がたびたび取り上げられる免疫系へと広げた。Arf1, 6 の T, B リンパ球での組織特異的な欠損を誘導したところ、免疫機構の異常 (成熟異常や抗体分泌異常など) を見出した。現在免疫研究の専門家と共に詳細な解析を進めている。

(3) Arf1, Arf1&6, SMAP1&2 欠損細胞での解析: Arf1&6 欠損 MEF 細胞をタモキシフェン誘導法にて誘導したが、Arf1 は両アリルが、Arf6 は一方のアリルのみに欠損が誘導された。原因が不明のため、Arf1(flox/flox); Arf6 (-/-); ERT2-Cre MEF を作製するためのマウスの交配を継続し、Arf1(flox/+); Arf6 (+/-); ERT2-Cre マウスまで得ることに成功した。現在当初予定した二重欠損 MEF の作製を計画している。SMAP1&2 欠損細胞では二重欠損特異的に BMP シグナルの活性低下の遅延 (活性の持続) が見られることを発見した。これは二重欠損胚でも盛られることから、詳細な解析に向いている MEF を用いてその分子メカニズムに迫ろうと計画している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

N Tanga, K Kuboyama, A Kishimoto, H Kiyonari, A Shiraiishi, R Suzuki, T Watanabe, A Fujikawa, and M Noda. (2019) The PTN-PTPRZ signal activates the AFAP1L2-dependent PI3K-AKT pathway for oligodendrocyte differentiation: Targeted inactivation of PTPRZ activity in mice. *GLIA* 67:967-984. DOI: 10.1002/glia.23583. (査読有)

Y Yoshino, H Qi, H Fujita, M Shiota, S Abe, Y Komiyama, K Shindo, M Nakayama, A Matsuzawa, A Kobayashi, H Ogoh, T Watanabe, C Ishioka and N Chiba. (2018) The BRCA1-interacting protein OLA1 requires the interaction with BARD1 to regulate centrosome number. *Molecular Cancer Research* 16, 1499-1511. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0269. (査読有)

K Kurosawa, Y Inoue, Y Kakugawa, Y Yamashita, H Yamada, K Kishimoto, M Nomura, Y Momoi, K Miura, I Sato, N Chiba, M Suzuki, H Ogoh, T Watanabe, N Tanuma, M Tachi and H Shima. (2018) Loss of protein phosphatase 6 in mouse keratinocytes enhances K-rasG12D-driven tumor promotion. *Cancer Science* 109, 2178-2187. DOI: 10.1111/cas.13638. (査読あり)

M Morita, T Sato, M Nomura, Y Sakamoto, Y Inoue, R Tanaka, S Ito, K Kurosawa, K Yamaguchi, Y Sugiura, H Takizaki, Y Yamashita, R Katakura, I Sato, Y Okada, H Watanabe, G Kondoh, S Matsumoto, A Kishimoto, M Obata, M Matsumoto, T Fukuhara, H Motohashi, M Suematsu, M Komatsu, K Nakayama, T Watanabe, T Soga, H Shima, M Maemondo and N Tanuma. (2018) Pkm1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth. *Cancer Cell* 33, 1-13. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.004. (査読あり)

[学会発表] (計9件)

天津友貴、松尾 尚輝、山本采佳、中寄詩乃、小河穂波、一戸猛志、小柴琢己、渡邊利雄: ウイルス感染に対する Mu11 欠損マウスの応答解析 H30 年度文部科学省新学術領域研究・学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」成果発表会 2019 年 1 月、大津

中寄詩乃、増田成美、早川夏姫、住吉麻実、金保安則、松田達志、渡邊利雄: Arf1 と Arf6 の両方を欠損する MEF 細胞株取得の試み

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年、横浜

大桑良菜、大塚瑞希、住吉麻実、増田成美、小河穂波、木村-吉田千春、松尾勲、渡邊利雄：
マウス Smap1, Smap2 二重欠損胚は原腸形成期において異常を示す

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年、横浜

加藤里佳、小河穂波、岸本綾子、鈴木麻衣、田沼延広、島礼、渡邊利雄：Tie2-Cre により誘
導した組織特異的な Ppp6c の欠損はマウスの胚発生における異常を引き起こす

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月、横浜

天津友貴、松尾 尚輝、山本采佳、中寄詩乃、小河穂波、一戸猛志、小柴琢己、渡邊利雄：
ウイルス感染に対する Mu11 欠損マウスの応答解析

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月、横浜

小谷 唯、住吉 麻実、江口 稚佳子、金保 安則、渡邊 利雄、松田 達志：B 細胞における低
分子量 G タンパク質 Arf 経路の機能解明。Elucidation of the function of the small G protein
Arf family in B cells. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月、横浜

Kazutsune Yamagata, Mariko Saito, Mai Suzuki, Honami Ogo, Toshio Watanabe and Issay
Kitabayashi. AF10 links histone chaperones Supt6h and FACT complex to MLL-fusion leukemia.

第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月、大阪

天津友貴、山本采佳、中寄詩乃、小河穂波、一戸猛志、渡邊利雄、小柴琢己：ウイルス感染
に対する Mu11 欠損マウスの応答解析 先端モデル動物支援 若手技術講習会 2018 年 9 月、蓼
科グランドホテル滝の湯

住吉麻実、渡邊利雄、松田達志：T 細胞特異的 Arf 欠損マウスの解析

第 28 回 Kyoto T cell Conference 2018 年 6 月、京都

[図書] (計 1 件)

Toshio Watanabe and Mami Sumiyoshi. Springer International Publishing AG 2012,
Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition、発行年 2018 年、総ページ 6060
担当部分：ADP-ribosylation factor 1. 412-414.

[その他]

6. 研究組織

研究代表者

渡邊 利雄 (WATANABE, Toshio)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60201208

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。