

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06502

研究課題名(和文) 大脳皮質ニューロン線維形成にかかわる新規分子機構

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism involved in fiber growth of the cortical neurons

研究代表者

勝山 裕 (Katsuyama, Yu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10359862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Sbno1は脳の発達に関与することが示唆されているが実験的な証明はない。そこで我々はSbno1が大脳皮質で特異的に顕著するノックアウトマウスを作成した。変異マウスでは脳梁や錐体路の低形成が見られた。このノックアウトマウスの大脳皮質運動野に電気刺激を行うと、四肢の動きを惹起させるためにはコントロールに比べてより大きな電流が必要ことがわかった。また、Sbno1欠損マウスの大脳皮質ニューロンでは軸索と樹状突起の形成不全が起こっていることがわかった。またプロテオミクス解析より多くの既知の転写調節因子が、Sbno1に結合する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトゲノム解析からSbno1は精神疾患や正常な脳の発達に関与していることが示唆されていた。本研究はSbno1は軸索や樹状突起の正常な発達に必要であることを示した。Sbno1は転写因子に結合する可能性が高いことからSbno1は遺伝子発現制御に関わることで神経ネットワークの正常な発達に必要な遺伝子である可能性が高い。Sbno1による遺伝子発現制御は新しい分子機構であり、脳の正常な発生について重要な知見を与える。本研究は将来的に精神疾患の新規診断方法や治療法の開発に貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Although involvement of Sbno1 in psychiatric diseases and brain development was suggested from human genome analyses, experimental study of Sbno1 to examine its function in brain had not been reported. We constructed Sbno1 deficient mouse strain, in which Sbno1 is specifically knocked out in the differentiating cortical neurons. In this mutant, atrophy in the corpus callosum and pyramidal tract was observed. We examine function of cortical motor neurons utilizing intracortical electric stimulation and found that Sbno1 knockout conical neurons require higher amplitude of electric current compared to control brain to induce movements of limbs. We also examined morphology of each single cortical neuron and found neurites were shorter in the knockout neurons compared to normal neurons.

Sbno1 binding candidates that we isolated by proteomics analysis included many transcription factors were, suggesting that Sbno1 involved in neurite growth by regulating genes expression.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経線維成長制御機構

1. 研究開始当初の背景

我々は大脳皮質の発生に関わる新規候補遺伝子探索する過程で、Sbno1 を同定した (Baba et al., 2006)。Sbno1 はショウジョウバエで同定された Strawberry Notch(Sbno)遺伝子の脊椎動物ホモログの1つであり、ショウジョウバエの遺伝学的解析から Sbno は Notch シグナルの下流因子として報告されていた(Coyle-Thompson & Banerjee, 1993)。しかし植物 (Brzezinka et al., 2016)と線虫 (Simms & Baillie, 2010)の Sbno 相同遺伝子、およびマウス Sbno2 (Grill et al., 2015 ; Maruyama et al., 2013)も Notch シグナルとの関連は報告されていない。つまり Sbno1 の神経発生における機能は、これまでの研究から類推することはできない。SBNO1 は GWAS などのゲノム解析でヒトの知的機能障害と関連する遺伝子の1つとして報告され(Bulayeva et al., 2015)、孤発性統合失調症(Girard et al., 2011)や、正常な脳の発達(Taal., et al. 2012)に關与する可能性が示されている。また、我々はウィリアムズ症候 群様の精神遅滞をもつ6歳児の全ゲノム配列を決定し、SBNO1 遺伝子にアミノ酸置換を見出した(Jaen & Katsuyama, 未報告)。これらヒトゲノム解析から、Sbno1 が脳の正常な発達に必要な遺伝子であることが示唆されるが、実験的証明はなされていない。

Sbno1 は核移行シグナルをもつ DNA/RNA ヘリカーゼに類似した一次構造をもつタンパク質であり、DNA 結合因子と相互作用し遺伝子発現制御に関わっていることが示唆されている (Takano et al., 2010)。これまでに神経系の発生における Sbno1 の機能についての論文報告は全くなかった。そこで、ゼブラフィッシュ胚を用い Sbno1 の機能阻害を行ったところ、脳の形態に異常が生じた(Takano et al., 2010; 2011)。次に、Sbno1 タンパク質に対する抗体を作成し、免疫組織化学によって大脳皮質発生過程での Sbno1 の発現を調べた。すると、神経幹細胞がニューロンを産生すると、新生ニューロンで Sbno1 の発現が検出されるようになり、出生後の大脳皮質ニューロンで発現が維持されていることがわかった。

マウスでの Sbno1 機能を明らかにするためにノックアウトマウスの作成を試みた。しかし Sbno1 を受精卵から欠損させると、胚は着床前に致死となることがわかった(勝山 未発表 ; Watanabe et al., 2016)ので、新生ニューロンで特異的にノックアウトが起きる Sbno1 コンディショナルノックアウトマウス(cKO)を作成した。このマウスでは大脳皮質の低形成が見られた。Nissl 染色標本で調べると、Sbno1 cKO マウスの脳では、ニューロンの数には顕著な違いがみられなかった。ニューロンのサブタイプを区別するマーカーの発現を調べた結果、Sbno1 cKO では調べた全てのマーカーは正常に発現しており、ニューロン分化には影響がないことがわかった。しかし、Sbno1 cKO では脳梁や錐体路の発達が極めて悪かった。以上の観察から Sbno1 cKO の脳形態異常は他に類をみないものであることから、Sbno1 の機能解析によりニューロン形態形成における新規分子機構を示すことができるかと期待される。

受精時からの Sbno1 欠損では着床前に胚は致死となる(Watanabe et al., 2017)ため、脳の発生発達における Sbno1 の機能は不明である。大脳皮質で特異的に Sbno1 欠損を行うために、我々は LoxP 配列を Sbno1 遺伝子座位に導入したトランスジェニックマウス(floxed Sbno1)を作成した。我々は Sbno1 特異的抗体を作成し、これを用いて免疫染色を行った。その結果、胎児期の予定大脳皮質神経上皮において、脳室帯から放射移動を始めたニューロンで Sbno1 タンパク質の発現が検出された。Sbno1 発現はニューロン特異的である(勝山、未発表)。そこで、分化を開始したニューロンで特異的に Sbno1 をノックアウトするために、我々は floxed Sbno1 マウスと Nex-Cre ドライバーマウスをかけ合わせ Sbno1 コンディショナルノックアウト(Sbno1 cKO)マウスを作成した。Sbno1 cKO マウスは生後3週で明瞭な四肢の痙性麻痺を呈し、同じ母親マウスから生まれた仔の中からはっきりと区別できる (勝山、未発表)。Sbno1 cKO マウスの脳を Klüver-Barrera (KB) 染色で組織観察すると、大脳皮質が小さく薄くなり、ニューロン

の密度が高くなっていた一方で、層構造は保存されていた(図 2A, B; 井之口 & 勝山, 未発表)。顕著な脳梁の低形成もみられ(図 2C, D)。つまり Sbno1 cKO マウスの大脳皮質ではニューロンの繊維が低形成になっていることが示唆された。以上の観察から Sbno1 cKO マウスでは脳梁や皮質脊髄路といった大脳皮質ニューロンの出力線維の低形成が起こり、それによって運動の障害が生じている可能性がある。

2. 研究の目的

本計画では以下の実験によりニューロンの線維形成とそこに関わるタンパク質・遺伝子の発現を調べ、Sbno1 の機能を明らかにするとともに、Sbno1 に相互作用する分子を単離し、Sbno1 タンパク質の分子機能についても知見を得ることが目的である。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的解析による大脳皮質からの出力の Sbno1 欠損の影響の解析

我々の Sbno1 cKO は出生後 20 日で痙性麻痺を示すが、大脳皮質を胎生期に失ってもこのような麻痺はみられない。Intracortical microstimulation (ICMS: 大脳皮質電気刺激) 実験により錐体路から運動ニューロンを介した筋への回路形成を調べる事が可能である。Sbno1 cKO 皮質では細胞構築から運動野を同定できる(勝山, 未発表)。そこで ICMS 実験により Sbno1 cKO の運動失調が大脳皮質出力線維の低形成に原因があるかを調べた。

実験 : ICMS を行い筋肉の反応を myography で記録し、皮質運動野領域の機能的分布を示し、cKO とコントロールの間で比較し、皮質脊髄路の投射先を調べたところ、大脳皮質運動野の体部位局在には異常がないことがわかった。

実験 : ICMS を用いて四肢の筋肉の収縮を誘発する際に必要な電流閾値を求めたところ、Sbno1 cKO では四肢を動かすためにはより大きな電流が必要なことがわかった。つまり、Sbno1 cKO では大脳皮質から四肢を動かす脊髄運動ニューロンへの投射は完全に失われているわけではなく、組織学的に検出するのは困難であるものの、生理学的には大脳皮質による脊髄運動ニューロンの制御は(効率が落ちてはいるものの)保存されていることがわかった。

(2) Sbno1 cKO 脳の組織学的解析

Sbno1 cKO 脳を出生 21 日で Klüver-Barrera(KB)染色によって組織観察すると、Sbno1 cKO では髄鞘化線維を示す染色がみられない。Sbno1 cKO でニューロン数が減っているという所見はないことから、Sbno1 cKO では神経線維形成に異常が生じている可能性が高い。

実験 : 鍍銀染色による神経線維形態の観察を行う。再現性がよく微差な神経線維をよく染める Bodian 法により脳全体の線維分布をみる。微細な線維に加え主要な線維束を明瞭にそめる Bielschowsky 法により皮質脊髄路など主要な伝導路の形成を調べる。Golgi 法により個々のニューロン形態を明らかにし、ニューロン形態をトレースする。Sholl 解析を行い、主に樹状突起の形態を定量的に調べた結果、Sbno1 cKO の大脳皮質ニューロンでは樹状突起の分岐が減っており、より短くなっていることがわかった。

(3) Sbno1 欠損ニューロンの培養を用いた解析

ニューロンへの分化能がある株化された培養細胞をいくつか入手し、それらの細胞で CRISPR/Cas9 システムによる Sbno1 ノックアウトを試みた。その結果、Neuro2a 細胞において Sbno1 欠損細胞株を確立することに成功した。この細胞をレチノイン酸で処理するとニューロンへの分化が始まる。正常な Neuro2a 細胞ではレチノイン酸投与によって Sbno1 発現が上昇す

ることがわかった。Sbno1 欠損細胞ではニューロンの分化は起こるが、神経線維はコントロール細胞に比べて半分程度にしか伸長せず、コントロールと Sbno1 欠損細胞との間の差は培養を長くするとより顕著になった。このことから細胞増殖段階からニューロンへの分化には Sbno1 は重要ではないが、Sbno1 が欠損すると軸索の伸長が抑えられることがわかった。つまり、sbno1 は軸索を伸長させるのに関与する因子であることが細胞レベルでも証明された。

(4) Sbno1 相互作用因子の単離

Sbno1 タンパク質には2つの核移行シグナルがあり、免疫染色でタンパク質は核に検出された。我々は Sbno1 が転写因子に結合することを示した(Takano et al., 2010)。よって Sbno1 は直接的には遺伝子発現制御に関与する可能性が高い。

遺伝子ノックアウトは受精後 12.5 日から起こるが形態的な異常が現れるのは出生後4日目であり、この時に Sbno1 cK0 では脳室が拡大していることがわかった。また、軸索伸長に必要な遺伝子であるニューロンフィラメント発現についてはコントロールに比べて cK0 で出生後4日から差が見られ出生後7日には cK0 でのニューロフィラメント遺伝子の発現が明瞭に減少した。

上記の実験で Sbno1 cK0 での異常が明瞭になる出生後すぐの時期の大脳皮質を摘出し、Sbno1 抗体を用いて免疫沈降を行い、Sbno1 と一緒に沈降してきたタンパク質は質量分析にかけた結果、多くのタンパク質断片配列の情報が得られた。これら Sbno1 結合候補因子の中で、核内因子を選び、HA タグをつけた cDNA 発現用プラスミドを作成した。タグに対する抗体を用いて免疫沈降法で Sbno1 と候補因子との結合を確認している。

免疫沈降法で Sbno1 との結合が示された分子に関しては、さらに表面プラズモン共鳴バイオセンサー(ピアコア)によって、分子間結合をさらに検討することを計画しており、そのための実験系を確立するための作業を行っている。

4. 研究成果

上記の実験から、軸索と樹状突起は Sbno1 が欠損していても起こるが、Sbno1 機能が失われたニューロンでは、これら神経線維の発達が不十分になることがわかった。このことはヒトのゲノム解析から示唆されている精神疾患への Sbno1 遺伝子の関与とサポートする結果である。Sbno1 機能の軽微な低下により、脳の形態形成には異常が見られないものの神経ネットワークの発達が不十分となるために統合失調症や精神遅滞などの症状が現れると考えられる。

我々は Sbno1 タンパク質の分子機能について知見を得るために、Sbno1 に結合する分子の候補をプロテオミクス解析によって得た。得られた候補分子には転写調節因子が多く含まれていた。Sbno1 は核移行シグナルを2つ持っており、実際に免疫組織学で調べると Sbno1 タンパク質はニューロンの核に検出される。よって、Sbno1 はニューロンにおいて遺伝子発現調節によって、神経線維の発達制御に関与していると考えられる。今後は、Sbno1 タンパク質の遺伝子発現制御機能について研究を行っていくことを計画している。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nimura T, Itoh T, Hagio H, Hayashi T, Di Donato V, Takeuchi M, Itoh T, Inoguchi F, Sato Y, Yamamoto N, Katsuyama Y, Del Bene F, Shimizu T, & Hibi M.	4. 巻 15;455(2)
2. 論文標題 Role of Reelin in cell positioning in the cerebellum and the cerebellum-like structure in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 393-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2019.07.010	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 該当する

1. 著者名 Racetin A, J. et al.	4. 巻 60(6)
2. 論文標題 Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Croatian Medical Journal	6. 最初と最後の頁 521-531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3325/cmj.2019.60.521	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Munkhsoyol Erkhembaatar, Keito Minemori, Iroha Yamamoto, Fuduki Inoguchi, Takashi Imaz, Shinsuke Ikeno, Carina Hanashima, Satoru Yamagishi, Hayato Naka-Kaneda, Kosuke Taki, and Yu Katsuyama
2. 発表標題 The role of the Strawberry Notch Homolog 1 in the neurite growth of the cortical neurons
3. 学会等名 第57回日本発生物学会（大阪）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝山裕
2. 発表標題 形態学的解析を端緒とする遺伝子変異の神経疾患への関与の解明
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iroha Yamamoto, Fuzuki Inoguchi, Satoru Yamagishi, Kosuke Taki, Leanne Delaney, Carina Hanashima, Hayato Naka-Kaneda, Yu Katsuyama
2. 発表標題 Sbno1 is involved in growth of axon and dendrites of the cortical neurons
3. 学会等名 Cell and Developmental biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iroha Yamamoto, Fuzuki Inoguchi, Satoru Yamagishi, Kosuke Taki, Leanne Delaney, Carina Hanashima, Hayato Naka-Kaneda, Yu Katsuyama
2. 発表標題 Cortical neurites growth requires a DNA/RNA helicase family protein Sbno1
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018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	金田 勇人 (Hayato Kaneda) (40528212)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	
研究分担者	椎野 顯彦 (Shiino Akihiko) (50215935)	滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授 (14202)	
研究分担者	平賀 真理子 (Hiraga Mariko) (50638757)	大阪大学・歯学研究科・講師 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------