

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07378

研究課題名(和文) エンドソーム系システムの破綻による細胞死の分子生理学的研究

研究課題名(英文) Molecular physiological study of impairment in endosome system

研究代表者

安藤 恵子 (ANDO, KEIKO)

東北大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：40221741

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)：本研究では重症先天性好中球減少症の原因遺伝子の一つであるvps45に着目して線虫の分子遺伝学的、分子生理学的研究を行った。vps45の機能発現に関わる新たな分子を探索するため、線虫vps45変異体のサプレッサー変異のスクリーニングを行い、複数のサプレッサー変異アリルの分離に成功した。重症先天性好中球減少症の患者で同定されたヒトvps45変異を持つトランスジェニック動物を開発した。アポトーシス細胞のカルシウム動態および神経機能異常の解析を行うため、独自の生体カルシウムイメージングシステムを構築した。今後vps45の機能と分子病態の解明を目指し、開発した疾患動物モデル等を応用していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

vps45はエンドソームを介した小胞輸送に働く膜融合制御因子の一つであるが、近年、パーキンソン病などの神経変性疾患においてもエンドソーム輸送の関連遺伝子の変異が多数報告されている。本研究で開発された新規疾患動物モデルは、エンドソーム機能異常を起因とした細胞死の分子メカニズム解明や、神経変性疾患や免疫疾患の創薬を目的とした生体レベルでの薬効評価において優れたツールになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on vps45 gene, which is one of the causative genes identified in severe congenital neutropenia (SCN). As an model animal, we used the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) and conducted molecular genetic and molecular physiological studies of vps45. (1) To identify novel genes involved in vps45, we conducted genetic screenings for suppressor mutations of a vps45 mutant and obtained multiple suppressor mutant alleles. (2) We have developed a transgenic animal harbouring human vps45 mutations in severe congenital neutropenia. (3) We developed a calcium imaging system to analyze calcium dynamics in apoptotic cells and neural activity in the SCN disease model.

研究分野：分子生物学

キーワード：線虫 細胞死 重症先天性好中球減少症

1. 研究開始当初の背景

重症先天性好中球減少症 (severe congenital neutropenia: SCN) は慢性好中球減少症、反復性細菌感染症を臨床的特徴とする希少疾患である。原因遺伝子として SCN1(HAX1)、SCN2(ELA2)、SCN3(Gfi1)、SCN4(WASP)が知られているが、原因遺伝子が不明な症例も多く、発症機構の解明と有効な治療法開発が望まれている。最近、新たに SCN5 の原因遺伝子としてエンドソーム関連遺伝子 vps45 が報告されている。SCN5 の変異の症例では好中球の過剰なアポトーシス (細胞死) が報告されているが、vps45 の異常がどのように好中球の細胞死を引き起こすのかよくわかっていない。

2. 研究の目的

膜融合制御因子 Sec1/Munc18 (SM) は酵母からヒトに至るまで進化的に保存されたタンパク質ファミリーで、VPS45 を含む 4 ~ 7 個のアイソフォームから構成されている。我々はこれまで線虫をモデルに SM ファミリーの分子遺伝学的解析を行い、線虫 vps45 がエンドソームを介した小胞輸送とエンドサイトーシスに重要な役割を持つことを明らかにしてきた (Gengyo-Ando et al. *EMBO Rep* 2007; Gengyo-Ando et al., *Traffic* 2016)。興味深いことに、線虫 vps45 変異体において小胞輸送障害に加えて過剰なアポトーシスが認められることを見出した。この結果は vps45 変異によるエンドソーム異常が細胞死を引き起こす可能性を示すものであり、線虫モデルが SCN の分子病態メカニズムの解析に有用なツールとなり得ると考えられる。

そこで本研究は SCN の分子病態メカニズムの解明を目指して、ヒト vps45 変異を導入した疾患モデル動物を開発するとともに、vps45 の新規な機能的関連遺伝子を同定することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

遺伝学的解析：vps45 変異体を変異原 EMS で処理し、F2 世代で表現型が回復した個体のスクリーニングを行い、サプレッサー変異を分離した。サプレッサー変異を vps45 変異体と数回バッククロスした後、次世代シーケンス解析および SNP 解析を行った。

疾患モデル動物の作成：SCN5 の vps45 変異をヒト vps45 cDNA に導入し、線虫 vps45 の遺伝子発現制御配列を連結して発現コンストラクトを作成した。線虫生殖細胞へのマイクロイ

ンジェクションによりトランスジェニック動物を作成し、vps45 ヌル変異体との交配により疾患モデル動物を樹立した。

細胞生理学的解析 : G-CaMP を発現するトランスジェニック体を作成し、ICaST システムを用いて細胞内カルシウム動態を可視化した。

4 . 研究の成果

(1) 変異型ヒト vps45 を持つ線虫トランスジェニック系統を樹立することに成功した。同様にコントロールとして正常ヒト vps45 を発現するトランスジェニック系統を樹立した。これらのヒト化線虫疾患モデルの解析から、興味深い知見が得られつつあり、今後詳細な表現型解析を進めていく。

(2) vps45 は小胞輸送の主要因子である SNARE ・ Rab エフェクターと結合し、膜のドッキングと融合過程を制御することが知られている。vps45 の機能発現に関与する新規分子を探索するため、vps45 変異体の表現型を回復するサプレッサー変異のスクリーニングを行い、複数のサプレッサー変異を分離することに成功した。これらのサプレッサー変異体の表現型を解析し、特にサプレッサー効果の高い変異を同定し詳細な遺伝学的解析を進めた。

(3) SCN は慢性的な好中球の減少を特徴とするが、精神運動発達遅滞やてんかんなどの神経学的異常を合併する症例も報告されている。そこで神経系の機能異常を解析するため、行動中の個体におけるカルシウム動態を可視化するイメージングシステム ICaST を開発し、線虫神経系のカルシウム動態を時空間的に高解像度で可視化することに成功した。また、アポトーシス細胞におけるカルシウム動態を時空間的に高解像度で可視化するため、イメージング系の最適化を進めた。今後これらのイメージング技術を疾患動物モデルの解析に応用していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Motegi Yuki, Sato Masaaki, Horiguchi Kazuhide, Ohkura Masamichi, Gengyo-Ando Keiko, Ikegaya Yuji, Fusamae Yasuyuki, Hongo Yoshie, Suzuki Minoru, Ogawa Koichi, Takaki Miyako, Nakai Junichi	4. 巻 151
2. 論文標題 Confocal and multiphoton calcium imaging of the enteric nervous system in anesthetized mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 53～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanaki Nanako, Matsuda Ayako, Dejima Katsufumi, Murata Daisuke, Nomura Kazuko H, Ohkura Takashi, Gengyo-Ando Keiko, Yoshina Sawako, Mitani Shohei, Nomura Kazuya	4. 巻 29
2. 論文標題 UDP-N-acetylglucosamine-dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminophosphotransferase is indispensable for oogenesis, oocyte-to-embryo transition, and larval development of the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 163～178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwy104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kagawa-Nagamura Yuko, Gengyo-Ando Keiko, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Role of tyramine in calcium dynamics of GABAergic neurons and escape behavior in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-018-0103-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akama Kagari, Ebata Kanami, Maeno Akiteru, Taminato Tomohito, Otosaka Shiori, Gengyo Ando Keiko, Nakai Junichi, Yamasu Kyo, Kawamura Akinori	4. 巻 236
2. 論文標題 Role of somite patterning in the formation of Weberian apparatus and pleural rib in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anatomy	6. 最初と最後の頁 622～629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joa.13135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sato Masaaki, Motegi Yuki, Yagi Shogo, Gengyo-ando Keiko, Ohkura Masamichi, Nakai Junichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Optics Express	6. 最初と最後の頁 4049 ~ 4049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/BOE.8.004049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanimoto Yuki, Yamazoe-Umemoto Akiko, Fujita Kosuke, Kawazoe Yuya, Miyanishi Yosuke, Yamazaki Shuhei J, Fei Xianfeng, Busch Karl Emanuel, Gengyo-Ando Keiko, Nakai Junichi, Iino Yuichi, Iwasaki Yuishi, Hashimoto Koichi, Kimura Koutarou D	4. 巻 6
2. 論文標題 Calcium dynamics regulating the timing of decision-making in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.21629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安藤恵子
2. 発表標題 自由運動下の線虫神経活動の可視化と解析：チラミンによる運動神経の制御
3. 学会等名 線虫研究の未来を創る会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茂木優貴, 佐藤正晃, 堀口和秀, 大倉正道, 安藤恵子, 池谷裕二, 房前裕順, 本郷良泳, 鈴木稔, 小川公一, 高木都, 中井淳一
2. 発表標題 G-CaMP6トランスジェニックマウスを用いたin vivoカルシウムイメージングによる腸管神経系の機能解析
3. 学会等名 生理学研究所研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茂木優貴, 佐藤正晃, 堀口和秀, 大倉正道, 安藤恵子, 池谷裕二, 房前裕順, 本郷良泳, 鈴木稔, 小川公一, 高木都, 中井淳一
2. 発表標題 G-CaMP6トランスジェニックマウスを用いた生体カルシウムイメージングによる腸管神経系の機能解析
3. 学会等名 筋生理の集い
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茂木優貴, 佐藤正晃, 堀口和秀, 大倉正道, 安藤恵子, 池谷裕二, 房前裕順, 本郷良泳, 鈴木稔, 小川公一, 高木都, 中井淳一
2. 発表標題 G-CaMP6トランスジェニックマウスを用いた生体腸イメージング実験法
3. 学会等名 生理学東京談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井淳一, 大倉正道, 橋本浩一, 安藤恵子
2. 発表標題 線虫自動追尾装置による神経活動の可視化
3. 学会等名 心血管膜輸送研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中井淳一, 安藤恵子, 佐藤正晃, 大倉正道
2. 発表標題 カルシウムプローブG-CaMP1によるin vivo細胞機能イメージング
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学学術大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤恵子
2. 発表標題 G-CaMPによるin vivoカルシウムイメージング
3. 学会等名 Cell Biology合同セミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井淳一, 安藤恵子
2. 発表標題 G-CaMPによるin vivoカルシウムイメージング
3. 学会等名 京都府立医科大学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井淳一, 佐藤正晃, 大倉正道, 安藤恵子
2. 発表標題 GRINレンズと可変焦点レンズを用いたin vivo深部カルシウムイメージング
3. 学会等名 日本薬理学会第71回北部会 テクニカルセミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安藤恵子 (総編集者 末光隆志)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 772
3. 書名 動物の事典 (第7章7.1.4 線虫の発生)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
連携研究者	中井 淳一 (Nakai Junichi) (80237198)	東北大学・歯学研究科・教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関