

# クラスリン集合因子 *CALM* 欠損マウスに見られる、毛や組織の色の薄さの解析 —細胞内物資輸送と体色との関連を探る—

奈良女子大学大学院人間文化研究科個体機能学講座

渡邊 利雄

CALM is not believed to be an essential component of clathrin-associated endocytosis of transferrin. However, we made *CALM*-deficient mouse and found that *CALM* does indeed appear to be involved in clathrin-mediated membrane traffic. We also noticed that *CALM*-deficient mouse showed pale coat color and started a trial to analyze the relationship between membrane traffic and coat color. As an initial step, we successfully established *CALM* knock-down melanoma cells for the analysis.

## 1. 緒言

体の各組織は皮膚を含めて様々な色を持っている。メラニンに代表されるように色素は細胞内物流システムで輸送されることにより産生・分配される。この機構に不備が生じると、例えば皮膚におけるシミなどの色素沈着等の現象が起こると考えられる。ということはこの輸送を担う分子の動態を制御する方向での研究を行うことができれば、皮膚を健康に保つための新しい研究標的として役立つ可能性が高く、近年この物流システムに関与する因子と色素の輸送との関係が解析され始めている。代表的な成功例はメラノソーム輸送での低分子量Gタンパク質のRabの働きである<sup>1)</sup>。しかし、細胞内の物流システムはRabのみで成り立つのではない。色素を輸送する小胞は小胞形成開始因子Arf群やArfの制御因子のGEF（GTP交換因子群で小胞形成の活性化因子）やGAP（Arf1が持つGTP加水分解活性の活性化因子群で小胞形成の不活性化因子）、被覆のクラスリンやその集合因子の*CALM*等々の様々な因子の関与があることは判明しているのであるが、これらと色素との関連の解析は遅々として進んでいない<sup>2-7)</sup>。

我々は、従来から培養細胞でのみ解析されてきたクラスリン集合因子の*CALM*を個体レベルで解析するために世界に先駆けてノックアウトマウスを作製し、これを用いた研究から、クラスリン集合因子*CALM*はEGF、トランスフェリン等のクラスリン依存性の小胞輸送に関して従来の報告とは真逆の働きをしていることが明らかになった。即ち、従来のドミナントネガティブ体(優性抑制型変異体)やノックダウンを用いた研究報告では*CALM*は関与しないと



図1

言われていたが、ノックアウトでは*CALM*依存性が見られ、ノックアウトマウスはトランスフェリンによる鉄の取り込みの低下により重度の貧血となることを明らかにした<sup>8,9)</sup>。さらに、大規模遺伝子変異解析から推定されていたが従来は因果関係が知られていなかった、*CALM*とアルツハイマー症との関係など、我々の作製したノックアウトマウスにより*CALM*の新しい知見が蓄積しつつある<sup>10,11)</sup>。

このような研究を行う中で、我々はクラスリン集合因子*CALM*欠損マウスの体色が薄いことに気が付いた。図1の白い星印がホモ欠損マウスで、同腹の兄弟姉妹に比べて体色が薄い。その後、成長後の個体の解析から体色のみならず、肝臓や心臓等の臓器の色も薄いことを見出している。

本研究は、細胞内物流システムがどのように組織の色と関係しているのかを、クラスリン集合因子*CALM*欠損マウスで発見した毛や組織の色の薄さを解析することで明らかにしようと試みる、従来にない研究である。我々が作製した*CALM*の欠損マウスに見られた新しい知見を基に、従来知られていない*CALM*の欠損マウスでの毛や組織の色の薄さを手掛かりとして、現在までに一切の知見がないクラスリンを被覆として使う細胞内物流機構と毛や組織の色との関係を明らかにすることを目的とする。

## 2. 実験

### 2.1. *CALM*欠損マウスの色の薄さは何に由来するのか

明瞭な色素の薄さが観察されるのは、脾臓、骨髄、肝臓、心臓、皮膚、毛であり、そのほかの組織では色の薄さは明瞭ではない。そこで、これらの組織で組織の色を決定する分子の動態にどのような変化が生じているのかを*CALM*



An analysis on pale coat color found in *CALM*-deficient mice – A trial study on the relationship between membrane traffic and coat color –

Toshio Watanabe

Department of Biological Science, Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University

欠損マウスで検討し、標的として扱う分子を決定する。グロビンやミオグロビンなどの色素タンパク質が最初の解析対象になると予想している。このような計画を基に実験を開始した。

## 2.2. CALM欠損培養細胞株の樹立と解析

既に作成している CALM 遺伝子破壊マウスの胎児 (14 日胚) から初代培養を行い、胎児の繊維芽細胞 (MEF 細胞) を得、SV40 ウイルスの不死化遺伝子の T 抗原遺伝子を導入し、CALM 欠損および野生型の株細胞を樹立した。樹立した細胞株を用いて、初めに関与が推定される輸送機構の解析を、蛍光標識したトランスフェリンや EGF 等、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれる分子を取り込ませた後に、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内への取り込みに違いが無いかを解析する。マウスの解析から予想される色素に関して、その輸送に CALM の有無が効果を与えるか検討する。同様な解析を、メラニン合成細胞として知られる CALM 遺伝子破壊メラノサイトにも行う。

## 2.3. CALMノックダウンメラニン合成細胞株の樹立

さて、申請研究の提案を行った際にも CALM 欠損マウスは離乳期以降にごくわずかに存在するだけで、十分な解析を行うことができないことが問題と考えられた。また、生体のメラノサイトの単離培養とメラニン合成の測定はかなりの熟練を要することから、最初はマウスと平行して培養細胞を用いたモデル系で実験も行うこととした。そこで、扱いやすさの点からメラニンを合成しているメラノーマ細胞の B16C2M 細胞をモデル系として、CALM のノックダウンによるメラニン合成への効果を調べるためにノックダウン細胞株の樹立を試み、得た細胞株を用いてメラニン合成と CALM との関連を解析した。

## 2.4. 新しい個体レベルでの解析系を目指して

CALM 欠損マウスは交配を重ねることにより、生存率の低下が著しいことが判明した。特に C57B/6 の遺伝背景では全く生まれてこないことを新たに見出した。今後の個体レベルでの詳しい解析を目指して、新しくコンディショナルノックアウトマウスの作製を検討するために標的部位の解析を研究に加えることとした。加えて、発生後期の胚の検討を行い、CALM と体色との関連を探る手がかりを得ることを試みた。

## 3. 結果

### 3.1. CALM欠損マウスの色の薄さは何に由来するのか

マウス系統の樹立時には、離乳期以降に生存するホモ欠損マウスの数が少ないものの誕生後 1 週間ほどの体色が判

断できる時点までは相当数のホモ欠損体を得ることができた。詳しい解析を安定して行うためにこの申請研究に向けて標準系統の C57BL/6 に戻し交配を行ったところ、誕生後にホモ欠損体が全く出現しなくなってしまった。また姉妹交配で維持していたマウスでも同様の現象が観察された。このことは、CALM 欠損の効果に影響を及ぼすマウスの遺伝子 (いわゆるモディファイヤー) の存在を示唆している。

マウス作製に使用した ES 細胞は C57BL/6 と CBA マウスの雑種一代目に由来することから、現在 CBA マウスへの戻し交配を行っており、誕生するマウスの取得を目指している。なお、我々とは独立に CALM 欠損マウスを作製したハーバード大のグループも CALM ホモ欠損マウスは生まれないとしていることから、我々が遭遇した事態は「ある種のマウスの遺伝背景」によるものだと考えるのは妥当だと判断できる。

### 3.2. CALM欠損培養細胞株の樹立と解析

既に作成している CALM 遺伝子破壊マウスの胎児 (14 日胚) から初代培養を行い、胎児の繊維芽細胞 (MEF 細胞) を得、SV40 ウイルスの不死化遺伝子の T 抗原遺伝子を導入し、CALM 欠損および野生型の株細胞を樹立した。樹立した細胞株を用いて、初めに関与が推定される輸送機構の解析を、蛍光標識したトランスフェリンや EGF 等、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれる分子を取り込ませた後に、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内への取り込みに違いが無いかを解析した。その結果、参考文献 1 に一部報告したように、従来の定説とは異なり、CALM がトランスフェリンの取り込みに重要であることを明らかにした。一方、同じクラスリン依存性で取り込まれる増殖因子の EGF の取り込みには影響が見られないことを発見した。現在、EGF に関しては細胞内への取り込み後の挙動に異常がないかを解析している。

### 3.3. CALMノックダウン細胞の樹立

CALM ノックアウト MEF 細胞では、増殖に問題がないことを確認していたので、ノックダウンは sh-RNA 発現ベクター HuSH (ORIGENE) を用いて、「CALM がノックダウンされた B16C2M メラノーマ細胞株」を樹立することとした。

CALM のノックダウンを目指して、sh-CALM-1 ~ 4 の以下の配列を用いた。

sh-CALM-1: GCCAGAGCCTGACGGACCGAATCACCGCG  
sh-CALM-2: GAGCAAGTTGGAATTGACAGAGGAGATAT  
sh-CALM-3: GAATGATGTAAGTTGGAGTCAACCAGGTG  
sh-CALM-4: ATAATGACTGCACCAGCCATCGACATATT

コントロールとして、空のベクターとランダムな配列の SC を導入した。

図2に示すように、合計61個のクローンを得た。

最初にRT-PCRにて*CALM*のノックダウンの程度を検討した。図2に示すようにsh-CALM-2, 3で良好なノックダウンが見られたが、sh-CALM-1, 4ではあまり効果が見られなかった。これは別の細胞系のBAF3細胞を用いた場合も同様の結果を得ていることから（未発表）、*CALM*のノックダウンにはsh-CALM-2, 3の配列が有効であると考えられる。

良好なノックダウン効果が見られた7つのクローンに関して、再度確認実験をRT-PCRにて行った。結果を図3Aに示す。

うち6クローンに関してウエスタン法で*CALM*タンパク質の発現を検討した。図3Bに示すように、*CALM*タン

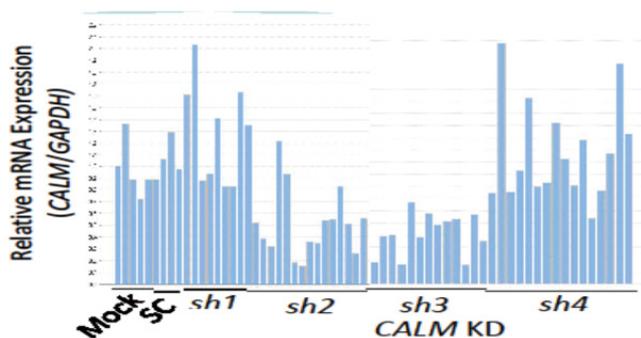
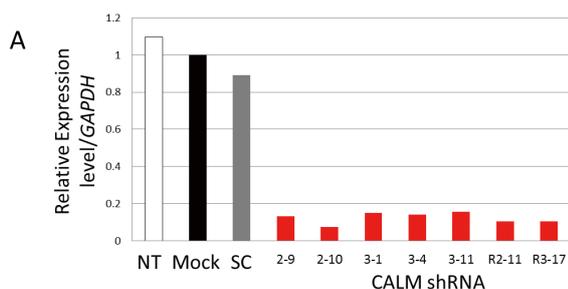


図2



パク質発現の低下が著しいクローン 2-9, 2-10, 3-1 と低下が見られる 3-17, 3-4, あまり低下が見られない 3-11 のクローンが得られた。

これらのクローンを実験に用いることとし、液体窒素中に保存した。

### 3. 4. *CALM*タンパク質の低下とメラニン合成との関連性の検討

スクランブル コントロールを導入した株、sh-CALM-2、sh-CALM-3を導入した株、親株、*CALM*の発現検討の対照として我々が作製した*CALM* KO MEF細胞と*CALM* WT MEF細胞を用いた解析を行った。

まず、選んだ細胞株の*CALM*発現をウエスタン法で確認した。

図4に示すように、向かって左側のB16C2M細胞のKD1はスクランブル コントロールを導入した株、KD4はsh-CALM-2を導入した株、KD5はsh-CALM-3を導入した株、WTは親株B16C2Mである。ウエスタン法のコントロールとして用いたMEF細胞では、WTは*CALM* WT MEF細胞、KOは*CALM* KO MEF細胞である。KOでバンドが検出されないことから抗体の特異性が確認できる。

sh-CALM-2を導入した株 (KD4) と sh-CALM-3を導入した株 (KD5) では*CALM*タンパク質の発現が低下していた。一方で、スクランブル コントロールを導入した株と親株では*CALM*タンパク質の発現が見られた。検出している

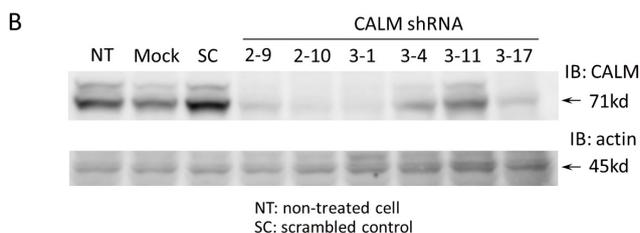


図3

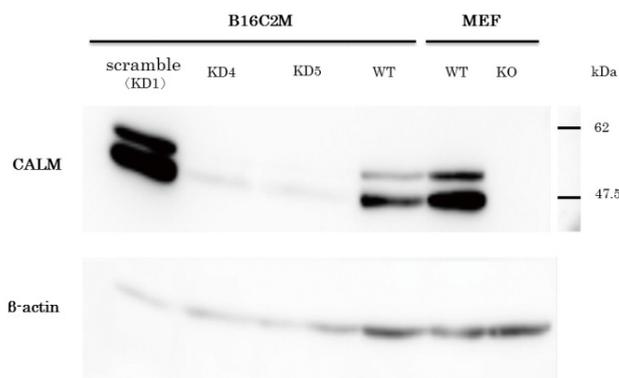


図4

バンドが*CALM* (2本のバンド) であることは、*CALM* WT MEFでバンドが検出され、*CALM* KO MEFで検出されないことから判断できる。また  $\beta$ -アクチンのバンドから、KD4, KD5の*CALM*のバンドがKD1やWTに対しての薄いことが確認できる。

次に、細胞を沈殿させ沈殿の色を比較した。

図5に示したものが結果である。1はスクランブルコントロールを導入した株、2はsh-*CALM*-2を導入した株、3はsh-*CALM*-3を導入した株である。

この結果と先の*CALM*タンパク質の発現解析とからは、*CALM*の発現が低下しているB16細胞では細胞の色が親株の黒から白っぽくなっていることが分かる。

メラニン合成細胞は黒色を呈することから、*CALM*の発現量とメラニン合成とに何らかの関連があることが推察できる。

さらに、この色の変化がメラニン合成の低下によるものかを、吸光度によるメラニン量の測定を行い検討した(図6)。1はスクランブルコントロールを導入した株、2はsh-*CALM*-2を導入した株、3はsh-*CALM*-3を導入した株である。傾向として、*CALM*の発現が低下している細胞ではメラニンの含量が低下しているように見える。

### 3.5. 新しい個体レベルでの解析系を目指して

申請者が作製したKOマウスでは、発生初期から全身で*CALM*が欠損している状態での解析しかできなかったため、前述のように注目しているメラノソームでの解析が困難になっている。参考文献2の白血病との関連や、参考文献4のアルツハイマー症との関連の解析を行う際にも、同様の「解析前に個体が死亡してしまう」という問題を抱えている。より詳しい解析には発生が終了したのちに注目する組織や細胞特異的に*CALM*を欠損させて解析する必要がある。そこで、*CALM*欠損の効果を解析するために新しくcKOマウスを作製するために設計を行っている。参考

文献2で明らかにした*CALM*のNES(核排出)配列の欠損による効果の検討を、樹立した*CALM*欠損細胞を用いて変異体でのレスキュー実験を開始している。

現在までに、2種類知られている*CALM*のアイソフォームのいずれでもトランスフェリンの取り込みが回復することを確認している。現在NES変異体の作製を試みようとしている。

尚、現在保有している*CALM*欠損マウスは誕生直後に死亡すると推察される。そこで、誕生前の発生最終期の胚での解析ができないかを検討している。

E18.5日胚を解析したところ、図7に示すように*CALM*欠損胚では目の黒味が低下している(1, 2, 3の番号を付したホモ欠損体の目は、黒い色が薄くなっている)ことを見出している。今後は、E19.5日胚と誕生直後の胚(P0)を解析して、見出した目の色の薄さを手掛かりに、マウス個体を用いた*CALM*と色との関係を解析できないかを検討したい。

## 4. 考察

これまでの研究期間に、予想したもの、予想しなかったものを含めて以下に述べる成果を得ている。

- (1) *CALM*遺伝子の機能を修飾する遺伝子(モディファイアー)の存在を示唆する結果を得た。
- (2) 戻し交配により(1)の仮説の検証を行う準備ができた。
- (3) *CALM*欠損培養細胞株としてMEF細胞株を樹立し、いくつかの新しい知見を得た。
- (4) メラニン合成への*CALM*の効果の有無を調べるツールとして、*CALM*がノックダウンされたB16C2Mメラノーマ細胞株の樹立に成功した。さらに*CALM*タンパク質量の低下とメラニン合成量の低下とに相関があることを見出した。
- (5) メラノサイトレベル、個体レベルでの解析を可能にすると期待される*CALM*のコンディショナルノックアウト

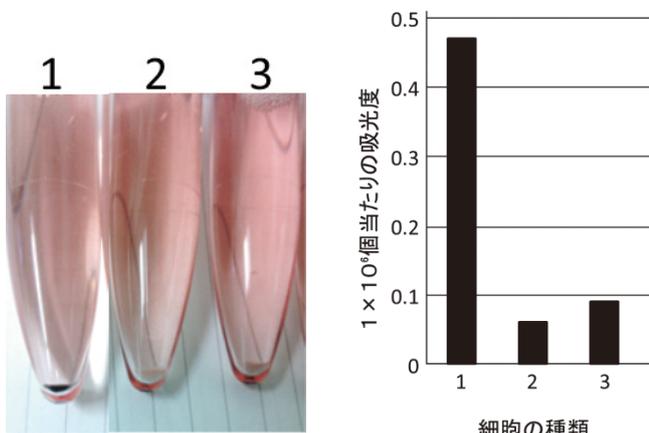


図5

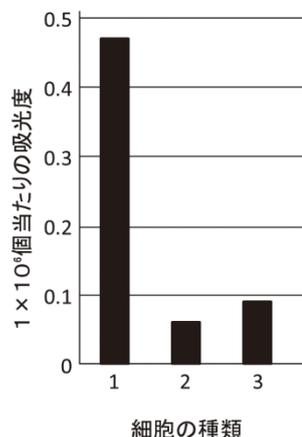


図6



図7

トマウス作製に向けた一歩を踏み出した。

(6) *CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを見出し、マウスを用いた解析の可能性を見出した。

*CALM*欠損マウスが生まれなくなったのは予想外であったが、新しい修飾遺伝子の存在が明らかになり、今後の解析への期待が持てた点は良かった。このために、当初の計画を若干変更してメラノーマ細胞を用いて*CALM*がノックダウンされたB16C2Mメラノーマ細胞株の樹立に成功し、*CALM*タンパク質量の低下とメラニン合成量の低下とに相関があることを見出したことは、今後の解析にとり大きな進捗であった。また予想外の障害を乗り越えるべく、将来的に重要になるとされるコンディショナルノックアウトマウス作製へに向けた一歩を踏み出したことは、研究の進展にとって良かったと思いたい。加えて、*CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを見出し、マウスを用いた解析の可能性を見出した。

今後の課題としては、見出した「*CALM*の発現量が低下するとメラニン合成が低下する」という相関関係は因果関係となり得るのかと言う点がまず解決すべき点である。このために、KD細胞への*CALM*遺伝子導入による*CALM*発現復帰体でのメラニン合成の回復の有無を検討する予定である。さらに、*CALM*低下によるメラニン合成低下の分子メカニズムを探るために、まずはメラニン合成系酵素の動態を探ることを計画している。加えて、*CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを手掛かりに解析が行えるかの検討を計画している。

## 謝 辞

本財団より受けた助成金が研究の一部を担った参考文献10, 11では、Cosmetology Research Foundationよりのサポートがあったことを明記した。

## (参考文献)

- 1) M. Ishida, N. Ohbayashi, Y. Maruta, Y. Ebata Y, Fukuda M. (2012) Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes. *J Cell Sci.* 125, 5177-87. doi: 10.1242/jcs.109314.
- 2) J.G. Donaldson, C.L. Jackson. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 362-375.
- 3) E. Mizuno-Yamasaki, F. Rivera-Molina, P. Novick. (2012) GTPase networks in membrane traffic, *Annu. Rev. Biochem.* 81, 637-659.
- 4) Militello R, Colombo MI. (2013) Small GTPases as regulators of cell division. *Commun Integr Biol.* 6, e25460. doi: 10.4161/cib.25460.
- 5) Seixas E, Barros M, Seabra MC, Barral DC. (2013) Rab and Arf proteins in genetic diseases. *Traffic.* 14, 871-85. doi: 10.1111/tra.12072.
- 6) Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P. (2012) GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem.* 81, 637-59. doi: 10.1146/annurev-biochem-052810-093700.
- 7) Donaldson JG, Jackson CL. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 362-75. doi: 10.1038/nrm3117.
- 8) M. Suzuki, H. Tanaka, A. Tanimura, K. Tanabe, N. Oe, S. Rai, S. Kon, M. Fukumoto, K. Takei, T. Abe, I. Matsumura, Y. Kanakura, T. Watanabe. (2012) The mouse clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization. *PLoS ONE*, 7(2): e31854. doi:10.1371/journal.pone.0031854
- 9) 鈴木麻衣、渡邊利雄 (2012) クラスリン集合因子 CALMはトランスフェリンの取り込みに必要で、欠損は貧血を引き起こす。-培養細胞研究での定説を覆す-細胞工学 31巻 7月号 808-809. HOT PRESS
- 10) M. Suzuki, K. Yamagata, M. Shino, Y. Aikawa, K. Akashi, T. Watanabe, I. Kitabayashi. (2014) The nuclear export signal (NES) within CALM is necessary for CALM-AF10-induced leukemia. *Cancer Science.* 105, 315-323.
- 11) K. Kanatsu, Y. Morohashi, M. Suzuki, T. Watanabe, T. Tomita, T. Iwatsubo. (2014) Decreased CALM expression modulates Aβ42 production through clathrin-mediated endocytosis of γ-secretase. *Nature Communication* DOI: 10.1038/ncomms4386.