

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21390318

研究課題名（和文）

神経発達におけるセプチンの機能と自閉症・広汎性発達障害との関連性の解析

研究課題名（英文）Septin functions and autistic spectrum disorder/pervasive developmental disorders during neuronal development

研究代表者

永田 浩一（NAGATA KOH-ICHI）

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・部長

研究者番号：50252143

研究成果の概要（和文）：

Sept14は神経組織に大量に存在し、発生過程の大脳皮質の形成過程において必須の役割を果たすことから、小児知的障害・発達障害との関連性が示唆される。本研究ではSept14とSept4について生化学的な相互作用分子スクリーニングを行い、その分子機能の解明を試みた。親和性クロマトグラフィーと質量分析（shotgun LC-MS/MS）を組み合わせる手法で網羅的スクリーニングを実施した結果、細胞骨格系蛋白質のダイナミクス制御において重要な役割を担っている分子を相互作用候補として複数見出した。これらの候補分子の中には神経細胞遊走に関与することがすでに報告されているものもあり、Septin の分子作用機序を解明する上での重要な手がかりとなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Sept14 is strongly expressed in the cortical plate of developing cerebral cortex, suggesting its pathophysiological role in developmental disorders. We thus screened binding partners for Sept14 and Sept4. Affinity chromatography combined with shotgun LC-MS/MS revealed that many proteins functioning in the cytoskeleton regulation interact with these septins. We are focusing on several molecules, of which involvement in neuronal cell migration has been reported, such as coffilin, drebrin and filamin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

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：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

（1）神経系が正常な機能を発揮するにあたっては、1)神経細胞の分化、2)個々の神経細胞の適切な領域への移動、3)神経細胞同士もしくは神経-投射先組織間での適切なシナプ

ス形成が必須である。現在ではこのような神経回路構築の過程における異常が自閉症・広汎性発達障害や注意欠陥・多動性障害(AD/HD)の一因である可能性が広く認知されている。また自閉症・広汎性発達障害には明

らかな遺伝性を示すケースも存在し、これら疾患の原因もしくは発症リスクに関連する遺伝子変異が幾つか報告されていた。

(2) セプチンは、酵母から哺乳類まで保存されている分子量4～8万のGTP結合蛋白質群である。構造的には種々のセプチンが複合体を形成し、アクチンや微小管細胞骨格と相互作用することで細胞骨格の機能を制御すると考えられている。哺乳動物では13種のセプチン(Sept1～Sept14; Sept13は偽遺伝子)が存在しており、分子ファミリーを形成している。私共を含む近年の研究で、セプチンが発達障害や遺伝性神経疾患の病態に関与する可能性が強く示唆されている。例えば、①ダウン症患者脳組織において複数のセプチンの発現上昇/減少が認められる、②Sept9の点突然変異による1アミノ酸置換が遺伝性神経痛性筋萎縮症の病態を形成する、③双極性障害と統合失調症で多彩なセプチンの発現異常が認められること、などが報告された。さらに、パーキンソン病患者脳組織におけるレビー小体へのSept4の集積やアルツハイマー病患者脳組織でのSept1, Sept2, Sept4の異常集積、も報告されている。また、正常機能解析により、①神経組織に多彩なセプチン分子種が多量に存在する、②Sept2, Sept4, Sept8が神経伝達物質の放出に関与する、③Sept9の発現が脳由来神経栄養因子BDNFにより増強する、ことも私共や他のグループにより示された。これらの結果は、セプチンが発達期～成人に至る脳機能の発現に必須であることを強く示唆する。しかし、神経発達期におけるセプチンの機能については、国内外でほとんど研究されていない。

(3) セプチンが神経回路形成・神経機能獲得に深く関与し、その異常が神経疾患や発達障害の病態を形成する可能性は高いものの、具体的な機能およびその作用メカニズム、更に各セプチン分子間の機能連関は全く解明されていない。見方を変えると、セプチンが神経発達と神経回路の形成に果たす役割を解明すれば、その機能異常が背景となっている疾患の病態解析、新規疾患の同定およびそれらの治療法の開発に結びつく可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では神経疾患との関連が示唆されている蛋白質、セプチンに焦点を絞り、セプチンが神経発達過程で果たす機能およびその作用機序の解明を第一の目的とし、最終的には神経発達障害や小児神経疾患の病態解明と新規治療法開発の基礎とすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 神経発達におけるセプチンの役割をSept4, Sept14およびSept9に焦点を絞って包括的に解析した。Sept4とSept14に関しては、大脳皮質神経細胞の正確な局在化(即ち、大脳皮質層構造の正確な構築)に果たす役割を分子レベルで検証した。具体的には、子宮内胎仔遺伝子導入法(妊娠マウスを開腹して子宮内胎仔の脳室に遺伝子を注入し、子宮壁の外側から電圧をかけることで遺伝子を胎仔脳内に導入する方法)を用いて、マウス胎仔脳にセプチン遺伝子やその変異体、あるいはsiRNAを導入した。適当な時間が経過した後に胎仔脳の切片を作成した。そして、遺伝子やsiRNA導入の結果起こる神経細胞の分化・移動については大脳皮質の層構造の構築の変化を、タイムラプス・イメージングを主体とする共焦点レーザー顕微鏡観察で時間的・空間的に解析した。さらに、神経発達段階でSept4およびSept14と相互作用する分子群を生化学的に同定し、これらのセプチンが、どのような細胞内シグナル伝達機構と関連しあいながら機能を発揮しているかを分子レベルで解析した。

(2) Sept9に関しては、ミトコンドリアの形態および機能制御の観点から解析を遂行する。具体的には、中枢神経系および末梢神経系培養細胞を用いて形態学的・分子細胞生物学的にSept9の機能解析を行うと共に、結合蛋白質の同定と結合のメカニズムの解析も行った。

(3) 上述の基礎的なセプチン機能解析と平行して臨床面からのアプローチも試みた。即ち、自治医科大学小児科で得られた自閉症や発達障害患者の血液検体を用いて、Sept5とSept8の変異および発現プロファイルを解析する。そして、セプチンの遺伝子レベルでの異常の有無を検証した。

4. 研究成果

(1) Sept14はSeptinと呼ばれる細胞骨格関連蛋白質ファミリーのメンバーで、神経組織に大量に存在する。発生過程の大脳皮質の形成過程において必須の役割を果たすことから、小児知的障害・発達障害との関連性が示唆される。実際、胎生期マウスの脳室帯細胞でのSept14の発現抑制を行うと、皮質錐体神経細胞の局在異常が生じた。その結果、Sept14発現抑制細胞が局在の異常が観察されるとともに、神経細胞の形態的な異常も観察された。一方、神経幹細胞の分化過程はSept14の発現抑制による影響を受けなかった。さらに、Sept14の機能を分子レベルで解明するために結合蛋白質の探索を行い、Septinファミリー分子であるSept4を見出した。Sept14とSept4は脳組織において共局在すると共に、生化学的に結合した。胎児期の

マウス脳で Sept4 を発現抑制すると、Sept14 の発現抑制の場合と非常に良く似た表現型が観察され、神経細胞の移動と形態の異常が観察された。さらに、神経細胞の正常な移動には、内在性の Sept14 と Sept4 の相互作用が必須であることも判明した。

(2) Sept8 は、ラット脳の発達に伴って増加し、成熟マウスでは神経シナプスに存在する Septin である。Sept8 の異常も知的障害や発達障害と関連する可能性がある。そこで、Sept8 の神経における生理機能を個体レベルで明らかにすることを目指し、Sept8 のノックアウトマウスの作成を試みている。これまでに floxed マウスの作成を完了し、現在、神経組織特異的なコンディショナル・ノックアウトマウスの作成に着手している。さらにホモの欠損マウスも作成中であり、順調な経過を辿っている。

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 9 件)

- ① 伊東秀記、永田浩一：統合失調症脆弱性遺伝子産物 Dysbindin-1 の機能-病態との関連性。日本神経精神薬理学雑誌 31:35-40, 2011 査読なし
- ② Hamatake M, Miyazaki N, Sudo K, Matsuda M, Sadakata T, Furuya A, Ichisaka S, Hata Y, Nakagawa C, Nagata K, Furuichi T, Katoh-Semba R: Phase advance of the light-dark cycle perturbs diurnal rhythms of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels, which reduces synaptophysin-positive presynaptic terminals in the cortex of juvenile rats. *J. Biol. Chem.* 286: 21478-21487, 2011 査読あり doi: 10.1074/jbc.M110.195859.
- ③ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata K: Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Mol. Psychiatry* 15: 976-986, 2010 査読あり

doi: 10.1038/mp.2010.69.

- ④ Shinoda T, Ito H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Nagata K: Septin 14 is involved in cortical neuronal migration via interaction with Septin 4.

Mol. Biol. Cell 21, 1324-1334, 2010 査読あり doi: 10.1091/mbc.E09-10-0869.

- ⑤ 伊東秀記、篠田友靖、永田浩一：SNARE 複合体形成におけるセプチンの役割 生体の科学 61(3) : 242-246, 2010 査読なし

- ⑥ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K, Nagata K: Dysbindin-1, a schizophrenia-related molecule, is involved in the regulation of neuronal dendritic development.

Mol Psychiatry 15: 969, 2010 (IMAGE) 査読あり doi: 10.1038/mp.2010.93.

- ⑦ Li X, Serwanski DR, Miralles CP, Nagata K, De Blas AL: Septin 11 is present in gabaergic synapses and plays a functional role in the cytoarchitecture of neurons and gabaergic synaptic connectivity.

J. Biol. Chem. 284, 17253-17265, 2009 査読あり doi: 10.1074/jbc.M109.008870.

- ⑧ Iguchi Y, Katsuno M, Niwa J, Yamada S, Sone J, Waza M, Adachi H, Tanaka F, Nagata K, Arimura N, Watanabe T, Kaibuchi K, Sobue G: TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J. Biol. Chem.* 284, 22059-22066, 2009 査読あり doi: 10.1074/jbc.M109.012195.

- ⑨ Nagata K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T: Interaction of a multi-domain adaptor protein, vinexin, with a Rho-effector, Rhotekin. *Med. Mol. Morphol.* 42, 9-15, 2009 査読あり

doi: 10.1007/s00795-008-0433-8.

〔学会発表〕(計13件)
シンポジウム

① Nagata K, Shinoda T, Nishimura YV, Ito H: Role of the septin in neural cell migration during brain development. International Society of Neurochemistry 23rd Biennial Meeting, "Septin and Disease" Athens, Greece, 8.29.2011

② Nagata K: Possible roles of septins in neural cell migration during brain development. The First International Mini-symposium on Brain Disease & Septin Research, Philadelphia, USA. 3.24.2010

③ Arora P, Basu A, Krishnan R, Nagata K and Kaushik-Basu N. Identification of the Rho effector Rhotekin as a novel host factor mediating hepatitis C virus replication through NS5B interaction. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice Acropolis, Nice, France, 10.4.2009

ワークショップ

④ Shinoda T, Ito H, Nishimura YV, Nagata K: EMBO workshop "Function and Structure of Septins". Role of the Septin in neural cell migration during brain development—Screening of novel interacting partners. St. Goar, Germany, 3.9.2011

⑤ Ito H, Shinoda T, Nishimura YV, Nagata K: Neurogenetics Seminar Series. Regulation of neuronal development by adaptor proteins, Septin and Dysbindin-1. Max-Planck-Institute of Experimental Medicine. Goettingen, Germany, 2011.3.4

⑥ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Nagata K: International Society

of Neurochemistry 23rd Biennial Meeting, Satellite Meeting "The Glutamatergic Synapse" A Novel function of Dysbindin-1, a schizophrenia risk factor, supporting neurodevelopmental hypothesis. Heraklion, Greece 9.4.2011

⑦ Nagata K, Shinoda T, Ito H: The spring Janelia Farm conference "Structure and Function of Septins". Possible roles of Sept14 and Sept4 in neural cell polarization during brain development. Washigton DC, USA, 3.18.2009.

一般演題

⑧ Ito H, Morishita R, Nishimura YV, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Nagata K: Functional analysis of Dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine formation. American Society for Cell Biology Annual Meeting, Denver 12.4.2011

⑨ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Okamoto K Nagata K: Dysbindin-1, a schizophrenia risk factor, regulates dendritic spine formation: Evidence supporting neurodevelopmental hypothesis. 50th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Philadelphia, 12.13.2010

⑩ Ito H, Morishita R, Shinoda T, Iwamoto I, Sudo K, Nagata K: Schizophrenia susceptibility gene, Dysbindin-1, regulates the dendritic spine formation: Evidence Supporting neurodevelopmental hypothesis The 10th Biennial meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry Phuket, Thailand 10.17.2010

⑪ Kaushik-Basu N, Arora P, Basu A, Nagata K, Krishnan K: Rhotekin-A Rho effector protein regulates Hepatitis C virus RNA

replication. 17th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice Acropolis, Yokohama, 9.14.2010.

⑫ Arora P, Basu A, Krishnan R, Nagata K & Kaushik-Basu N. Identification of the Rho effector Rhotekin as a novel host factor mediating hepatitis C virus replication through NS5B interaction. 16th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses. Nice Acropolis, Nice, France, 10.5.2009.

⑬ Shinoda T, Ito H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Okamoto K, Nagata K: Sept14 is involved in the proper positioning of cortical pyramidal neurons. The spring Janelia Farm conference “Structure and Function of Septins”. Washigton DC, USA, 2009.3.18

[その他]

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/hsc/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 浩一 (NAGATA KOH-ICHI)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・部長
研究者番号：50252143

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

稲熊 裕 (INAGUMA YUTAKA)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員
研究者番号：10250250

伊東 秀記 (ITO HIDENORI)
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・神経制御学部・主任研究員
研究者番号：40311443