

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590366

研究課題名(和文) Rap2 ノックアウトマウスの表現型解析：病態との関連と分子基盤の解明にむけて

研究課題名(英文) Phenotypic analysis of Rap2 knockout mice

研究代表者

苅谷 研一 (Kariya, Ken-ichi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40263371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：癌遺伝子産物Rasの類縁分子である低分子量GTP結合蛋白質Rap2の固有のシグナル機能は不明であったが、私共はその最初の例としてRap2がJNKの上流MAP4K(NIK、TNIK、MINK)を活性化することを見出した(Rap2-MAP4K系)。本研究では、Rap2-MAP4K系の個体レベルでの機能解明のため、世界に先駆けて作成したRap2ノックアウトマウスを解析した。マウスは胎生致死ではなかったが、Rap2-MAP4K系による神経シナプスの制御から予想される通り、個体間相互作用、母子相互作用、恐怖関連行動等に異常を示した他、不妊、ある種のTリンパ球の分化異常等を示した。

研究成果の概要(英文)：Rap2 is a Ras-like small G protein. We found that it regulates mitogen-activated kinase kinase kinase kinases (MAP4Ks) upstream of JNK (Rap2-MAP4K system). The Rap2-regulated kinases include Nck-interacting kinase (NIK/HGK), Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK), and Misshapen/NIKs-related kinase (MINK). The system affects synaptic structure/function of neurons. We have investigated in vivo functions of Rap2 by generating knockout mice. Knockout mice were not embryonic lethal, did not show major deformity, but some were sterile. The null mutation slightly shortened natural life span but did not appear tumorigenic. As expected from interaction of TNIK with a psychiatric disease protein DISC1, knockout mice showed various behavioral abnormalities, especially in interaction with other mice. Their hematopoietic system was generally normal but defective in some T cell subpopulations.

研究分野：生化学

キーワード：Rap2 ノックアウトマウス 表現型

1. 研究開始当初の背景

(1) Rap2 のシグナル機能

Rap2 のシグナル機能は不明であったが、申請者は Rap2 が JNK の上流 MAP4K (HGK, TNIK, MINK) を活性化することを発見した (Rap2-MAP4K 系) [文献 1-3]。この系は海馬神経細胞でも追試され [Neuron 46, 905-16, 2005]、Rap2 のシグナル機能として最初に認知された [Curr Opin Cell Biol 17, 123-8, 2005]。申請者はさらに Rap2 がリサイクリングエンドソームで機能すること [文献 4]、また共同研究で、Rap2A、TNIK がそれぞれ Nedd4-1 ユビキチンリガーゼ、DISC1 蛋白により不活性化されることも見いだした [文献 5, 6]。

一方、Rap2-MAP4K 系による non-canonical Wnt 経路 (planar cell polarity, PCP 経路) の制御や MAP4K による canonical Wnt 経路 (β カタニン/TCF 経路) の制御も示された [EMBO J 26, 3592-606, 2007; Cancer Res 79, 5024-33, 2010]。また、Rap2B による PLC ϵ の活性化も示されたが [MCB 24, 4664-76, 2004]、PLC ϵ /PLC210/p1c-1 はもともと申請者らが線虫から発見した新規 PLC 種である [文献 7-10]。

(2) Rap2 KO マウスの作成

個体での Rap2 機能は、活性化型 Rap2A の脳特異的トランスジェニック (TG) マウスの空間学習障害と恐怖記憶消去障害以外に報告が無かった [J Neurosci 28, 8178-88, 2008]。そこで、Rap2 の KO マウスを作成した。組織特異的 KO 用に Cre-loxP 法を採ったが、Rap2 KO マウスは CAG-Cre による非特異的 KO でも胎生致死とならず、行動異常、T 細胞機能異常などの表現型を C57BL/6 背景で示した。

2. 研究の目的

(1) 行動異常の検証

Rap2 KO マウスは処置のために捕捉されることを忌避しなかった。上記の活性化型 Rap2A TG マウスと逆の、恐怖記憶の消去促進と考えた。実際、同 TG マウスと逆に海馬神経細胞の過剰な樹状突起も見られ (図 1)、神経系の細胞・分子レベルの構造・機能異常を反映した多彩な行動異常が予想されるため、その全体像を明らかにすることを目指した。行動異常については、Rap2-MAP4K 系と精神疾患の関係が注視されており、申請者らが発見した Rap2 制御分子 RAPGEF6/PDZ-GEF2/RAPGEF2 [文献 11] をはじめ Rap2 結合分子 RPIP8、TNIK、DISC1 蛋白と統合失調症との関係が指摘されていた [Nat Genet 40, 880-5, 2008; Mol Brain Res 139, 317-32, 2005; Wang et al. Mol Psychiatry 2010 中の引用文献]。

(2) 正常な白血球分化と T 細胞サイトカイン過剰分泌の検証

リンパ節 T 細胞を CD3/CD28 抗体で刺激 (T 細胞受容体刺激と CD28 副刺激の代用) すると、KO 細胞は明らかに過剰なサイトカイン分泌を示した (図 2)。この原因を解明する。

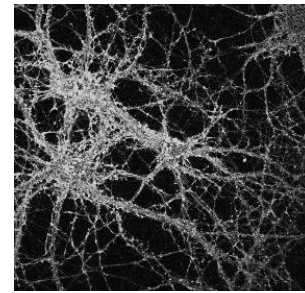


図 1. Rap2 KO マウスの初代培養海馬神経細胞

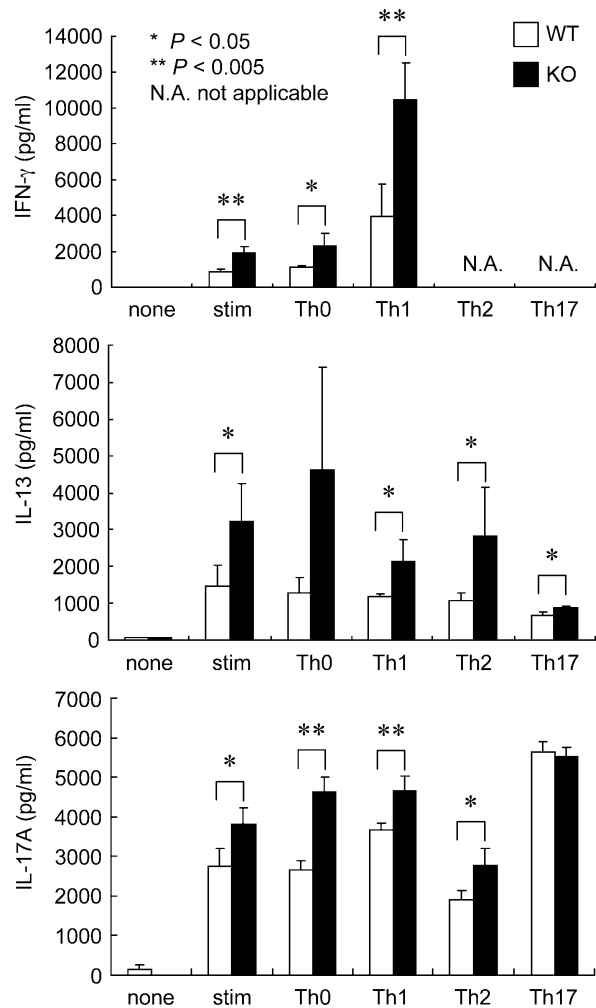


図 2. 各サブセットサイトカイン過剰分泌 (Th1, IFN- γ ; Th2, IL-13; Th17, IL-17A)

3. 研究の方法

(1) 行動異常の検証

代表者が現有しているオペレータ無しで全自動行動解析可能な装置 IntelliCage™ を使用する。分担者丸山 (沖縄科学技術大学院大学 OIST) の設備も利用する。

(2) T 細胞サイトカイン過剰分泌の検証

KO、WT の末梢血、脾臓、リンパ節、胸腺の白血球を、以下のマーカーと flow cytometry (FCM 法) で比較したが差は無かった: CD3, T 細胞; CD19, B 細胞; NK1.1, NK 細胞;

T 細胞受容体 $\alpha\beta$, $\alpha\beta$ T 細胞; 同 $\gamma\delta$, $\gamma\delta$ T 細胞; CD4, ヘルパー-T 細胞 (Th 細胞); CD8, キラー-T 細胞; Gr1, 好中球; CD11b, 食細胞。また、胸腺での成熟過程 (CD4- CD8- \rightarrow CD4+ CD8+ \rightarrow CD4+CD8- 又は CD4- CD8+) の細胞の割合および NKT 細胞の割合に差は無かった。脾臓 T 細胞では、CD3/CD28 抗体刺激による増殖に差が無かった。これらの結果を再確認すると共に、各種条件で Th 細胞を刺激しサイトカイン過剰分泌を検証する。

4. 研究成果

(1) 行動異常の検証

Rap2 KO マウスは強い攻撃性を示し、図 3 のように、Rap2 KO マウスと WT マウスを同じオープンフィールド解析用ケージに入れると、KO マウス (写真上のマウス。尻尾の根元に黒い目印「↓」を付けている) は新環境よりも WT マウスに興味を抱き、追尾して匂いを嗅ぎ、襲って怪我を負わせ、最終的には死に至らしめた。しかし、IntelliCage™での検討では、空間記憶・タスクルール変更に対する行動可塑性等に異常を認めない。

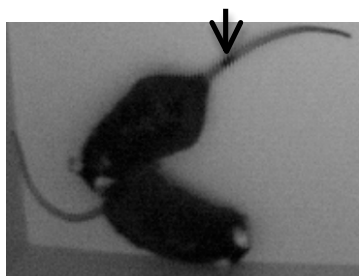


図 3. Rap2B KO マウスの攻撃性

一方、IntelliCage™で圧搾空気による恐怖体験が Rap2 KO マウスで失われる結果を得た。図 4 は、飲水中の恐怖体験後、同じ飲水場所に戻るまでの時間を 5 時間まで観測したもので、WT では 2-4 時間半の間戻ることが出来ないマウスが居るのに対し、KO マウスは全て 30 分以内に復帰している。

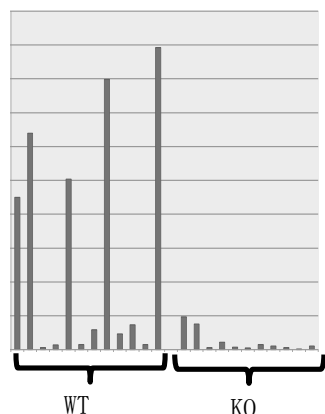


図 4. Rap2 KO マウスの恐怖体験喪失

また、図 5 のように、Rap2 KO マウスは育児放棄傾向を示した。WT マウスは育児のため

の巣を作って仔を集め、背を丸めて (クラウチング) 母乳を与えるが、KO マウスは巣を作らず、仔を集めることもしない (写真に放置された仔に黒い目印「↓」を付けて示す)。しかし、妊娠マウスの飼育環境に特別に配慮してコントロールした結果、この現象が一定程度正常化可能であることも判明した。

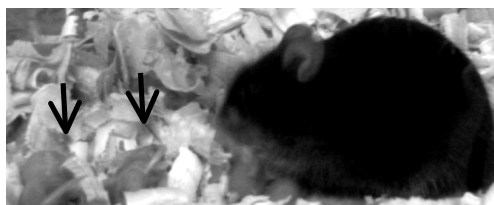


図 5. Rap2 KO マウスの育児放棄

(2) 正常な白血球分化と T 細胞サイトカイン過剰分泌の検証

白血球分化に異常はなかったが、T 細胞サイトカイン分泌については最終的な評価は逆となった。

当初は、制御性 T 細胞に無関係かつ T 細胞受容体活性化誘導性細胞死に関係すると考えられる Th17 以外のサブセットサイトカインの過剰分泌が見られた (図 2)。しかし、細胞死を出来るだけ抑制し活性化誘導性増殖が続くよう実験条件を設定した場合、むしろノックアウトマウスでの Th2 サイトカイン (IL-4, 5, 13) の分泌低下が見られた (図 6)。そこで、CD4+ T 細胞の個々のサブポピュレーションについて調べたところ、原因となる異常は effector memory 細胞群にあることが判明した。

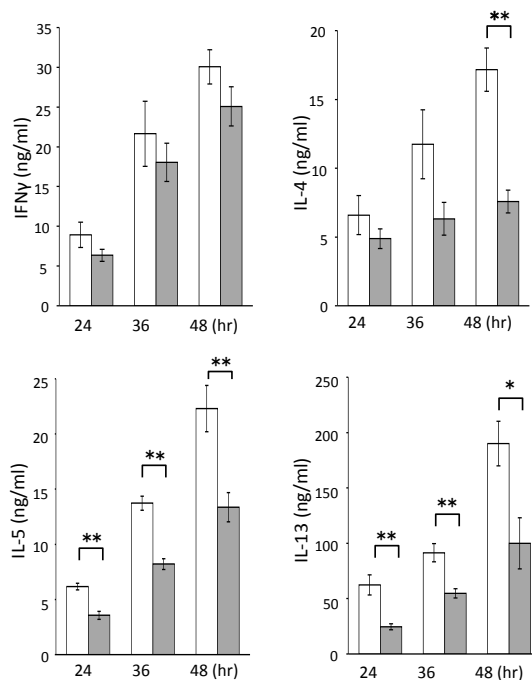


図 6. Rap2 KO マウス Th2 サイトカイン (IL-4, 5, 13) の分泌低下

<引用文献>

- ① Machida N, et al., Mitogen- activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase, *JBC* 279, 15711-15714, 2004
- ② Taira K, et al., The Traf2- and Nck- interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton, *JBC* 279, 49488-49496, 2004
- ③ Nonaka H, et al., MINK is a Rap2 effector for phosphorylation of the postsynaptic scaffold protein TANC1, *BBRC* 77, 573-578, 2008
- ④ Uechi Y, et al., Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization, *BBRC* 378, 732-737, 2009
- ⑤ Kawabe H, et al., Regulation of Rap2A by the ubiquitin ligase Nedd4-1 controls neurite development, *Neuron* 65, 358-372, 2010
- ⑥ Wang Q, et al., The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNIK interact to regulate synapse composition and function, *Mol Psychiatry* 16, 1006-1023, 2010
- ⑦ Shibatohe M, Kariya K et al., Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras, *JBC* 273, 6218-6222, 1998
- ⑧ Song C, et al., Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras, *JBC* 276, 2752-2757, 2001
- ⑨ Kariya K, et al. Phospholipase C ϵ regulates ovulation in *Caenorhabditis elegans* *Dev Biol* 274, 201-10, 2004
- ⑩ Hiatt SM, et al. *Caenorhabditis elegans* FOS-1 and JUN-1 regulate plc-1 expression in the spermatheca to control ovulation, *MBC* 2009
- ⑪ Gao X et al. Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras, *JBC* 276, 42219-25, 2001

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1件)

- ① Enkhbaatar Ulziikhishig, Maitsetseg Bayarjargal, Kimiko Nonaka, Minoru Oshiro and Ken-ichi Kariya. Phenotypic changes in a squamous cell carcinoma cell line induced by an effector kinase of a small G protein Rap2, *Ryukyu Medical Journal*, 査読有, Vol. 32, No. 3, 4, 2013, pp. 89-94.

[学会発表] (計1件)

- ① Kimiko Takei, Yoshito Yamashiro, Masato Umikawa, Tsuyoshi Asato, Minoru Oshiro, Yukiko Uechi, Kiyohito Taira, Ken-ichi Kariya and Hiroshi Uezato. A search for candidate genes involved in invasion and metastasis of cutaneous squamous cell carcinoma, 日本研究皮膚科学会 第36回年次学術大会・総会. (2011.12.9-11). 国立京都国際会館 (京都府、京都市)

[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：
出願年月日：
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

荻谷 研一 (KARIYA, Ken-ichi)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40263371

(2) 研究分担者

丸山 一郎 (MARUYAMA, Ichiro)
沖縄科学技術大学院大学・情報処理ユニット・教授
研究者番号：70426568

吉見 直己 (YOSHIMI, Naoki)
琉球大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30166996

(3) 連携研究者

松崎 吾朗 (MATSUZAKI, Goro)
琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30229455

掛山 正心 (KAKEYAMA, Masaki)
東京大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：30353535