

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590341

研究課題名(和文)細胞内膜輸送関連因子による神経分化と機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of physiological roles of membrane trafficking in neural function

研究代表者

原 太一(Hara, Taichi)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00392374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量Gタンパク質Rab35は細胞内膜輸送や神経機能制御に関わると考えられているが、哺乳動物におけるRab35の生理的役割は明らかになっていない。本研究では、Rab35遺伝子欠損マウスを作成し、その表現型を解析した。Rab35遺伝子欠損マウスは胎生致死となり、Rab35がマウス初期胚発生に必須の役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Small GTPase Rab35 has been suggested to be involved in intracellular membrane trafficking and neural function, although its physiological roles in mammal remained to be elucidated. In this study, we generated Rab35 deficient mice and analyzed the phenotype. We found that Rab35 deficient mice were embryonic lethal, indicating that Rab35 has an essential role in mouse early development.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rab35 神経細胞 初期発生 低分子量Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

小胞輸送機構は膜小胞による特異的分子の選択的輸送システムであり、細胞の基本的機能調節において必須の役割を果たしている。申請者の所属する研究グループは、線虫を用いた遺伝学的スクリーニングにより、新規の小胞輸送制御因子として低分子量GTPaseファミリーの一つであるRab35を同定し、Rab11非依存性の新たな膜のリサイクリング経路に機能することを報告した。その後、哺乳動物細胞を用いた解析から、Rab35が神経突起伸長に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、ショウジョウバエを用いた研究から、Rab35の神経系特異的制御因子(Rab35のGAPとして活性の抑制に機能する)であるSkywalkerが同定され、神経伝達物質の放出反応に関与することが報告された。このように、Rab35によって仲介される小胞輸送システムが神経機能調節において重要な役割を果たすことが明らかになりつつあったが、哺乳動物の組織や個体でのRab35の生理的役割は解析されていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではRab35遺伝子欠損マウスを作成し、Rab35の生理的役割を解明するとともに、神経機能調節における組織レベルでの役割を明らかにする。また、Rab35の相互作用因子を探索し、同定した分子の機能解析を通して、Rab35が関わる生命現象の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Rab35 遺伝子欠損マウスの作成

Rab35 遺伝子欠損マウスはgene trap法により作成した。すなわち、Rab35 遺伝子領域にgene trapカセット[SA(splice acceptor)-IRES(internal ribosomal entry site)-βgeo(LacZ とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子から構成される)]が挿入されることにより、Rab35 遺伝子の発現を阻害する(図1)。組換えES細胞(EUCOMMより入手)を用いて、ネオマイシン耐性遺伝子をプローブとしたサザンブロッティングを行い、Rab35 遺伝子領域にトラップベクターが挿入されていることを確認した。gene trapカセットの挿入を確認した3つのES細胞を、マイクロマニピュレーターを用いて胚盤胞に注入し、仮親の子宮に移植(放射線医学総合研究所塚本智史博士との共同研究)し、キメラマウスを作成した。トランスジーンがgermlineに導入されたキメラマウスから、ヘテロマウス(Rab35^{+/geo})を得た。ヘテロマウス同士の交配により、Rab35 遺伝子欠損マウス(Rab35^{geo/geo})の作成を試みた。

(2) Rab35 結合因子の探索

Rab GTPaseは、GTP型(活性化型)とGDP型(不活性化型)の構造変換を通し、輸送小胞が標的膜へと輸送される際の分子スイッ

チとして機能している。Rabタンパク質は下流のエフェクター(Rabの活性化型に特異的に結合して共に機能するタンパク質)を介して、膜輸送に関わることが知られている。そこで、yeast-two hybridやプルダウン法を用いたプロテオミクス的アプローチによりRab35のエフェクターを探索した。

(3) 初代培養神経細胞を用いた解析

初代培養神経細胞を調製し、レンチウイルスやエレクトロポレーション法により、GFP-Rab35を発現するプラスミドを細胞に導入した。ニポウディスク方式により、蛍光タンパク質の長時間ライブセル観察が可能な、Cell Voyager CV1000(横河電気株式会社)を用いて、初代神経細胞におけるGFP-Rab35の動態を検討した。

(4) 神経系特異的Rab35欠損マウスの作成

神経系におけるRab35の生理的役割を明らかにするために、神経系特異的Rab35遺伝子欠損マウスの作成を試みた。常法に従って、Cre-loxPシステムによりRab35遺伝子のcoding領域を欠損させるように設計したマウス(Rab35 floxed)を作成した。本研究では、神経系特異的にCreリコンビナーゼを発現させる目的で、Nestin-Creマウスと交配した。Nestin-creマウスは胎生7.5-9.5日において神経幹細胞においてCreリコンビナーゼを発現することから、神経系特異的にRab35を欠損させることが可能となる。

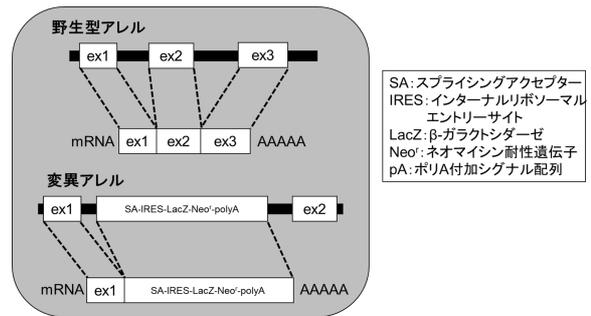


図1. プロモータートラップ法による遺伝子ノックアウトの概念

4. 研究成果

(1) C57BL/6由来の組換えES細胞をICRやBALB/cマウスの胚盤胞に注入し、高いキメラ率のマウスを得た(写真1:左)。得られたキメラマウスをC57BL/6マウスと交配し、ES細胞由来のトランスジーンを有するヘテロマウス(Rab35^{+/geo})を得た(写真2:右、毛色が黒のマウス)。

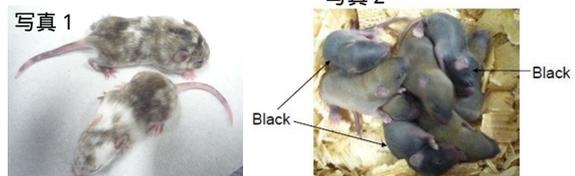


写真1

写真2

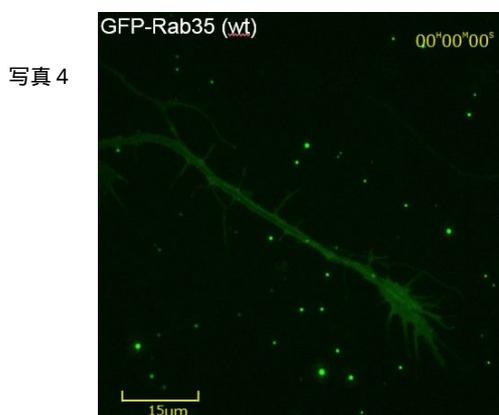
Black

(2) ヘテロマウス同士を交配し、ホモ接合体の変異マウスの作成を試みたが、生まれた仔体(44匹)中に Rab35 遺伝子欠損マウスは認められなかった。また、胎生 12.5 日において、Rab35 遺伝子欠損胚の存在を検討したが認められず、着床痕のみの早期吸収胚が高頻度に観察された(写真3)。これらの結果から、Rab35 がマウス初期胚発生に必須の生理的役割を果たしていることが示された。線中 *rab-35* 遺伝子の変異は生存に必須ではないことから、Rab35 がマウス初期胚発生に特有の機能を有する可能性が考えられる。今後、Rab35 欠損胚の発生異常の詳細を解析することで、初期発生における細胞内小胞輸送の役割にたいする知見を供給できると考える。



(3) Rab35 欠損マウスが胎生致死となることから、神経系特異的に Rab35 遺伝子を欠損するマウス(*Rab35^{lox/flox}; Nestin-Cre* マウス)の作成を試みた。神経系特異的 Rab35 欠損マウスは胎生致死とならずに成獣まで発育することから、高次脳機能に及ぼす Rab35 の役割について解析を行う予定である。

(4) 初代神経細胞をもちいて GFP-Rab35 の細胞内における動態を解析した。Rab35 は細胞膜と細胞内の膜構造体に局在しており、Rab35 陽性の構造体が細胞体と細胞膜間を活発に移動する様子が観察された(写真4)。今後、Rab35 の局在する膜構造体の詳細を明らかにするとともに、細胞内輸送や軸索形成における Rab35 の役割について、Rab35 欠損初代神経細胞を用いて解析する予定である。



(5) Rab35 結合タンパク質の同定
Rab35 結合因子として、Acap2/Centaurinβ2 や OCRL1 などを同定した。Acap2 は細胞内小胞輸送やアクチン細胞骨格リモデリング

の調節に関係する Arf6 を不活性化させる GAP として機能することが示されていた。また、OCRL1 はイノシトール環の 5 位のリン酸を脱リン酸化するイノシトール 5-ホスファターゼであり、その遺伝子変異は筋緊張低下及び腱反射低下といった神経症状を示す口症候群や筋尿細管性蛋白尿を呈するデント病と関連することが分かっていた。OCRL1 もまた、クラスリンや AP-2 などのエンドサイトーシス関連因子と相互作用し、細胞内小胞輸送の制御に関わると考えられていた。これらの知見から、Rab35 が Acap2 や OCRL1 を介して細胞機能を制御する可能性が考えられた。実際、申請者が Rab35 結合因子の同定を進めている最中、Acap2 や OCRL1 が Rab35 のエフェクターとして、神経突起伸長やファゴサイトーシス形成、細胞分裂などの機能調節に関与することが報告された(Kobayashi H and Fukuda M., J Cell Sci., 2012; Egami Y et al., J Cell Sci., 2011; Damboumet D et al., Nat Cell Biol., 2011)。今後、本研究で作成した組織特異的 Rab35 欠損マウスをもちいて、Rab35 の欠損がこれらのエフェクターの機能にどのように影響するかを、動物個体レベルで検証していく予定である。

(6) 本研究課題において、Rab35 がマウス初期胚発生に必須の役割を果たすことを明らかにすることができた。また、Rab35 が神経突起伸長に関わる Acap2 や神経疾患と関わる OCRL1 と相互作用することを見出した。Rab35 はエンドサイトーシスや細胞骨格系の制御に関与するエフェクター分子の制御に関わることも報告されており、Rab35 がこれらのエフェクター因子を統合的に制御することで、初期発生や高次脳機能の制御に関わる可能性が考えられる。本研究中に作成した有用な研究試料を駆使して、引き続き、未解明の課題に取り組んでいきたい。

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4件)

Hara T, Hashimoto Y, Akuzawa T, Hirai R, Kobayashi H, Sato K. (2014) Rer1 and calnexin regulate endoplasmic reticulum retention of a peripheral myelin protein 22 mutant that causes type 1A Charcot-Marie-Tooth disease. Sci Rep. 4:6992. doi: 10.1038/srep06992. 査読有

Yamasaki A, Hara T, Maejima I, Sato M, Sato K, Sato K. (2014) Rer1p regulates the ER retention of immature rhodopsin and modulates its intracellular trafficking. Sci Rep. 4:5973. doi: 10.1038/srep05973. 査読有

Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Kito S, Minami N, Kubota T, Sato K, Kokubo T. (2014) Fluorescence-based visualization of autophagic activity predicts mouse embryo viability. Sci Rep. 4:4533. doi: 10.1038/srep04533.

査読有

Tsukamoto S, Hara T, Yamamoto A, Ohta Y, Wada A, Ishida Y, Kito S, Nishikawa T, Minami N, Sato K, Kokubo T. Functional analysis of lysosomes during mouse preimplantation embryo development. (2013)

J Reprod Dev. 59, 33-39

査読有

〔学会発表〕(計7件)

原太一、佐藤健：ミスフォールドタンパク質の小胞体蓄積を病因とする遺伝病の治療応用を目指した機能性化合物の探索. 第19回日本フードファクター学会(鹿児島) 2014年11月9日

原太一、山本正道、堀居拓郎、角田美佳、小林久江、塚本智史、神吉康晴、井上剛、金木清美、畑田出穂、佐藤健：分子選別装置 Rer1 による膜タンパク質の複合体形成調節の生理的役割. 第66回日本細胞生物学会年会(奈良) 2014年6月11日~6月13日

原太一、佐藤健：細胞内メンブレントラフィックによるマウス初期胚の発生・分化制御機構の解析. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会(栃木) 2014年3月27日~3月29日

原太一、山本正道、堀居拓郎、角田美佳、小林久江、塚本智史、神吉康晴、井上剛、金木清美、畑田出穂、佐藤健：マウス初期胚発生過程における分子選別装置 Rer1 の生理的役割. 第36回日本分子生物学会年会(神戸) 2013年12月3日~12月6日

Taichi Hara, Masamichi Yamamoto, Mika Tsunoda, Satoshi Tsukamoto and Ken Sato: Physiological roles of a sorting receptor Rer1p during early embryogenesis in mice. 第61回 NIBB コンファレンス Cellular community in mammalian embryogenesis(岡崎) 2013年7月10日~2013年7月12日

原太一、角田美佳、山本正道、堀居拓郎、塚本智史、畑田出穂、佐藤健：哺乳動物における分子選別装置 Rer1 の生理的役割. 第65回日本細胞生物学会大会(名古屋) 2013年6月19日~6月21日

Taichi Hara, Satoshi Tsukamoto, Ken Sato: Analysis of novel physiological roles of membrane trafficking in animal models. 第85回日本生化学会大会(福岡) 2012年12月14日~12月16日

〔その他〕

ホームページ等

<http://traffic.dept.med.gunma-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 太一 (HARA TAICHI)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：392374

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし