

氏 名 小田 奈央子

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2247 号

学位授与の日付 2021年3月 24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Cellular and behavioral functions of *Ar18b* gene revealed by  
targeted genome editing

論文審査委員 主 査 北野 潤  
遺伝学専攻 教授  
平田 たつみ  
遺伝学専攻 教授  
岩里 琢治  
遺伝学専攻 教授  
久保 郁  
遺伝学専攻 准教授  
小林 和人  
福島県立医科大学 生体情報伝達研究所 教授

(様式 3)

## Summary of Doctoral Thesis

Name in full Oda, Naoko

Title

Cellular and behavioral functions of *Arl8b* gene revealed by targeted genome editing

ADP-ribosylation factor-like GTPase 8b (*Arl8b*) is a small GTPase which is primarily localized to lysosomes. *Arl8b* is known to be a key regulator for lysosome positioning. In mammalian cultured cell lines, *Arl8b* knockdown and overexpression induced the distribution of lysosomes in the perinuclear area and the cell peripheral area, respectively. *Arl8b*-mediated lysosomal positioning is closely related to nutrient state-dependent autophagy. As these previous studies have been conducted only on particular cell lines, we do not know whether the phenotypic effects of *Arl8b* in lysosomal functions are general in primary cells. In addition, *Arl8b* has been previously identified as one of the candidate genes underlying a variation in locomotor activity between a laboratory strain C57BL/6J (B6) and a wild-derived mouse strain MSM/MS (MSM). Although previous studies using *Arl8b* knockout mice showed that *Arl8b* is important for survival, degradation of maternal protein, and embryonic development, the functions of *Arl8b* in mouse behavior are still unknown.

In chapter 1, I examined the roles of *Arl8b* in lysosomal positioning in primary cells, mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Using the CRISPR-Cas9 gene editing technique, I generated four types of *Arl8b* gene-edited mutant mouse: *Arl8b* gene knockout (*Arl8b*-KO), a mutant that has a 9-base pair deletion in the coding region of *Arl8b* gene (*Arl8b*<sup>Δ9</sup>), GTP-bound form mutant (*Arl8b*<sup>Q75L</sup>), and GDP-bound form mutant (*Arl8b*<sup>T34N</sup>). *Arl8b*<sup>Δ9</sup> mutant was obtained by chance and its three amino acids deletion was located near an effector domain that interacts with motor proteins. First, I

investigated whether lysosomal positioning is changed depending on nutritional states. In MEFs from wild-type (WT) mice, fetal bovine serum starvation induced perinuclear clustering of lysosomes whereas nutritional recovery restored lysosome distribution to the cell periphery. Next, comparison among MEFs from the four types of *Arl8b* mutant and WT mice showed that lysosomal positioning was not different among genotypes under normal condition or starvation. However, a delay of a response to nutritional recovery was observed in MEFs from *Arl8b*<sup>Δ9/Δ9</sup> and *Arl8b*<sup>T34N/T34N</sup> mice compared to the WT MEFs, while the *Arl8b*<sup>Q75L/Q75L</sup> MEFs were similar to the WT MEFs. This suggests that lysosome positioning in response to nutrient recovery requires *Arl8b* function. Also, the sequence of the three amino acids deleted in *Arl8b*<sup>Δ9</sup> mutants may be important for proper *Arl8b* functions although these three amino acids are not located in GTP-binding domains.

In chapter 2, I investigated behavioral effects of *Arl8b* by using the *Arl8b* gene-edited mice. First, I examined whether the expression level of *Arl8b* is different between MSM and B6. MSM, which shows higher home-cage activity than B6, had higher expression levels of *Arl8b* gene in the striatum and cerebellum than B6. Next, before performing behavioral analyses, I checked the genotypes of the embryos and the newborn mice and found that homozygotes for *Arl8b*-KO, *Arl8b*<sup>Δ9</sup> and *Arl8b*<sup>T34N</sup> died around birth, suggesting that *Arl8b* in its GTP-bound form is required for perinatal survival. Finally, behavioral tests of the *Arl8b* mutants were performed to measure the locomotor activity and anxiety-related behaviors. *Arl8b*<sup>+/-</sup> and *Arl8b*<sup>Q75L/Q75L</sup> did not show any difference from their WT littermates in any measurements. *Arl8b*<sup>+/Δ9</sup> mouse showed higher activity in the early phase of the dark period in the home-cage activity test. Also, *Arl8b*<sup>+/Δ9</sup> mouse showed significantly higher locomotor activity than WT in the open-field test and the light and dark box test. No statistically significant difference was detected between *Arl8b*<sup>+/T34N</sup> mice and their WT littermates, but there was a tendency of *Arl8b*<sup>+/T34N</sup> mice increasing their locomotion activity in the open-field test.

In conclusion, I generated *Arl8b* gene-edited mutant mice and found that Arl8b function is important for lysosome positioning in response to the recovery of nutrition in primary cells. The three amino acids that are located near the effector domain may be important for Arl8b functions. Finally, my behavioral observations demonstrated that Arl8b might be an important regulator for the locomotor activity.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 小田 奈央子

Title  
論文題目 Cellular and behavioral functions of *Arl8b* gene revealed by targeted genome editing

ADP-ribosylation factor-like GTPase 8b (*Arl8b*)は、主にライソゾームに局在する低分子量 GTPase である。これまでの哺乳類由来の細胞株を用いた研究で、*Arl8b* の活性をノックダウンするとライソゾームが核周囲に局在すること、過剰発現させるとライソゾームが細胞の辺縁へ移動することが知られていた。また、細胞株を飢餓状態にさらすとライソゾームが核周囲に集積しオートファジーが促進するが、この過程に *Arl8b* が関与することも示唆されていた。そこで、小田さんは、初代培養細胞でも飢餓状態の変化によってライソゾームの局在が変化するのか、変化するなら *Arl8b* がその過程に関与するのかを検証することとした。また、野生マウス由来系統 MSM は実験用近交系マウス系統の C57Bl/6 よりも行動の活動性が高いことが知られているが、先行研究によって同定された行動活性の原因遺伝子座内に *Arl8b* が局在していることから、*Arl8b* がマウスの行動に与える効果を調べることを小田さんは着想した。

小田さんはまず、ゲノム編集法により、*Arl8b* のノックアウトマウス、および、GTP 結合型 (Q75L) あるいは GDP 結合型 (T34N) の *Arl8b* を持つマウスを作出した。また、キネシンなど他のタンパク質と結合するエフェクター領域に近い 3 アミノ酸をコードする 9 塩基を欠損したマウス (デルタ 9) が偶然に得られたことから、このデルタ 9 マウスも解析に用いた。

まず、野生型マウスから調製したマウス胚由来線維芽細胞 (MEF) において、細胞をウシ胎児血清 (FBS) 抜きの飢餓状態にさらすとライソゾームが核周囲に集積し、FBS を含む富栄養状態に戻すと細胞の辺縁へライソゾームが移動することを見出した。その後、遺伝子編集マウスの解析を行い、刺激前と飢餓状態では、どの遺伝子編集個体由来の MEF も野生型 MEF と大きな違いがないものの、FBS を戻した回復期において、デルタ 9 と GDP 結合型マウスでは、細胞の辺縁へのライソゾームの移動が遅れることを見出した。この結果は、栄養状態の回復期において *Arl8b* が何らかの役割を果たしていることを示す知見である。

ついで、行動実験を実施しようとしたところ、GTP 結合型 *Arl8b* を持つマウス以外の遺伝子編集マウスでは、ホモ接合体が出生前後に致死であったことから、GTP 結合型以外についてはヘテロ接合体個体を用いて行動実験を実施した。行動活性や不安様行動のテストを行った結果、野生型マウスと比較してデルタ 9 のヘテロ接合体は、オープンフィールドでの活動性が高いこと、明暗ボックステストでの暗ボックス内での活動性が高いことを見出した。

以上の通り、小田さんは、*Arl8b* の遺伝子編集マウスを複数系統作出し、初代培養細胞

でのライソゾームの局在に Arl8b が関与すること、特に飢餓からの回復期に Arl8b が重要であることを明らかにした。また、マウスの行動活性に Arl8b が関与すること、さらに、エフェクター領域近くの3アミノ酸が Arl8b の機能に重要な役割を持つことを示した。これらは、Arl8b の機能に関する新しい知見であることに加えて、ライソゾームの機能を理解する上でも将来的に貴重な知見となることが期待される。以上のことから、遺伝学専攻の博士号授与の要件を満たすと全会一致で委員会は判断した。