

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19659

研究課題名(和文) 神経発達障害の病態形成における選択的polyA付加反応の意義

研究課題名(英文) The importance of alternative polyadenylation on the development of neurodevelopmental disorder.

研究代表者

宗宮 仁美 (Hitomi, Soumiya)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20548713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、選択的ポリA付加反応に関わるタンパク質Xのジントラップヘテロ接合型マウスの行動解析を行った。その結果、open field試験では有意な差は認められなかったが、社会性行動の低下を示した。また、脳内の遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、遺伝子発現量自体が大きく変化した遺伝子は少なかったものの、3' UTRの形状が変化した遺伝子は多く存在した。このことからmRNAの3' UTRの変化により社会性行動の低下を導いた可能性が示唆された。またタンパク質Xの過剰発現によりNGFに応答した突起伸長が修飾されることを見出した。

研究成果の概要(英文)： In this study, we investigated the behavior of mice heterozygous for protein X that involved in alternative polyadenylation. The protein X heterozygote mice were not showed the deficient for open field test. On the other hand, they had abnormalities in the social behaviors. Next, we investigated the gene expression and 3' UTR length by RNA-sequence. Protein X deficient were induced the change of 3' UTR length in the several genes. This change may induce the deficient of sociability. Furthermore, the overexpression of protein X in the PC12 cells were modulated the neurite formation induced by NGF.

研究分野：神経科学

キーワード：発達障害 社会性行動

## 1. 研究開始当初の背景

脳の神経細胞では、個々のシナプス連結を独立に制御することで様々な脳領域の神経活動を統合し、認知、記憶・学習、情動制御などの高次脳機能を可能にしている。この機構を支える重要なものとして、シナプス連結に応じた遺伝子の時空間的な発現制御がある。

哺乳類の細胞に存在するほとんどの RNA 前駆体が複数のポリアデニル鎖 (poly A) 付加部位を有し、その選択により 3'側の非翻訳領域 (3'UTR) の長さの多様な mRNA が形成されることが知られている。3'UTR 領域には、RNA 輸送タンパク質や、発現調節に関わる miRNA の結合部位があるため、その長さの違いにより mRNA の細胞内局在、安定性を変化させ、遺伝子発現の多様性を生み出す。従って、選択的 poly A 付加反応は高次脳機能を調節する重要な機構であると考えられるが、その分子機構は不明である。選択的 poly A 付加反応の中心的な役割を果たすと考えられているタンパク質 X について、申請者らは、これまでにタンパク質 X が神経細胞に豊富に発現していること、タンパク質 X の減少により樹状突起の数が変化することを見出している。また、タンパク質 X が知的障害をもつ患者のリンパ球で遺伝子多型があることが報告されている。申請者らが有するタンパク質 X ジェントラップマウスは、胎生致死であるが、ヘテロ接合型 (タンパク質 X  $gt/+$ ) マウスは、通常通り成長する。成長後に新規環境下におくと、卒倒するようなマウスが存在しており、高次脳機能のうち特に情動制御機構に失調が認められる神経発達障害の病態形成に関与する可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、タンパク質 X  $gt/+$  マウスを用いて 1)不安様行動の詳細な解析、2)心理ストレス負荷時の情動制御に関わる脳領域での活動変化及びその標的遺伝子の同定、3)神経回路強化時に使われる神経栄養因子のシグナル経路伝達調節に及ぼすタンパク質 X の役割を明らかにすることで、発達障害や高次脳機能障害の治療薬の開発のための足がかりを作ることとする。

## 3. 研究の方法

### (1) 行動試験

#### open field test

10 cm 区画に区切った 50cm × 50cm × 40cm の open field 装置を設置し、中央にマウスを置いた。装置内を自由に行動させ、マウスの行動を 10 分間観察し、以下の項目を評価した。

- 中央侵入回数：マウスの足が 4 本とも中央の 10cm × 10 cm のマスに入った回数
- 中央滞在時間：マウスが中央のマスに入った時間
- 立ち上がり回数：前足 2 本を床からはなした回数
- 行動量：マウスの移動時間を測定。

#### social interaction test

open field 装置の対角線上の各 4 マス分をそれぞれ Social zone 及び Non-social zone とし、各ゾーンに網かごを設置した (図 1)。装置への馴化後、social zone の網かごに初対面の同性同週齢のマウスをいれ、中央に被験マウスを置いた。装置内を自由に行動させ、10 分間以下の項目を評価した。

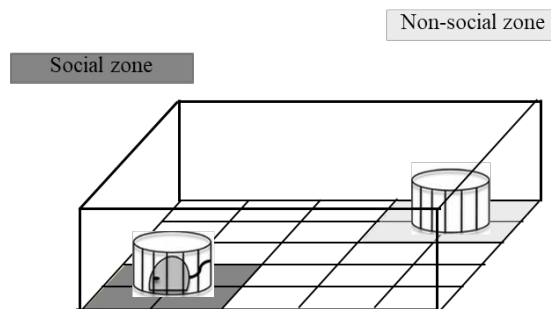


図 1 social interaction test 装置

- 侵入回数・滞在時間：各ゾーンに 4 本とも足が入った回数及び時間を測定
- 臭い嗅ぎ行動回数・時間：網かごの側面に鼻をつけ、sniffing を行った回数及び時間を測定

#### novel objective test

Open field 装置に 2 つの同じ形状の物体 (球状) 入れ、対象のマウスの行動を 10 分間観察する (トレーニング)。装置から対象のマウスを取り出し、1 時間後に、片方の物体を別の形状 (円柱状) に変え、対象のマウスの行動を 5 分間観察し (試験) 以下の項目について評価した。この試験により、マウスの認知機能を評価。

- 接触回数：マウスの鼻先が各物体に接触した回数を測定。鼻先あるいは体が物体から離れたら、1 回とする。新規物体に接触した割合を object preference (%) として評価。
- 接触時間 (s)：マウスの鼻先が各物体に接触した時間 (s) を測定。鼻先あるいは体が物体から離れたら、ストップウォッチを止める。新規物体に接触した時間を novel object interaction (s) (N)、既存物体への接触時間を familiar object interaction (s) (F) とし、以下

の3項目を評価。

- a. INTERACTION TIME (s)
- b. DIFFERENCE SCORE: N-F
- c. DISCRIMINATION RATIO (差別比): N / N+F

#### (2) シナプス関連タンパク質の発現変化

8-10 週齢の雄性 野生型マウスおよびタンパク質 X gt/+ マウスの全脳からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにて評価した。

#### (3) 脳内遺伝子発現変化

8-10 週齢の雄性 野生型マウスおよびタンパク質 X gt/+ マウスの全脳から RNA を抽出し、RNAseq により、遺伝子発現量、アイソフォーム別遺伝子発現量、3' UTR 解析のデータを取得した。

#### (4) ストレス負荷時の神経活動

8-10 週齢雄性野生型マウス、タンパク質 X gt/+マウスを直径 6 センチ、高さ 25 センチの円柱の上に 30 分間おき、精神的なストレスを負荷し、その2時間後に脳を摘出し、免疫染色にて神経活動最初期遺伝子 c-Fos の発現分布を評価した。

#### (5) 神経栄養因子シグナルに及ぼす影響

テトラサイクリン誘導性タンパク質 X 過剰発現 PC12 細胞株を樹立し、NGF による神経突起伸長について評価した。また、タンパク質 X ノックダウン PC12 細胞についても同様に評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 行動試験

##### open field test

評価した中央侵入回数、立ち上がり回数、中央滞在時間のいずれの項目も野生型マウスとタンパク質 X gt/+マウス間で有意な差は認められず、不安様行動は認められなかった。

##### social interaction 試験

マウスは一般的に初対面のマウスとの接触を好む傾向にあるため、social zone での滞在時間が長くなる。野生型マウスでは social zone での滞在時間及び臭い嗅ぎ行動、臭い嗅ぎ時間のいずれも non-social zone に比して有意に増加していた。一方で、タンパク質 X gt/+マウスでは、social zone と non-social zone 間での有意な差は認められなかった。またこの時、各ゾーンでの侵入回数には野生型、タンパク質 X gt/+マウス間で有意な差は認められなかった。このことから、タンパク質 X gt/+マウスでは社会性行動が低下することが示唆された。

##### novel objective 試験

物体認知への影響を調べるため、novel objective 試験を行った。評価した項目い

れも野生型とタンパク質 X gt/+マウス間で差は認められず、物体認知能には影響がない可能性が示唆された。

#### (2) シナプス関連タンパク質の発現変化

シナプス後細胞の足場タンパク質である PSD-95、シナプス前細胞終末に存在するシナプスマーカーであるシナプトフィジン、抑制性シナプスマーカーである GAD67 に対する抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。野生型マウス、タンパク質 X gt/+マウス脳内での発現には差が認められなかった。今回は全脳から抽出したタンパク質を用いたが、脳部位により違いがある可能性もあり、さらなる検討が必要である。

#### (3) 脳内遺伝子発現変化

タンパク質 X の欠損により、選択的 poly A 付加部位の選択の影響及び遺伝子発現にどのような影響を与えたのかを検討するため、全脳から RNA を抽出し、RNAseq により網羅的に解析をした。その結果、mRNA の発現自体には大きな変化は認められなかった。一方で、poly A 付加部位が変化した遺伝子群には、転写調節に関わるものや神経細胞の発達、成熟に関わるものが認められた(図2)。これらの結果により、選択的 poly A 付加部位反応の制御不全により社会性行動に影響が出る可能性が示唆されたが、選択的 poly A 付加部位の位置が変わったことによる RNA の局在変化など今後、さらに検討する予定である。

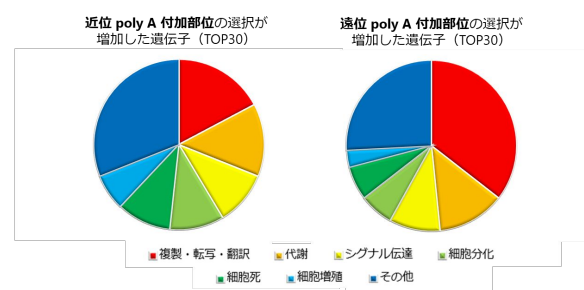


図2 poly A 付加部位が変化した遺伝子の分類

#### (4) ストレス負荷時の神経活動

マウスに心理的なストレスとして高所ストレスを負荷し、その2時間後に脳を摘出し、組織化学的に解析をした。その結果、タンパク質 X gt/+マウスでは、前頭皮質での c-Fos 発現細胞の数の減少傾向にあった。

#### (5) 神経栄養因子シグナルに及ぼす影響

神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞は、血清濃度を下げ、NGF を添加すると増殖を停止し、突起様構造物を伸長させる。タンパク質 X の発現の変動が、NGF による突起伸長に及ぼす影響について検討した。まず、テトラサイクリン誘導性タンパク質 X 過剰発現 PC12

安定変異株を樹立した。樹立した細胞クローンは、ドキシサイクリン非存在下では、タンパク質 X の発現が認められないのに対し、ドキシサイクリンの添加によりその濃度依存的にタンパク質 X が過剰発現するものである。NGF を添加する前にタンパク質 X を過剰発現させると、突起の伸長が有意に抑制された。一方で、NGF 添加と同時にドキシサイクリンを添加した場合には、突起伸長には影響を及ぼさなかった。このことから、タンパク質 X は、NGF により誘導される初期の遺伝子群を制御し、突起伸長を調節している可能性が示唆された。またこの時に NGF により誘導される ERK1/2 シグナル、Akt シグナルには変化が認められなかった。

タンパク質 X に対する shRNA あるいはルシフェラーゼに対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを導入した PC12 細胞を作製した。タンパク質 X shRNA を導入すると、NGF により突起が有意に慎重した。これらのことから、NGF により惹起される突起伸長により誘導される遺伝子群の発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。今後、どのような遺伝子に影響を及ぼしているのか検討する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

選択的 poly A 付加反応制御因子の遺伝子欠損マウスの行動と神経機能に関する研究  
柿原 聡美、宗宮 仁美、大西 諒司、今村 優太、福光 秀文  
第 63 回 日本薬学会東海支部 総会・大会  
2017 年 7 月 8 日 岐阜薬科大学 (岐阜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.gifu-pu.ac.jp/info/organization/list/bunsei/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

宗宮 仁美 (Soumiya Hitomi)  
岐阜薬科大学・助教  
研究者番号：20548713

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )