

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10081

研究課題名(和文) 神経発達障害の情動機能失調の分子機構：選択的polyA付加反応に着目して

研究課題名(英文) Molecular mechanism of emotional dysfunction in mouse model of neurodevelopmental disorders: focusing on alternative polyadenylation

研究代表者

福光 秀文 (Fukumitsu, Hidefumi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00308280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： 選択的 polyA 付加反応の主要な制御因子 Xa の遺伝子改変マウスが社会性行動異常を呈し、ストレスに対して脆弱な神経回路を有することを明らかにした。その後の培養細胞を用いた解析から、Xa は発現量依存的に細胞の様々な性状に影響するが、特に細胞挙動への影響が強いことを明らかにした。また、Xa は標的遺伝子の発現量よりも 3' UTR の形状変化によりトランスクリプトームに影響を与えることが分かった。これらの神経回路および物質基盤が Xa 遺伝子改変マウスの行動異常に結びつくと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

知的障害や自閉症スペクトラム障害を含む神経発達障害の患者数は近年増加傾向にあるが、発症機序は不明なところが多い。一般に、多くの遺伝子 mRNA 前駆体は複数の polyA 付加部位をもち、その選択により 3' UTR 長の異なる多様な mRNA を生成する(選択的 polyA 付加反応：APA)。病態との関係は不明であるが、近年、神経発達障害の患者脳で APA の制御不全の可能性を示唆するデータが集積しつつある。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて、APA の主要な制御因子である Xa の欠損が情動制御や社会性行動異常と関連することを明らかにし、分子機構の一部を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Xa gene deficient mice, one of the key regulators of alternative polyadenylation (APA), showed social behavioral abnormalities with stress-sensitive neural circuits. Subsequent in vitro analyses revealed that Xa affects the various cellular properties in a dose-dependent manner, especially against cell mobilities. Xa was also found to influence on transcriptome by regulating with the length of target gene mRNA's 3'UTR than the expression levels. These alterations in the neural circuits and in the molecular bases are believed to be linked to behavioral abnormalities in Xa gene-modified mice.

研究分野：神経科学

キーワード：神経発達障害 選択的 polyA 付加反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

知的障害や自閉症スペクトラム障害を含む神経発達障害の患者数は近年増加傾向にある。患者の社会適応、自立の困難さ、家族の負担等が社会問題となっているが、発症機序は解明されておらず、薬物治療や養育法は確立していない。

一般に、多くの遺伝子 mRNA 前駆体は複数の polyA 付加部位をもち、その選択により 3' UTR 長の異なる多様な mRNA を生成する (選択的 polyA 付加反応, alternative polyadenylation: APA)。3' UTR は miRNA や RNA 結合タンパク質の標的配列を含み、転写後調節に中心的な役割を果たす。一方、APA に関わる因子 X の主要サブユニット Xa の発現を抑制すると polyA 付加部位が前方シフトし、3' UTR の長さが短い mRNA の生成割合が増大する。

X の脳機能における役割は不明だが、知的障害患者の一部で Xa 遺伝子のコピー数増幅、欠損が報告された。患者の白血球では遺伝変異に伴う Xa の発現量変動により、レット症候群原因遺伝子 MeCP2 を含む様々な遺伝子にて polyA 付加部位のシフトが起こり、それぞれのタンパク質発現が影響を受けており、病態脳形成に関与していると推定されている。

2. 研究の目的

申請者らは、独自に作製・維持している Xa 遺伝子ジーントラップヘテロ接合体 (Xa^{gt/+}) マウスが新規環境下でパニック発作 (けいれん/卒倒) を起こすこと、過剰なストレス応答を抑える脳領域の神経機能が低下していること、を明らかにした (未発表)。このことから、Xa 遺伝子変異は知的障害患者の適応障害と関係の深い情動制御システムの発達に影響を及ぼすのではないかと考えた。

本研究では Xa^{gt/+} マウスの行動や脳の神経科学的变化をもたらす物質基盤を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 行動試験

① open field test

通常飼育ケージと同型のケージを用いて、投入後 8 分間の自発行動量を測定した。

② social interaction test

open field 装置に馴化後、被験マウスと初対面の同性同週齢のマウスをいれ、装置内を自由に行動させ、10 分間における社会性行動 (匂い嗅ぎ、後追いなど) の時間を測定した。

(2) ストレス負荷に伴う神経活動依存的な c-Fos 遺伝子の発現

Xa^{gt/+} マウス (BL6 系) では、情動神経回路の発達不全が考えられたため、身体的ストレスに対する神経応答の違いを検討した。そこで、まず、野生型 ddY マウスに慢性的なストレス (1 日 30 分間連日の拘束ストレス) を与え、同ストレスに対する神経応答の変化を神経活動マーカーである c-Fos を用いて検討した。非ストレス負荷 (non-stress) 群と比較して、1 週間慢性ストレス負荷群 (stress 1 week: S1W) や S2W 群では、拘束ストレスに対する反応が前頭皮質、扁桃体、海馬、室傍核などで顕著に上昇した。同評価系を用いて、BL6 系統の genotype 間の差を検討した (Xa^{gt/+} マウス、wild type マウス)。1 日 1 回 2 時間拘束ストレスを連日 1 週間にわたって負荷した後、経心的に灌流固定した。凍結切片を用いて、脳の神経活動依存的な c-Fos 発現の変化を免疫組織化学的に解析した。

(3) 脳内の神経伝達物質含量

8-10 週齢の雄性野生型マウスおよびタンパク質 Xa^{gt/+} マウスの脳を部位別に摘出し、神経伝達物質とその代謝物の含量を測定した。

(4) 脳内の物質変動 (トランスクリプトーム解析とメタボローム解析)

8-10 週齢の雄性野生型マウスおよびタンパク質 Xa^{gt/+} マウスの全脳サンプルを用いた全メタボローム解析により、脳内で変動する低分子化合物の網羅解析を行った。

全脳の RNAseq については以前の研究で検討済みであったため、本研究では (5) で作製した Tet-On システムを用いた Xa 発現誘導細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。

(5) Xa タンパク質の量的変動が細胞性状に及ぼす影響

Tet-On システムを用いて、ドキシサイクリンの濃度依存的にタンパク質 Xa が発現するモデル細胞を作製した。また、タンパク質 Xa の遺伝子発現を抑制する shRNA 産生ウイルスベクターを作製した。

(6) Xa タンパク質が選択的 polyA 付加反応に及ぼす影響

Xa タンパク質の量的変動が APA に及ぼす影響を調べるため、Xa のいくつかの標的遺伝子の PAS の選択性を評価するベクター系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 行動試験

① open field test

新規の飼育ケージ内では、 $Xa^{gt/+}$ マウスは同腹の wild type マウスと比較して有意に高い行動量を示した。

② social interaction 試験

10 分間の試験のうち、前後 5 分間ずつに分けて評価すると、野生型では前半に比して後半でマウスどうしの接触回数が増え、接触時間が長くなる傾向が示された。一方、 $Xa^{gt/+}$ マウスでは後半ではそのような傾向は見られず、むしろ後半で低下した。また、新規環境下における身づくろい行動は時間の経過とともに減少することが知られており、野生型では前半と比べ、後半で低下したが、 $Xa^{gt/+}$ マウスでは後半ではより増加した。これらの行動変化は $Xa^{gt/+}$ マウスでは不安が強く、社会性行動が低下していることを示している。

(2) ストレス負荷に伴う神経活動依存的な c-Fos 遺伝子の発現

$Xa^{gt/+}$ マウスの扁桃体では、野生型と比してより多くの c-Fos 陽性細胞が認められた (図 1)。このことは同マウスがストレスに脆弱な神経回路を持つ可能性を示唆している。現在、ストレス応答に関連する脳領域のシナプスレベルでの変化について特殊抗体を用いて解析している。

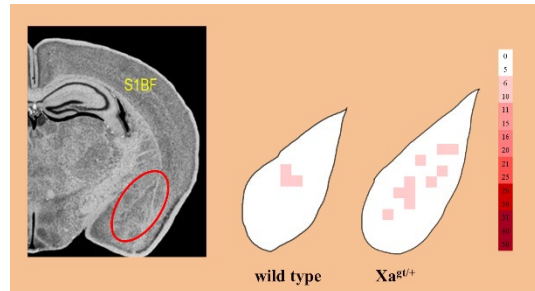


図 1 ストレス負荷に伴う c-Fos 陽性細胞の発現分布。陽性細胞の数をヒートマップにて表した。

(3) 脳内の神経伝達物質含量

$Xa^{gt/+}$ マウスの脳領域特異的な神経伝達物質の含量を測定したところ、特定脳領域において神経伝達物質の有意な変動が認められた。この伝達物質の発現変動が Xa タンパク質の発現変動に伴う全脳の発達不全の結果なのか、あるいは脳部位特異的な神経細胞の分化や成熟もしくは神経伝達物質の生合成・代謝酵素の発現に対する直接的な影響の結果なのかを明らかにするため、分子メカニズムを調べている。

(4) 脳内の物質変動 (トランスクリプトーム解析とメタボローム解析)

全脳サンプルを用いたトランスクリプトームと同様に全メタボローム解析を用いた解析からも、顕著な遺伝子発現および低分子化合物の変動は観察されなかった。したがって、このマウスの行動異常は脳の組織構築あるいは全脳の高度な神経発達異常を伴わないと考えられる。

同様に Tet-On システムを用いた培養細胞実験からも Xa タンパク質の発現増減に伴うトランスクリプトームレベルの変動は観察されなかった。だが、一方で RNA の形状解析からは 3'UTR の長さの変動が観察された。 $Xa^{gt/+}$ マウス脳において伝達物質の代謝変化が見られた領域に絞って全メタボローム解析を進めることで、変調をきたす神経回路とその分子基盤を特定できると考えている。

(5) Xa タンパク質の量的変動が細胞性状に及ぼす影響

Tet-On システムを用いたタンパク質 Xa を発現誘導実験から、外因性の Xa の発現誘導は内因性の Xa の発現低下を招くことを明らかにした。ドキシサイクリン除去後の時間経過を調べたところ、 Xa のタンパク質の半減期は 3 日程度であったが、外因性 Xa の発現誘導に伴う内因性 Xa の発現の半減期は 1 日であることから、内因性 Xa は合成量に応じて新生タンパク質と積極的に置き換えられ、分解されている可能性が示唆された。また、細胞内における Xa タンパク質の総量は別のサブユニット Xb の存在に依存することも明らかにした (Xb の強制発現により 2 倍程度に高められる)。現在、この分解系の特徴を調べている。

また、 Xa 遺伝子の発現増減が細胞性状に及ぼす影響を明らかにするため、まず、すでに報告のあるグリオーマ細胞に対する影響を調べた。Tet-On 誘導系および shRNA を用いて、細胞増殖や細胞運動に及ぼす影響を検討した。その結果、内因性の発現量の 0.5-2.0 倍程度の変動では、生存・増殖には影響を及ぼさないことを明らかにした。一方で、細胞挙動については顕著な影響が認められた。したがって、 Xa は細胞性状に対して、発現量に依存した異なる影響を及ぼすことが予想される。

(6) Xa タンパク質が選択的 polyA 付加反応に及ぼす影響

Xa は量的変動により細胞性状に異なる影響を及ぼすことが明らかになった。そこで、標的遺伝子群の APA に対する Xa の発現量依存的な影響を調べることにした。そのために APA をモニターできるリポーター系の構築を行った。現在、細胞周期依存的に変動する遺伝子 α を含む複数の標的遺伝子の APA レポーターベクターを作製し、そのバリデーションを進めている。当然のことながら、内因性のタンパク質とリポーター系の発現のピークは異なるが、いずれも細胞周期依存的な制御を受けていることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagashima K, Miwa T, Soumiya H, Ushiro D, Takeda-Kawaguchi T, Tamaoki N, Ishiguro S, Sato Y, Miyamoto K, Ohno T, Osawa M, Kunisada T, Shibata T, Tezuka KI, Furukawa S, Fukumitsu H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Priming with FGF2 stimulates human dental pulp cells to promote axonal regeneration and locomotor function recovery after spinal cord injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-13373-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sugiyama K, Nagashima K, Miwa T, Shimizu Y, Kawaguchi T, Iida K, Tamaoki N, Hatakeyama D, Aoki H, Abe C, Morita H, Kunisada T, Shibata T, Fukumitsu H, Tezuka KI	4. 巻 37
2. 論文標題 FGF2-responsive genes in human dental pulp cells assessed using a rat spinal cord injury model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 467 ~ 474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-018-0954-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakade Y, Yamanaka K, Soumiya H, Furukawa S, Fukumitsu H	4. 巻 40
2. 論文標題 Exposure to valproic acid during middle to late-stage corticogenesis induces learning and social behavioral abnormalities with attention deficit/hyperactivity in adult mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 179-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.179	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Soumiya H, Arais H., Furukawa S., Fukumitsu H.	4. 巻 705
2. 論文標題 Pyrroloquinoline quinone improves abnormal functional development of whisker-mediated tactile perception and social behaviors caused by neonatal whisker trimming.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 67-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2019.04.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柿原 聡美、宗宮 仁美、大西 諒司、今村 優太、福光 秀文
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第63回 日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大西 諒司、今村 優太、伊東 沙紀、宗宮 仁美、福光 秀文
2. 発表標題 哺乳類型 mRNA 前駆体開裂因子（CFIm）の発現自己調節機構に関する研究
3. 学会等名 第65回 日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宗宮 仁美、荒磯 ひろみ、五代 亜由美、古川 昭栄、福光 秀文
2. 発表標題 ピロロキノリンキノンは生後10日間マウスの頬ひげを切除することにより生じる触覚認知の機能及び社会性行動の発達異常を改善する。
3. 学会等名 Neuro2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田 まこと、長島 光介、佐藤 友美、尾上 愛、岡田 のりあ、大西 諒司、井本 愛梨香、手塚 建一、宗宮 仁美、古川 昭栄、福光 秀文
2. 発表標題 線維芽細胞増殖因子2処理歯髄細胞の性状と移植による脊髄損傷ラットの運動機能回復効果
3. 学会等名 Neuro2019（第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学大会）2019年7月（新潟市）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	宗宮 仁美 (Soumiya Hitomi) (20548713)	岐阜薬科大学・薬学部・助教 (23701)	