

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860141

研究課題名(和文)新規細胞内極性輸送関連タンパク質の海馬神経細胞形態形成における機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel polarity-related genes for hippocampal neuronal formation

研究代表者

岩野 智彦 (IWANO, Tomohiko)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：10442930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の形態形成における極性輸送関連遺伝子の分子機構を解析するため、極性輸送に関与する遺伝子の相互関係について調べた。線虫のRNAi解析により同定された極性輸送関連遺伝子を調べたが、有意な相互関係を示すものはなかった。そこで、線虫の表現型が興味深かったRab1遺伝子に着目し、解析を進めた。Rab1a, 神経特異的ノックアウトマウスは行動などに特に大きな異常を見せず、脳形成にも大きな変化がなかった。Rab1遺伝子はマウスではRab1aとRab1bがあり、Rab1bがRab1aの機能を相補していると考えられるため、今後Rab1a, 1bダブルノックアウトマウスを用いて解析をする必要がある。

研究成果の概要(英文)：To know the functional relationship of novel polarity-related genes for hippocampal neuronal formation, I analyzed the genes which involved in the polarity formation using *C. elegans*. RNAi analysis. I performed the yeast two-hybrid system to identify the physical relationships of the candidate genes. However, I couldn't identify the significant result of their physical relationships. Therefore, I investigated the gene Rab1, whose knockdown showed significant abnormality in polarized epithelial cells of *C. elegans*. I analyzed the conditional knockout mice for Rab1a using Nestin-Cre, but can't see any significant abnormality in the behavior and the brain formation. This might come from the redundancy of Rab1b, which is a gene in Rab1 family. Therefore, I must analyze the Rab1a and 1b double knockout mice in the future research.

研究分野：Neurogenesis

キーワード：ノックアウトマウス 極性輸送 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

神経細胞が成熟する過程において、細胞の種類に応じた樹状突起や軸索を伸長するために、細胞の極性は重要な役割を果たしている。極性の形成や維持には細胞内の方向性を持つ小胞輸送(極性輸送)が必須だが、これまでの極性輸送の研究は主に培養細胞を用いて行われてきたため、組織・個体の発生、機能、病態における役割が不明だった。

2. 研究の目的

神経上皮細胞では頂端側に aPKC,Par3,Par6 といった因子が蓄積し、側底側には、Numb が局在する極性を持っている。それだけでなく、側底側に突起を伸長しそこから何らかのシグナルを受け、自己複製と神経分化の非対称な運命をたどる娘細胞を生み出すと考えられているが、まだ分子機構の全容は明らかでない(Develop. Growth Differ. (2012) 54, 277, Nat. Neurosci.(2007), 10, 812)。一方、成熟過程の神経細胞では細胞極性が軸索の形成に関与することが知られている。こちらでも aPKC,Par3,Par6 複合体が軸索側へ局在し、軸索伸長に重要な役割を果たす事が知られている。今日まで国内外で、極性輸送関連タンパク質の同定やその神経軸索形成における機能の解析には、ショウジョウバエ、線虫などのモデル生物や、マウスでも初代神経細胞培養などの実験でしかそれらの分子機構はまだ良くわかっていない。それにも関わらず、その解答を得るために必要な、極性輸送関連蛋白を欠損する動物の作製・解析はあまり行われていない。そのことをより深く研究するために、神経細胞の形態を決めるのに重要な細胞極性に焦点を当ててその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規の極性輸送関連蛋白の相互作用能

を酵母 2-ハイブリッド法を用いて網羅的に調べ、相関図としてまとめる(インタラクトーム解析)。

(2) (1)で関連づけられた遺伝子および培養細胞で極性輸送に関わることが知られる遺伝子に関し、KO マウスを作成する。その神経特異的 KO マウスの表現型を解析する。

4. 研究成果

神経細胞の形態形成における極性輸送関連遺伝子の分子機構を解析するため、極性輸送に関与する遺伝子の相互関係について調べた。

(1) スクリーニングで得られた候補遺伝子のタンパク質相互作用の解析

線虫の RNAi スクリーニングにより極性輸送に関与する遺伝子は研究室で既に同定されており、多くの候補遺伝子からより重要な因子を見出すために、候補遺伝子間のタンパク質相互作用関係を調べた。候補遺伝子は 81 種類あり、それらを用いて酵母 2-ハイブリッド解析を行った。クローニングできたもの、酵母 2-ハイブリッド解析に適したものに絞り、総当たりで計 4200 組の結合実験を行った。しかしながら、そのなかで再現性があり、かつ有意な結果に結びつくものは得られなかった。得られた候補遺伝子間で相互作用するタンパク質複合体を同定するためには、今回用いた酵母 2-ハイブリッド法は不向きであったと考えられる。

(2) 特定の極性形成関連遺伝子の解析

上記の線虫スクリーニングの中で、顕著な表現型を示し、細胞の恒常性維持にとってより重要と考えられる遺伝子および培養細胞で重要と見出されている極性関連遺伝子に関し、ノックアウトマウス解析を行った。

Rab1 遺伝子の解析

線虫スクリーニングの中で、顕著な表現型を示し、細胞の恒常性維持にとってより重

要と考えられる遺伝子として Rab1 に着目し、KOMP (<https://www.komp.org>)より条件的 Rab1a ノックアウト ES 細胞を入手し、マウスの作成を行った。この系統は FLP, Cre 非存在下では LacZ ノックインであるにもかかわらず、Rab1a 遺伝子は正常と同様に発現していた。このマウス由来の線維芽細胞へ Cre 遺伝子を発現させると、Rab1a は確かにノックアウトすることができた。このことは、LacZ ノックインシステムはうまく動いていないが、loxP/Cre システムによる条件的ノックアウトはできることを示している。従って次に Nestin-Cre マウスと交配し、その産仔である神経特異的 Rab1a ノックアウトマウスの解析を行った。このマウスは体の大きさやその行動などに特に大きな異常を見せず、脳形成にも大きな変化が見られなかった。Rab1 遺伝子ファミリーにはマウスでは Rab1a と Rab1b があり、Rab1b が Rab1a の機能を相補していると考えられるため、今後 Rab1a,1b ダブルノックアウトマウスを用いて解析をする必要がある。

Rab11a 遺伝子の脳発生に関わる解析 Rab11a はリサイクリングエンドソームにおける役割が培養細胞で報告されているが、生体での機能を示した報告はなかった。研究室で作成されていた Rab11a は全身で欠損すると胎生致死になった。そこで Nestin-Cre を用いて、神経特異的 KO マウスを作成したが、脳の大きさや神経発達において大きな異常を示さなかった (Sobajima et al., 2014)。Rab11b が機能を代償している可能性が高いため、Rab11b ノックアウトマウスを作製し、解析を進める必要がある。

PKD 遺伝子の神経成熟に関わる解析 PKD1,2 は培養細胞において上皮細胞の側底面への輸送に重要と言われるが、PKD1,2の単独のKOでは上皮組織に顕著

な異常が見られなかった。そこで PKD1,2 ダブルノックアウトマウスの作成を試みたが、胎生致死だった。そこで、海馬神経細胞を分離し、in vitro において Cre 発現ウイルスの感染による条件的ノックアウト細胞解析を行った。その結果、神経突起の伸長に異常が見られた。このことから、PKD1、PKD2 は互いに相補的に神経突起の成長時における極性輸送に関係することが示された (Avriyanti et al., 2015)。

上記、の Rab1a, Rab11a 神経特異的ノックアウトマウスは神経発生には残念ながら影響を与えなかったが、小腸上皮特異的ノックアウトマウスは Rab1a や Rab11a 単独欠損でも異常を示している (Sobajima et al., 2014, 未発表)。これらのことは、極性輸送と一言に言えども、上皮細胞と神経細胞における極性輸送のメカニズムや必要コンポーネントが大きく違っていることを示している。

本研究では、神経細胞成熟における極性関連遺伝子の機能的分子メカニズムやそのネットワークを構築するに至らなかったが、in vivo においては個体の構成細胞や細胞成熟過程における個別の解析が必要であり、神経細胞成熟に関わる極性関連遺伝子の解析には複合的遺伝子ノックアウトを用いて研究を今後更に進める必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

Sobajima T, Yoshimura S, Iwano T, Kunii M, Watanabe M, Atik N, Mushiake S, Morii E, Koyama Y, Miyoshi E, Harada A.

Rab11a is required for apical protein localisation in the intestine.

Biology Open, 4:86-94. (2014) 査読あり

Avriyanti E, Atik N, Kunii M, Furumoto N,
Iwano T, Yoshimura S, Harada R, Harada A.
Functional redundancy of protein kinase D1 and
protein kinase D2 in neuronal polarity.
Neuroscience Research,95:12-20. (2015) 査読あ
り

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岩野 智彦 (IWANO Tomohiko)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：10442930

(2) 研究協力者

原田 彰宏 (HARADA Akihiro)
大阪大学・医学研究科・教授
研究者番号：40251441

吉村 信一郎 (YOSHIMURA Shin-ichiro)
大阪大学・医学研究科・助教
研究者番号：60584521