

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07341

研究課題名(和文) EGF受容体下流アダプタータンパク質GAREM及びCLPABPの生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological functions of the EGF receptor downstream adaptor proteins GAREM and CLPABP

研究代表者

小西 博昭 (Konishi, Hiroaki)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：40252811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：GAREM1(広範な臓器に発現)、GAREM2(脳特異的発現)のそれぞれのノックアウト(KO)マウスを作製した。GAREM1のKOマウスは軽体重であった(発表準備中)。GAREM2のKOマウスは低不安度と高活動性を示すことを行動解析により見出した。また、GAREM1はヒトにおいて心臓病に関与することが共同研究者らにより明らかにされた。CLPABPはアミノ末端がミリスチン酸化されることにより、ミトコンドリア外膜表面上に安定に結合できることを見出した。また、CLPABPの発現の有無により、数多くのmRNAの発現量が変化することをRNA-seqにより明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は4報の国際学術誌にすでに発表済みである。また、今後のさらに研究を進展させるための科研費にも採択された。

近年、生命科学研究における技術や情報がさらに充実し、ヒト疾患等の係わる遺伝子の変異やタンパク質の異常に関して多数の報告がなされている。申請者の所属先でそのような規模の研究を単独で遂行することは困難であるが、申請者らが機能解析を続けてきたタンパク質とヒト疾患の関係についての報告が国内外から徐々に始めている。

研究成果の概要(英文)：We generated knockout (KO) mice of GAREM1 (expressed in a wide range of organs) and GAREM2 (expressed specifically in the brain), and found that GAREM1 KO mice were light in weight (in preparation for publication), and GAREM2 KO mice showed low anxiety and high activity by behavioral analysis. Our collaborators also found that GAREM1 is involved in heart disease in humans.

They found that CLPABP can bind tightly to the outer mitochondrial membrane surface by myristoylation of its amino terminus. In addition, RNA-seq revealed that the expression levels of a number of mRNAs were altered depending on whether CLPABP was expressed or not.

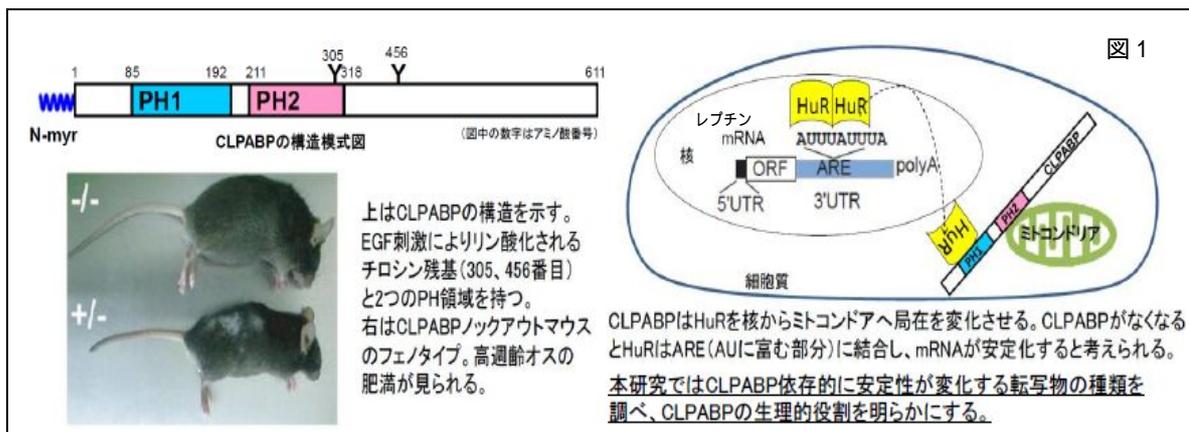
研究分野：細胞情報伝達

キーワード：細胞情報伝達 タンパク質リン酸化 アダプタータンパク質 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

申請者らはチロシンリン酸化を指標とした EGF 受容体下流タンパク質の網羅的解析 (プロテオミクス) により見出した新規タンパク質の研究を行ってきた。この研究計画の前に、GAREM (Grb2-associated regulator for Erk/MAPK) 分子種については培養細胞における役割を、CLPABP (Cardiolipin and phosphatidic acid-binding protein) は培養細胞のみならず、ノックアウト (KO) マウスを用いた動物個体における役割の解析を行っていた。

以下に研究開始当初の CLPABP の研究結果について図 1 に示す。



GAREM には 2 つの分子種 GAREM1 と GAREM2 が存在し、前者は広範な臓器で、後者は脳で発現する。両分子種に共通した機能ドメインとして、プロリンリッチ領域及び ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition) モチーフを持つ。両 GAREM は EGF 刺激を受けた細胞内で 2 もしくは 3 ヶ所のチロシン残基がリン酸化され、プロリンリッチ領域を介し細胞増殖因子受容体結合タンパク質の Grb2 と結合し、ITIM モチーフを介し Erk 活性制御因子である Shp2 (Src homology 2-containing protein tyrosine phosphatase2) とも結合する。その結果、細胞増殖因子刺激による Erk の活性化度合いを制御し、GAREM1 は培養線維芽細胞のがん化に、GAREM2 は神経芽細胞腫の IGF-1 刺激依存的な神経様突起伸長の制御に関与することを見出した (図 2)。

2. 研究の目的

GAREM 及び CLPABP の生理機能を明らかにする。

- A、GAREM1 の KO マウスの病理学的解析
- B、GAREM2 の KO マウスの行動学的解析と GAREM2 の脳機能における役割の解析
- C、GAREM1 及び 2 のダブル KO マウスの作製とその解析
- E、CLPABP の役割と結合リン脂質の関連
- G、CLPABP のターゲットとなる遺伝子転写物の網羅的同定

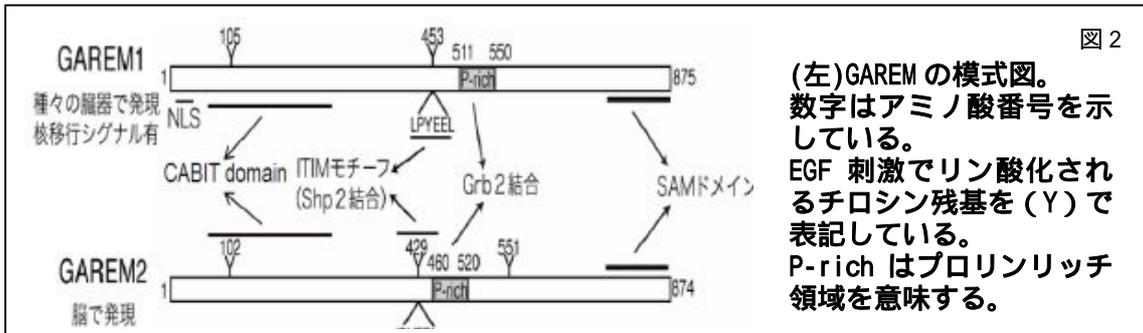
3. 研究の方法

GAREM について

GAREM1、GAREM2 のそれぞれのコンディショナル KO マウス作製は理化学研究所発生・再生科学総合研究センター (理化学研究所) との共同研究により作製した。その後、キメラマウスから F1 ヘテロマウスの作製、マーカー遺伝子除去、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウス (全身で発現するタイプ) との交配およびホモ KO マウスを作製した。

両分子種の KO マウスは正常に発生・生育するが、GAREM2 KO マウスは理研・脳科学総合研究センターの内匠透シニアチームリーダー（現・神戸大学医学部教授）の研究室との共同研究として、行動解析実験（行動試験バッテリー）を実施した。

GAREM 1 の KO マウスは、先端モデル動物支援プラットフォームのご支援を受け、25 週齢のオスマウスの種々臓器切片を作製後、病理観察により野生型と KO マウスの差異を確認した。



CLPABP について（図 1 参照）

これまでの解析より、CLPABP は摂食量調節ホルモンであるレプチンの mRNA 安定性に関与することで、高齢オスマウスの体重制御に寄与していることを明らかにしている(図 1)。しかし、レプチンの他に、どのような種類の遺伝子転写産物の安定性が CLPABP の発現により影響を受けるかについては不明であった。そこで、CLPABP の発現の有無により転写量が変化する遺伝子の種類を RNA-seq 解析により網羅的に解析した。野生型及び CLPABP KO マウスの胎児から調整した線維芽細胞(MEF)を 10%血清存在下で 3 日間培養し、それぞれのトータル RNA を抽出した。それをもとにライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによる網羅的配列決定を行った。

4 . 研究成果

行動解析実験（行動試験バッテリー）を実施した結果、GAREM2 の KO マウスは野生型マウスに比較して低不安度と高活動性が見受けられた。

GAREM 1 の KO マウスは、誕生後半年を経過しても目立った表現型は認められなかった。しかし、野生型マウスよりも体重が若干少ない。病理観察により野生型と KO マウスの差異を確認したが、各種臓器のサイズが若干小型であること以外、大きな差は見られなかった。

RNA-seq により MEF の転写物を比較すると、野生型と CLPABP KO の MEF 細胞由来の総 RNA 間（約 15000 種）で、発現量が 2 倍以上増減する種類は約 1500 以上であった。その内訳として、野生型に比較し、CLPABP を発現しない細胞で 2 倍以上転写量が増加する RNA が 736 種類に対し、800 種類は 2 倍以上減少した。

また、CLAPBP のアミノ末端がミリスチン酸化されることで、ミトコンドリア外膜表面に、より安定に局在できることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishino, T., Tamada, K., Maeda, A., Abe, T., Kiyonari, H., Funahashi, Y., Kaibuchi, K., Takumi, T., and Konishi, H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral alterations in mice deficient for GAREM2 (Grb2-associated regulator of Erk/MAPK subtype2) that is a subtype of highly expressing in the brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol. Brain	6. 最初と最後の頁 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-019-0512-x.	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 Maeda A, Nishino T, Matsuzaki R, Yokoyama A, Suga H, Yagi T, Konishi H.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Transglutaminase-mediated cross-linking of WDR54 regulates EGF receptor-signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.	6. 最初と最後の頁 285-295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2018.11.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda A, Uchida M, Nishikawa S, Nishino T, Konishi H.	4. 巻 495
2. 論文標題 Role of N-myristoylation in stability and subcellular localization of the CLPABP protein.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 1249-1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.112. Epub 2017 Nov 24.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim HO, Lim JE, Kim MJ, Kang JO, Kim SM, Nam JM, Tak J, Konishi H, Nishino T, Koh IS, Jin YH, Baik HH, Kim JB, Kim MK, Choi BY, Lee SH, Jang Y, Shin J, Oh B.	4. 巻 63
2. 論文標題 GAREM1 regulates the PR interval on electrocardiograms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet.	6. 最初と最後の頁 297-307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-017-0367-x. Epub 2017 Dec 22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishino T, Oshika T, Kyan M, Konishi H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of the glycine-rich domain in GAREM2 on its unique subcellular localization upon EGF stimulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Biol Lett.	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s11658-021-00260-1.	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 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 傳保聖太郎、福原光海、國村尚人、佐藤香帆、畑村朱里、小西博昭、八木俊樹、菅裕
2. 発表標題 基底膜の起源 - 単細胞ホロゾアにおけるラミニン様遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会 OA05-02
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青野克俊、小出尚史、國村尚人、山原直樹、畑村朱里、八木俊樹、小西博昭、菅裕
2. 発表標題 単細胞ホロゾアCapsaspora owczarazaki におけるNotch 様遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本進化学会第21回大会 PA-011
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 朱音, 西野 扶, 菅 裕, 八木 俊樹, 小西 博昭
2. 発表標題 細胞内で架橋形成する機能未知タンパク質WDR (WD-like repeat) 54の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 傳保聖太郎、福原光海、小西博昭、八木俊樹、菅裕
2. 発表標題 基底膜の起源 単細胞ホロゾアのラミニン様遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日野礼仁、小野真実、小西博昭、八木俊樹、菅裕
2. 発表標題 単細胞ホロゾア解析を通じた動物の細胞間連絡の起源解明
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------