

Title	XLMR protein related to neurite extension (Xpn/KIAA2022) regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration
Author(s)	馬込, 卓弥
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34601
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (馬込卓弥)

論文題名

XLMR protein related to neurite extension (Xpn/KIAA2022) regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration
(精神遅滞関連因子Xpn/KIAA2022はPC12細胞において細胞間・細胞-基質接着に影響し細胞移動を制御する)

〔 論文内容の要旨 〕

近年の遺伝学的研究により、発達障害を含む広義の精神障害において発症リスクに関わる脆弱性遺伝子が多数報告されている。これら脆弱性遺伝子の一つである *KIAA2022* は X連鎖精神遅滞 (XLMR) 患者の遺伝子解析において逆位による遺伝子断絶が報告されており、XLMR責任遺伝子として知られている。これまでに *KIAA2022* mRNA は脳での発現が高いことから、脳における機能が注目されてきたが、基本的な機能は未知であった。そこで当研究室では、*KIAA2022* 発現抑制により PC12 細胞の突起伸張が阻害されることを明らかにし、XLMR protein related to neurite extension (Xpn) と名付けた。本因子の更なる XLMR 発症メカニズムへの関与を明らかにする目的で研究を行った。従来、細胞接着因子群と精神遅滞との関連性が多く報告されていることから、本研究は Xpn の細胞接着因子への影響を検討することを目的として、細胞-細胞間接着を評価する cell association assay、細胞と-細胞外基質接着 cell-matrix attachment assay を行った。その結果 siRNA による Xpn 発現抑制により細胞-細胞間接着、細胞-細胞外基質接着がともに増強されることを明らかにした。細胞間接着に関与する代表的な因子として Nカドヘリン、細胞-細胞外基質接着に関与するインテグリン $\beta 1$ に注目し、Xpn 発現抑制細胞と、コントロール細胞における N-カドヘリンとインテグリン $\beta 1$ の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法により比較・解析した結果、Nカドヘリン・インテグリン $\beta 1$ は、コントロール群と比較して、いずれも有意な増加を示した。Xpn の発現抑制により、Nカドヘリン・インテグリン $\beta 1$ がタンパク質レベルでも増加していることをウェスタンブロット法と細胞免疫染色法において確認した。Nカドヘリン、インテグリン $\beta 1$ の転写制御を Xpn が担っている可能性が考えられたため、Xpn の細胞内局在を Xpn のタグ付き強制発現ベクターを作製し解析を行ったところ、免疫細胞染色法、ウェスタンブロット法いずれの結果からも、Xpn の大半は核局在を示しており、核内での転写因子としての機能を有している可能性が示された。一方で N-cadherin をはじめとする接着因子は細胞遊走に関係しており、さらに発達期の大脳皮質での Xpn の発現は、移動している神経に強い事を既報で明らかにしており、また大脳皮質での細胞移動の異常により精神遅滞の一因となる事が挙げられていることから、wound healing assay による細胞遊走を検討した結果、Xpn 発現抑制細胞は、コントロール細胞と比較して、細胞遊走が抑制されていた。さらに、この遊走異常を示した Xpn 発現抑制細胞の Nカドヘリン、インテグリン $\beta 1$ の発現を抑制すると、Xpn 発現抑制による細胞遊走障害が回復することを明らかにした。

〔 目的 〕

近年の遺伝学的研究により、発達障害を含む広義の精神障害において発症リスクに関わる脆弱性遺伝子が多数報告されている。これら脆弱性遺伝子の一つである *KIAA2022* は X連鎖精神遅滞 (XLMR) 患者の遺伝子解析において逆位による遺伝子断絶が報告されており、XLMR責任遺伝子として知られている。これまでに *KIAA2022* mRNA は脳での発現が高いことから、脳における機能が注目されてきたが、基本的な機能は未知であった。当研究室では、*KIAA2022* 発現抑制により PC12 細胞の突起伸張が阻害されることを明らかにし、XLMR protein related to neurite extension (Xpn) と名付け機能解析を行っている。さらにマウス脳を用いた検討から、1) Xpn は胎生後期から周産期において高発現すること、2) 発進が進むに連れて脳全体における発現量が徐々に減少すること、3) Xpn タンパク質は核と細胞質に局在することなどを明らかにし、突起伸張、細胞移動、細胞骨格系等への関与が MR 発症に関わる可能性を示した。一方、近年、MR 発症と細胞接着因子群との関連性が報告されていることから、本研究では、細胞接着因子群に対する Xpn の機能を明らかにする目的で本研究を行った。

[方法ならびに成績]

XpnはPC12細胞において細胞接着因子に関与する

Xpnの細胞接着因子への影響を検討する目的で、当研究室でXpnの突起伸展作用を評価したPC12細胞を用いて細胞-細胞間接着を評価するcell association assay、細胞と-細胞外基質接着cell-matrix attachment assay を行った。その結果siRNAによるXpn発現抑制により細胞-細胞間接着、細胞-細胞外基質接着がともに増強されていることを明らかにした。

Xpnは細胞接着因子の発現に関与する

上記結果より細胞間接着に関与する代表的な因子としてNカドヘリン、細胞-細胞外基質接着に関与するインテグリン β 1の発現に注目し、Xpn発現抑制細胞と、コントロール細胞におけるN-カドヘリンとインテグリン β 1のmRNA発現をリアルタイムPCRにより比較・解析した。その結果Nカドヘリン、インテグリン β 1は、コントロール群と比較して、いずれも有意な増加を示した。また各接着因子のタンパク質レベルの発現についてもウェスタンブロッティング法を用いて生化学的に検討した結果、両接着因子はXpnの発現抑制によりタンパク質レベルにおいても発現増加が認められ、細胞免疫染色法においても確認した。

そこでNカドヘリン、インテグリン β 1の転写制御をXpnが担っている可能性が考えられるため、Xpnの細胞内局在をXpnのタグ付き強制発現ベクターを作製し解析を行ったところ、免疫細胞染色法、ウェスタンブロット法いずれの結果からも、KIAA2022の大半は核局在を示しており、核内での機能（転写因子としての働き）を有している可能性が示された。

Xpnは接着因子群の発現を制御し、細胞遊走に影響を与える

N-cadherinをはじめとする接着因子は細胞遊走に関係しており、さらに発達期の脳皮質でのXpnの発現は、移動している神経に強い事を既報で明らかにしており、また脳皮質での細胞移動の異常により精神遅滞の一因となる事が挙げられていることから、wound healing assayによる細胞遊走を検討した結果、Xpn発現抑制細胞は、コントロール細胞と比較して、細胞遊走が抑制されていた。さらに、この遊走異常を示したXpn発現抑制細胞のNカドヘリン、インテグリン β 1の発現をsiRNAを用いて抑制すると、Xpn発現抑制による細胞遊走異常からレスキューされることを明らかにした。

[総括]

以上の実験結果及び、精神遅滞発症における細胞接着因子群の関連性の既報告から鑑みて、XLMR関連因子Xpn/KIAA2022はタンパク質レベルで核に局在し、Nカドヘリン、インテグリン β 1の発現を制御し、その結果、細胞間・細胞-基質接着に影響し、さらには細胞遊走を制御するなど、脳構造・神経回路構築過程に影響し、XLMRの発症に関わる可能性が示された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (馬 込 卓 弥)	
論文審査担当者	(職) 氏 名 主 査 教 授 谷 池 雅 子
	副 査 教 授 松 崎 秀 夫
	副 査 准教授 小 泉 恵 太

論文審査の結果の要旨

自閉症を伴うX連鎖精神遅滞 (XLMR) 患者において染色体逆位による *Xpn* (KIAA2022) 遺伝子の断絶が報告されており、*Xpn* はXLMR責任遺伝子として知られている。脳におけるRNA発現が高いことから、*Xpn*の脳における機能が注目されてきたが、生理的な機能は未知であった。従来、細胞接着因子群と精神遅滞との関連性が多く報告されていることから、本研究は*Xpn*の細胞接着因子への影響を検討することを目的として、細胞-細胞間接着を評価するcell association assay、細胞と-細胞外基質接着cell-matrix attachment assay を行った。その結果siRNAによる*Xpn*発現抑制により細胞-細胞間接着、細胞-細胞外基質接着がともに増強されることを明らかにした。細胞間接着に関与する代表的な因子としてNカドヘリン、細胞-細胞外基質接着に関与するインテグリン β 1に注目し、*Xpn*発現抑制細胞と、コントロール細胞におけるN-カドヘリンとインテグリン β 1のmRNA発現をリアルタイムPCR法により比較・解析した結果、Nカドヘリン・インテグリン β 1は、コントロール群と比較して、いずれも有意な増加を示した。*Xpn*の発現抑制により、Nカドヘリン・インテグリン β 1がタンパク質レベルでも増加していることをウェスタンブロッティング法と細胞免疫染色法において確認した。Nカドヘリン、インテグリン β 1の転写制御を*Xpn*が担っている可能性が考えられたため、*Xpn*の細胞内局在を*Xpn*のタグ付き強制発現ベクターを作製し解析を行ったところ、免疫細胞染色法、ウェスタンブロット法いずれの結果からも、*Xpn*の大半は核局在を示しており、核内での転写因子としての機能を有している可能性が示された。一方でN-cadherinをはじめとする接着因子は細胞遊走に関係しており、さらに発達期の脳皮質での*Xpn*の発現は、移動している神経に強い事を既報で明らかにしており、また脳皮質での細胞移動の異常により精神遅滞の一因となる事が挙げられていることから、wound healing assayによる細胞遊走を検討した結果、*Xpn*発現抑制細胞は、コントロール細胞と比較して、細胞遊走が抑制されていた。さらに、この遊走異常を示した*Xpn*発現抑制細胞のNカドヘリン、インテグリン β 1の発現を抑制すると、*Xpn*発現抑制による細胞遊走障害が回復することを明らかにした。以上の実験結果から*Xpn*は脳構造・神経回路構築過程に影響し、XLMRの発症に関与することが示された。馬込らの研究は新規のXLMR責任遺伝子である*Xpn*の機能解析を世界に先駆けて行い、発達障害の発症に関わる病態発生モデルを提示した。内容は独創的であり、当研究科の学位論文にふさわしいと判定された。