

令和元年6月18日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08463

研究課題名(和文)膜骨格蛋白MPPファミリー遺伝子欠損マウスの機能形態解析

研究課題名(英文) Morphofunctional analyses of membrane skeletal proteins using MPP family gene mutant mice

研究代表者

寺田 信生 (Terada, Nobuo)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：60293461

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)：膜骨格蛋白4.1G欠損マウスを用い、末梢神経髄鞘にある切痕において4.1Gが接着分子 cell adhesion molecule (CADM) 4、シグナル蛋白 membrane palmitoylated protein(MPP) 6とLin7蛋白を輸送、4.1G欠損で髄鞘形成不全を起こし神経伝導速度低下による運動障害を起こすことを明らかにした。またMPP6欠損マウスを新たに作製し、MPP6欠損でLin7は消失するがCADM4と4.1Gは野生型同様に局在、髄鞘肥厚はあるが形態変化に著変なかった。以上より、4.1G-CADM4 complex MPP6 Lin7の複合体形成様式を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経における4.1G蛋白複合体に新たにシグナル蛋白であるLin7を含み、4.1GがMPP6とCADM4と合わせてその輸送も主導することが明らかとなり、さらに4.1G欠損における形態と生理機能にも異常を認めたことから、4.1Gの複合体蛋白の運搬と局在化による髄鞘形成への制御の役割が示唆された。ヒト末梢神経系にもCADM4や4.1Gが存在していることから、マウスで見出している膜骨格構造の破綻が、ヒトのシャルコー・マリー・トゥース病の原因や病態を解明する一助となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Under 4.1G deficiency, cell adhesion molecule (CADM)4, membrane palmitoylated protein (MPP)6, and Lin7 were disappeared in Schmidt-Lanterman incisures in peripheral nervous system (PNS) myelinated nerve fibers. 4.1G-deficient mouse had impairment of moter activity with decreased nerve conduction velocity. We produced novel MPP6-deficient mice, showing disappearance of Lin7 as well as remaining of 4.1G and CADM4. Thus, process of the 4.1G-CADM4-MPP6-Lin7 molecular complex in PNS was clarified.

研究分野：解剖学

キーワード：末梢神経 膜骨格 髄鞘 蛋白複合体 足場蛋白 接着分子

1. 研究開始当初の背景

I. 「膜骨格」の概念

赤血球が血管との剪断力に対応して弾丸状やヘルメット状に変形して柔軟に血管内を流動するために、赤血球膜直下には「膜骨格」と呼ばれる網目状構造がある。この赤血球「膜骨格」は spectrin - actin がつくる網目が ankyrin やプロテイン 4.1R によって膜内蛋白である band3 (陰イオン交換体) や glycoporphin C (糖蛋白) と結合し、これら構成蛋白の異常によって溶血性貧血の病態が知られることから、膜の安定化機能が考えられていた。

私はこの「膜骨格」が、赤血球のみに特異的な構造ではなく種々の組織や器官にあって、細胞接着やイオンチャネル蛋白と結合する機能に着目してきた。「膜骨格」の構成要素の一つである 4.1R のドメイン構造に着目すると、ezrin-radixin-moesin 接着蛋白の共通配列部(ERM)、spectrin-actin 結合部、カルボキシル末端部の 3 つのドメイン(機能的アミノ酸配列)をもつ 4.1B (brain に多い)、4.1G (general に種々の組織にある)、4.1N (nerve に多い) の 3 つの相同蛋白があってプロテイン 4.1 ファミリーを構成し、種々の組織・臓器に発現局在をしていることを報告してきた。

II. シュミット・ランターマン切痕 (SLI) の構造と構成要素

シュミット・ランターマン切痕 (Schmidt-Lanterman incisures : SLI) は、末梢神経系の有髄神経線維の髄鞘 (ミエリン) 輪間部にある構造で、軸索を巻くシュワン細胞によって作られる。マウス坐骨神経のほぐし標本では、末梢神経線維内にラッパの口のように並んで見える形である。シュワン細胞は自身の薄く引き伸ばした細胞膜を軸索に巻物状に重ねることで末梢神経の髄鞘を作りながら、その途中に細胞質を残した部位を用いて SLI を構成し、細胞質による膨らみもち、隣接する細胞膜が互いに接着している。そして細胞質は軸索の長軸方向に対して垂直ではなく斜めに巻くために、連続してコイルバネ状態となる。これらの結果として、竹の子バネのような伸縮作用をもたらす機能をもつと考えた。

この SLI の細胞膜には、「膜骨格」を構成する蛋白の actin や spectrin の局在、またイオン輸送と同時に細胞間接着をするギャップ結合の構成蛋白 connexin や水チャネル aquaporin-1 も局在していることから、SLI においてイオンや水の移動が盛んに起こると考えられていた。SLI における接着分子に関しては、閉鎖帯 (tight junction) を構成する claudin や occludin、接着帯 (adherens junction) を構成するカルシウム依存性接着蛋白 E-cadherin や免疫グロブリンスーパーファミリーである junctional adhesion molecule (JAM) -C の局在が報告され、これらの接着装置が複合的に構築されていることになる。我々は SLI の構成要素として、「膜骨格」蛋白である 4.1G やシグナル蛋白 membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family である membrane-protein palmitoylated-6 (MPP6)、膜貫通型接着分子 cell-adhesion molecule-4 (CADM4) を見出し、接着装置と「膜骨格」の接点を明らかにしてきた。

III. プロテイン 4.1 と MAGUK ファミリー蛋白

Membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) ファミリー蛋白は、postsynaptic density : シナプス後膜にある蛋白 (PSD) -95 · Drosophila disks large (Dlg) : ショウジョウバエの細胞膜直下にある蛋白 · zonula occludens : タイト結合蛋白 (ZO) -1 に共通する PDZ ドメイン、src-homology : Src 類似蛋白 (SH) -3 ドメイン、guanylate kinase : グアニン酸リン酸化蛋白の類似配列 (GUK) ドメインをもち、細胞の状況に応じて細胞膜と細胞小器官の間を微小管に沿って結合蛋白を輸送させるシグナル伝達としての役割が注目されていた。赤血球では、MAGUK ファミリーの 1 つ MPP1 が 4.1R と共同して spectrin - actin 網目と glycoporphin C の結合強度を増加させている。この MPP ファミリーは、MAGUK ファミリーに特徴的な PDZ、SH3、GUK ドメインに加えて 4.1 ファミリーと結合できる HOOK ドメインと MPP ファミリー同士で結合できる Lin2/7 binding (L27) ドメインをもち、MPP1~7 が同定されていた。我々はマウス末梢神経線維において、MPP6 が 4.1G と結合していること、さらに正常で主に SLI に局在する MPP6 が 4.1G 欠損で消失してシュワン細胞核周囲細胞質に観察されたことから、シュワン細胞では 4.1G が MPP6 を輸送していることを見出した。マウス網膜における 4.1G の微小管との相互作用が明らかとなり、シュワン細胞でも類似の分子機構をもつ可能性もあった。

さらに他の MAGUK ファミリーである Dlg1 や MPP5 は、リン酸化や脱リン酸化酵素である myotubularin related-2 (MTMR2) や phosphatase and tensin homolog (PTEN) への作用や、それに連動するリン脂質 phosphatidyl inositol (PI) の代謝制御によって髄鞘形成に関与することが報告されていた。また MPP5 の接着分子 E-cadherin の輸送制御による、MPP5 欠損マウスにおける髄鞘形成に関連した神経線維の構造変化も報告されていた。上皮細胞で Dlg1 や MPP5 などの MAGUK ファミリー同士の相互作用も知られることから、シュワン細胞における髄鞘形成の各段階での MPP6、MPP5 と Dlg1 の発現や局在のタイミングや、これらの分子結合状態の解明が重要であると思われた。

2. 研究の目的

細胞膜直下にある網目構造で接着分子やチャネル蛋白に結合する「膜骨格」構成蛋白である

プロテイン 4.1G と Membrane Protein Palmitoylated (MPP)に着目して、これらの遺伝子欠損マウスを作製して野生型と比較することによって、細胞が連携しながら秩序だった組織を形成するための膜骨格の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

I. MPP6 遺伝子欠損マウス作製

- 1)ゲノム編集用 mRNA 解析：マウス MPP6 遺伝子 Exon を含む部位の遺伝子を確認。
- 2)ターゲティングベクター構築：MPP6 遺伝子ゲノム編集用ターゲティングベクターを構築。
- 3)受精卵へのベクター導入とマウス作製：作製ベクターをマウス受精卵にインジェクション、MPP6 遺伝子がゲノム編集されたマウスを PCR、DNA シークエンスで確認。
- 4)F1 ヘテロマウス作製：可能性のあるラインを交配後、F1 ヘテロマウス取得。PCR、DNA シークエンスで MPP6 遺伝子変異を確認して絞込。
- 5)交配によるホモマウスを得て、次に示す機能形態学的解析。

II. 4.1G および MPP6 遺伝子欠損マウスの機能形態学的解析

これまで報告した組織・臓器（腸管、精巣、神経系など）に着目し、すでに独自に作製した 4.1G 欠損マウスと、今回新たに作製する MPP6 欠損マウスを用い形態機能変化を解析。

1) 光学および電子顕微鏡による 4.1G および MPP6 欠損マウスにおける組織形態解析

マウス心臓よりアルデヒド還元固定、臓器を摘出。オスミウム、脱水、樹脂包埋。透過型電子顕微鏡観察。一部の試料は、免疫染色のために固定後、蔗糖に入れ、クライオスタットで切片を作製。免疫染色のためには、MPP6 などの膜骨格蛋白、既知の接着装置に関与する蛋白（閉鎖結合：occludin, ZO-1；密着結合：カドヘリン、カテニン；膜内貫通蛋白：CADM, NCAM など）に対する抗体を組み合わせて多重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察。一部の試料は液体窒素冷却したメタルコンタクト法もしくはイソペンタン・プロパン液性寒剤により、試料を急速凍結。凍結置換固定 - エポキシ樹脂包埋。超薄切片作製し、透過型電子顕微鏡で観察。

2)4.1G および MPP6 欠損マウスにおける生理学的機能変化の検討

神経伝導速度や、懸垂試験などの生理機能を欠損マウスと野生型マウスで比較。

3)複合体蛋白の検索

結合蛋白について、抗体による免疫沈降法、蛋白の cDNA から作製した GST 融合蛋白の Pull-down 法を用いて最適な反応条件設定を行い、質量分析法によって蛋白同定。この際、作製した 4.1B、4.1G および MPP6 遺伝子欠損マウス試料間で比較。

4. 研究成果

I. 凍結技法を用いた末梢神経伸縮に伴う SLI 形態の解析、高圧凍結技法の形態解析への応用

SLI がコイルバネ状構造を含む竹の子バネの役割をする可能性を前述したが、実際の生きた状態における伸縮性を確認するために、標的部位を凍結によってできるだけ速く生きた状態を止めることによって生体で起こるダイナミックな変化を組織切片として可視化できる生体内凍結技法で解析した。麻酔したマウス坐骨神経を露出して後趾を牽引して伸展させながらイソペンタン・プロパン液性寒剤（-193 度）を直接かけて生体内凍結を行うと、神経線維は、非伸展状態では円筒状であるが、外力を加えた伸展状態では数珠状形態に変化した。この際に SLI は数珠状の細い部位や太い部位への移行部に位置して円錐台の高さを増加させることが明らかとなり、SLI が外力に抗する緩衝機能を担っていることが示唆された。このことから、関節の屈伸運動をする際に起こる末梢神経線維の伸縮による傷害の防止装置の一つが SLI であると考えている。

さらに凍結技法に関連して、麻酔した小動物 *Drosophila* をそのまま高圧凍結することで、秒単位で変化する網膜の超微細構造変化について電子顕微鏡を用いて観察できることも報告した。

II. プロテイン 4.1G 欠損における末梢神経髄鞘形態と機能の変化

加齢によって 4.1G 欠損マウスの SLI が接着蛋白 E-cadherin の局在は保持されているが円錐台の高さが低くなっていくことから、4.1G - MPP6 - CADM4 膜骨格蛋白複合体が SLI 構造を保持する要素であることを示していた。さらに細胞間結合の活性制御に関わる Src・Fyn といった癌関連蛋白である Src kinase ファミリーが SLI に局在しているが、Src は正常状態では細胞増殖シグナルの指標となるチロシン (Y) 416 のリン酸化は弱い状態にある。このことは、4.1G - MPP6 - CADM4 膜骨格蛋白複合体が Src のリン酸化と関連して細胞内シグナル伝達に関わること

を示唆していた。

今回我々は作製した 4.1G 欠損マウスの末梢神経において、加齢に伴って機能障害が起こっていることを明らかにした。4.1G 欠損と野生型マウスにおける髄鞘の形態の検討では、ランビエ絞輪筋にある傍絞輪部について Contactin-associated protein (Caspr) の免疫染色を指標として光顕観察すると 4.1G 欠損の傍絞輪部は絞輪部を挟んで Caspr の非対称性染色パターンが多く、その部位の超微形態を透過型電顕で観察すると軸索とシュワン細胞の接着部位の一部解離を認めた。さらに髄鞘輪間部の電顕観察では、髄鞘の二重輪や局所の肥厚や突出を認め、G-ratio (神経線維と軸索の直径の比) を統計学的に解析すると、4.1G 欠損においては過剰な髄鞘形成状態となっていることを見出した。

生理機能検査として懸垂試験を行うと、4.1G 欠損マウスは 6 ヶ月近くの月齢に加齢するにつれて体幹方向に前後肢を握る姿勢を示すものが多く、さらに連日の懸垂負荷によってその頻度と時間が増加した。また、坐骨神経の電気刺激によって下肢筋肉収縮への反応時間を測定した運動神経伝導速度は、4.1G 欠損で有意に低下していた。

この解析過程で、SLI におけるさらなる複合体蛋白として、接着分子から細胞内へのシグナル伝達の役割が考えられている Lin7 (Veli) ファミリーも新たに見出した。マウス坐骨神経を用いた局在解析には抗 Lin7 抗体による免疫染色で Lin7 は 4.1G と同様のパターンで SLI に局在し、4.1G 欠損神経線維では消失した。Lin7 は Western blot で蛋白量が 4.1G 欠損で激減し、免疫沈降法により MPP6 と Lin7 の結合性が確認できた。

以上から、末梢神経における 4.1G 蛋白複合体に新たにシグナル蛋白である Lin7 を含み、4.1G が MPP6 と CADM4 と合わせてその輸送も主導することが明らかとなり、さらに 4.1G 欠損における形態と生理機能にも異常を認めたことから、4.1G の複合体蛋白の運搬と局在化による髄鞘形成への制御の役割が示唆された。

ヒト末梢神経系にも CADM4 や 4.1G が存在していることから、マウスで見出している膜骨格構造の破綻が、ヒトのシャルコー・マリー・トゥース病の原因や病態を解明する一助となることが示唆された。

III. MPP6 欠損における末梢神経における髄鞘形態と複合体蛋白の変化、MPP6 の組織局在

今回、新たに MPP6 遺伝子の 2 つの部分を変化したマウスを作製した。1 つは MPP6 蛋白 L27N ドメイン欠損、2 つめは中央部 PDZ ドメインを変化したことによる MPP6 蛋白欠損マウスである。これらは、4 種類の特異抗体によって蛋白レベルまで変化したことを解析し、さらに形態解析を行った。

この MPP6 欠損マウスの末梢神経において、超微形態を透過型電顕で観察すると G-ratio (神経線維と軸索の直径の比) を統計学的に解析すると、過剰な髄鞘形成状態となっていることを見出した。ただし、4.1G 欠損で認めた髄鞘の二重輪や局所の肥厚や突出は著明でなく、複合体蛋白は Lin7 の消失は認められたが 4.1G と CADM4 の局在は野生型と比べて変化がなかった。

さらに MPP6 蛋白に関連して、腸管上皮細胞での発現と局在を見出し、シグナル蛋白 CASK と複合体を形成していることも発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件) (PI: principal investigator)

1. Terada H, Saitoh Y, Kametani K, Sakaguchi M, Sakamoto T, Kamiyo A, Terada N (PI). Electron microscopic observation of photoreceptor cells in directly inserted anesthetized Drosophila into a high-pressure freezing unit. *Microsc Res Tech*. 2019 82:244-249. doi: 10.1002/jemt.23166. 査読有
2. Saitoh Y, Kamiyo A, Yamauchi J, Sakamoto T, Terada N (PI). The membrane palmitoylated protein, MPP6, is involved in myelin formation in the mouse peripheral nervous system. *Histochem Cell Biol*. 2019 151:385-394. doi: 10.1007/s00418-018-1745-y. 査読有
3. Saitoh S, Ohno N, Saitoh Y, Terada N, Shimo S, Aida K, Fujii H, Kobayashi T, Ohno S. Improved serial sectioning techniques for correlative light-electron microscopy. Mapping of human Langerhans islets. *Acta Histochem Cytochem*. 2018 51:9-20. doi: 10.1267/ahc.17020. 査読有
4. Saitoh Y, Ohno N, Yamauchi J, Sakamoto T, Terada N (PI). Deficiency of a membrane skeletal protein, 4.1G, results in myelin abnormalities in the peripheral nervous system. *Histochem Cell Biol*. 2017 148:597-606. doi: 10.1007/s00418-017-1600-6. 査読有
5. Ohno S, Saitoh Y, Ohno N, Terada N (PI). Renaissance of morphological studies: the

examination of functional structures in living animal organs using the in vivo cryotechnique. *Anat Sci Int.* 2017 92:55-78. 査読有

6. Terada N (PI), Saitoh Y, Kamijo A, Ohno S, Ohno N. Involvement of membrane skeletal molecules in the Schmidt-Lanterman incisure in Schwann cells. *Med Mol Morphol.* 2016 49:5-10. doi: 10.1007/s00795-015-0125-0. 査読有
7. Kamijo A, Saitoh Y, Ohno N, Ohno S, Terada N (PI). Immunohistochemical study of the membrane skeletal protein, membrane protein palmitoylated 6 (MPP6), in the mouse small intestine. *Histochem Cell Biol.* 2016 145:81-92. doi: 10.1007/s00418-015-1374-7. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 齊藤百合花, 寺田信生: シグナル蛋白 membrane protein palmitoylated-6 のマウス末梢神経における役割の検討. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 東京, 2018, 3 月.
2. 寺田仁美, 齊藤百合花, 亀谷清和, 坂口雅彦, 寺田信生: 高圧凍結技法による生きた状態を反映した *Drosophila* 視細胞の電子顕微鏡観察. 第 74 回日本顕微鏡学会学術講演会, 久留米, 2018, 5 月.
3. 齊藤百合花, 寺田信生: マウス末梢神経における膜骨格 4.1G 結合シグナル蛋白機能の検討. 第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 宮崎, 2018, 9 月.
4. 齊藤百合花, 鄭裕花, 寺田信生, 坂本毅治: マウス正常組織における munc-18 interacting protein3(Mint3)局在の検討. 第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 宮崎, 2018, 9 月.
5. 上條明生, 齊藤百合花, 寺田信生: マウス精細管における膜骨格蛋白 4.1G-MPP6 に対するシグナル蛋白 Lin7 ファミリーの局在と関連性の検討. 第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 宮崎, 2018, 9 月.
6. 齊藤百合花, 寺田信生: マウス末梢神経における膜骨格 4.1G 結合シグナル蛋白機能の検討. 第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 宮崎, 2018, 9 月.
7. 寺田信生, 齊藤百合花, 上條明生: 膜骨格蛋白 membrane protein palmitoylated-6(MPP6) 欠損マウス末梢神経系の検討. 第 78 回日本解剖学会中部支部学術集会, 富山 2018, 10 月.
8. Terada N, Saitoh Y, Ohno N, Yamauchi J, Sakamoto T.: Function of a membrane skeletal protein, 4.1G, in myelin formation in the peripheral nervous system. The 12th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry, Zhangjiakou, Hebei, China, August, 2017.
9. 寺田信生, 齊藤百合花: 膜骨格蛋白 4.1G によるシグナル蛋白 Lin7 へのマウス末梢神経における役割. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 岐阜, 2017, 9 月.
10. 齊藤百合花, 寺田信生: マウス末梢神経における膜骨格蛋白複合体 4.1G-CADM4-MPP6-Lin7 の役割の検討. 第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 愛媛, 2017, 9 月.
11. 齊藤百合花, 寺田信生: 新規シグナル蛋白を含む膜骨格 4.1 蛋白複合体のマウス末梢神経における役割検討. 第 112 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎, 2017, 3 月.
12. Terada N, Saitoh Y, Ohno N.: Membrane skeletal protein complex, 4.1G-MPP6-Src-CADM4, in peripheral nerve Schwann cells. (Symposium) in Newly-occurring knowledge of molecular mechanism concerning polarity formation of myelinating nerve. 第 39 回日本神経科学大会, 横浜, 2016, 7 月.
13. 齊藤百合花, 寺田信生: 膜骨格蛋白 4.1G 欠損マウスの末梢神経における機能と形態変化の検討. 日本解剖学会 第 76 回中部支部学術集会, 松本, 2016, 10 月.
14. 齊藤百合花, 大野伸彦, 山内淳司, 寺田信生: 膜骨格蛋白 4.1G 欠損による末梢神経における機能と形態の検討. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 三鷹, 2016, 9 月.

〔図書〕(計3件)

1. 寺田信生 (編集): 生物の電子顕微鏡試料作製法を理解しよう = クライオから 3 次元コンピュータグラフィックスまで = . 第 29 回 電顕サマースクール 2018 in 信州 (日本顕微鏡学会主催) テキスト . 2018. 総 205 ページ.
2. 齊藤百合花, 大野伸彦, 山内淳司, 寺田信生: シュミット・ランターマン切痕の膜骨格蛋白による構造と機能への役割 (総説) 「特集 ; 末梢ミエリンの機能形態とその異常」 *Peripheral Nerve*, 28:2-7, 2017.
3. Ohno S, Ohno N, Terada N (Editors) : In vivo cryotechnique in biomedical research and application for bioimaging of living animal organs. Springer BOOK 2016. 総 300 ページ.