

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591224

研究課題名（和文）発達障害にみられる社会適応不全の分子機構解明と診断治療法の開発

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of the incomplete adaptability for social behaviors in developmental disorders and the development of diagnosis and treatment.

研究代表者

三井 真一（MITSUI SHINICHI）

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：20295661

研究成果の概要（和文）：発達障害モデルである motopsin 欠損マウスの社会刺激に対する海馬の応答性の異常は嗅覚刺激に対する応答性の異常と関連していることが明らかになった。また、motopsin は sez-6 と相互作用することでニューロンの突起進展を制御している可能性が培養細胞を用いた実験で示された。Motopsin 欠損マウス海馬膜蛋白質の網羅的な同定を行い、いくつかの motopsin 基質候補分子を同定した。これらにより発達障害の診断治療法開発の基盤知見が得られつつある。

研究成果の概要（英文）：Our data suggested the following subjects. Abnormal response to social stimulation at the hippocampus of motopsin-deficient mice, known as a model for developmental disorder, appears to be derived from the cognitive deficit to olfactory stimulation. The interaction between motopsin and sez-6 may modulate the development of neuronal processes. Further, proteomic analysis of hippocampus in motopsin-deficient mice identified some candidates for motopsin substrates.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：発達小児科学、精神遅滞、発達障害、motopsin、neurotrypsin、プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

自閉症や精神遅滞といった発達障害は数パーセントの高い罹患率を示す疾患であるにもかかわらず、分子生物学的な発症機構について不明な点が多いがために、診断マーカーや根治療法が皆無な状態である。申請者は、神経系に特異的な分泌型セリンプロテアーゼ motopsin について発現動態や酵素学的性状などを明らかにしてきた。最近、非症候群

性常染色体劣性精神遅滞の原因として motopsin 遺伝子上の突然変異が報告された。そこで、発達障害の分子病態を明らかにするために motopsin 欠損マウスを作製し、1) motopsin 欠損マウスは同種他個体に対して有意に長い時間接触行動を示すこと、2) motopsin 欠損マウスの海馬錐体ニューロンのシナプス密度が低下していること、3) 同種他個体との接触に対する海馬の応答性が

著しく低下していることを見いだした。さらに、錐体ニューロンの樹状突起の分枝を調節する膜貫通蛋白質 *sez-6* や *itm2a* を *motopsin* と相互作用する蛋白質として同定し、*motopsin* の機能を分子レベルで明らかにしつつある。

精神遅滞では社会行動の異常を伴うことが知られている。例えば、Down 症候群や Williams 症候群などの精神遅滞患者では見知らぬ他人に対しても馴れ馴れしいほどの親密さを示す一方で、脆弱 X 症候群ではしばしば自閉症を伴うことが知られている。*Motopsin* 欠損マウスの社会行動の異常は嗅覚系や不安・探索行動の異常ではなく社会的関心の亢進に起因していることから、*motopsin* 欠損マウスの異常を分子レベルで明らかにすることにより、精神遅滞ばかりでなく社会適応異常を示す他の精神疾患の診断・治療法開発に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は社会行動に異常が認められる精神遅滞モデルマウス (*motopsin* 欠損マウス) を用いて、I) *motopsin* 欠損マウスに見られる社会行動異常の分子機構の解明、II) 発達障害の生化学マーカーとなる分子の探索、III) 臨床検体を用いた *motopsin* および関連分子の検出法の確立、を行うことで発達障害の診断・治療法開発の基盤とすることを目的としている。当該期間中には以下の項目を検討することにした。

- (1) 各種刺激に対する海馬ニューロンにおける CREB のリン酸化を指標として、*motopsin* が関わる社会認知機構を解析する。
- (2) 細胞膜上に存在する *Sez-6* と *motopsin* との相互作用の役割を明らかにする。
- (3) *Motopsin* 欠損マウスの脳内蛋白質に対してプロテオーム解析を行い、*motopsin* の基質分子および診断マーカーの候補分子を同定する。
- (4) 抗 *motopsin* モノクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA による *motopsin* 測定系を確立する。

3. 研究の方法

(1) *Motopsin* 欠損マウスにおける海馬の応答性の検討

雄の *motopsin* 欠損マウスおよび野生型マウスを実験ステージ上で 4 時間以上馴化した。これらのマウスに対して 150 μ L の他マウスの尿を染みこませた濾紙を 10 分間提示した。また、尿臭刺激の代わりにアクリルケースに入れたマウスを 10 分間提示し、社会的な視覚刺激とした。刺激 90 分後に被検マウスを 4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定し、脳を摘出した。凍結切片法により作製した脳薄切切片を抗 CREB 抗体および抗リン酸化 CREB 抗体を用いて蛍光免疫二重染色することで海馬錐体ニューロンの応答性を検討した。

(2) *Motopsin* と *sez-6* との相互作用の解析
EGFP cDNA を *motopsin* cDNA、および、myc-tagged *sez-6* cDNA の両者、あるいはそれぞれとタンデムに連結したプラスミドベクター (EGFP, EGFP+*motopsin*, EGFP+*sez-6*, EGFP+*motopsin*+*sez-6*) を構築した。各 cDNA の発現量を確保する為に、それぞれを発現させるプロモーターは異なるものを使用した。これらをリポフェクション法により、神経芽細胞腫 *neuro2a* にトランスフェクトした。2 日後に細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し、抗 GFP 抗体、抗 *motopsin* 抗体、抗 *sez-6* 抗体による三重蛍光免疫細胞染色を行い、導入遺伝子が発現している細胞について写真撮影し、突起の数、長さ、分枝数、細胞体の大きさ等を NIH image を用いて計測した。

(3) *Motopsin* 欠損マウス脳でのプロテオーム解析

生後 10 日の *motopsin* 欠損マウスおよび野生型マウスから海馬を取り出し、340 mM sucrose, 4 mM HEPES-OH (pH7.4) 中でホモゲナイズし、10,000 \times g、10 分間遠心して上清 (可溶性画分) と沈殿を得た。沈殿に 0.5% Triton X-100 を含む抽出バッファーで再抽出を行った後、1000,000 \times g、1 時間の遠心して得られた上清 (Triton 可溶性画分) 沈殿

表 1. *Motopsin* と *sez-6* との共発現の細胞形態への影響

	EGFP	EGFP+ <i>sez-6</i>	EGFP+ <i>motopsin</i>	EGFP+ <i>sez-6</i> + <i>motopsin</i>	P 値
細胞体周囲長	92.62 \pm 8.20 μ m	73.82 \pm 9.45 μ m	76.21 \pm 8.00 μ m	83.26 \pm 7.68 μ m	0.40
神経突起数	0.75 \pm 0.13	0.74 \pm 0.15	1.41 \pm 0.12 ^a	0.71 \pm 0.12	<0.0001
突起分枝数	0.25 \pm 0.16	0.12 \pm 0.18	0.90 \pm 0.15 ^b	0.54 \pm 0.15	0.0029
神経突起長	31.60 \pm 7.34 μ m	32.45 \pm 8.45 μ m	68.45 \pm 7.09 μ m ^a	31.06 \pm 6.87 μ m	0.0003

a, EGFP, EGFP+*sez-6*, EGFP+*Sez-6*+*motopsin* と有意差がある

b, EGFP, EGFP+*sez-6* と有意差がある

(Triton 不溶性画分)を得た。100 μ g の Triton 可溶性画分を 8-16% アクリルアミドのグラジエントゲルを用いて SDS-polyacrylamide gel 電気泳動した。ゲルの泳動レーンを上から 5 mm ごとにスライスし、trypsin による in gel digestion を行った。得られたペプチドフラグメントはフォーリエ変換型の LC-MS/MS によって同定し、同定したペプチドのカウント数とゲル片の位置から推定される分子量を motopsin 欠損マウスと野生型マウスとの間で比較した。

(4) 抗 motopsin モノクローナル抗体の作製 NUS-tag (NOVAGEN) を付加した motopsin を IPTG 存在下で大腸菌に発現させた。菌体内の封入体を 8 M 尿素を含む緩衝液に溶解し、Hitrap Q 陰イオン交換カラムによって組換え motopsin を調製した (Brain Research 1136, 1, 2007)。これを Balb/c にもどし交配した motopsin 欠損マウスに免疫した。尾静脈から採血して調製した抗血清について、motopsin を一過的に発現させた neuro2a に対する免疫応答性を確認することで抗体価の上昇を確認した。最終免疫から 3 日後に抗体価が上昇した個体の脾細胞を調製し、ClonaCell HY ハイブリドマクローニングキットを用いてモノクローナル抗体の作製を試みた。

4. 研究成果

(1) Motopsin 欠損マウスにおける海馬の応答性の検討

マウスに尿臭刺激を提示した場合に尿臭に対して嗅ぎ行動を示した時間は motopsin KO マウス 99.11 ± 24.91 秒 ($n=7$, 平均 \pm SED) に対して野生型マウス 120.18 ± 24.91 秒 ($n=7$) であり、両者に差は認められなかった (Student's t-test, $P > 0.05$)。しかし、海馬 CA1 領域での CREB の蛍光強度に対するリン酸化 CREB の蛍光強度の比 (pCREB/CREB) は motopsin KO マウス 0.46 ± 0.14 ($n=5$) に対して野生型マウス 0.87 ± 0.16 ($n=4$) であり、両者には有意に差が認められた ($P < 0.05$)。

一方、嗅覚刺激を与えないようにアクリルケースに入れて刺激マウスを提示した場合の嗅ぎ行動の時間は motopsin KO マウス 13.98 ± 2.03 秒 ($n=14$) と野生型マウス 12.32 ± 2.03 秒 ($n=14$) であり、両者に差は認められなかった。この場合の pCREB/CREB は motopsin KO マウス 0.49 ± 0.22 ($n=7$) と野生型マウス 0.65 ± 0.22 ($n=7$) で両者に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。

(2) Motopsin と sez-6 との相互作用の解析 EGFP を単独で発現させた群を対照群とし、EGFP+sez6、EGFP+motopsin、EGFP+sez-6+motopsin を発現させた場合の細胞体の周囲長、神経突起数、神経突起の分枝数、および

神経突起の長さは表 1 の通りであった。Sez-6 は単独で発現させても細胞形態への影響は認められなかったが、motopsin を単独に発現させると神経突起の数、長さ、および分枝数が有意に増加した。興味深いことに sez-6 を共発現させると motopsin による突起数の増加が完全に抑制された。突起の伸長も半分程度に抑制される傾向が認められた。この結果、motopsin は sez-6 との相互作用を介して神経突起の進展を制御している可能性を示唆している。

(3) Motopsin 欠損マウス脳でのプロテオーム解析

Triton 可溶性画分について網羅的な解析を行い、1390 種の蛋白質を同定した。これらを Gene ontology に従って細胞画分別に分類すると図 2 のようになり、膜蛋白質やミトコンドリア局在蛋白質が多く同定されることから、Triton 可溶性画分の調製は予想通り行われたと考えられる。また、野生型マウスのみで同定できた蛋白質は 312 種で、motopsin 欠損マウスのみで同定できた蛋白質は 147 種であった。さらに、ニューロンの膜上に局在し、ペプチドの出現パターンが遺伝子欠損マウスと野生型マウスによって異なる蛋白質をいくつか見出すことができた。

(4) 抗 motopsin モノクローナル抗体の作製 4 匹の motopsin 欠損マウスに組換え motopsin を免疫したところ、1 匹について抗 motopsin 抗体の抗体価が上昇した。この個体から脾細胞を調製し、モノクローナル抗体の産生細胞株の取得を試みた。免疫細胞化学的手法によっておよそ 700 クローンを検討したが、抗 motopsin 抗体産生株は得ることができなかった。現在、さらなるクローンを検索するために免疫方法等を再検討しているところである。

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 2 件)

- ① Osaki, G., Mitsui, S., Yuri, K., The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody. Brain Research, 1386, 58-69, 2011. 「査読有」
- ② Mitsui, S., Osako, Y., Yokoi, F., Dang, M. T., Yuri, K., Li, Y., Yamaguchi, N., A mental retardation gene, motopsin/neurotrypsin/prss12, modulates hippocampal function and

social interaction., European Journal of Neuroscience 30, 2368-2378, 2009.
「査読有」

〔学会発表〕(計10件)

- ① 三井真一、由利和也：精神遅滞原因遺伝子 motopsinとSeizure related protein-6 (Sez-6)の相互作用による神経突起伸制御. 第88回日本生理学会大会, 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会, 横浜, 2011.3.28-30
- ② Mitsui, S.: A mental retardation-related protease, motopsin (PRSS12), modulates social behavior and hippocampal function: Sixth General Meeting of the International Proteolysis Society. Gold Coast, Australia, 2009.10.26-30
- ③ 三井真一：分泌型プロテアーゼによる脳高次機能の制御. 日本解剖学会第64回中国・四国支部学術集会, 高知, 2009.10.24-25
- ④ 三井真一、大迫洋治、由利和也：脳内プロテアーゼ motopsin/neurotrypsin欠損マウスに見られるCREBリン酸化と行動の異常. 第50回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 大津, 2009.9.26-27
- ⑤ 三井真一、大迫洋治、Yuqing Li、由利和也、山口希：精神遅滞原因遺伝子 motopsin/neurotrypsin欠損マウスに見られる行動学異常と海馬の機能異常. 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会, 岡山, 2009.3.28-30
- ⑥ 三井真一、大迫洋治、Yuqing Li、山口希、由利和也：精神遅滞原因遺伝子 motopsin欠損マウスに見られる海馬でのCREBのリン酸化の異常. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学大会合同大会, 神戸市, 2008.12.9-12
- ⑦ Mitsui, S., Osako, Y., Yokoi, F., Dang, M. T., Yuri, K., Li, Y., Yamaguchi, N.: Mice lacking a mental retardation gene, motopsin/neurotrypsin/prss12, show enhanced social behavior and impaired spatial memory. Neuroscience 2008. Washington, DC. 2008.11.15-19
- ⑧ 三井真一、大迫洋治、Yuqing Li、由利和也：精神遅滞原因遺伝子 motopsin欠損マウスにおける海馬ニューロンの機能・形態の異常. 日本解剖学会第63回中国・四国支部学術集会, 出雲市, 2008.10.25-26
- ⑨ 三井真一、足立貴世美、由利和也：Itm2aは精神遅滞原因遺伝子 motopsin/prss12と相互作用する. 第31回神経科学大会, 東京, 2008.7.9-11
- ⑩ 三井真一：社会行動異常を示す遺伝子欠損マウスの発達障害モデル動物としての利用. 第7回国際バイオEXPO, 東京, 2008.7.2-4

〔その他〕

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~ff_antml/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井 真一 (MITSUI SHINICHI)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：20295661

(2) 研究分担者

由利 和也 (YURI KAZUNARI)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：10220534

大迫 洋治 (OSAKO YOJI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：40335922

細川 貞利 (HOSOKAWA SADATOSHI)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：10380312

足立 貴世美 (ADACHI KIYOMI)
(H20-H21のみ、退職の為)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：60335932