

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20300108

研究課題名（和文）ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ欠損による行動異常の神経基盤解明

研究課題名（英文）Roles of heparan sulfate endosulfatases in higher brain functions

研究代表者

梶 正幸（MASU MASAYUKI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：20243032

研究成果の概要（和文）：ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ遺伝子（Sulf1 と Sulf2）を単独で破壊した成獣マウスを用いて10数種類の行動実験を実施した。Sulf1 ノックアウトマウスでは、ヒト精神疾患モデルマウスで見られることの多い異常が観察されたが、Sulf2 ノックアウトマウスでは、いずれの行動実験でも異常は見られなかった。ヒト患者対象関連解析では、SULF1 遺伝子と双極性障害の間に遺伝的関連が観察された。

研究成果の概要（英文）：The roles of heparan sulfate endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, in higher brain functions were examined using their respective knockout mice and behavioral test battery. Sulf1 knockout mice showed abnormalities in some behavioral tests, whereas Sulf2 knockout mice showed no behavioral abnormalities. Human SULF1 gene showed genetic association with bipolar disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

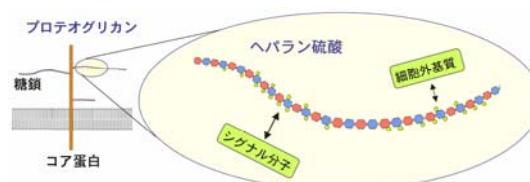
研究分野：分子神経生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：脳・神経、糖鎖、遺伝子、遺伝学

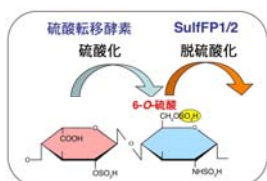
1. 研究開始当初の背景

ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）は、細胞表面または細胞外基質に存在し、細胞の分化、増殖、移動、形態形成などを制御している。これら多様な生物活性は、プロテオグリカンのコア蛋白に共有結合したヘパラン硫酸糖鎖とシグナル分子、受容体、細胞外基質分子との相互作用によることが知られている（図1）。ヘパラン硫酸は、ウロン酸（グルクロン酸またはイズロン酸）とN-アセチルグルコサミンなら成る二糖単位が繰り返した直鎖状の構造を持つ巨大な多糖である。ヘパラン



硫酸は、ウロン酸と硫酸基に富むことから、多くの分子との相互作用が生じる（図1）。硫酸基は、ウロン酸の2位、グルコサミンの6位とN位（まれに3位）に生じるが、その分布や一様ではないため、ヘパラン硫酸糖鎖は膨大な構造多様性を有している。従来、こ

の硫酸化パターンは、N位、2位、6位、3位に特異的に硫酸基を転移する酵素群によって作り出されると考えられてきた。しかしながら、最近、我々を含む複数のグループが新規のスルファターゼ遺伝子（Sulf1 と Sulf2）を発見し、これらが生合成後のヘパラン硫酸に作用して内部の6位の硫酸基を分解するエンドスルファターゼ活性を持つことを明らかにし、Sulf1 と Sulf2 が硫酸化パターン生成に寄与していると考えられるようになった(図2)。これまでに Sulf1 と Sulf2 ノックアウトマウスが作成され、軟骨形成、腎臓形成などに関わるという報告があるが、神経系における役割は不明であった。



2. 研究の目的

Sulf1 と Sulf2 の神経系、特に脳高次機能における役割を明らかにすることを目的とした。更に、Sulf1 と Sulf2 の脳における発現と機能の間に関連があるかどうか、ヒト SULF1、SULF2 遺伝子が精神疾患と遺伝的関連があるかどうかを明らかにすることを目的とした。これまでに Sulf ノックアウトマウス解析の論文が複数報告されているが、いずれも脳機能については解析していない。一方、我々は Sulf1 と Sulf2 が成獣脳でも豊富に存在していること、Sulf1/2 ダブルノックアウトマウスで神経回路形成に異常があることなどを見出しており、神経系において重要な役割を担っていると想定し、本研究を実施した。当初はダブルノックアウトマウスを用いた行動実験も計画していたが、コンジュニク化が進んだ段階でダブルノックアウトマウスが致死になることが判明したため、単独ノックアウトマウスの解析のみを実施することとした。

3. 研究の方法

C57BL/6N 系統に各々10代または12代交配した、Sulf1 または Sulf2 ノックアウトマウスを用いた。ヘテロ同士の交配で誕生した、野性型♂マウスとホモ♂マウス（各20匹）を用いて、宮川剛博士との共同研究で各種行動バッテリー検査を実施し、野性型マウスとホモマウスの中に差があるかどうかを統計的に検定した。また、定法により、in situ ハイブリダイゼーション、免疫組織化学、二糖組成解析、PCR、ウェスタンブロットを実施した。統合失調症および双極性障害の患者 DNA と正常対照群 DNA を用いてゲノムワイド関連解析を実施した。

4. 研究成果

Sulf1、Sulf2 ノックアウトマウスは、外見上正常であり、交配も可能であった。Sulf1（または Sulf2）ノックアウトマウスとも脳で Sulf1（または Sulf2）遺伝子発現が完全に消失しており、Sulf2（または Sulf1）遺伝子による代償はないことを RT-PCR を用いて確認した。更に、ウェスタンブロット解析により、Sulf1、Sulf2 蛋白が作られていないことも確かめた。in situ ハイブリダイゼーションで調べたところ、成獣脳において、Sulf1 は大脳皮質6層、嗅覚経路、梨状葉、側坐核、線条体の一部、視床下部の一部、小脳バーグマングリア、脳室脈絡叢に発現が強かった。一方、Sulf2 は、脳全体のグリア（おそらくオリゴデンドロサイト）に発現するほか、大脳皮質5層、中隔核、海馬 CA3 領域、手綱核などに強い発現が観察された。抗 Sulf2 抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、海馬 CA3 領域にシグナルが観察された。Sulf1 に関しても市販の抗体および自作の抗体を複数試したが、成獣脳で免疫組織化学を行うことのできる抗体は得られなかった。

行動実験としては、オープンフィールド試験、ロタロッド試験、ビーム試験、明暗箱試験、強制水泳試験、ホットプレート試験、プレパルス抑制試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け学習試験、社会性試験を実施し、ホームケージ活動度、日内変動、アルコール嗜好性を測定した。Sulf1 ノックアウトマウスでは、オープンフィールド試験における移動量（活動量）が低下していたが、それ以外のパラメーターに関しては正常であった。また、プレパルス抑制の低下が見られた。一方、Sulf2 ノックアウトマウスでは、上記の行動実験のいずれにおいても異常は観察されなかった。Sulf2 は海馬 CA3 野に強く発現していることから、放射状迷路試験、バーンズ迷路試験を追加して実施したが、記憶学習にも異常は見られなかった。

ヒト SULF1 遺伝子と精神疾患との関連を患者対象解析で調べたところ、双極性障害と有意な関連があることが分かった。従って、SULF1 遺伝子は何らかの機構により双極性障害の発症脆弱性と関連があるのではないかと考えられた。

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8件）

①Koike, S., Yutoh, Y., Keino-Masu, K., Noji, S., Masu, M., and Ohuchi, H. Autotaxin is required for the cranial neural tube closure and establishment of the midbrain-hindbrain boundary during mouse development. Dev. Dyn. 査読有 240

卷, 413-421, 2011

②Syu, A., Ishiguro, H., Inada, T., Horiuchi, Y., Tanaka, S., Ishikawa, M., Arai, M., Itokawa, M., Niizato, K., Iritani, S., Ozaki, N., Takahashi, M., Kakita, A., Takahashi, H., Nawa, H., Keino-Masu, K., Arikawa-Hirasawa, E., and Arinami, T. Association of the HSPG2 Gene with Neuroleptic-Induced Tardive Dyskinesia. *Neuropsychopharmacology* 査読有 35 卷, 1155-1164, 2010.

③Yamazoe, H., Keino-Masu, K., and Masu, M. Combining the Cell Encapsulation Technique and Axon Guidance for Cell Transplantation Therapy. *J. Biomaterial Sci.* 査読有 21 卷, 1815-1826, 2010.

④Koike, S., Keino-Masu, K., and Masu, M. Deficiency of autotaxin/lysophospholipase D results in head cavity formation in mouse embryos through the LPA receptor-Rho-ROCK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 400 卷, 66-71, 2010.

⑤Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., and Masu, M. Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase SulFP2 by furin-type proprotein convertases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 391 卷, 107-112, 2010.

⑥Ikeuchi, Y., Stegmüller, J., Netherton, S., Anh Huynh, M., Masu, M., Frank, D., Bonni, S., and Bonni, A. A SnoN-Ccd1 Pathway Promotes Axonal Morphogenesis in the Mammalian Brain. *J. Neurosci.* 査読有 29 卷, 4312-4321, 2009.

⑦Hatanaka, Y., Matsumoto, T., Yanagawa, Y., Fujisawa, H., Murakami, F., Masu, M. Distinct Roles of Neuropilin 1 Signaling for Radial and Tangential Extension of Callosal Axons. *J. Comp. Neurol.* 査読有 514 卷, 215-225, 2009.

⑧Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T., Sugiyama, F., Takahashi, S., and Masu, M. Autotaxin/lysophospholipase D-mediated LPA Signaling is Required to Form Distinctive Large Lysosomes in the Visceral Endoderm Cells of the Mouse Yolk Sac. *J. Biol. Chem.* 査読有 284 卷, 33561-33570, 2009.

[学会発表] (計 2 3 件)

①Tagiuchi, S. Koike, Y. Yutoh, K. Keino-Masu, S. Noji, M. Masu, H. Ohuchi. Autotaxin is required for anterior neural ridge formation, midbrain-hindbrain boundary patterning, and cranial neural tube closure. 第 33 回日本分子生物学会年

会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010/12/7-10、神戸

②寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 DIX ドメインの X 線結晶構造解析、2010/12/7-10、神戸

③寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹 Wnt シグナル伝達で機能する CCD1 オリゴマー形成機構に関する構造学的研究、日本結晶学会 2010 年年会、2010/12/3-5、大阪

④T. Okada, K. Keino-Masu, S. Nagamine, S. Kunita, S. Takahashi, M. Masu, Heparan sulfate 6-O-endosulfatases are required for neural network formation. The 40th Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2010/11/13-17, San Diego, California, USA

⑤榎正幸 The roles of heparan sulfate in axon guidance. International Graduate Schools International Conference 2010/11/1、つくば

⑥岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、Arie Oosterhof, Toon van Kuppevelt、榎正幸、マウス胎児脳におけるヘパラン硫酸多様性の検出、第 33 回日本神経科学学会大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会、2010/9/2-4、神戸

⑦寺脇慎一、塩見健輔、榎正幸、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達機構ではたらく CCD1 の構造化学的研究、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010/6/16-18、札幌

⑧寺脇慎一、矢野孝明、塩見健輔、榎正幸、庄村康人、小森博文、柴田直樹、樋口芳樹、Wnt シグナル伝達の活性化を制御する新規因子 Coiled-Coil DIX1 (CCD1) の持つ DIX ドメインの X 線結晶構造解析、日本結晶学会、2009 年年会、2009/12/5-6、西宮

⑨岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、榎正幸、電気穿孔法で導入した SulFP1 と SulFP2 で SulFP 欠損マウスの表現型回復の効果が異なる、第 3 回日本神経科学大会、2009/9/16-18、名古屋

⑩岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、榎正幸、ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ SulFP1/2 導入による神経軸索走行回復効果、第 29 回日本糖質学会年会、2009/9/9-11、高山

⑪Masayuki Masu, Seiichi Koike, Tatsuyuki Ohto, and Kazuko Keino-Masu, Cellular Functions of Autotaxin in Neural and Non-neural Systems, FASEB summer research conferences Lysophospholipid Mediators in Health and Disease, 2009/6/28-7/3, Carefree, Arizona, USA

⑫榎正幸、神経回路形成の分子基盤第一回 JAXA/筑波大学医学系ジョイントセミナー、

2009/6/24、つくば

⑬小池誠一、榎和子、大戸達之、杉山文博、高橋智、榎正幸、Autotaxin-LPA シグナル経路はマウス臍側内胚葉細胞のライソソーム形成に必要である、日本生化学会関東支部例会、2009/6/20、つくば

⑭Koike, S., Keino-Masu, K., Ohto, T., Sugiyama, F., Takahashi, T., and Masu, M. Autotaxin-mediated Control of Actin Dynamics through Rho-ROCK-LIM kinase Pathway is Required for Endocytic Vesicle Fusion and Lysosome Biogenesis in Yolk Sac Visceral Endoderm Cells. The 48th annual meeting of the American Society for Cell Biology. 2008/12/13-17, San Francisco, California, USA

⑮榎正幸、岡田拓也、長嶺聖史、塩見健輔、丹波道子、石嶺久子、大戸達之、國田智、高橋智、榎和子、神経発生におけるヘパラン硫酸エンドスルファターゼの役割、第51回日本神経化学学会大会、2008/9/11-13、富山

⑯榎正幸、丹波道子、長嶺聖史、石嶺久子、大戸達之、國田智、高橋智、榎和子、ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ欠損マウス臓器におけるヘパラン硫酸二糖解析第28回日本糖質学会年会、2008/8/18-20、つくば

⑰岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、榎正幸、ヘパラン硫酸6-O-エンドスルファターゼは正常な神経回路形成に必要である、第28回日本糖質学会年会、2008/8/18-20、つくば

⑱榎和子、岡田拓也、塩見健輔、長嶺聖史、丹波道子、石嶺久子、大戸達之、國田智、高橋智、榎正幸、エンドスルファターゼによるヘパラン硫酸リモデリングと生体シグナル制御、第28回日本糖質学会年会、2008/8/18-20、つくば

⑲畠中由美子、松本智子、柳川右千夫、藤澤肇、村上富士夫、榎正幸、大脳皮質交連神経伸長におけるニューロピリン1の機能解析、第31回日本神経科学大会、2008/7/9-11、東京

⑳塩見健輔、桑野剛英、榎和子、榎正幸、ゼブラフィッシュ sulfFP 遺伝子の機能解析第31回日本神経科学大会 2008/7/9-11、東京

㉑榎正幸、村上さおり、岡田拓也、榎和子、グリピカンとシンデカン遺伝子のマウス胎児脳における発現、第31回日本神経科学大会、2008/7/9-11、東京

㉒岡田拓也、榎和子、長嶺聖史、國田智、高橋智、榎正幸、SulfFP 欠損マウスの表現型回復実験、第31回日本神経科学大会、2008/7/9-11、東京

㉓Masu, M., Okada, T., Nagamine, S., and Keino-Masu, K. Heparan sulfate endosulfatases are required for normal

brain development. 17th Biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. 2008/6/1-4, Asilomar, California, USA

〔図書〕 (計1件)

①Keino-Masu, K. and Masu, M. Heparan sulfate endosulfatase assay. In: Experimental Glycoscience (ed. by N. Taniguchi et al.), Springer-Verlag, pp. 123-124, 2008. Total pages 498

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/moinneurobiol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎 正幸 (MASU MASAYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：20243032

(2) 研究分担者

榎 和子 (MASU KAZUKO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：50344883

有波 忠雄 (ARINAMI TADAO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：10212648

(3) 連携研究者

宮川 剛 (MIYAKAWA TSUYOSHI)

藤田保健衛生大学・総合医学研究所・教授
研究者番号：10301780

池田 和隆 (IKEDA KAZUTAKA)

東京都精神医学総合研究所・研究員
研究者番号：60281656