

博士学位論文

低分子量 GTP 結合タンパク質を標的にした
オリゴデンドロサイト病態改善のアプローチ

東京薬科大学大学院

生命科学研究科 生命科学専攻

分子神経科学研究室

福島 那奈

目次

1. 序章	4
1.1. 概要	5
1.2. 用語解説	6
2. 第1章 Rab7B のノックダウンによるツニカマイシン誘発の分化不全の回復 Rab7A との拮抗的な役割	8
2.1. 概要	9
2.2. はじめに	11
2.3. 実験材料と方法	12
2.3.1. 抗体および化学物質	12
2.3.2. siRNA とプライマーの塩基配列と PCR 技術	13
2.3.3. 細胞培養、分化、トランスフェクション	13
2.3.4. 細胞溶解と免疫ブロッティング	13
2.3.5. 統計解析	14
2.3.6. 倫理に関する記述	14
2.4. 結果	15
2.4.1. Rab7A は形態分化に正の影響を与える	15
2.4.2. Rab7B は形態分化に負の影響を与える	19
2.4.3. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる	22
2.4.4. Rab7B のノックダウンがツニカマイシン誘発の小胞体ストレスシグナリングを回復させる	28
2.5. 考察	29
2.6. 引用文献	32
3. 第2章 FBD-102b 細胞における Rab9 のノックダウンが小胞体ストレスによる形態分化の障害を回復する	37
3.1 概要	38
3.2 はじめに	39
3.3 実験材料と方法	40
3.3.1. 抗体および化学物質	40
3.3.2. 細胞培養と分化	41
3.3.3. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)	41

3.3.4. siRNA トランスフェクション	41
3.3.5. 細胞溶解およびポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	42
3.3.6. イムノブロッティング.....	42
3.3.7. 統計解析.....	42
3.3.8. 倫理的考慮.....	42
3.4. 結果.....	43
3.4.1. Rab9 は細胞形態形成を負に制御する	50
3.4.2. Rab9 のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる ..	50
3.4.3. Rab9 のノックダウンはジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) 誘発の 形態分化の抑制を回復させる.....	50
3.5. 考察.....	54
3.6. 引用文献.....	56
4. 結論.....	62
5. 謝辞.....	63

1. 序章

1.1. 概要

オリゴデンドロサイトは中枢神経系でミエリン鞘を形成するグリア細胞の1つであり、神経伝達の跳躍伝導、軸索の保護など、多岐にわたる重要な役割を担う。これらの細胞が適切に機能しない場合、神経活動は阻害され、ミエリン形成不全症や脱髄疾患などの神経変性疾患の発生原因となる。本研究では、オリゴデンドロサイトの分化を促進することにより、これらの疾患に対する治療的介入の可能性を探る。具体的には、オリゴデンドロサイトのリソソームおよびトランスゴルジネットワークへのタンパク質輸送の制御に着目し、細胞の恒常性の維持を目指す。この輸送プロセスの最適化が、不要な物質の効率的な分解とタンパク質の品質管理に寄与し、オリゴデンドロサイトの恒常性の維持につながると予想する。一方、この輸送プロセスが不適切な場合、物質の分解が不十分となり、結果としてオリゴデンドロサイトの恒常性が維持できなくなると予測する。この研究では、リソソーム及びトランスゴルジネットワークに局在する **Rab7** と **Rab9** に焦点を当て、これらのタンパク質がオリゴデンドロサイトの機能に及ぼす影響を調査する。この研究成果が、**Rab7** と **Rab9** を標的とする新たな疾患治療薬の開発に寄与することが期待される。

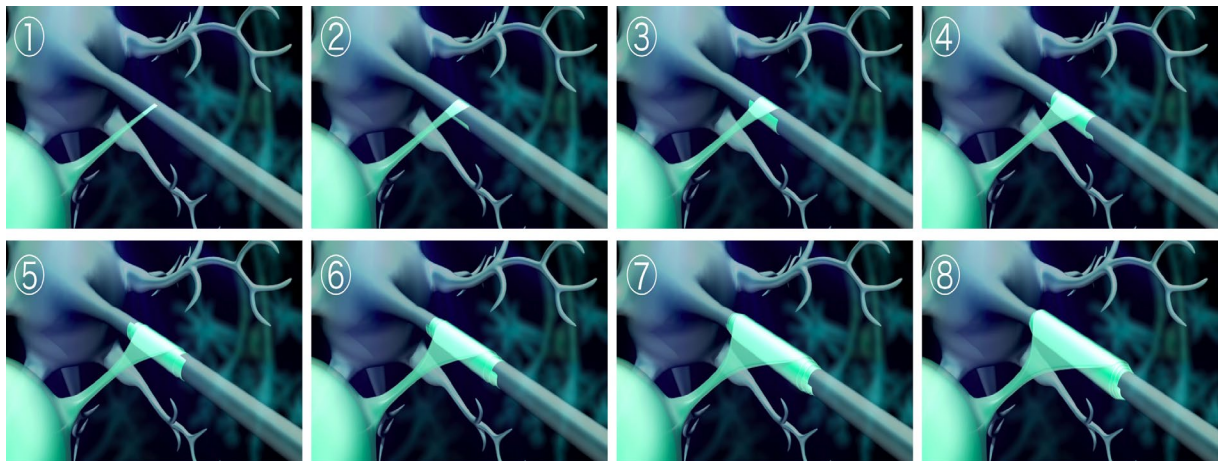


図1. オリゴデンドロサイトが神経軸索に巻き付きミエリンを形成する様子

1.2. 用語説明

オリゴデンドロサイト

神経軸索を取り巻くミエリン鞘を形成し、これによって神経信号の効率的な伝達を支援する。このミエリン鞘が適切に形成されない、または維持されない場合、多発性硬化症やペリチェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD) などの重篤な神経変性疾患が発生するリスクが高まる。これらの疾患は、ミエリンの損傷が神経伝達を不安定にし、最終的には神経機能の低下や身体的障害を引き起こす。オリゴデンドロサイトの健全な機能は、中枢神経系の保護と修復過程で極めて重要であり、適切なミエリン化は神経系の健康維持に不可欠である。

Rab タンパク質

Rab タンパク質は哺乳類で 60 種類以上が同定されており、Ras スーパーファミリーに属する低分子量 G タンパク質のファミリーである。これらは GTP に結合した活性型と GDP に結合した不活性型の間で切り替わる分子スイッチとして機能し、細胞内の膜輸送を制御する。Rab タンパク質は特異的なエフェクタータンパク質をリクルートし、膜出芽、輸送、融合などのプロセスを調節することで、細胞の機能と整合性を維持する。

Rab7 は、細胞に取り込まれた不要な物質が初期エンドソームから後期エンドソームを経て、最終的にリソソームと融合して分解されるプロセスを効率的に促進する役割を担う。この活動は細胞の恒常性とクリアランスに不可欠であり、細胞の健康を保つために中心的な役割を果たす。

Rab9 は、主にゴルジ体からリソソームへのタンパク質輸送を調節し、リサイクルまたは分解が必要な長寿命のリソソーム酵素が適切に配送されることをサポートする。このタンパク質は、細胞が消化酵素や分解機構を必要とする際に特に重要であり、機能不全は代謝異常や細胞の機能障害を引き起こす可能性がある。

小胞体ストレス

小胞体は生体恒常性を維持するために不可欠な細胞小器官であり、膜タンパク質や分泌タンパク質の翻訳後修飾や適切な折りたたみを担う。酸化ストレスや炎症などの外部からのストレス、遺伝的要因や代謝異常などの内部からの負荷が細胞に加わると、小胞体でのタンパク質の折りたたみが障害される。この結果、折りたたみ不全による不良タンパク質が蓄積し、小胞体ストレスが生じる。小胞体ストレスが生じると、細胞は状態を改善するために小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR) を発動し、不良タンパク質を排除しようと試みる。しかし、過度または持続的な小胞体ストレスは UPR で対処できず、細胞は最終的にアポトーシスを引き起こす。このアポトーシスにより細胞の脱落または組織の機能不全が生じ、さまざまな疾患の発症につながる。

2. 第1章

Rab7B のノックダウンによるツニカマイシン誘発の分化不全の回復
Rab7A との拮抗的な役割

2.1. 概要

中枢神経系 (Central Nervous System, CNS) では、オリゴデンドロサイトから分化した細胞膜によって生成される絶縁性のミエリン鞘が神経軸索を取り囲み、活動電位の伝導を可能にしている。中枢神経系においてミエリン鞘が果たす機能的役割にもかかわらず、オリゴデンドロサイト自体の細胞膜がどのような分子機構によって分化するのかは依然として明らかではない。また、これらのシグナル伝達機構をオリゴデンドロサイト関連疾患の治療に応用できるかどうかも解明されていない。我々は、オリゴデンドロサイトの前駆細胞である FBD-102b 細胞を用いて、Rab7 サブファミリーの一員である Rab7B がオリゴデンドロサイトの形態分化を抑制する役割を持つことを明らかにした。Rab7A または Rab7B をそれぞれ特異的な siRNA でノックダウンした結果、形態分化が異なる方向に制御されることが示された。これらの変化は、分化や髄鞘形成に関連するタンパク質やプロテインキナーゼマーカーの発現の変動を通じて一貫して支持された。さらに、Rab7B をノックダウンすることで、ツニカマイシン誘発の小胞体ストレスによる形態分化の抑制が回復されることを確認した。この小胞体ストレスは PMD などの先天性大脳白質形成不全症の主要な分子病理学的原因を模倣している。また、Rab7B をノックダウンすることで小胞体ストレス下の分化不全の表現型が改善した。この結果は Rab7B のノックダウンは PMD などのオリゴデンドロサイト疾患に対する治療薬の可能性を示唆するものである。

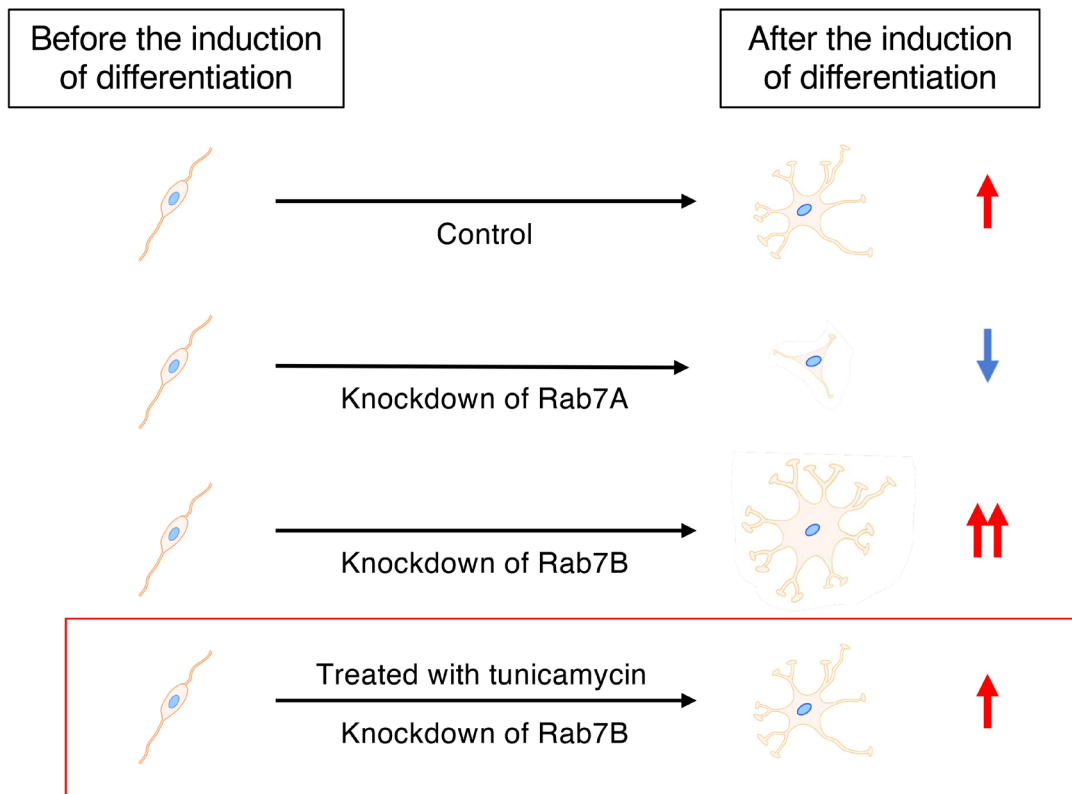


図 2. Rab7 が分化における役割とツニカマイシン誘発ストレスシグナリングの回復への潜在的応用の概念図

2.2. はじめに

Rab タンパク質は Ras スーパーファミリーに属する低分子量 GTP 結合タンパク質である。これらは細胞内小胞輸送を媒介し、同種の標的膜や小胞と融合することで基本的な細胞機能を制御するマスターレギュレーターとして機能する[1-3]。Rab タンパク質は小胞体、ゴルジ体、ゴルジ体と小胞体の中間体、初期エンドソーム、リサイクリングエンドソーム、後期エンドソームなど、それぞれの小器官に局在する[1-4]。これらの細胞内小胞や成分を区別するために、60 種以上の Rab タンパク質が存在する[1-4]。特に、Rab7A と Rab42 (Rab7B と呼ばれる) は、リソソームや後期エンドソーム周辺の膜輸送に特異的に関与する。Rab7A は広範囲に研究されており、Rab7A と Rab7B はリソソームの生合成、位置決め、機能だけでなく、細胞表面の受容体や接着分子の輸送や分解にも関与する[3, 4]。Rab7A は後期エンドソームとリソソームに特異的に局在し、Rab7B はゴルジ体ネットワーク、後期エンドソーム、リソソームに局在する[5-10]。

発生過程で、中枢神経系のオリゴデンドロサイトと末梢神経系のシュワン細胞が分化した細胞膜からミエリン鞘が形成される。ミエリン膜は神経細胞の軸索を包み込み、何層にも重なったミエリンとなる[11-14]。成熟したミエリンは活動電位の伝導を助けるだけでなく、酸化的ストレス、機械的損傷、炎症などの多様なストレス要因から軸索を保護し、神経軸索への栄養供給にも寄与する[11-16]。

Rab タンパク質がオリゴデンドロサイト細胞の形態分化をどのように制御しているかはまだ不明であり、特に Rab7 サブファミリーの具体的な役割も明らかでない。本章では、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化モデルである FBD-102b 細胞を使用し、Rab7A と Rab7B が形態分化を異なる方法で制御していることを示す[17-20]。特に、Rab7B のノックダウンが分化を大きく促進することが明らかとなった。この発見は、疾患に伴う未分化状態の回復の可能性を示唆しており、実際に Rab7B のノックダウンは、ツニカマイシン処理によって誘導された未分化形態の回復させた[21, 22]。小胞体ストレスは、PMD などの神経変性疾患で見られる主要な病理学的原因であり、PMD のオリゴデンドロサイトはしばしば分化不全の表現型を示す[12, 23, 24, 25, 26]。この知見は、PMD や他のオリゴデンドロサイト疾患の治療に向けた新たなターゲットとなる可能性を示唆している。

2.3 材料と方法

2.3.1. 抗体および化学物質

抗体および化学物質の詳細は表1に示す。

試薬や原材料	製造会社または供給源	カタログ番号	ロット番号	使用濃度
抗体				
Anti-proteolipid protein 1 (PLP1)	Atlas Antibodies	HPA004128	8115828	イムノブロット法 (IB), 1/500
Anti-myelin basic protein (MBP)	BioLegend	836504	B225469	IB, 1/500
Anti-actin (pan-β type)	MBL	M177-3	007	IB, 1/5,000
Anti-c-Jun N-terminal kinase (JNK, pan-JNK [p54 isoforms])	Santa Cruz Biotechnology	sc-7345	J2521	IB, 1/1,000
Anti-phospho-c-Jun N-terminal kinase (pJNK, pan-pJNK [phosphorylated p54 isoforms])	Santa Cruz Biotechnology	sc-6254	c1722	IB, 1/1,000
Anti-CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein (CHOP, GADD153)	PGI Proteintech Group, Inc.	15204-AP	00117318	IB, 1/1,000
Anti-Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5 (BIP, GRP78)	PGI Proteintech Group, Inc.	11587-AP	00085813	IB, 1/1,000
主要な化学物質				
Tunicamycin	Cayman chemical company	11445	0637439-4	100 ng/ml
DMSO	Wako	047-29353	CDN0170	0.1%以下
Dithiothreitol (DTT)	Nacalai Tesque	14128-46		1 mmol/L
主要な試薬				
ScreenFect™ siRNA Transfection Reagent	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	292-75013	CAM0357	☐製造会社の指示に従った
ScreenFect™ Dilution Buffer	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	194-18181	SKF5794	☐製造会社の指示に従った
ImmunoStar Zeta	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	295-72404	WTL5319	☐製造会社の指示に従った
Chemi-Lumi One Ultra	Nacalai Tesque	11644-40	L2P1314	☐製造会社の指示に従った
Skim Milk Powder	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	190-12865	SKG4901	☐製造会社の指示に従った
Western Blotting (WB) Stripping Solution	Nacalai Tesque	05364-55	L5M5218	☐製造会社の指示に従った
Gflex DNA Polymerase	TaKaRa Bio (滋賀, 日本)	R060A	AL80564A	☐製造会社の指示に従った
2×Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	☐製造会社の指示に従った
ISOGEN	Nippon Gene (東京, 日本)	311-02501	75009K	☐製造会社の指示に従った
Sample Buffer Solution (plus 2-Mercaptoethanol) (4-fold mixtures)	FUJIFILM Wako Pure Chemical Co	191-13272	WDP4995	☐製造会社の指示に従った
5×Prime Script Master Mix	TaKaRa Bio	RR036A	AIE0440A	☐製造会社の指示に従った
Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Nacalai Tesque	02525-35	L9M9989	☐製造会社の指示に従った
Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Cosmo Bio	PM1500	PM1500211500-5	☐製造会社の指示に従った
ExcelBrand 3-color Regular Range Protein	SMO SMOBIO TECHNOLOGY, INC	PM2500-2	PM25002112601-2	☐製造会社の指示に従った
使用した細胞				
FBD-102b cells (mouse oligodendrocyte progenitor cells)	Dr. Yasuhiro Tomo-oka (東京理科大学, 千葉, 日本)	該当なし	該当なし	
siRNA配列 (5'から3')				
Sense chain for siLuciferase (Control siRNA) GCCAUUCUUAUCCUCUAGAG-dTdT Antisense chain for siLuciferase (Control siRNA) CUCUAGAGGAUAGAAUGGC-dTdT	Yamauchi, J. et al. Exp. Cell Res. (2009) 315:2043-2052	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9a-97th GAUUCACAGCUCUCCACA-dTdT Antisense chain for siRab9a-97th UGUGAAGAGCGUGGGAUC-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9a-142th GAUCUGGAGGUGGACGGAC-dTdT Antisense chain for siRab9a-142th GUCCGUCCACCUCCAGAU-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9a-166th GUUACCAUGCAGAUUGGG-dTdT Antisense chain for siRab9a-166th CCCAAUUGCAUGGUAAC-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9b-142th GAUCUGGAGGUGGACGGAC-dTdT Antisense chain for siRab9b-142th GUCCGUCCACCUCCAGAU-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9b-199th GAACGCUUCCGAAGCCUGA-dTdT Antisense chain for siRab9b-199th UCAGGCUUCGGAAGCGUUC-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense chain for siRab9b-212th GCCUGAGGACCCAUUUUA-dTdT Antisense chain for siRab9b-212th UAAAUGGCGUCCACAGGC-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
PCRプライマー (5'から3')				
Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGGCTGGTC Antisense primer for actin (internal control) CTAGAAGCACTTGGGTGCAGATGGAG	Kato, Y. et al. Exp. Cell Res. (2021) 405:112654	該当なし	該当なし	50 nM
Sense primer for Rab9a GTTGGCAAGAGTTCTTATGAACAG Antisense primer for Rab9a ACAGCAAGATGAGTTGGCTTG	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Sense primer for Rab9b ATGGCAGGAAAATCGTCTTTTTAAATAATCTCTTGG Antisense primer for Rab9b TCAACAGCAAGATGAGTTGGCTTGG	本論文	該当なし	該当なし	50 nM

表1. 使用した抗体及び化学物質の詳細

2.3.2. siRNA とプライマーの塩基配列と PCR 技術

siRNA とプライマーの塩基配列は表 1 に示した。逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) では、cDNA を ISOGEN (NIPPON GENE, 東京、日本) から抽出した全 RNA から PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio, 京都、日本) を使用して調製した。メーカーの説明に従い、RT 産物からの PCR 増幅は Gflex DNA Polymerase (Takara Bio, 京都、日本) を使用し、98°C での変性反応 (0.2 分)、アニーリング温度に応じて 56~65°C でのアニーリング反応 (0.25 分)、68°C での伸長反応 (0.5 分) からなるサイクルを 30~36 回行った。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル (Nacalai Tesque, 京都、日本) にロードし、ゲル電気泳動で解析した。

2.3.3. 細胞培養、分化、トランスフェクション

FBD-102b 細胞 (東京理科大学・岡友博博士より提供) は、オリゴデンドロサイト前駆細胞株に属し [15-18]、10% 熱不活性化ウシ胎児血清 (FBS) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 混合培地 (Nacalai Tesque, 京都、日本) で、通常の培養皿 (Nunc ブランド、Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 上で培養した。ペニシリンとストレプトマイシンの混合溶液 (Nacalai Tesque, 京都、日本) を含む、5% CO₂、37°C の条件下で培養を行った [16, 18]。ScreenFect siRNA transfection kit (FUJIFILM, 東京、日本) を使用し、dTdT で合成した 21-mer siRNA で細胞をトランスフェクトし、トランスフェクションの 4 時間後に培地を交換した。分化を誘導するため、細胞をポリリジン (Nacalai Tesque, 京都、日本) でコートした培養皿 (Greiner Bio-One, Oberösterreich, Austria) 上で、FBS を含まない培養液中、5% CO₂、37°C で 3 日間培養した [15-18]。一次突起を持たない細胞をカテゴリー 1、一次突起を持つ細胞をカテゴリー 2、一次突起から分岐した二次突起やミエリン膜様の広範な突起を持つ細胞をカテゴリー 3 と分類した。

2.3.4. 細胞溶解とイムノブロットティング

細胞を溶解バッファー (50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethane sulfonylfluoride, 1 μ g/ml of leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, and 0.5% NP-40) で溶解し、遠心分離して細胞溶解液として回収した。その上清をサンプルバッファー (Nacalai Tesque, 京都、日本) で変性した後、あらかじめ作製したドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (Nacalai Tesque, 京

都、日本)で分離した。電気泳動で分離したタンパク質を、ろ紙 (FUJIFILM, 東京、日本)で挟んだ PVDF 膜 (FUJIFILM, 東京、日本)に移し、スキムミルクブロッカー (FUJIFILM, 東京、日本)でブロッキングした後、一次抗体を用いてイムノブロットィングを行い、続いてペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いた。CanoScan LiDE400 イメージスキャナー (Canon, 東京、日本)でペルオキシダーゼ反応性バンドを X 線フィルム (FUJIFILM, 東京、日本)に取り込んだ後、UN-SCAN-IT ソフトウェア (Silk Scientific, Orem, UT, USA)を用いてデジタルスキャンした。定量された免疫反応性バンド(3 ブロット)は、Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて、100%に設定したコントロールの免疫反応性バンドと比較した。

2.3.5. 統計解析

実験データは平均値±標準偏差 (SD) で示され、グループ間の比較は Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) を使用して独立した Student's t-test で行った。p 値が 0.05 未満であれば、結果を統計的に有意と判断した。

2.3.6. 倫理に関する記述

in vitro および in vivo での遺伝子組換え技術を、東京薬科大学遺伝子・動物愛護委員会が承認したプロトコール (承認番号 LS28-20 および LSR3-011) に従って実施した。

2.4. 結果

2.4.1. Rab7A は形態分化に正の影響を与える

Rab7A がオリゴデンドロサイトの形態分化の調節に関与しているかを調べるために、FBD-102b 細胞に Rab7A 特異的な siRNA (図 3 参照) をトランスフェクトした。Rab7A のノックダウンは、対照のルシフェラーゼと比較して、形態分化を抑制した (図 4、A および B)。これらの変化は、分化および髄鞘形成マーカータンパク質の MBP および PLP1 の発現レベルが減少したことによって確認した (図 5、A および B)。対照的に、アクチンの発現レベルは、Rab7A ノックダウン細胞と対照ノックダウン細胞で変化がないことから、Rab7A が形態分化を促進する役割を果たしていることを示唆している。

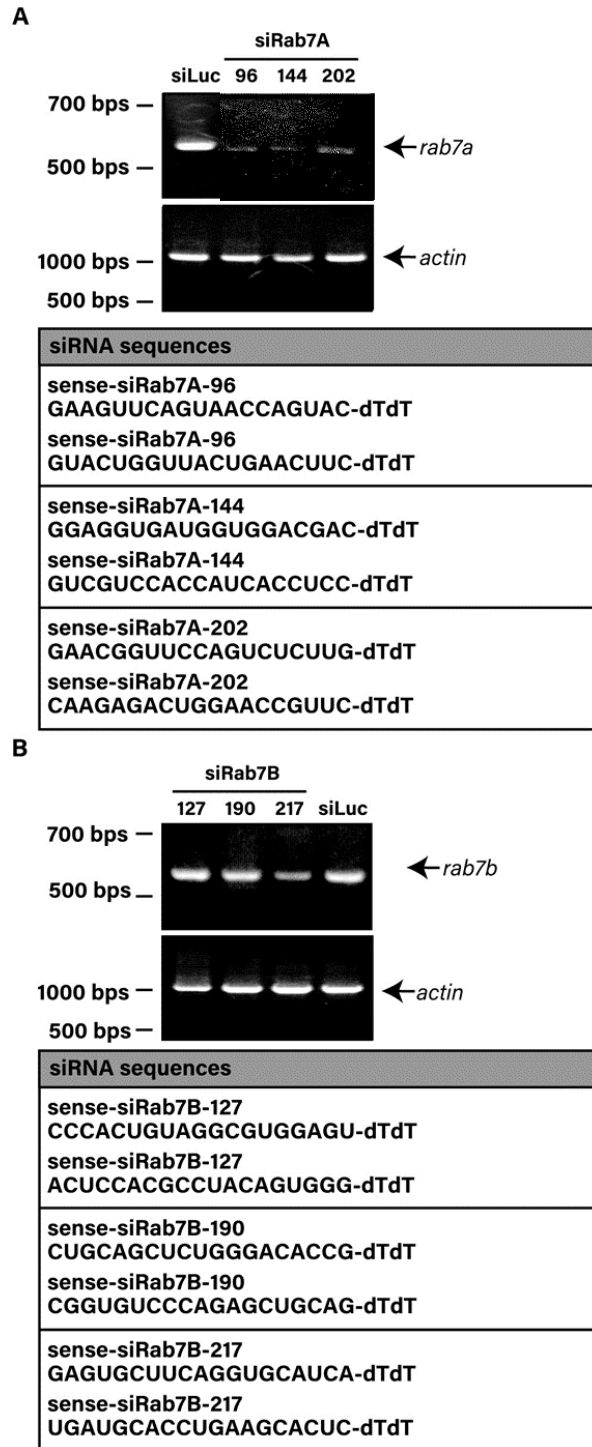


図 3. FBD-102b 細胞における Rab7A および Rab7B siRNA のノックダウン効率の比較
 A, B. FBD-102b 細胞に、製造業者の指示に従って各 siRNA (siRNA 番号は A1TG3 から
 のヌクレオチドを示す) をトランスフェクションした。それぞれのトータル RNA を用
 いて逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応を行い、各ノックダウン効率を評価した。Rab7A
 siRNA の 96 番と Rab7B siRNA の 217 番を実験に使用した。

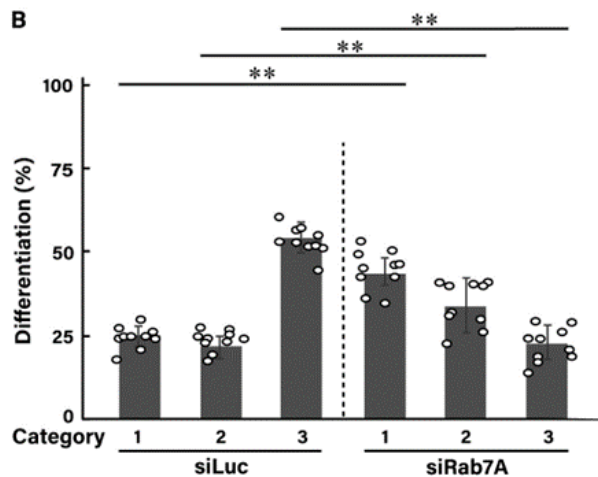
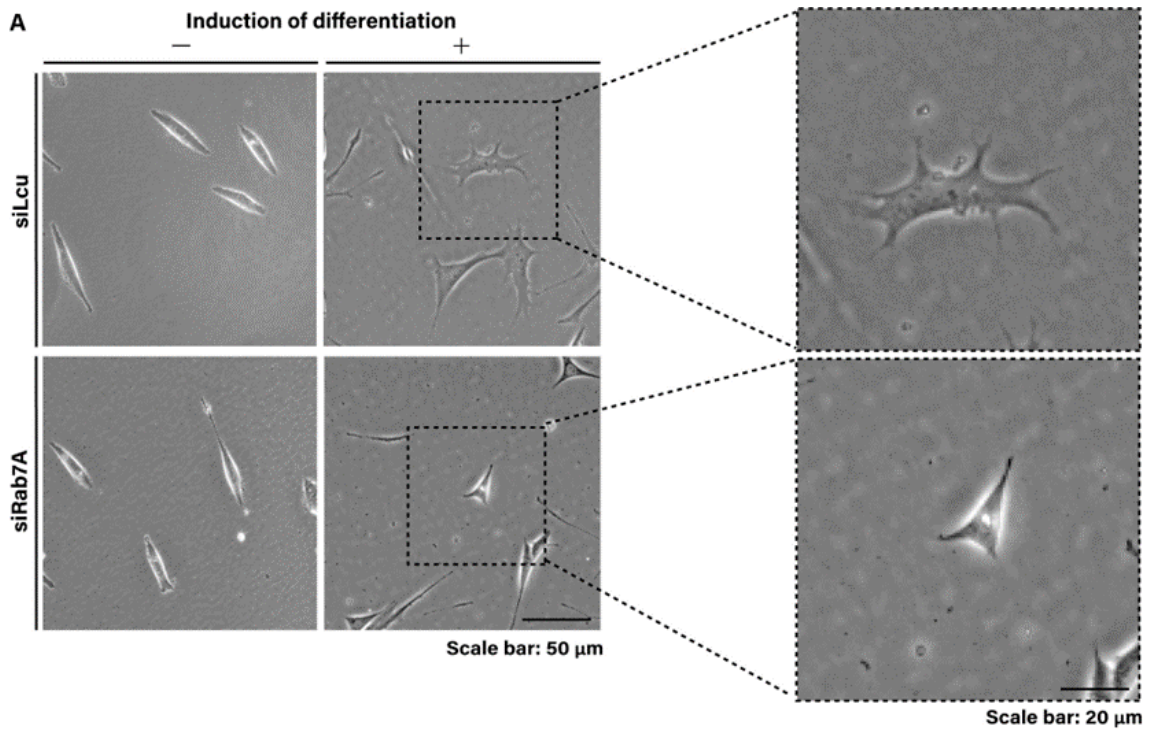


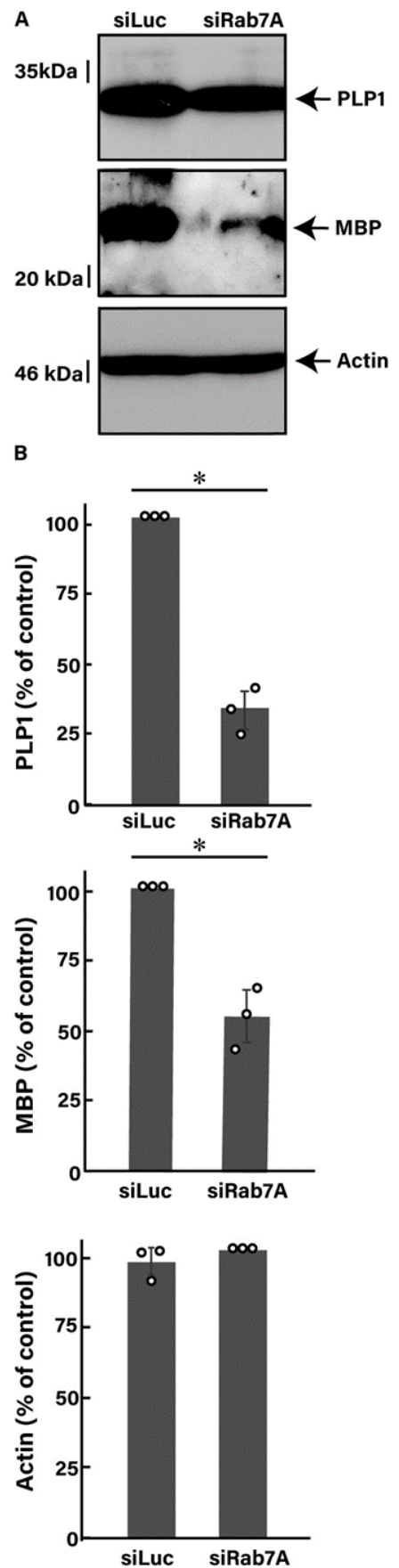
図 4. Rab7A のノックダウンはオリゴデンドロサイトの形態分化を抑制する

A. FBD-102b 細胞に対して、コントロールのルシフェラーゼまたは Rab7A の siRNA をトランスフェクションした。分化を促すか否かの条件 (+ 分化、- 分化なし) で 3 日間培養した。代表的な細胞画像 (黒線で示されている) から拡大した画像も図に示した。

B. 分化の状態により、一次突起を持たない細胞はカテゴリー1 として、一次突起を持つ細胞はカテゴリー2、一次突起から分岐する二次突起を持つ細胞や広範な膜を持つ細胞はカテゴリー3 として分類した。各カテゴリーに属する細胞は顕微鏡下で数え、その割合を示した。分化の促進またはコントロール条件下で 3 日後に、統計的評価を行った (** $p < 0.01$; $n = 10$ フィールド [合計 480 細胞]) 。

図5. Rab7A のノックダウンはオリゴデンドロサイト分化マーカータンパク質の発現を減少させる

A, B. 細胞にコントロールのルシフェラーゼまたは Rab7A の siRNA をトランスフェクションした。分化誘導後、細胞を溶解し、プロテオリピドタンパク質 1 (PLP1)、ミエリン基本タンパク質 (MBP)、またはコントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロットィングを行い、統計的評価を実施した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。



2.4.2. Rab7B は形態分化に負の影響を与える

次に、FBD-102b 細胞に Rab7B 特異的な siRNA (図 3 参照) をトランスフェクトした。Rab7B のノックダウンは、コントロールのルシフェラーゼと比較し、オリゴデンドロサイトの形態分化を促進した (図 6、A および B)。また、ノックダウンは分化および髄鞘形成マーカータンパク質の発現レベルを増加させたが、対照タンパク質の発現レベルには影響を与えなかった (図 7、A および B)、これは Rab7B が形態分化に抑制的な役割を果たしていることを示している。

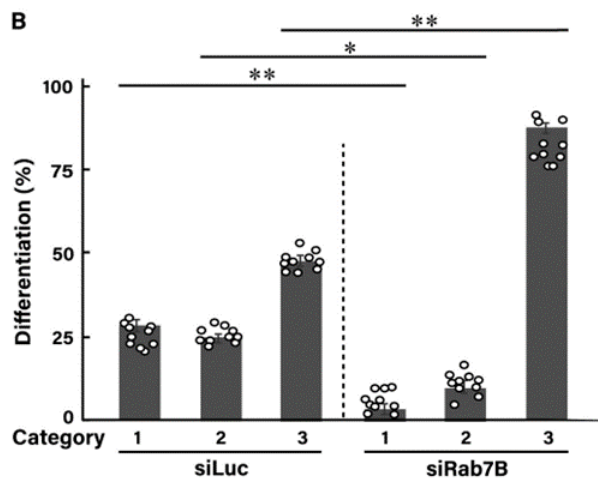
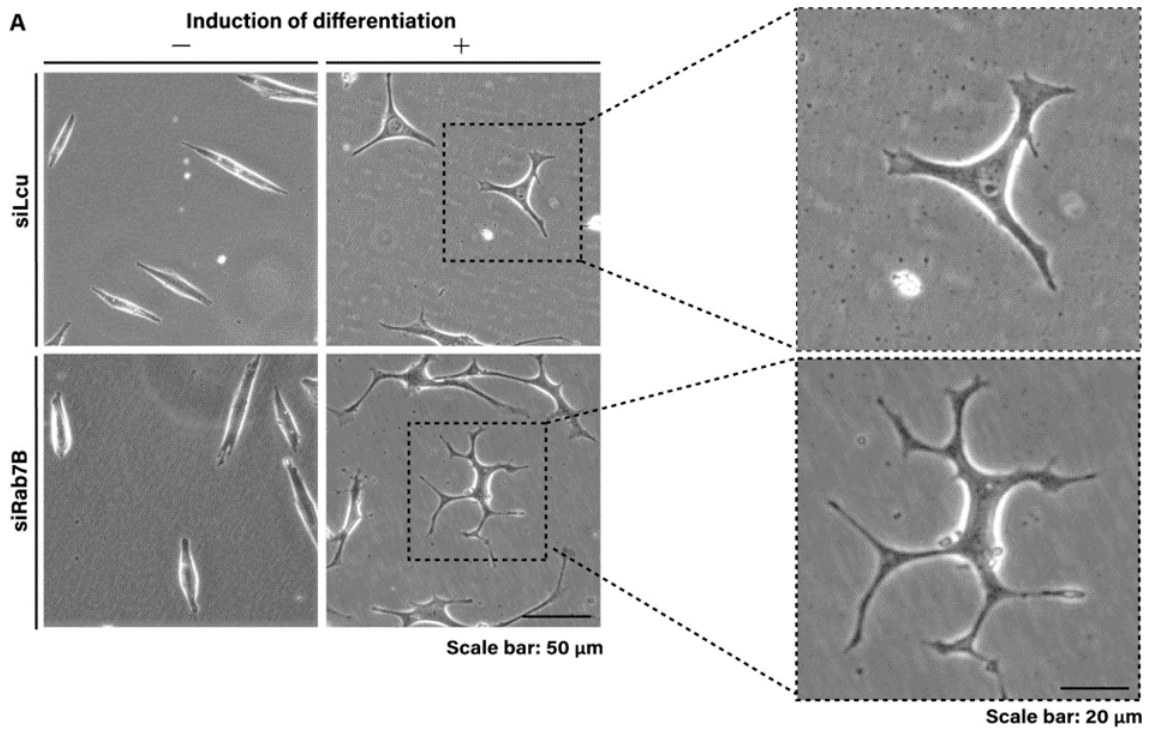


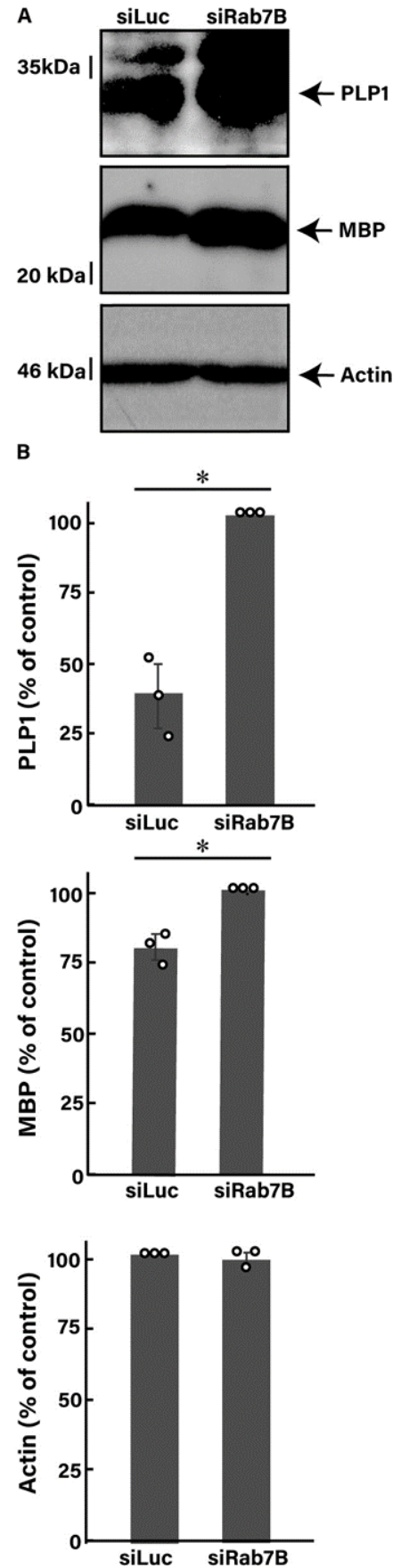
図 6. Rab7B のノックダウンは形態分化を著しく促進する

A. FBD-102b 細胞に対して、コントロールのルシフェラーゼまたは Rab7B の siRNA をトランスフェクションした。分化を促すか否かの条件 (+ 分化、- 分化なし) で3日間培養した。代表的な細胞画像 (黒線で示されている) から拡大した画像も図に示した。

B. 分化の促進またはコントロール条件下での3日後に、統計的評価を行った (** $p < 0.01$ および * $p < 0.05$; $n = 10$ フィールド [合計 520 細胞])。各分化カテゴリーに属する細胞はその割合で示した。

図 7. Rab7B のノックダウンは分化マーカータンパク質の発現増加を著しく促進する

A, B. 細胞にコントロールのルシフェラーゼまたは Rab7B の siRNA をトランスフェクションした。分化誘導後、細胞を溶解し、プロテオリポドタンパク質 1 (PLP1)、ミエリン基本タンパク質 (MBP)、またはコントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した (* $p < 0.05$; $n = 3$ プロット)。



2.4.3. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発の形態分化の抑制を回復させる

Rab7B の結果から、Rab7B のノックダウンが、疾患状態などで抑制された形態分化を回復するのに役立つ可能性が示唆された[25, 26]。ツニカマイシンを用いて小胞体ストレスを誘導し[21, 22]、オリゴデンドロサイトおよび多くの神経疾患でよく見られる細胞病態を模倣した[23, 24]。実際に、ツニカマイシンは FBD-102b 細胞において用量依存的に形態分化を抑制した (図 8)。さらに、ツニカマイシンは小胞体ストレスシグナルの発現を増加させ、JNK と eIF2A のリン酸化レベルを上昇させた。JNK および eIF2A のリン酸化は小胞体ストレスシグナリングの主要な下流である[29, 30]一方、JNK および eIF2A 自体の発現レベルには影響を与えなかった。予想された通り、実験条件下で、Rab7B のノックダウンはツニカマイシンによって誘導された形態分化の抑制を回復させた (図 9, A および B)。また、分化マーカータンパク質の発現レベルが増加したことから、Rab7B が小胞体ストレス誘発の形態分化抑制を回復させる効果的なターゲットであることが示された (図 10, A および B)。一方、Rab7A のノックダウンは、ツニカマイシンによる形態分化の抑制効果 (図 11) やマーカータンパク質の発現レベルの変化 (図 12) を回復させることができなかった。

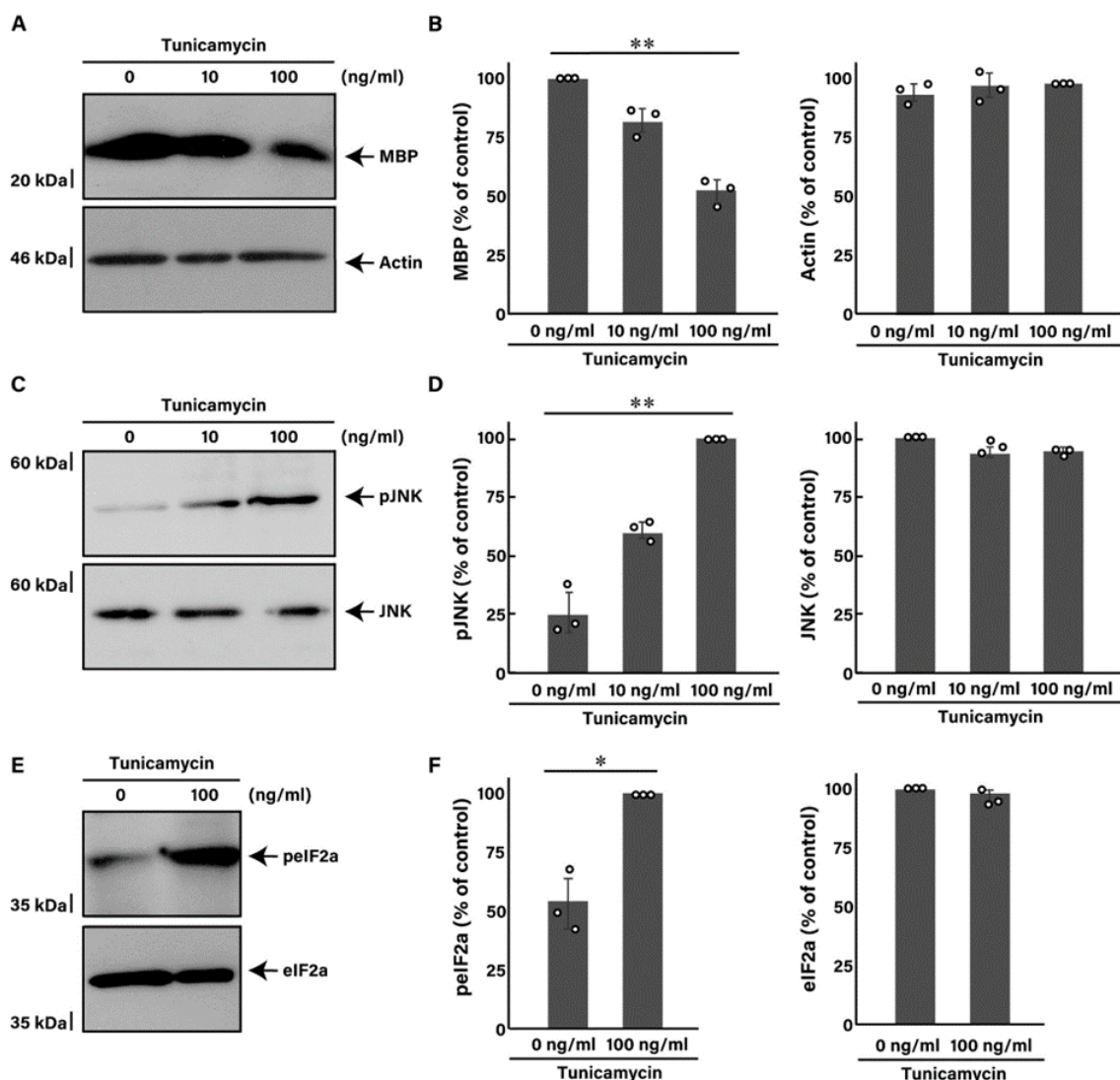


図 8. ツニカマイシンの小胞体ストレス誘導剤としての影響

A, B. FBD-102b 細胞にツニカマイシンまたはコントロールのそれぞれの濃度をトランスフェクションした。細胞を溶解し、ミエリン基本タンパク質 (MBP) またはコントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的に評価した ($p < 0.01$; $n=3$ プロット)。C-F. 同じ条件で、リン酸化 c-Jun N 末端キナーゼ (pJNK)、c-Jun N 末端キナーゼ (JNK)、リン酸化真核翻訳開始因子 2A (peIF2A)、または真核翻訳開始因子 2A (eIF2A) に対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的に評価した ($p < 0.01$; $n=3$ プロット)。

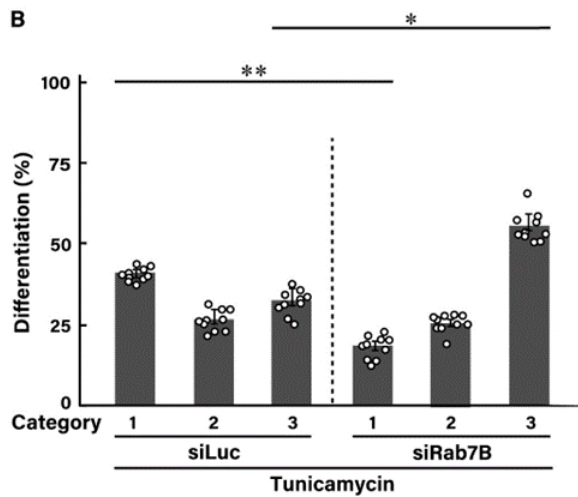
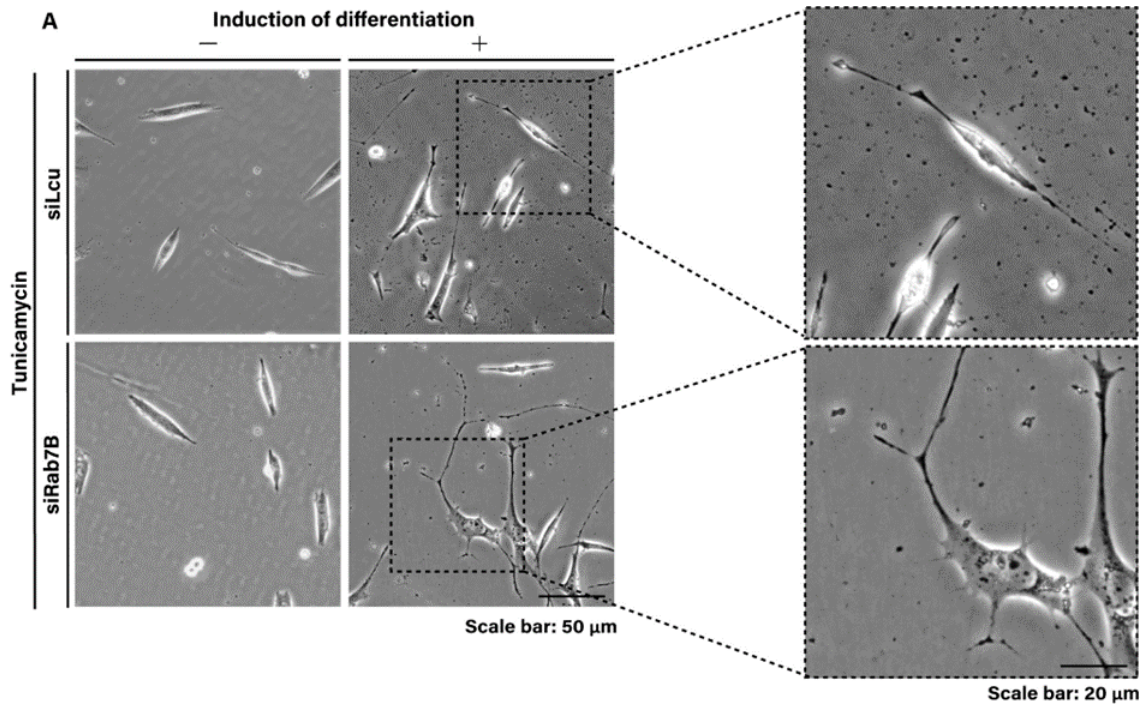


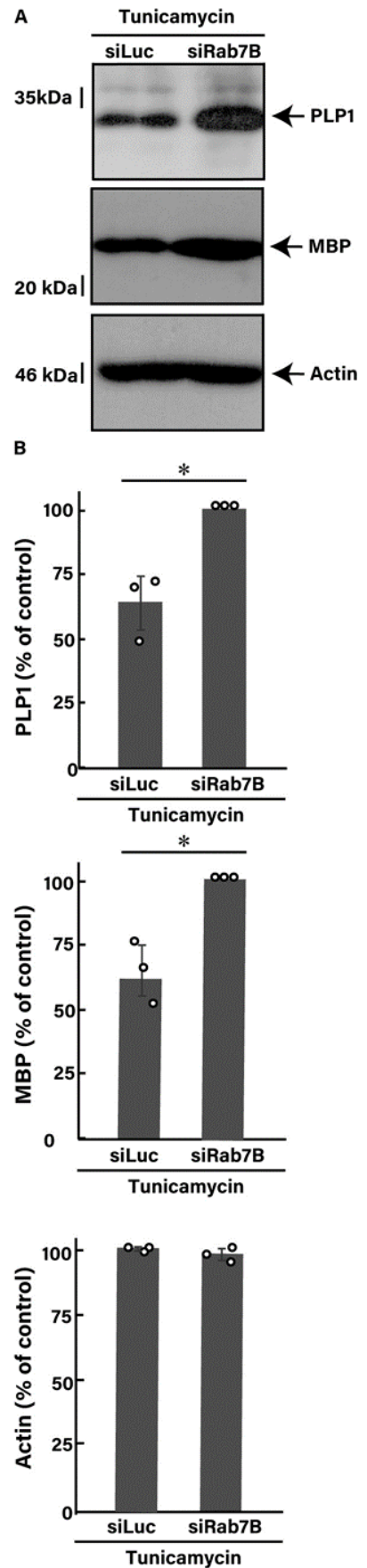
図 9. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発小胞体ストレスによる形態分化抑制を回復する

A. Rab7B の siRNA をトランスフェクションした細胞にツニカマイシン (100 ng/ml) を投与した。細胞は分化を促すか否かの条件 (+ 分化、- 分化なし) で 3 日間培養した。代表的な細胞画像 (黒線で示されている) から拡大された画像も図に示した。

B. 分化の促進またはコントロール条件下での 3 日後に、統計的評価を行った (** $p < 0.01$ および * $p < 0.05$; $n = 10$ フィールド [合計 512 細胞])。各分化カテゴリーに属する細胞はその割合で示した。

図 10. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発小胞体ストレスによる分化マーカータンパク質の発現減少を回復する

A, B. Rab7B の siRNA をトランスフェクションした細胞にツニカマイシン (100 ng/ml) を投与し、分化誘導後、細胞を溶解し、プロテオリピドタンパク質 1 (PLP1)、ミエリン基本タンパク質 (MBP)、またはコントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロットィングを行い、統計的評価を実施した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。



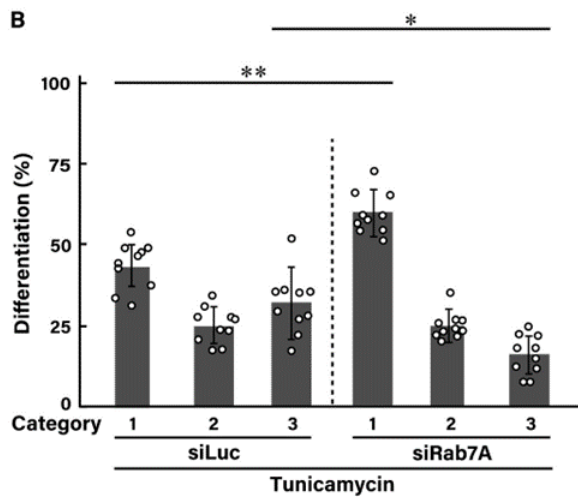
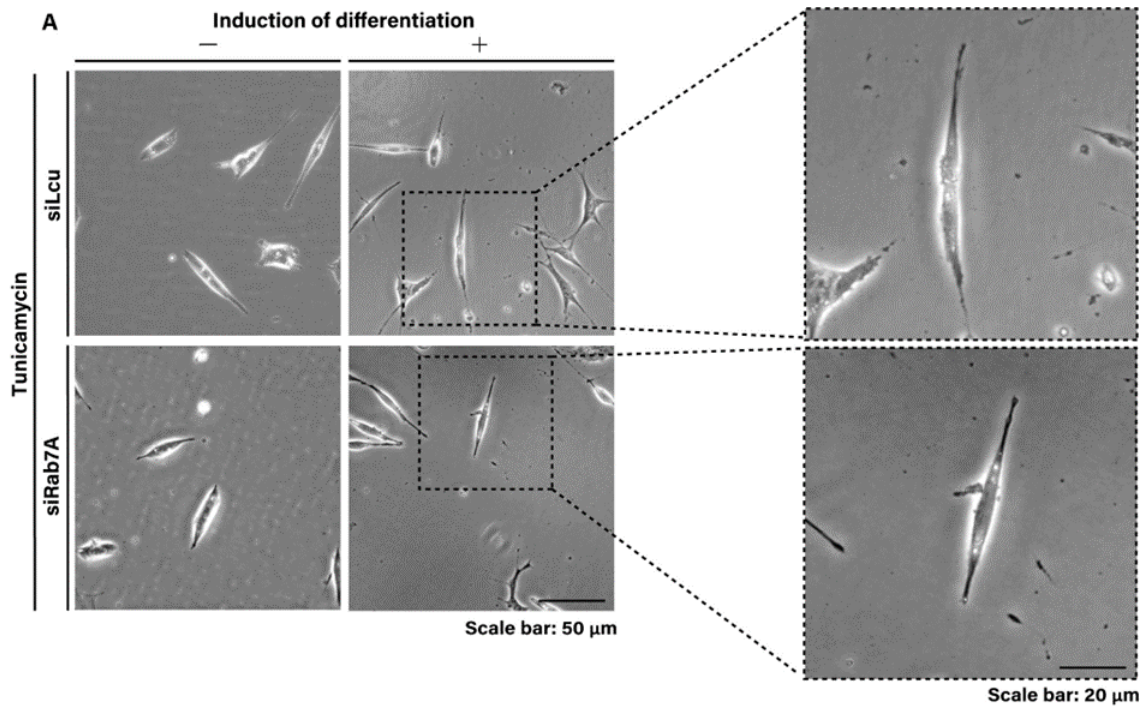
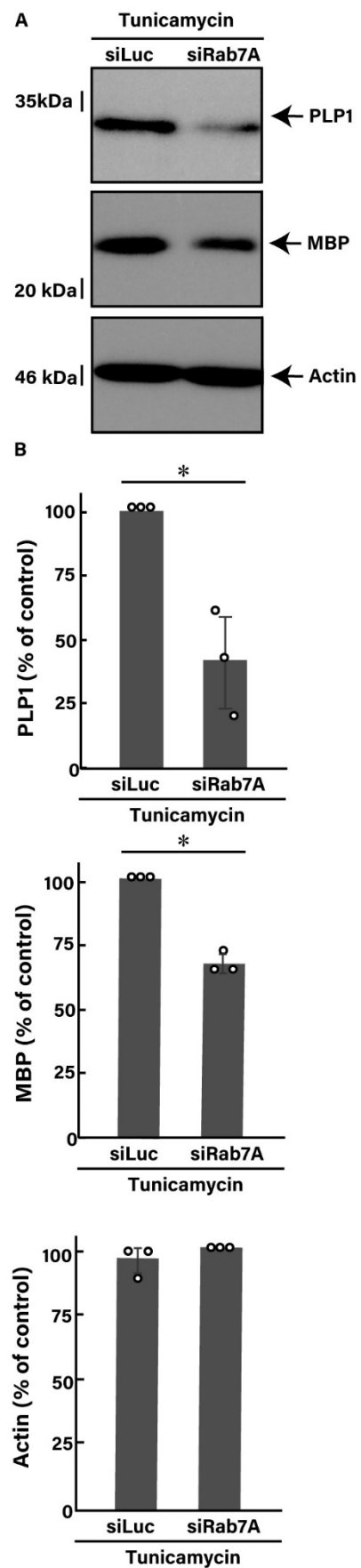


図 11. Rab7A のノックダウンはツニカマイシンによる形態分化抑制を回復しない
 A, B. FBD-102b 細胞に Rab7A の siRNA をトランスフェクションし、ツニカマイシンを投与した。代表的な細胞画像 (黒線で示されている) から拡大された画像も図に示した。分化した細胞は統計的に評価した (**, $p < 0.01$ および *, $p < 0.05$; $n = 10$ フィールド)。

図 12. Rab7A のノックダウンはツニカマイシンによる
分化マーカータンパク質発現の抑制を回復できない

A, B. 細胞に Rab7A の siRNA をトランスフェクションし、ツニカマイシンを投与した。細胞を溶解し、プロテオリピドタンパク質 1 (PLP1)、ミエリン基本タンパク質 (MBP)、またはコントロールのアクチンに対する抗体を使用してイムノブロッティングが行われ、統計的に評価された (*, $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。



2.4.4. Rab7B のノックダウンがツニカマイシン誘発の小胞体ストレスシグナリングを回復させる

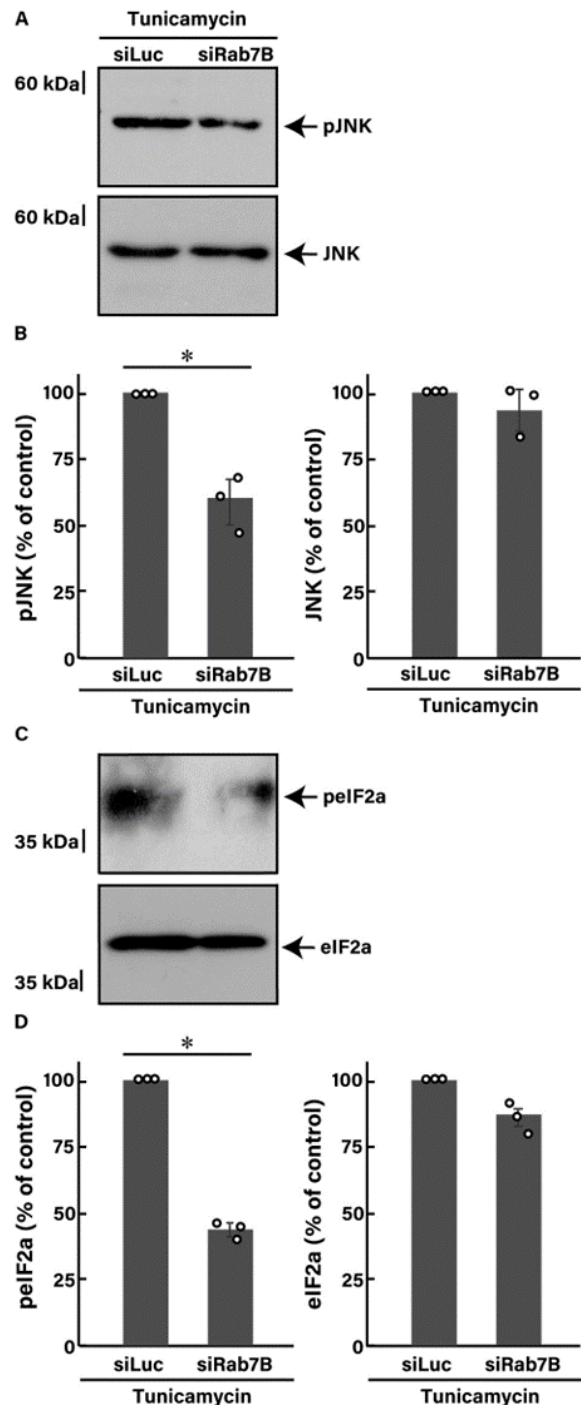
最後に、Rab7B のノックダウンが小胞体ストレスシグナルを回復するかどうかを検討した。Rab7B のノックダウンは細胞内で JNK および eIF2A のリン酸化レベルを減少させたが、JNK および eIF2A の発現レベルには変化を与えなかった (図 13、A および B)。これらの結果と併せて、Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発の小胞体ストレスに対して効果的であると考えられる。

さらに、Rab7B のノックダウンは小胞体ストレス条件下でキナーゼ活性の増加に関わる HSPA5 タンパク質の発現レベルを減少させた。HSPA5 は Rab7B ノックダウンによる小胞体ストレスシグナリングの回復を目指すターゲットである可能性が高い [29]。

図 13. Rab7B のノックダウンはツニカマイシン誘発小胞体ストレスシグナリングを回復する

A, B. Rab7B の siRNA をトランスフェクションした細胞にツニカマイシン (100 ng/ml) を投与し、分化誘導後、細胞を溶解し、リン酸化 c-Jun N 末端キナーゼ (pJNK) または c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) に対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した (** $p < 0.01$; $n = 3$ ブロット)。

C, D. これと同じ条件で、リン酸化真核翻訳開始因子 2A (peIF2A) または真核翻訳開始因子 2A (eIF2A) に対する抗体を使用してイムノブロッティングを行い、統計的評価を実施した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。



2.5. 考察

Rab7A と Rab7B はさまざまな細胞や組織で広く発現し、後期エンドソームとリソソーム間の輸送システムの調節に直接関与している[31-34]。したがって、Rab7 サブファミリー分子の機能不全は、タンパク質の状態を制御するための細胞内輸送システムの不全に直接関連していると考えられる[31-34]。また、この不全は細胞の恒常性におけるオートファジーの不具合とも関連している[31-34]。さらに、基本的な細胞代謝のマスターレギュレーターである mTOR に関連したリソソームシグナリングの減少が見られる[35, 36]。したがって、Rab7 は基本的な細胞機能の多くの側面にとって重要であると考えられる。

実際に、Rab7A の特定のアミノ酸突然変異は、末梢神経系で進行性神経障害を引き起こす。これにはシャルコー・マリー・トゥース病型 2B (CMT2B) が含まれ、その共通の特徴は遠位感覚の喪失、難治性の足の潰瘍などである[37-40]。特に注目すべきは、すべての Rab7A 突然変異が一貫して恒常的に Rab7A の活性化を引き起こすことである[40, 41]。後期エンドソームとリソソーム間の輸送を含む細胞生理機能を円滑にするため、Rab タンパク質は通常、活性型の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型の間でサイクルを必要とする[1-3]。このスイッチングサイクルは関連する小胞の輸送に不可欠である[1-3]。したがって、GTP ロックされた Rab7A が細胞内で小胞のリサイクルを阻害すると推定されるが、GTP ロックされた Rab7A が特に末梢神経障害を引き起こす理由はまだ明らかではない。さらに、Rab7B の突然変異が CMT2B や他の末梢神経障害を引き起こすかどうか未解明である。本研究では、オリゴデンドロサイト前駆細胞の分化モデルである FBD-102b 細胞に Rab7A をノックダウンすると形態分化が抑制されることを初めて記述し、Rab7A が分化に必要であることを示した[18, 42]。我々は以前、中枢神経系の神経細胞分化モデルとしてしばしば使用される N1E-115 細胞で、GTP ロックされた Rab7A が神経細胞の形態分化を抑制することを報告した[18, 42]。中枢神経系では、Rab7A は神経細胞とグリア細胞の形態分化において重要な役割を果たす。さらなる研究により、Rab7A が中枢神経系の疾患に対する影響を持つかどうかを明らかにすることができると予想される。さらに、後期エンドソームとリソソーム間だけでなく、トランスゴルジネットワークにおける輸送システムの調節にも Rab7B が関与すると考えられる[5-9]。Rab7B は特に後期エンドソームとトランスゴルジネットワーク間の小胞トラフィックを調節する[5-9]。今回の研究では、細胞において Rab7B をノックダウンするとオリゴデンドロサイトの形態分化

が促進されることを示し、Rab7B が分化の負の調節因子であることを明らかにした。この原因は、後期エンドソームとトランスゴルジネットワーク間の逆行性輸送がオリゴデンドロサイトにとって不必要な輸送経路を提供するためであると考えられるが、この逆行性輸送システムの正確な細胞内役割についてはまだ解明されていない。成熟したミエリン鞘は通常、ミエリン形成前の細胞膜の総面積よりもはるかに大きくなるため、細胞内でのミエリン成分の輸送システムは非常に活性化されると考えられる。その結果、順行性の輸送システムが逆行性輸送よりも優先される可能性がある。さらに、Rab7B はオリゴデンドロサイトにおいて特有の機能を果たすかもしれない。Rab7A は Rab-リソソーム相互作用タンパク質である RILP (Rab-interacting lysosomal protein) などのエフェクターと結合し、100 種以上の結合パートナーを持つことが BioGRID ウェブサイトで確認できる。しかし、Rab7B とこれらのタンパク質との相互作用はまだ十分に調査されていない。一部のエフェクタータンパク質は特異的に Rab7A にのみ結合し、他は Rab7B にのみ結合する可能性がある。これまでに知られていない分子メカニズムとして、Rab7B と Rab7A が形態形成を拮抗的に調節する可能性がある。オリゴデンドロサイトに関連する疾患（オリゴデンドロパチーとも呼ばれる）は深刻であり、その治療標的分子はしばしば未知である。その一つである PMD (Pelizaeus-Merzbacher disease、または大脳白質形成不全症 (Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1) とも呼ばれる) は、運動調整や技能、知的機能の低下を伴う進行性の中樞神経系疾患である [25, 26]。PMD はミエリン膜の主要なタンパク質をコードする *plp1* 遺伝子の増加を含む様々な遺伝子変異と関連しており、これにより PLP1 が小胞体内に蓄積し、タンパク質の折りたたみ不全が起こる。これが小胞体ストレスを引き起こし、オリゴデンドロパチーの細胞病理的表現型を引き起こすと考えられる [21, 23, 25, 26]。未分化または低髄鞘化したオリゴデンドロサイト細胞が増加するのは、このためであると考えられる。実際に、小胞体ストレスを減少させる化学物質は、ツニカマイシンなどの小胞体ストレス誘発因子による病理的表現型を逆転させる可能性がある [22]。我々は、Rab7B のノックダウンが小胞体ストレスによる分化不全を促進するだけでなく、小胞体ストレスを減少させる効果も持つという仮説を立て、これに基づいて研究を進めてきた。ここで、Rab7B のノックダウンが実際にツニカマイシン誘発の分化不全を回復し、さらに小胞体ストレスも減少させることを発見した。

この研究の最後に残された疑問は、Rab7B が小胞体ストレスをどのように制御しているかという点である。Mateus et al. による報告では、Rab7B が人間の上皮細胞および上皮様細

胞で小胞体ストレスと密接な関係があることが示されている[43]。Rab7A のノックダウンまたはドミナントネガティブ変異体の発現は細胞周辺ヘシート状の小胞体構造を拡大させる。この抑制は、小胞体ストレスを引き起こし、小胞体の拡大を誘導するが、Rab7A の再発現は実験条件下で小胞体ストレスを軽減し、拡大した小胞体の表現型を救済する。このことから、Rab7A は小胞体の恒常性維持に重要な役割を担っている可能性が高い。さらに、エンドリソソームは、Rab7 およびリソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP1) の両方の抗原に陽性で、過剰なストレスを受けた小胞体を取り込む[44]。エンドリソソームが特定の小胞体を取り込んでいくかは明確ではないが、ストレスが高い小胞体を取り込んで細胞の恒常性を維持する可能性がある。これらのプロセス中、Rab7A は小胞体を中心とした細胞の恒常性を仲介する可能性が高い。Rab7B が小胞体ストレスをどのように調節するかを決定することは、我々の研究から、Rab7B が HSPA5 タンパク質の発現レベルを維持することで、小胞体ストレス信号伝達の中心的な調節因子としての役割を果たすことを示唆している[45, 46]。

2.6. 引用文献

1. Pfeffer, S. R., Soldati, T., Geissler, H., Ranaño, C., Dirac-Svejstrup, B. Selective membrane recruitment of Rab GTPases. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1995 60:221-227
2. Ng, E. L., Tang, B. L. Rab GTPases and their roles in brain neurons and glia. *Brain Res. Rev.* 2008 58:236-246
3. Homma, Y., Hiragi, S., Fukuda, M. Rab family of small GTPases: an updated view on their regulation and functions. *FEBS J.* 2021 288:36-55
4. Snider, M. D. A role for Rab7 GTPase in growth factor-regulated cell nutrition and apoptosis. *Mol. Cell* 2003 12:796-797
5. Progida, C., Cogli, L., Piro, F., De Luca, A., Bakke, O., Bucci, C. Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *J. Cell Sci.* 2010 123:1480-1491
6. Borg, M., Bakke, O., Progida, C. A novel interaction between Rab7b and actomyosin reveals a dual role in intracellular transport and cell migration. *J. Cell Sci.* 2014 127:4927-4939
7. Distefano, M. B., Kjos, I., Bakke, O., Progida, C. Rab7b at the intersection of intracellular trafficking and cell migration. *Commun. Integr. Biol.* 2015 8:e1023492
8. Marubashi, S., Fukuda, M. Rab7B/42 Is functionally involved in protein degradation on melanosomes in keratinocytes. *Cell Struct. Funct.* 2020 45:45-55
9. Vestre, K., Persiconi, I., Borg Distefano, M., Mensali, N., Guadagno, N. A., Bretou, M., Wälchli, S., Arnold-Schrauf, C., Bakke, O., Dalod, M., Lennon-Dumenil, A. M., Progida, C. Rab7b regulates dendritic cell migration by linking lysosomes to the actomyosin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 2021 134:jcs259221
10. Tian, X., Teng, J., Chen, J. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2021 17:2680-2688

11. Simons, M., Nave, K. A. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015 8:a020479
12. Barateiro, A., Brites, D., Fernandes, A. Oligodendrocyte development and myelination in neurodevelopment: Molecular mechanisms in health and disease. *Curr. Pharm. Des.* 2016 22:656-679
13. Elbaz, B., Popko, B. Molecular control of oligodendrocyte development. *Trends. Neurosci.* 2019 42:263-277
14. Adams, K. L., Dahl, K. D., Gallo, V., Macklin, W. B. Intrinsic and extrinsic regulators of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2021 116:16-24
15. Bercury, K. K., Dai, J., Sachs, H. H., Ahrendsen, J. T., Wood, T. L., Macklin, W. B. Conditional ablation of raptor or rictor has differential impact on oligodendrocyte differentiation and CNS myelination. *J. Neurosci.* 2014 34:4466-4480
16. Figlia, G., Gerber, D., Suter, U. Myelination and mTOR. *Glia* 2018 66:693-707
17. Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Chan, J. R., Okada, A., Tomooka, Y., Hisanaga, S., Tanoue, A. Cdk5 regulates differentiation of oligodendrocyte precursor cells through the direct phosphorylation of paxillin. *J. Cell Sci.* 2007 120:4355-4366
18. Urai, Y., Yamawaki, M., Watanabe, N., Seki, Y., Morimoto, T., Tago, K., Homma, K., Sakagami, H., Miyamoto, Y., Yamauchi, J. Pull down assay for GTP-bound form of Sar1a reveals its activation during morphological differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018 503:2047-2205
19. Nishino, S., Fujiki, Y., Sato, T., Kato, Y., Shirai, R., Oizumi, H., Yamamoto, M., Ohbuchi, K., Miyamoto, Y., Mizoguchi, K., Yamauchi, J. Hesperetin, a citrus flavonoid, ameliorates inflammatory cytokine-mediated inhibition of oligodendroglial cell morphological differentiation. *Neurol. Int.* 2022 14:471-487

20. Kato, Y., Tago, K., Fukatsu, S., Okabe, M., Shirai, R., Oizumi, H., Ohbuchi, K., Yamamoto, M., Mizoguchi, K., Miyamoto, Y., Yamauchi, J. CRISPR/CasRx-mediated RNA knockdown reveals that ACE2 is involved in the regulation of oligodendroglial cell morphological differentiation. *Non-Coding RNA*. 2022 8:42
21. Morimura, T., Numata, Y., Nakamura, S., Hirano, E., Gotoh, L., Goto, Y. I., Urushitani, M., Inoue, K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp. Biol. Med.* 2014 239:489-501
22. Wilding, A. S., Patte-Mensah, C., Taleb, O., Brun, S., Kemmel, V., Mensah-Nyagan, A. G. Protective effect of 4-phenylbutyrate against proteolipid protein mutation-induced endoplasmic reticulum stress and oligodendroglial cell death. *Neurochem. Int.* 2018 118:185-194
23. Dhaunchak, A. S., Colman, D. R., Nave, K. A. Misalignment of PLP/DM20 transmembrane domains determines protein misfolding in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Neurosci.* 2011 31:14961-14971
24. Wrabetz, L., D'Antonio, M., Pennuto, M., Dati, G., Tinelli, E., Fratta, P., Previtali, S., Imperiale, D., Zielasek, J., Toyka, K., Avila, R. L., Kirschner, D. A., Messing, A., Feltri, M. L., Quattrini, A. Different intracellular pathomechanisms produce diverse Myelin Protein Zero neuropathies in transgenic mice. *J. Neurosci.* 2006 26:2358-2368
25. Torii, T., Miyamoto, Y., Yamauchi, J., Tanoue, A. Pelizaeus-Merzbacher disease: cellular pathogenesis and pharmacologic therapy. *Pediatr. Int.* 2014 56:659-666
26. Wolf, N. I., Ffrench-Constant, C., van der Knaap, M. S. Hypomyelinating leukodystrophies - unravelling myelin biology. *Nat. Rev. Neurol.* 2021 17:88-103
27. Miyamoto, Y., Torii, T., Tago, K., Tanoue, A., Takashima, S., Yamauchi, J. BIG1/Arfgef1 and Arf1 regulate the initiation of myelination by Schwann cells in mice. *Sci. Adv.* 2018 4:eaar4471
28. Miyamoto, Y., Torii, T., Homma, K., Oizumi, H., Ohbuchi, K., Mizoguchi, K., Takashima, S.,

- Yamauchi, J. The adaptor SH2B1 and the phosphatase PTP4A1 regulate the phosphorylation of cytohesin-2 in myelinating Schwann cells in mice. *Sci. Signal.* 2022 15:eabi5276
29. Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000 287:664-666
30. Hotamisligil, G. S., Davis, R. J. Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016 8:a006072
31. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. Wang T, Ming Z, Xiaochun W, Hong W. *Cell Signal.* 2011 Mar;23(3):516-21. doi: 10.1016/j.cell
32. Balderhaar, H. J., Ungermann, C. CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell Sci.* 2013 126:1307-1316
33. Kuchitsu, Y., Fukuda, M. Revisiting Rab7 functions in mammalian autophagy: Rab7 knockout studies. *Cells.* 2018 7:215
34. Stroupe, C. This is the end: regulation of Rab7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2018 6:129
35. Condon, K. J., Sabatini, D. M. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J. Cell Sci.* 2019 132:jcs2225
36. Bar-Peled, L., Sabatini, D. M. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol.* 2014 24:400-406
37. Shy, M. E. Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr. Opin. Neurol.* 2004 17:579-585
38. Auer-Grumbach, M. Hereditary sensory neuropathies. *Drugs Today* 2004 40:385-394
39. Verhoeven, K., Timmerman, V., Mauko, B., Pieber, T. R., De Jonghe, P., Auer-Grumbach, M. Recent advances in hereditary sensory and autonomic neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 2006 19:474-480

40. Cogli, L., Piro, F., Bucci, C. Rab7 and the CMT2B disease. *Biochem. Soc. Trans.* 2009 37:1027-1031
41. Yamauchi, J., Torii, T., Kusakawa, S., Sanbe, A., Nakamura, K., Takashima, S., Hamasaki, H., Kawaguchi, S., Miyamoto, Y., Tanoue, A. The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* 2010 88:3189-3197
42. Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., Narumiya, S. Molecular dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J. Cell Biol.* 1998 141:1625-1636
43. Mateus, D., Marini, E. S., Progida, C., Bakke, O. Rab7a modulates ER stress and ER morphology. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2018 1865:781-793
44. Loi, M., Raimondi, A., Morone, D., Molinari, M. ESCRT-III-driven piecemeal micro-ER-phagy remodels the ER during recovery from ER stress. *Nat. Commun.* 2019 10:5058
45. Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., Elfiky, A. A. GRP78: A cell's response to stress. *Life Sci.* 2019 226:156-163
46. Chen, H. S., Wang, J., Li, H. H., Wang, X., Zhang, S. Q., Deng, T., Li, Y. K., Zou, R. S., Wang, H. J., Zhu, R., Xie, W. L., Zhao, G., Wang, F., Chen, J. G. Long noncoding RNA Gm2694 drives depressive-like behaviors in male mice by interacting with GRP78 to disrupt endoplasmic reticulum homeostasis. *Sci. Adv.* 2022 8:eabn2496

3. 第2章

FBD-102b 細胞における Rab9 のノックダウンが小胞体ストレスによる
形態分化の障害を回復する

3.1. 概要

低分子量 GTP 結合型タンパク質である Rab ファミリーは、細胞内の小胞の移動をコントロールする。これらの中で、Rab9 はトランスゴルジネットワークだけでなく、後期エンドソーム周辺の輸送システムを制御する役割で知られる。しかし、異なる細胞タイプや組織における具体的な機能は依然として不明である。ここでは、初めて Rab9 が形態変化を負に調節することを報告する。オリゴデンドロサイト前駆細胞株である FBD-102b 細胞において形態分化が進行する中、Rab9 のノックダウンは細胞形状の変化を増加させ、広範な膜の拡張を特徴とした。これらの変化には、オリゴデンドロサイトの分化および髄鞘形成マーカータンパク質の発現レベルの増加が伴った。特に、ツニカマイシンによって誘導される小胞体ストレス-これはペリチェウス・メルツバッハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD、Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1 ともいう) などのオリゴデンドロサイト疾患の主要な原因の一つである-の下での形態分化の欠陥の回復が Rab9 のノックダウンにより可能であった。さらに、Rab9 のノックダウンは小胞体ストレスマーカータンパク質および分化マーカーの発現レベルを回復させた。ジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) など他の小胞体ストレス誘発剤によっても同様の結果が得られた。これらの結果から、Rab9 がオリゴデンドロサイトの形態変化においてユニークな役割を果たし、PMD などの疾患の分子および細胞レベルでの治療標的としての潜在的可能性を示唆する。

3.2. はじめに

中枢神経系 (Central Nervous System, CNS) は、神経細胞とグリア細胞を含む多様な組織と細胞で構成されている [1-4]。オリゴデンドロサイトは、その分化した細胞膜で神経軸索を取り巻きミエリン鞘を形成する [5-8]。ミエリン鞘は、神経インパルスの効率的な伝導と軸索の保護に不可欠な役割を果たす。しかし、ミエリン鞘が適切に形成されない場合や損傷を受けた場合、炎症性 [9, 10] または遺伝的 [11-16] 神経変性疾患が発生する。

低分子量 GTP 結合型タンパク質である Rab タンパク質は Ras スーパーファミリーに属し、ほぼ全ての細胞内小胞の運搬を制御することで知られている [17-20]。これらのタンパク質は活性型の GTP 結合型と不活性型の GDP 結合型の二つの形態があり、GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating proteins, GAP) と GDP/GTP 交換因子 (GDP/GTP exchange factors, GEF) によってその切り替えが調節される [17-20]。各 Rab タンパク質は特定の細胞小胞、膜、または組織に局在し、小胞の運搬や融合を制御することで健康と病態の両方で多様な細胞生理に影響を及ぼす [21, 22]。Rab タンパク質の中でも、Rab9 はトランスゴルジネットワーク、後期エンドソーム、その他の小器官に広く局在しており [23-25]、マンノース-6-リン酸受容体タンパク質のリサイクルを制御し、これはトランスゴルジネットワーク周辺の典型的な細胞内リサイクル小胞マーカーである [23-25]。Rab9 はまた、リソソームへのタンパク質の分類と運搬にも寄与し [26-28]、リソソームの生物学的生成を促進し、オートファジーシステムの構築において橋渡しの役割を果たす [26-28]。Rab9 は 2 つの異なる相同体、Rab9A と Rab9B から構成されるが、一般的に Rab9A は Rab9 として認識されることから、本研究でも Rab9A を Rab9 分子として扱う [23-28]。

小胞体 (Endoplasmic Reticulum, ER) は、細胞内カルシウム貯蔵のみならず、分泌タンパク質や膜タンパク質の適切な折りたたみを通じたタンパク質品質管理にも中心的な役割を果たす [29-32]。細胞が外部および内部のストレスにさらされた場合、小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR) として知られる反応やタンパク質の生成が活性化される [29-32]。持続的または過剰なストレス状態の下で、これらの折りたたまれていないタンパク質が蓄積し、細胞の成長と分化が損なわれる。その結果、小胞体ストレスはさまざまな組織や臓器に影響を及ぼす疾患の一因となる。中枢神経系のグリア細胞関連疾患には、大脳白質形成不全症 (Hypomyelinating Leukodystrophy 1, HLD1)、通称ペリチェウス・メルツ

バツハ病 (Pelizaeus-Merzbacher Disease, PMD) や他の HLD が含まれる [33-36]。HLD1 および特定の HLD は、オリゴデンドロサイト由来の分化したミエリン鞘が不適切に形成される劣性疾患として現れる [11-16]。

3.3 材料と方法

3.3.1. 抗体および化学物質

主な材料、抗体、化学物質、およびヌクレオチドは表 2 に記載する。

試薬や原材料	製造会社または供給源	カタログ番号	ロット番号	使用濃度
抗体				
Anti-proteolipid protein 1 (PLP1)	Atlas Antibodies	HPA004128	8115828	イムノブロット法 (IB), 1:500
Anti-myelin basic protein (MBP)	BioLegend	836504	B225469	IB, 1:500
Anti-actin (also called pan-beta type actin)	MBL	M177-3	007	IB, 1:5,000
Anti-eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2a)	Santa Cruz Biotechnology	sc-13312	J1922	IB, 1:1,000
Anti-phosphorylated eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase (pEIF2a)	PGI Proteintech Group Inc	28740-1-AP	00089246	IB, 1:1,000
Anti-C/EBP homologous protein (CHOP)	PGI Proteintech Group, Inc.	15204-AP	00117318	IB, 1:1,000
Anti-heat shock protein family A member 5 (HSPA5)	PGI Proteintech Group, Inc.	11587-AP	00085813	IB, 1:1,000
Anti-IgG (H+L chain) (Mouse) pAb-HRP	MBL	330	365	IB, 1:5,000
Anti-IgG (H+L chain) (Rabbit) pAb-HRP	MBL	458	353	IB, 1:5,000
主要な化学物質				
Tunicamycin (TMC)	Cayman chemical company	11445	0637439-4	100 ng/ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	047-29353	CDN0170	0.1%以下
Dithiothreitol (DTT)	Nacalai Tesque	14128-46	not described	1 mmol/L
主要な試薬				
ScreenFect TM siRNA Transfection Reagent	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	292-75013	CAM0357	☐製造会社の指示に従った
ScreenFect TM Dilution Buffer	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	194-18181	SKF5794	☐製造会社の指示に従った
ImmunoStar TM Zeta	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	295-72404	WTL5319	☐製造会社の指示に従った
Chemi-Lumi TM One Ultra	Nacalai Tesque	11644-40	L2P1314	☐製造会社の指示に従った
Skim milk	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	190-12865	SKG4901	☐製造会社の指示に従った
Western blotting stripping solution	Nacalai Tesque	05364-55	L5M5218	☐製造会社の指示に従った
Fujifilm TM Sample buffer	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	191-13282	WDP4995	☐製造会社の指示に従った
Isogen	Nippon Gene	311-02501	75009K	☐製造会社の指示に従った
5×PrimeScript master mix	TaKaRa Bio	RR036A	AIE0440A	☐製造会社の指示に従った
Gflex DNA polymerase	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	☐製造会社の指示に従った
2×Gflex PCR buffer (Mg2+, dNTP plus; with or without dye)	TaKaRa Bio	R060A	AL80564A	☐製造会社の指示に従った
TaKaRa Bio TM loading buffer	TaKaRa Bio	9157	A7201A	☐製造会社の指示に従った
Pre-stained Protein Markers (Broad Range) for SDS-PAGE	Nacalai Tesque	02525-35	L9M9989	☐製造会社の指示に従った
ExcelBand All Blue Regular Range Protein Marker	Cosmo Bio	PM1500	PM1500211500-5	☐製造会社の指示に従った
ExcelBrand 3 Color Regular Range Protein Marker	Smo Bio	PM2500-2	PM25002112601-2	☐製造会社の指示に従った
使用した細胞				
FBD-102b cells (mouse oligodendrocyte progenitor cells)	Dr. Yasuhiro Tomo-oka (Riken, Saitama, Japan/Tokyo University of Science, Chiba, Japan)	該当なし	該当なし	
PCRプライマー (5'から3')				
Sense chain for siLuciferase-105th (control siRNA) GCCAUUCUAUCCUCUAGAG-dTdT	Yamauchi, J. et. al. Exp. Cell Res. (2009) 315:2043-2052	該当なし	該当なし	50 nM
Antisense chain for siLuciferase-105th CUCUAGAGGAUAGAAUGGC-dTdT				
Sense chain for siRab9-142th GAUCUGGAGGUGGACGGAC-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Antisense chain for siRab9-142th GUCCGUCACCCUCCAGAUC-dTdT				
Sense chain for siRab9-199th GAACGCUUCGGAAGCCUGA-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Antisense chain for siRab9-199th UCAGGCUUCGGAAGCCUGA-dTdT				
Sense chain for siRab9-212th GCCUGAGGAGCCAUUUUA-dTdT	本論文	該当なし	該当なし	50 nM
Antisense chain for siRab9-212th UAAAAGGCGUCCUCAGGC-dTdT				
PCR primers (5' to 3')				
Sense primer for actin (internal control) ATGGATGACGATATCGCTGCGCTGGTC	Kato, Y. et. al. Exp. Cell Res. (2021) 405:112654	該当なし	該当なし	250 nM
Antisense primer for actin CTAGAAGCACTTGGGTGCACGATGGAG				
Sense primer for Rab9 ATGGCAGGAAAATCGTCTCTTTTAAAATAATCTTCTTG	本論文	該当なし	該当なし	250 nM
Antisense primer for Rab9 TCAACAGCAAGATGATTTGGCTTGG				

表 2. 使用した抗体及び化学物質の詳細

3.3.2. 細胞培養と分化

FBD-102b 細胞株（東京理科大学・岡友博博士から提供）は、マウスのオリゴデンドロサイト前駆細胞株である。これらの細胞は、Nunc の細胞および組織培養ディッシュ（ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA）で、DMEM および Ham の F-12 栄養混合培地（Nacalai Tesque, 京都、日本; Fujifilm, 東京、日本）に 10% の熱不活性化した胎牛血清（FBS）と PenStrep 混合抗生物質（Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA）を加え、5% の二酸化炭素と 37° C の条件で培養。分化を誘導するため、ポリリジンでコーティングされた培養ディッシュ（Nacalai Tesque, 京都、日本）で、低濃度の血清を含む培地で 5% の二酸化炭素と 37° C で培養。一次突起から分岐する二次突起を持つか、0.03 mm を超える直径の円を含むことができる広範なミエリン膜様の突起を示す細胞は、分化した表現型とみなした[37, 38]。細胞の形態は、Micronet, Saitama, Japan の i-NTER LENS および i-NTER SHOT ver.2 を装備した顕微鏡システムを使用して捉え、Image J ソフトウェア (<https://imagej.nih.gov/>) で分析した。

3.3.3. 逆転写およびポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

RT-PCR において、cDNA は ISOGEN（Nippon Gene, 東京、日本）で抽出した全細胞 RNA から、メーカーの指示に従い PrimeScript RT Master Mix キット（Takara Bio, 京都、日本）を使用して調製した。RT 生成物からの PCR 増幅は、Gflex DNA ポリメラーゼ（Takara Bio, 京都、日本）を使用して 35 サイクルで行い、各サイクルは、98° C での変性反応（0.2 分）、アニーリング温度に応じた 56~65° C でのアニーリング反応（0.25 分）、および 68° C での伸長反応（0.5 分）から構成。得られた PCR 産物は、あらかじめ作成したアガロースゲル（Nacalai Tesque, 京都、日本）で電気泳動解析を行った。

3.3.4. siRNA トランスフェクション

細胞は、ScreenFect siRNA トランスフェクションキット（Fujifilm, 東京、日本）を使用して、各 siRNA でトランスフェクションを行った。トランスフェクションの 4 時間後に培地を交換し、トランスフェクション後 48 時間以上経過した細胞を使用した。

3.3.5. 細胞溶解およびポリアクリルアミドゲル電気泳動

細胞は、細胞および組織抽出バッファー（50 mM HEPES-NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethane sulfonylfluoride, 1 μg/ml leupeptin, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃V0₄, 10 mM NaF, 0.5% NP-40）で溶解した。変性条件のもとで、細胞溶解液は事前に製造されたサンプルバッファー（Fujifilm, 東京、日本）で変性し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル（Nacalai Tesque, 京都、日本）で分離した。

3.3.6. イムノブロッティング

電気泳動により分離したタンパク質は、ポリビニリデンフルオライド膜（Fujifilm, 東京、日本）に転写し、スキムミルクブロッカー（Fujifilm, 東京、日本）でブロックッキングした後、一次抗体を使用してイムノブロッティングを行った。次に、ペルオキシダーゼ酵素結合二次抗体でインキュベーションした。ペルオキシダーゼ反応性バンドは、CanoScan LiDE 400（Canon, 東京、日本）と CanoScan LiDE 400 Scanner Driver Ver.1.01 で撮影した。イムノブロッティングでは複数回の実験を行い、Image J ソフトウェアを使用して免疫反応性バンドの定量を行い、他のサンプルの免疫反応性バンドを 100% として比較した。

3.3.7. 統計解析

データは別々の実験からの平均値±標準偏差（SD）で示される。グループ間の比較は、Student の補正を用いた独立した t 検定で Excel ソフトウェア（Microsoft, Redmond, WA, USA）を使用して行った。p 値が 0.05 未満の場合、結果は統計的に有意と判断した。

3.3.8. 倫理的考慮

遺伝子改変細胞および関連手続きに関連する技術は、東京薬科大学遺伝子・動物愛護委員会が承認したプロトコール（承認番号 LS28-20 および LSR3-011）に従って実施した。

3.4. 結果

3.4.1. Rab9 は細胞形態形成を負に制御する

FBD-102b 細胞で Rab9 をノックダウンした (図 3.1. 参照)。分化誘導後、コントロールのルシフェラーゼ (Luciferase, Luc) でノックダウンした細胞は、通常 3 日目でオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ分化表現型の約 50% を示した【37, 38】。対照的に、Rab9 をノックダウンした細胞では、広範な膜を持つ表現型が顕著に増加し、約 75% に達した (図 3.2. A)。これらの結果は、プロテオリピドタンパク質 1 (Proteolipid Protein 1, PLP1) やミエリン塩基性タンパク質 (Myelin Basic Protein, MBP) を含むオリゴデンドログリア細胞分化および髄鞘形成マーカータンパク質の発現レベルの上昇と一致していた (図 3.2. B)。逆に、内部コントロールマーカータンパク質であるアクチンの発現レベルは、コントロール細胞と Rab9 ノックダウン細胞で同等であった。これらの結果は、Rab9 ノックダウンが形態分化を促進することを示唆している。

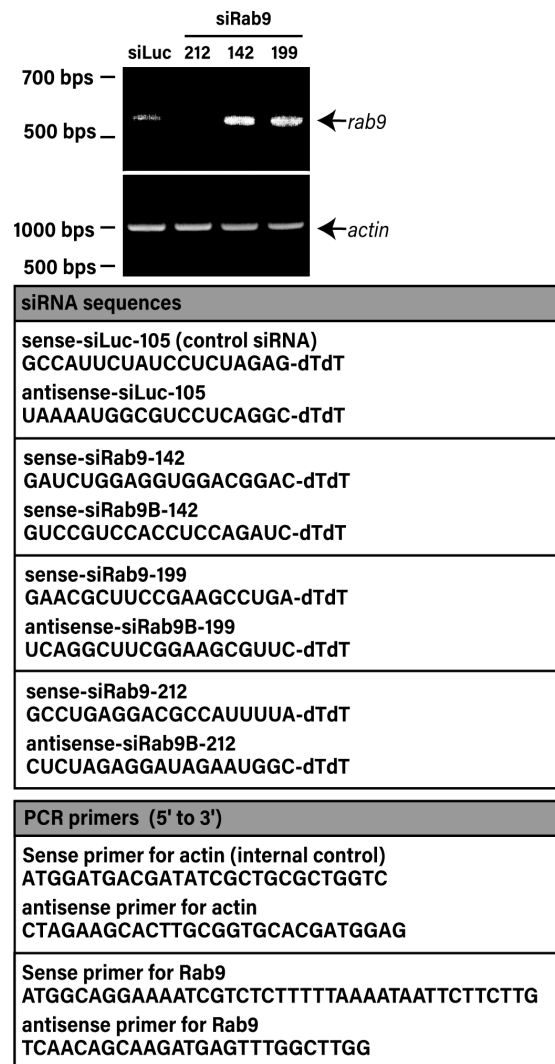


図 14. Rab9 の特異的な siRNA を使用したノックダウン

A. FBD-102b 細胞にそれぞれの siRNA (A1TG からの 142 番、199 番、212 番のターゲット配列) をトランスフェクションした。これらの細胞からの全 RNA を RT-PCR で分析し、ノックダウンの効率を評価した。実験には 212 番のターゲット配列を使用した。

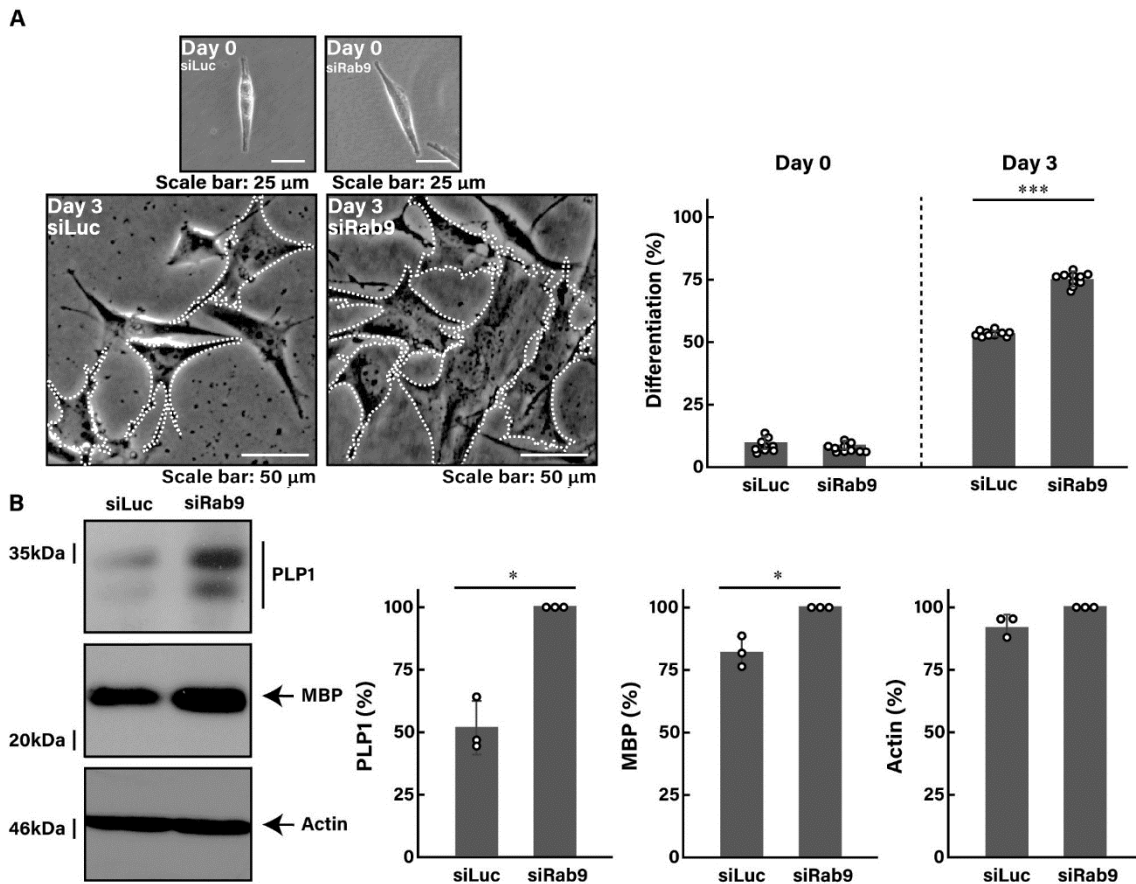


図 15. Rab9 のノックダウンは細胞の形態変化を促進する

A. FBD-102b 細胞にコントロールのルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションした。分化の誘導後、細胞の形態を撮影し、分化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または 3 日目に統計的に示した (***) $p < 0.001$; $n = 10$ fields)。典型的なオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化の誘導後 3 日目の細胞溶解物を、PLP1、MBP、および内部コントロールのアクチンに対する抗体を用いてイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。

3.4.2. Rab9 のノックダウンはツニカマイシン誘導の形態分化の抑制を回復させる

小胞体ストレスシグナルと小胞体ストレス応答を誘導するツニカマイシン[39, 40]で処理すると、FBD-102b 細胞では小胞体ストレスシグナルが刺激され、形態分化が 30-40%低下した[42]。ツニカマイシンは PLP1 と MBP の発現レベルを低下させただけでなく、熱ショックタンパク質ファミリーA メンバー5 (Heat Shock 70kDa Protein 5 [HSPA5], または免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 [BiP] または 78 kDa グルコース制御タンパク質 [GRP78] と呼ばれる) と CCAAT/エンハンサー結合タンパク質相同タンパク質 (C/EBP Homologous Protein [CHOP], C/EBP6 または DNA 損傷誘導性転写産物 3 [DDIT3] と呼ばれる) の発現レベルも上昇させた (図 16)。さらに、真核翻訳開始因子 2A (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A, eIF2A) のリン酸化レベルも上昇させた (図 16)。次に、Rab9 のノックダウンが、ツニカマイシン誘導による形態分化の低下を回復させる能力があるかどうかを調べた。Rab9 をノックダウンすると、PLP1 と MBP の発現レベルの上昇と一致して、膜が広がった表現型が約 50~60%回復した (図 17A)。これは、図 17B でも確認された。対照的に、アクチンの発現レベルはコントロール細胞と Rab9 ノックダウン細胞で同等であった。さらに、Rab9 ノックダウンにより、HSPA5 (図 18A および B) と CHOP (図 18C および D) の発現レベル、ならびに eIF2A のリン酸化レベルが回復し (図 18E および F)、Rab9 ノックダウンがツニカマイシン誘導の表現型に対して保護効果を持つことが示された。

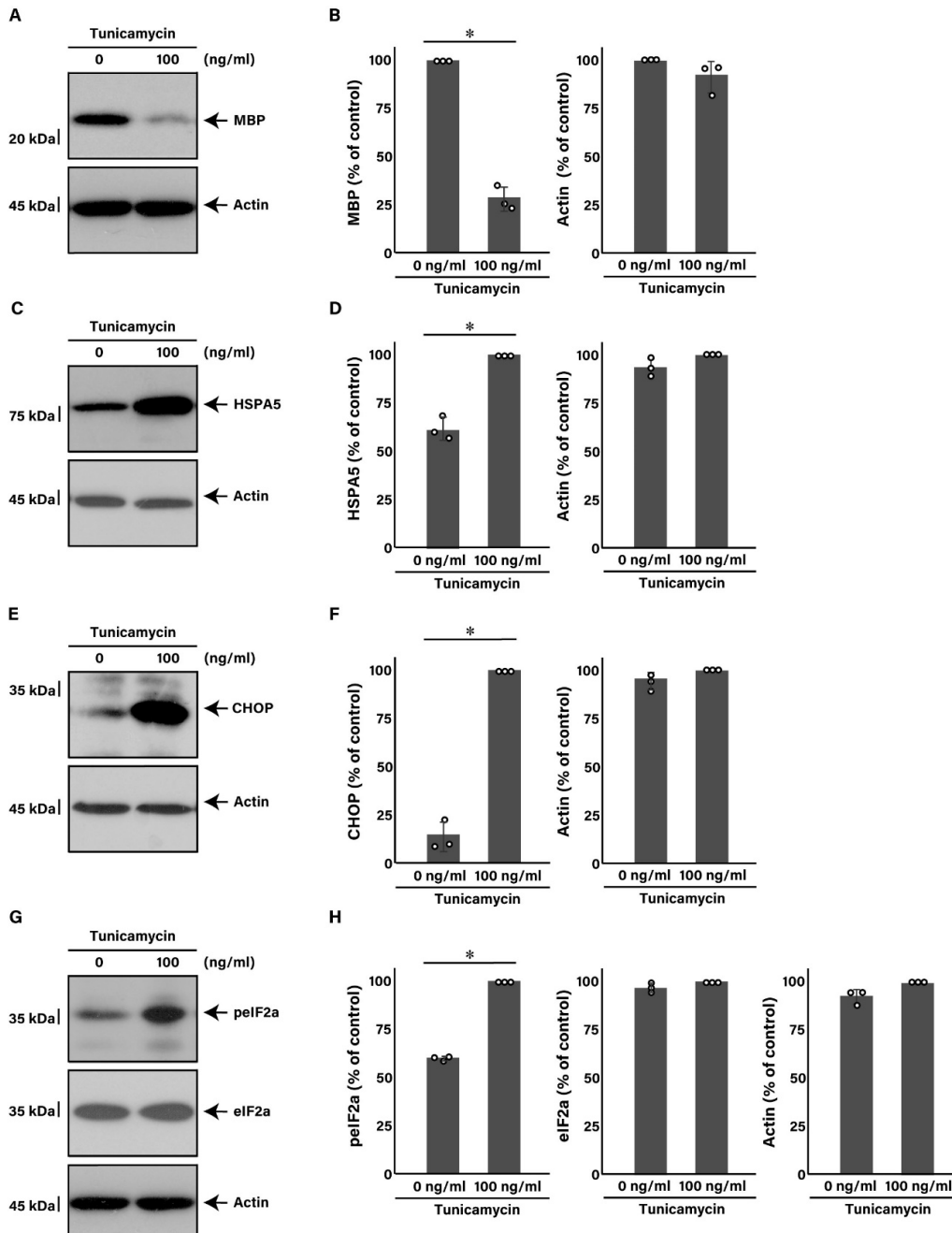


図 16. ツニカマイシンが FBD-102b 細胞の小胞体ストレスシグナルを刺激する

A, B. ツニカマイシン 100 ng/ml の存在下で分化を誘導した後、FBD-102b 細胞溶解物を MBP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。C, D. 同様に、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。E, F. さらに、CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。G, H. また、リン酸化された eIF2a (peIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* p < 0.05; n = 3 ブロット)。

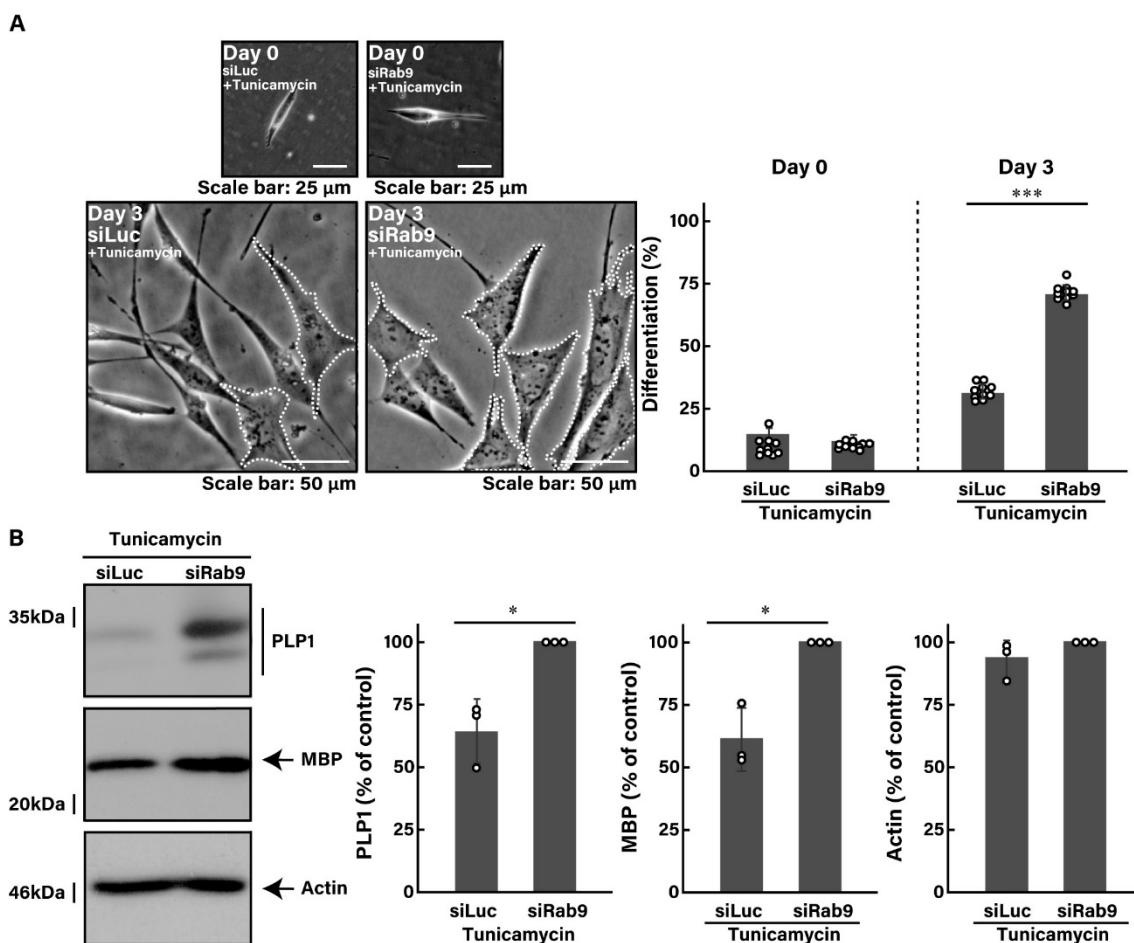


図 17. Rab9 のノックダウンはツニカマイシンによって誘導された表現型を回復する
A. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションし、100 ng/ml のツニカマイシンの存在下で分化を誘導した。その後、細胞の形態を撮影し、分化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または 3 日目に統計的に示した (***) $p < 0.001$; $n = 10$ fields)。典型的なオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化の誘導後 3 日目の細胞溶解物を、PLP1、MBP、およびアクチンに対する抗体でイムノブロットニングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。

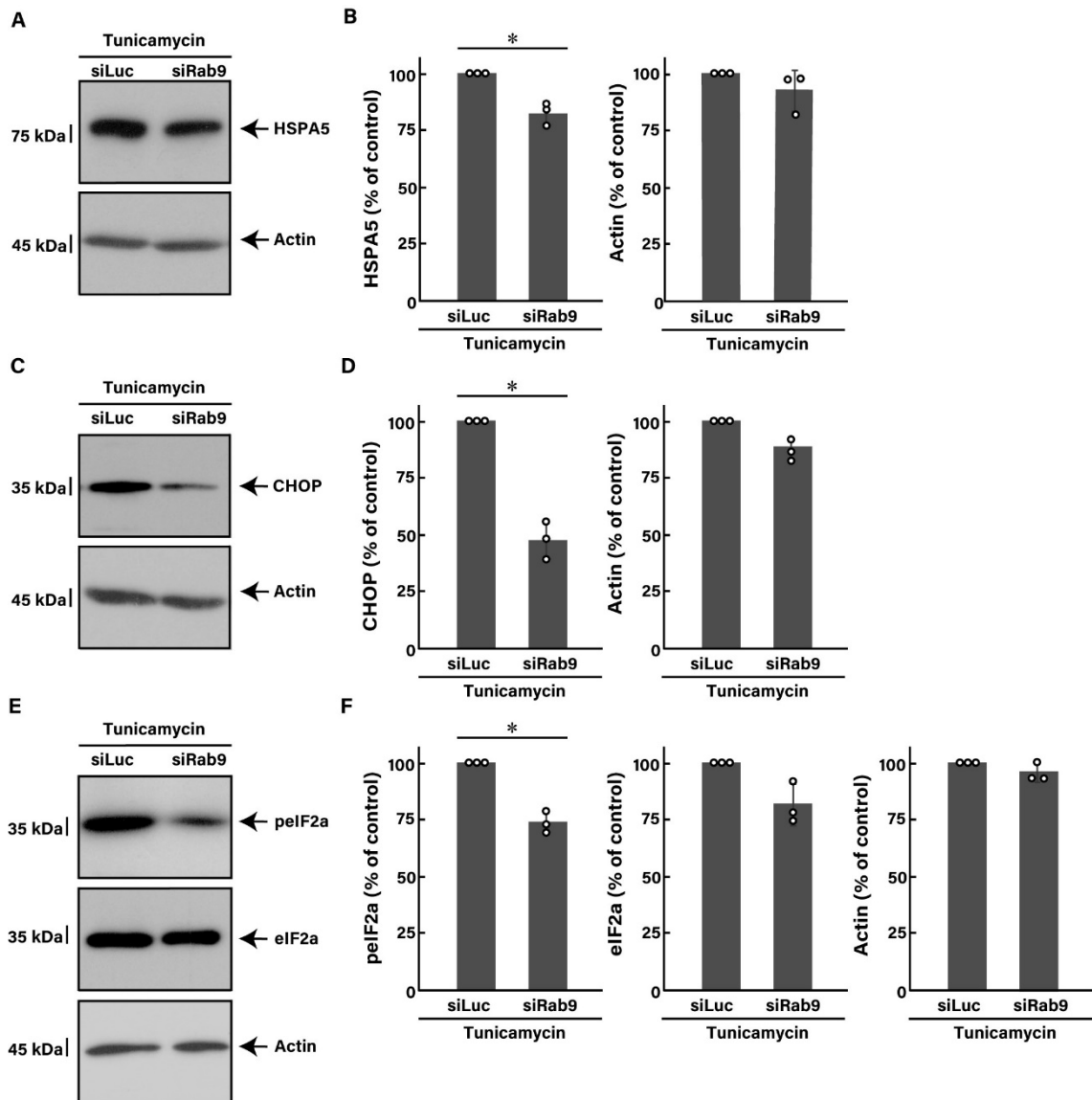


図 18. Rab9 のノックダウンはツニカマイシンによって誘導された小胞体ストレスシグナルを減少させる

A, B. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションし、100 ng/ml のツニカマイシンの存在下で分化を誘導した。その後、3 日目の細胞溶解物を、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。C, D. 同様に CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。E, F. さらに、リン酸化 eIF2a (peIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。

3.4.3. Rab9 のノックダウンはジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) 誘発の形態分化の抑制を回復させる

小胞体におけるストレスシグナルと小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response, UPR) のもう一つの誘導因子であるジチオスレイトール (Dithiothreitol, DTT) 【39, 40】で処理すると、小胞体ストレスシグナルが刺激されるかどうかを調べた。DTT で処理すると、HSPA5 と CHOP の発現レベルが eIF2A のリン酸化レベルとともに上昇し、一方で MBP マーカータンパク質の発現レベルは低下した (図 19)。

ツニカマイシンでの発見と同様に、Rab9 をノックダウンすることで DTT 誘発の形態分化の低下を回復できるかどうかを調べた。Rab9 をノックダウンすると、PLP1 と MBP の発現レベルの上昇と一致して、膜が広がった表現型が 50~60%回復した (図 20A および図 4B)。さらに、Rab9 のノックダウンは、HSPA5 (図 21A および図 21B) と CHOP (図 21C および図 21D) の発現レベルと eIF2A (図 21E および図 21F) のリン酸化レベルの両方を回復させた。まとめると、Rab9 ノックダウンは DTT 誘発の表現型に対して保護効果を持つことが示された。

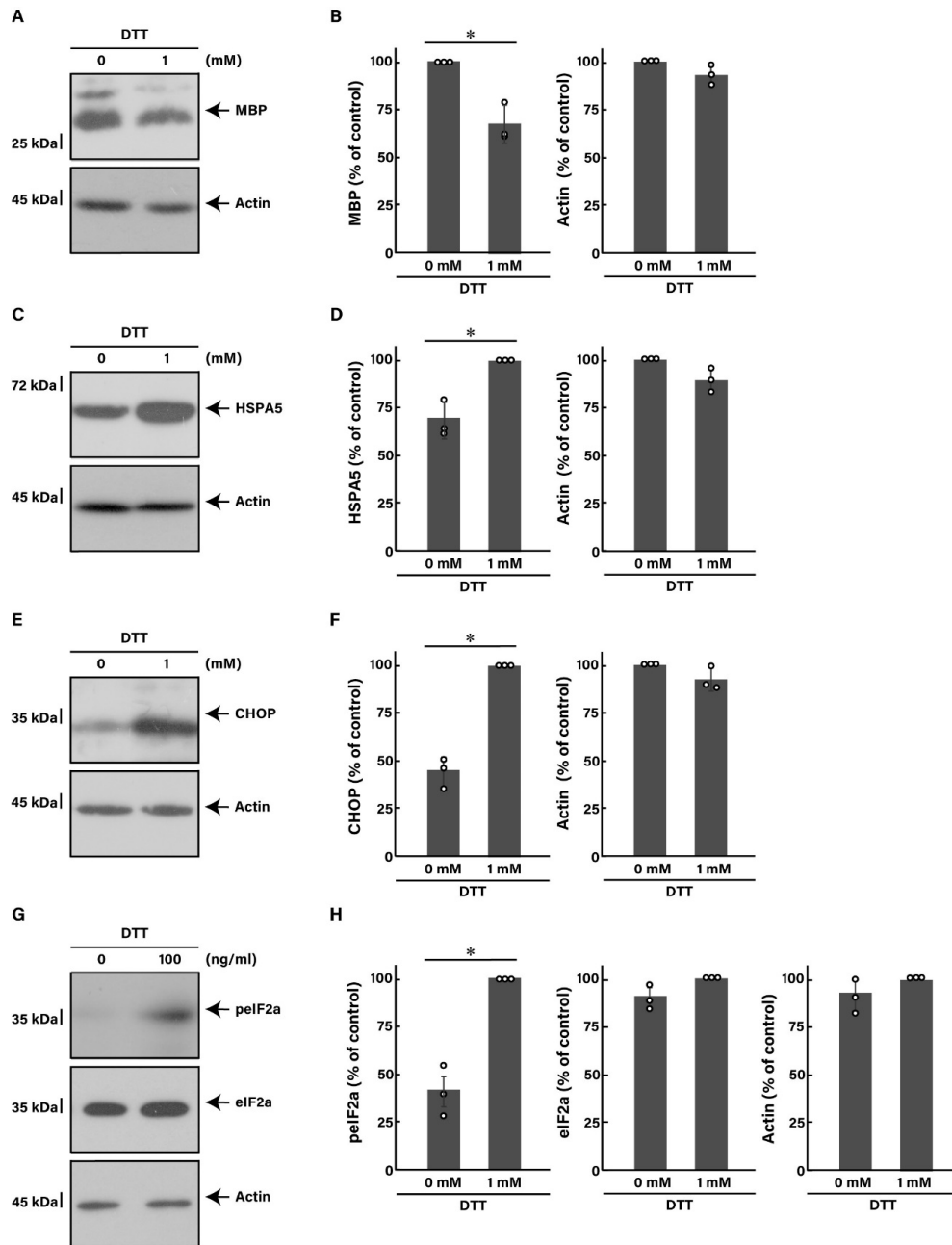
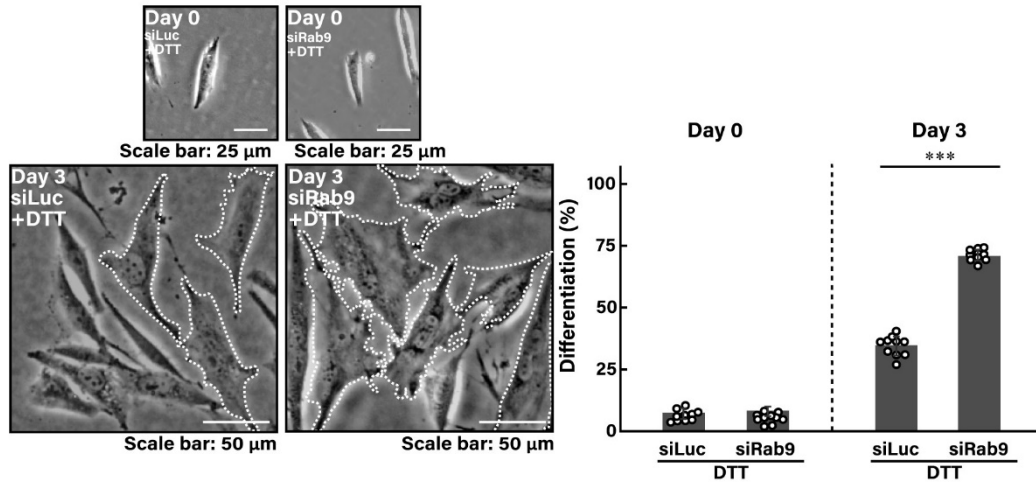


図 19. DTT が FBD-102b 細胞の小胞体ストレスシグナルを刺激する

A, B. 1 mM DTT の存在下で分化を誘導した後、FBD-102b 細胞溶解物を MBP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。C, D. 同様に、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。E, F. さらに、CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。G, H. また、リン酸化された eIF2a (p-eIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロットし、統計的にパーセンテージで比較を示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ ブロット)。

A



B

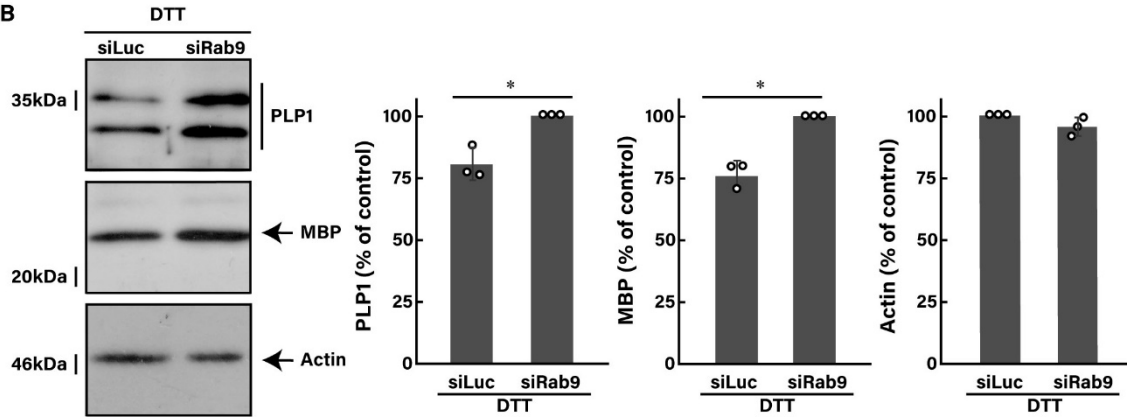


図 20. Rab9 のノックダウンは DTT によって誘導された表現型を回復する

A. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションし、1 mM DTT の存在下で分化を誘導した。その後、細胞の形態を撮影し、分化したオリゴデンドロサイト様の広範な膜を持つ細胞を 0 日または 3 日目に統計的に示した (** $p < 0.001$; $n = 10$ fields)。典型的なオリゴデンドログリア細胞様の広範な膜を持つ細胞の形態は白い点線で囲まれている。B. 分化の誘導後 3 日目の細胞溶解物を、PLP1、MBP、およびアクチンに対する抗体でイムノブロットィングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。

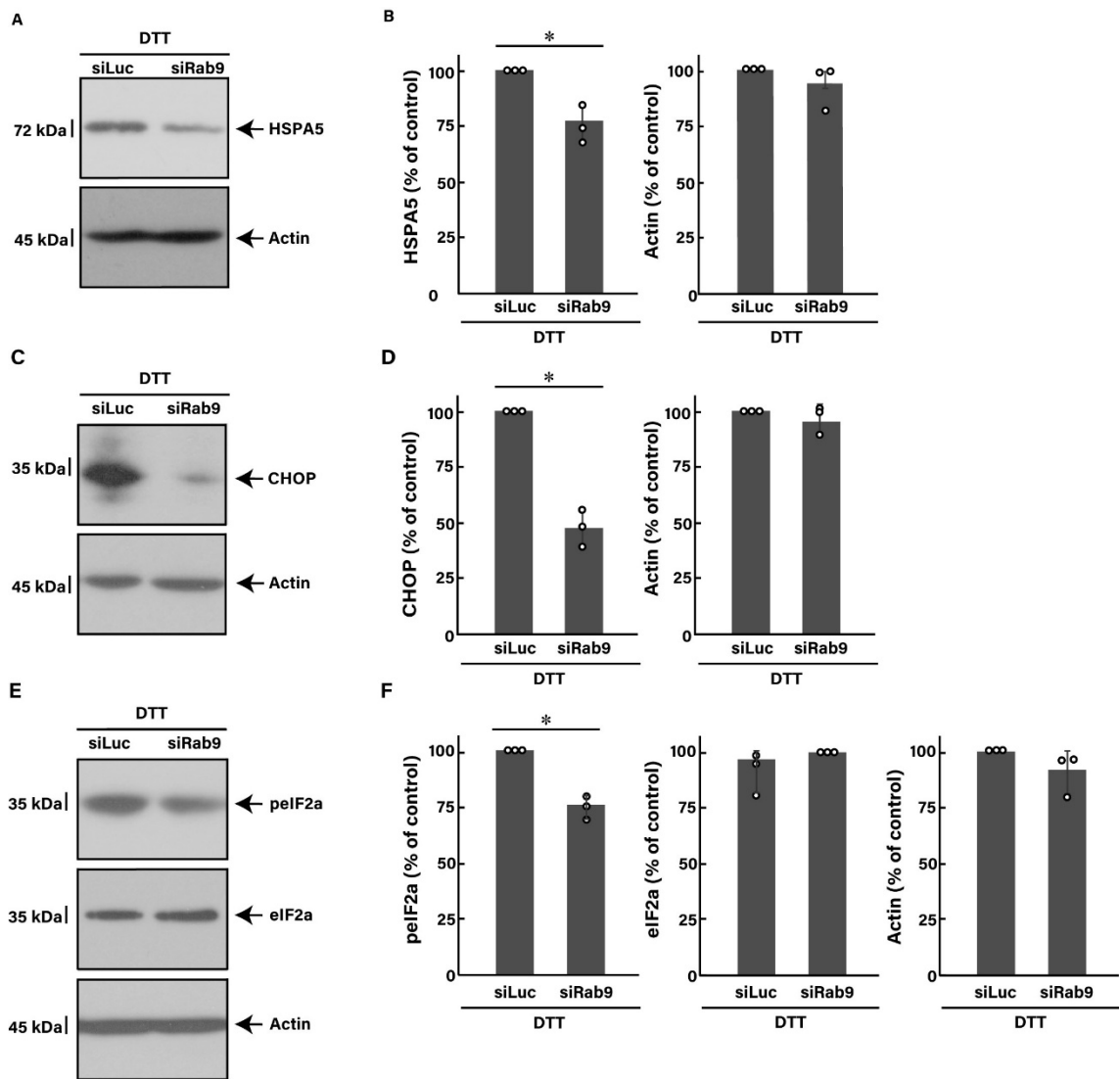


図 21. Rab9 のノックダウンは DTT によって誘導された小胞体ストレスシグナルを減少させる。

A, B. FBD-102b 細胞にルシフェラーゼ siRNA (siLuc) または Rab9 siRNA (siRab9) をトランスフェクションし、1 mM の DTT の存在下で分化を誘導した。その後、3 日目の細胞溶解物を、HSPA5 とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。C, D. 同様に CHOP とアクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示された (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。E, F. さらに、リン酸化 eIF2a (peIF2a)、eIF2a、アクチンに対する抗体でイムノブロッティングし、パーセンテージ比較で統計的に示した (* $p < 0.05$; $n = 3$ blots)。

3.5. 考察

Rab9 はトランスゴルジネットワーク周辺の小胞に広く分布し、細胞内小胞輸送において多様な役割を担う。Rab9 は後期エンドソーム周辺にも存在し、リソソームへのタンパク質の選別と輸送を促進する。また、オートファジー系の構築において橋渡し役として機能し、リソソームとオートファゴソームの融合を促進することでオートリソソームの形成を助けるとされる [23-28]。

細胞内小胞輸送系で Rab9 が果たす基本的な役割は広く認識されているが、それが具体的にどの細胞タイプのどの特性を形作るか、または単に基本的な細胞機能の維持に関わるだけかは、未だにはっきりとは分かっていない。例えば、分子系統樹上で Rab9 と近縁な Rab ファミリー分子である Rab7 のノックアウトは、神経細胞や腎臓上皮細胞を含む様々な細胞タイプにおいて、オートファゴソームやリソソームの融合不全を引き起こす。しかし、Rab をノックアウトすると、神経細胞は特定のアミノ酸の飢餓に反応しなくなるだけで、リソソームの機能は欠損しない [21, 22]。ここで我々は、Rab9 がオリゴデンドロサイト前駆細胞株において、オリゴデンドロサイト様の広範な膜を生成する特性に特異的に拮抗することを明らかにした。この結論は、Rab9 をノックダウンすると、オリゴデンドロサイトの分化と髄鞘形成マーカータンパク質の発現の増加とともに、広範な膜を持つ特性が増加することを示す結果によって支持される。

Rab9A は一般的な Rab9 分子であるが、Rab9B も Rab9A と同様の機能を果たすと考えられる [23-28]。ただし、Rab9A と Rab9B は脳細胞タイプで全く異なる転写プロファイルを示す (Human Protein Atlas ウェブサイト、<https://www.proteinatlas.org> 参照)。Rab9A はオリゴデンドロサイト系細胞に多く存在するが、Rab9B は特定の脳細胞タイプに特有の表現を示さない。この観察は、Rab9A とオリゴデンドロサイトの分化との間に密接な関連があることを強調している。Rab9 サブファミリー分子とオリゴデンドロサイトの分化不全および HLD1 で観察される低髄鞘化表現型との関連を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

Rab9 が ER ストレスに関連するシグナル伝達を減少させるメカニズムはまだ不明である。S. cerevisiae では、Ypt1 と呼ばれる Rab タンパク質が ER ストレス、ひいては UPR を直接制御している [47, 48]。このタンパク質は、塩基性ロイシンジッパー転写因子

HAC1 (Homologous to Atf/Creb1) タンパク質をコードする RNA の安定性を制御し、UPR 制御遺伝子のプロモーターにある UPR エlement を認識して結合する [47, 48]。小胞体ストレスは、Ypt1 タンパク質の細胞質への急速な局在化を引き起こし、pre-HAC1 mRNA からの解離につながる。この変化により pre-HAC1 mRNA の分解が減少し、その結果 UPR が活性化される [47, 48]。Ypt1 タンパク質が哺乳類の Rab9 タンパク質の非常に近いオルソログである可能性は低いですが、Rab9 を含む Rab タンパク質が、哺乳類細胞における ER 周囲の輸送系を介して、ER ストレスと UPR に関係していることは考えられる。あるいは、神経細胞を含む哺乳動物細胞は、小器官の輸送や小胞体周囲の膜接触に影響する Rab タンパク質の発現レベルを調節することによって、小胞体ストレスに応答しているかもしれない。実際、多発性硬化症 (Multiple Sclerosis, MS) などの炎症性脱髄疾患や実験モデルでは、Rab32 のアップレギュレーションが、小胞体ストレスに応答して小胞体とミトコンドリアの膜接触に影響を与えている [49]。いずれのメカニズムにおいても、これまで予想されていたことではなく、Rab タンパク質は ER ストレスと UPR に直接的または間接的に関与している可能性がある。

3. 6. 引用文献

1. Simons, N., Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 2001 81(2):871-927
2. Simons, M., Lyons, D. A. Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013 25(4): 512-519
3. Saab, A. S., Nave, K. A. Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017 47: 104-112
4. Abu-Rub, M., Miller, R. H. Emerging cellular and molecular strategies for enhancing central nervous system (CNS) remyelination. *Brain Sci.* 2018 8(6): E111
5. Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., Dombrowski, Y. Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. *Cells* 2019 8(11):1424
6. Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., Saab, M. Myelin in the central nervous system: structure, function, and pathology. *Physiol. Rev.* 2019 99:1381-1431
7. Yu, Q., Guan, T., Guo, Y., Kong, J. The initial myelination in the central nervous system. *ASN Neuro* 2023 15:17590914231163039
8. Barnes-Vélez, J. A., Aksoy Yasar, F. B., Hu, J. Myelin lipid metabolism and its role in myelination and myelin maintenance. *Innovation* 2023 4(1):100360
9. Dobson, R., Giovannoni, G. Multiple sclerosis-a review *Eur. J. Neurol.* 2019 26(1):27-40
10. Shirai, R., Yamauchi, J. New insights into risk genes and their candidates in multiple sclerosis. *Neurol. Int.* 2022 15(1):24-39
11. Garbern, J., Cambi, F., Shy, M., Kamholz, J. The molecular pathogenesis of Pelizaeus-Merzbacher disease. *Arch. Neurol.* 1999 56:1210-1214

12. Wolf, P, J, W., Vanderver, A., Bernard, G., Wolf, N, I., Dreha-Kulczewski, S, F., Deoni, S, C, L., Bertini, E., Kohlschütter, A., Richardson, W., Ffrench-Constant, C., Köhler, W., Rowitch, D., Barkovich, A, J. Hypomyelinating leukodystrophies: translational research progress and prospects. *Ann. Neurol.* 2014 76(1):5-19
13. Inoue, K. Pelizaeus-Merzbacher disease: molecular and cellular pathologies and associated phenotypes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019 1190:201-216
14. Wolf, N. I., Ffrench-Constant, C., van der Knaap, M. S. Hypomyelinating leukodystrophies- unravelling myelin biology. *Nat. Rev. Neurol.* 2021 17: 88-103
15. Torii, T., Yamauchi, J. Molecular pathogenic mechanisms of hypomyelinating leukodystrophies (HLDs). *Neurol. Int.* 2023 15(3):1155-1173
16. Dhaunchak, A. S., Colman, D. R., Nave, K. A. Misalignment of PLP/DM20 transmembrane domains determines protein misfolding in Pelizaeus-Merzbacher disease. *J. Neurosci.* 2011 31(42):14961-14971
17. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009 10(8):513-525
18. Hutagalung, A. H., Novick, P. J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol. Rev.* 2011 91(1):119-149
19. Cherfils, J., Zeghouf, M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 2013 93(1):269-309
20. Langemeyer, L., Fröhlich, F., Ungermann, C. Rab GTPase function in endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol.* 2018 28(11):957-970
21. Guadagno, N. A., Progidia, C. Rab GTPases: switching to human diseases. *Cells* 2019 8(8):909
22. Wilmes, S., Kümmel, D. Insights into the role of the membranes in Rab GTPase regulation. *Curr.*

Opin. Cell Biol. 2023 83:102177

23. Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S. R. Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J.* 1993 12(2):677-682
24. Barbero, P., Bittova, L., Pfeffer, S. R. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J. Cell Biol.* 2002 156(3):511-518
25. Ganley, I. G., Carroll, K., Bittova, L., Pfeffer, S. Rab9 GTPase regulates late endosome size and requires effector interaction for its stability. *Mol. Biol. Cell* 2004 15:5420-5430
26. Ao, X., Zou, L., Wu, Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death Differ.* 2014 21:348-358
27. Kucera, A., Bakke, O., Progida, C. The multiple roles of Rab9 in the endolysosomal system. *Commun. Integr. Biol.* 2016 9(4):e1204498
28. Kucera, A., Borg Distefano, M., Berg-Larsen, A., Skjeldal, F., Repnik, U., Bakke, O., Progida, C. Spatiotemporal resolution of Rab9 and CI-MPR dynamics in the endocytic pathway. *Traffic* 2016 17(3):211-229
29. Hetz, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012 13(2):89-102
30. Oakes, S. A., Papa, F. R. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu. Rev. Pathol.* 2015 10:173-194
31. Hetz, C., Saxena, S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurol.* 2017 13(8):477-491
32. Marciniak, S. J., Chambers, J. E., Ron, D. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022 21(2):115-140
33. Lin, W., Harding, H. P., Ron, D., Popko, B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of

- myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *Journal of Cell Biology*. 2005 169(4):603-612
34. Potter, E. CHOP and the endoplasmic reticulum stress response in myelinating glia. *Bone* 2008 23(1):1-7
35. D'Antonio, M., Feltri, M. L., Wrabetz, L. Myelin under stress. *J Neurosci Res*. 2009 87(15):3241
36. Tong, B. C. K., Benjamin Chun-Kit Tong. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. *Physiol. Behav*. 2017 176(5):139-148
37. Horiuchi, M., Tomooka, Y. An oligodendroglial progenitor cell line FBD-102b possibly secretes a radial glia-inducing factor. *Neurosci. Res*. 2006 56(2):213-219
38. Fukatsu, S., Miyamoto, Y., Oka, Y., Ishibashi, M., Shirai, R., Ishida, Y., Endo, S., Katoh, H., Yamauchi, J. Investigating the protective effects of a citrus flavonoid on the retardation morphogenesis of the oligodendroglia-like cell line by Rnd2 knockdown. *Neurol. Int*. 2023 16(1):33-61
39. Morimura, T., Numata, Y., Nakamura, S., Hirano, E., Gotoh, L., Goto, Y. I., Urushitani, M., Inoue, K. Attenuation of endoplasmic reticulum stress in Pelizaeus-Merzbacher disease by an anti-malaria drug, chloroquine. *Exp. Biol. Med*. 2014 239(4):489-501
40. Higa, A., Taouji, S., Lhomond, S., Jensen, D., Fernandez-Zapico, M. E., Simpson, J. C., Pasquet, J.-M., Schekman, R., Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress-activated transcription factor ATF6alpha requires the disulfide isomerase PDIA5 to modulate chemoresistance. *Mol. Cell. Biol*. 2014 34(10):1839-1849
41. Healy, S., McMahon, J., FitzGerald, U. UPR induction prevents iron accumulation and oligodendrocyte loss in ex vivo cultured hippocampal slices. *Front. Neurosci*. 2018 12:969
42. Fukushima, N., Shirai, R., Sato, T., Nakamura, S., Ochiai, A., Miyamoto, Y., Yamauchi, J.

- Knockdown of Rab7B, but not of Rab7A, which antagonistically regulates oligodendroglial cell morphological differentiation, recovers tunicamycin-induced defective differentiation in FBD-102b cells. *J. Mol. Neurosci.* 2023 73(6):363-374
43. Kuchitsu, Y., Homma, Y., Fujita, N., Fukuda M. Rab7 knockout unveils regulated autolysosome maturation induced by glutamine starvation. *J. Cell Sci.* 2018 131(7):jcs215442
44. Kuchitsu, Y., Fukuda, M. Revisiting Rab7 functions in mammalian autophagy: Rab7 knockout studies. *Cells* 2018 7(11):215
45. Xing, R., Zhou, H., Jian, Y., Li, L., Wang, M., Liu, N., Yin, Q., Liang, Z., Guo, W., Yang, C. The Rab7 effector WDR91 promotes autophagy-lysosome degradation in neurons by regulating lysosome fusion. *J. Cell Biol.* 2021 220(8):e202007061
46. Torisu, H., Iwaki, A., Takeshita, K., Hiwatashi, A., Sanefuji, M., Fukumaki, Y., Hara, T. Clinical and genetic characterization of a 2-year-old boy with complete PLP1 deletion. *Brain Dev.* 2012 34(10):852-856
47. Tsvetanova, N. G., Riordan, D. P., Brown, P. O. The yeast Rab GTPase Ypt1 modulates unfolded protein response dynamics by regulating the stability of HAC1 RNA. *PLoS Genet.* 2012 8(7):e1002862
48. Paira, S., Chakraborty, A., Das, B. The Sequential recruitments of Rab-GTPase Ypt1p and the NNS Complex onto pre-HAC1 mRNA promote its nuclear degradation in baker's yeast. *Mol. Cell. Biol.* 2023 43(8):371-400
49. Haile, Y., Deng, X., Ortiz-Sandoval, C., Tahbaz, N., Janowicz, A., Lu, J. Q., Kerr, B. J., Gutowski, N. J., Holley, J. E., Eggleton, P., Giuliani, F., Simmen, T. Rab32 connects ER stress to mitochondrial defects in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 2017 14(1):19
50. Wang, J., Yang, X., Zhang, J. Bridges between mitochondrial oxidative stress, ER stress and mTOR

- signaling in pancreatic beta cells. *Cell. Signal.* 2016;28(8):1099-1104
51. Kim, S., Woo, C. H. Laminar flow inhibits ER stress-induced endothelial apoptosis through PI3K/Akt-dependent signaling Pathway. *Mol Cells.* 2018 41(11):964-970
52. Zhu, Y., Shi, F., Wang, M., Ding, J. Knockdown of Rab9 suppresses the progression of gastric cancer through regulation of Akt signaling pathway. *Technol. Cancer Res. Treat.* 2020 19:153303
53. Hotamisligil, G. S., Davis, R. J. Cell signaling and stress responses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016 8(10):a006072
54. Johnson, G. L., Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002 298(5600):1911-1912
55. Schinzel, R. T., Higuchi-Sanabria, R., Shalem, O., Moehle, E. A., Webster, B. M., Joe, L., Bar-Ziv, R., Frankino, P. A., Durieux, J., Pender, C., Kelet, N., Kumar, S. S., Savalia, N., Chi, H., Simic, M., Nguyen, N. T., Dillin, A. The hyaluronidase, TMEM2, promotes ER homeostasis and longevity independent of the UPR. *Cell* 2019 179(6):1306-1318.e18

4. 結論

本研究では、オリゴデンドロサイトの形態分化におけるRab7およびRab9の役割に焦点を当て、小胞体ストレス応答との関係を調査した。Rab7B、Rab9のノックダウンが形態分化を促進し、特に小胞体ストレス下での細胞の機能不全を回復させる効果を示したことから、これらのRabタンパク質が神経変性疾患の進行において重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

この研究から得られた知見は、オリゴデンドロサイト関連疾患のPMDをはじめとする様々な神経変性疾患の治療に向けた新たな治療標的の同定に貢献するものであり、特に小胞体ストレスが関与する疾患の治療法開発において、Rab7BおよびRab9を標的とするアプローチが有望であることを示唆している。今後はこれらのRabタンパク質の詳細な機能機序およびオリゴデンドロサイトの健康と病態における具体的な役割の解明に向けて、さらなる研究が求められる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの皆様の御指導・御支援を賜りました。謹んで感謝を申し上げます。

山内淳司先生 (東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子神経科学研究室 教授) には研究遂行、論文作成に当たり、終始御指導・御鞭撻を賜りました。森本高子先生と関洋一先生 (同上 准教授および助教) には温かい御指導・御協力を頂きました。白井玲美奈先生 (同上 嘱託助教) には実験技術など多くの御指導を頂きました。

また、熊澤義之先生 (東京薬科大学 生命科学部 応用生命科学科 食品科学研究室 教授)、平位 秀世先生 (東京薬科大学 生命科学部 生命医科学科 幹細胞制御学研究室 教授)、には副指導教員として御指導を頂きました。

更に、東京薬科大学 生命科学部 分子生命科学科 分子神経科学研究室の皆様、東京薬科大学 生命科学部の多くの先生方には実験を遂行するに当たり御協力を頂きました。

本研究は、文部科学省 (MEXT) からの科学研究費補助金、厚生労働省 (MHLW) からの医学科学研究費補助金の支援を受けて行われました。また、第一三共科学財団 (第一三共株式会社)、武田科学財団 (武田薬品工業株式会社)、三菱田辺ファーマ財団 (三菱田辺製薬) からの助成もあり、この場を借りて深く感謝いたします。