

令和元年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		眼疾患モデルマウスにおけるグリア細胞の増殖制御
新規・継続の別		新規 ・ ■継続
研究代表者	所属	奈良先端科学技術大学院大学
	職名・氏名	准教授・笹井紀明
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	
	職名・氏名	
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	教授・近藤亨
概要 (100～150 字程度)		<p>遺伝性眼疾患の原因遺伝子の1つである Prominin-1 (Prom1) は、5 回膜貫通型の膜タンパク質をコードし、光受容細胞のほか、腎臓や精巣に発現する。これまで、Prom1 の下流シグナル系やその働きはほとんど知られてこなかった。本研究では、Prom1 の下流で低分子 GTP アーゼの1つである Rho が活性化されること、また Prom1 がカルシウム作動性の塩化物イオンチャネルであることを明らかにした。</p>
研究目的 (300 字程度)		<p>網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa; RP) ・黄斑変性 (macular degeneration; MD) は、光受容細胞の変性によって進行する眼疾患で、約半数が遺伝子変異によるものである。現在まで、多くの基礎研究や臨床研究が行われているにもかかわらず、その原因や根本的な治療法などは明らかになっておらず、厚生労働省から難病に指定されている。現在までに、RP の原因遺伝子として 60 種類程度の遺伝子が同定されており、Prom1 はその1つである。</p> <p>これまでに、Prom1 の下流シグナル経路については現在まで明らかになっていなかった。本研究では、近藤教授から細胞や遺伝子変異マウスなどの材料のほか、予備データの供与を受け、Prom1 の下流シグナル経路のほか、その膜タンパク質としての役割を明らかにした。</p>
研究内容・成果 (1000 字程度)		<p>以前に、近藤教授のグループにおいて、Prom1 の細胞内における強制発現により、細胞膜状に多数の突起が形成されることが見出されていた。そこで申請者らは、この突起形成を指標に Prom1 の活性を評価することを考えた。</p> <p>Prom1 を原因遺伝子とする眼疾患の患者では、Prom1 の様々な場所に変異が生じており、多くの場合、タンパク質の翻訳が途中でストップしてしまう。実際に Prom1 のカルボキシル末端を欠損した変異体を細胞に強制発現しても細胞の突起は形成されず、Prom1</p>

	<p>の突起形成の有無が Prom1 の本来の活性と相関していることが明らかになった。さらに詳細な欠損変異体の解析の結果、5回膜貫通型タンパク質の5回目の膜貫通領域の直下にある5アミノ酸が突起形成に必須であることが明らかになった。</p> <p>次に、Prom1 によって惹起される細胞内シグナル伝達経路を明らかにすることにした。突起形成には多くの場合低分子 GTP アーゼが関与することが知られている。そこで、GTP アーゼの阻害剤と Prom1 の強制発現を組み合わせることにより、突起形成が抑制されるような阻害剤を探索した。その結果、Rho の阻害剤が Prom1 による突起形成を阻害することが明らかになった。</p> <p>さらに、Rho の活性化型 (GTP 結合型) は Prom1 と細胞の突起上で共局在しており、この共局在が細胞膜の突起形成の発端に必須であることを明らかにした。</p> <p>一方、2次元構造予測から、Prom1 タンパク質の予想される構造が、カルシウム作動性の塩化物イオンチャンネルに類似していることが明らかになった。そこで、細胞内カルシウムレベルを惹起した上で塩化物イオンの流出入を経時的に観察したところ、Prom1 変異細胞では塩化物イオンの流出が起こらず、細胞内に滞留することがわかった。したがって Prom1 は細胞のイオンバランスを調節する膜タンパク質であることが示唆された。これらの内容を Scientific Reports 誌に報告した。</p> <p>さらに現在、上の知見が in vivo に与える影響を明らかにするために、Prom1 変異マウスに Rho の活性化剤などを注入し、網膜組織に症状の緩和が見られるかを検討することにした。この際の評価系として、グリア細胞の増殖を観察することにした。グリア細胞は細胞障害が起きた時に活性化または増殖する細胞群で、抗 GFAP 抗体の染色によって評価することができる。そこで、この GFAP の抗体染色によって発現をチェックし、実際に複数の薬剤の投与によってグリア細胞の増殖がブロックできることを観察した。</p> <p>そのほか、グリア細胞の増殖に関与するヘッジホッグシグナル経路の経時的变化を調節する因子の同定 (Development 誌) や、総説 (Frontiers in Genetics) の執筆を共同で行った。</p>
成果	<p>【学会報告】</p> <p>参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のこと (該当なし)</p> <p>【論文発表】</p> <p>著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のこと</p> <p>(1) Akiko Hori, Kenji Nishide, Yuki Yasukuni, Kei Haga, Wataru Kakuta, Yasuyuki Ishikawa, Matthew J Hayes, Shin-ichi Ohnuma, Hiroshi Kiyonari, Kazuhiro Kimura, <u>Toru Kondo</u>, <u>Noriaki Sasai</u></p>

“Prominin-1 modulates Rho/ROCK-mediated membrane morphology and calcium-dependent intracellular chloride flux.”

*Scientific Reports* (2019; IF 4.122) 9:15911.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31685837>

(2) Atsuki Yatsuzuka, Akiko Hori, Minori Kadoya, Mami Matsuo-Takasaki, Toru Kondo, Noriaki Sasai

“GPR17 is an essential regulator for the temporal adaptation of Sonic Hedgehog signalling in neural tube development.”

*Development* (2019; IF 5.763) 146: dev176784.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31444216>

(3) Noriaki Sasai, Michinori Toriyama, Toru Kondo

“Hedgehog signal and genetic disorders”

*Frontiers in Genetics* (2019; IF 3.789)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31781166>

【新聞報道】

(該当なし)