

## 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 6月 7日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21500332

研究課題名（和文）低分子量G蛋白質Rhebを介するスパイン形態制御のメカニズム

研究課題名（英文）Regulatory mechanism for spine morphogenesis by a small G-protein Rheb

研究代表者

杉浦 弘子（SUGIURA HIROKO）

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・基盤技術研究職員

研究者番号：40162870

研究成果の概要（和文）：結節性硬化症では、神経活動的に発現する低分子 G 蛋白質 Rheb が活性化されており、樹状突起スパインの形成障害も見られる。そのメカニズムを解析し、（1）結節性硬化症ニューロンの樹状突起ではミトコンドリアが増加していること、（2）スパイン形成障害は Rheb 下流の mTORC1 の活性化ではなく、Rheb と結合する蛋白質（RBP）の増加によって生じること、などを明らかにした。これらの発見は、結節性硬化症に合併する精神遅滞やてんかん、自閉症などの新しい治療法開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：An activity-regulated small G-protein Rheb is activated in tuberous sclerosis, which is accompanied with dendritic spine dysmorphogenesis. We have investigated the underlying mechanism and have clarified that mitochondria is increased in dendrites of tuberous sclerosis neurons and that impaired spinogenesis in tuberous sclerosis is caused by an increase in RBP levels, not due to mTORC1 activation. These findings may lead to development of a new treatment for tuberous sclerosis associated with epilepsy, mental retardation or autism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：スパイン、Rheb

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、自閉症を含む発達障害患者において、樹状突起スパインの形態や密度の異常が見られることが知られていた（Fiala et al. Brain Res Rev. 39:29-54, 2002）。また、その原因遺伝子の一つとして、神経接着分子Neuroigin-3のアミノ酸変異が見出され（Jamain et al. Nature Genet.

34: 27-29, 2003）、その変異体をラットの海馬ニューロンに導入するとスパイン形態変化が観察された（Comolletti et al. J Neurosci. 24: 4889-93, 2004）。これらの事実から、スパイン形成に関与する蛋白質の異常が発達障害の原因となり得ると考えられていた。そこで、スパイン形成に関わる分子の解析を行うことは、学習・記憶な

どの生理的可塑性のメカニズムのみならず、自閉症を始めとする発達障害の病態解明にも繋がると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、結節性硬化症という発達障害の発症に関与している低分子量 G 蛋白質 Rheb とそれによるスパイン制御のメカニズムに焦点を絞り、解析することを当初の目的とした。Rheb は、代表者たちが神経活動によって誘導される遺伝子産物の一つとして発見した。長らく機能が不明であったが、2003 年に結節性硬化症の原因遺伝子産物である TSC2 (tuberin) が Rheb に対する GTPase activating protein (GAP) であることが報告された (Zhang et al. Nat Cell Biol. 5:578-81, 2003)。

結節性硬化症は、全身に過誤腫とよばれる良性の腫瘍ができる病気であり、顔面血管線維腫・てんかん・知的障害の 3 主徴だけでなく、自閉症も高率 (30-60%) に合併する。すなわち、結節性硬化症患者では *Tsc1* あるいは *Tsc2* の変異によって、Rheb が GTP 結合型となり、その下流の mTOR (ラパマイシンの標的分子) を活性化するため、病気を発症することが明らかになった。この TSC-Rheb-mTOR 蛋白合成系はスパインの形態変化や LTP/LTD 誘導にも関わっている (von der Brélie et al. Eur J Neurosci. 23:686-92, 2006)。代表者らも *Tsc2* に変異のある Eker ラット (Rennebeck et al. Proc Natl Acad Sci U S A 95:15629-34, 1998) を用いて、スパイン形態変化があることを見出している。

そこで、本研究では Eker ラット用いて TSC-Rheb-mTOR の活性化によってスパイン形態変化が起こるメカニズムを明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 結節性硬化症ラットにおいて翻訳が亢進している蛋白質の同定

野生型および Eker ラットの脳から分画したシナプトソームを 2 次元電気泳動し、Eker ラットにおいて発現が増加している蛋白スポットを複数見出した。そのスポットを切り出し、蛋白質を抽出、トリプシンにより切断、質量分析計を用いてアミノ酸配列を決定した。

(2) TSC-Rheb-mTOR によるミトコンドリア制御機構の解析

初代培養ニューロンのミトコンドリアを Mito-Red や JC-1 などの色素、あるいはミトコンドリア結合配列を付加した dsRed2 発現プラスミドを遺伝子導入することによって可視化し、樹状突起内のミトコンドリア (長

さ・面積など) を野生型と Eker 間で比較した。さらに、電子顕微鏡による観察・計測によって、イメージングで得られた結果を検証した。

また、初代培養ニューロンを用いて酸素消費量と ATP 量を測定し、Eker と野生型間に差があるかどうかを調べた。さらに、Complex-V である ATPase  $\epsilon$  サブユニットを CFP と YFP で挟んだ FRET ベクターを用いて、スパイン内の ATP を可視化し、その動態を比較した。

(3) Rheb 結合蛋白質のスクリーニングと機能解析

Yeast two-hybrid法を用いて、Rheb と結合する蛋白質 (RBP) を探索した。同定した蛋白質を培養ニューロンに過剰発現あるいは siRNA によってノックダウンし、ニューロン形態を観察した。

次に、RBP がスパイン形成を抑制するメカニズムを調べるため、RBP と同じ部位を認識し、結合する蛋白質との競合実験を行った。

(4) 結節性硬化症におけるシャフトシナプス増加のメカニズム

興奮性シャフトシナプス形成を促進する ephrinB3 と RBP との結合を pull down 実験により確かめた。さらに、培養ニューロンの電気生理学的解析を行い、結節性硬化症と野生型のシナプス伝達を比較した。

## 4. 研究成果

(1) 結節性硬化症ラットにおいて翻訳が亢進している蛋白質の同定

Rheb が活性化している結節性硬化症のモデルラット (Eker) と野生型ラットからシナプトソームを分画し、Eker ラットにおいて発現が増加している蛋白スポットを複数見出した。解析の結果、それらはすべてミトコンドリアの蛋白質であった。

(2) TSC-Rheb-mTOR によるミトコンドリア制御

(1) の結果から、結節性硬化症ではミトコンドリアの量的異常があると考えられた。そこで、Eker ラットから海馬ニューロンを初代培養し、Mito-Red あるいはミトコンドリア結合配列を付加した dsRed2 発現プラスミドを導入することにより、樹状突起内ミトコンドリアを可視化した。その結果、結節性硬化症ニューロンの樹状突起では、ミトコンドリアが有意に増加していることが分かった。この所見は、電子顕微鏡を用いた観察および計測によっても検証された。さらに、Eker ラットの脳からシナプトニューロソームを調製し、その中に含まれる porin (ミトコンド

リア蛋白質)を野生型と比較したところ、やはり Eker ラットのほうが多かった。以上の結果から、Eker ラットの樹状突起ではミトコンドリアが増加しており、それが中枢症状の発症に関与していると考えられた。

次に、Eker ラットの脳からシナプトニューロソームを調製し、酸素消費量と ATP 量を野生型と比較した。酸素消費は検出出来なかったが、ATP 量は結節性硬化症の方が高い傾向が見られた。そこで、Complex-V である ATPase  $\epsilon$  サブユニットを CFP と YFP で挟んだ FRET ベクターを用いて、樹状突起内の ATP を可視化したところ、結節性硬化症の方が樹状突起内 ATP 濃度が高い事が確認された。

### (3) 結節性硬化症におけるスパイン形成異常

Eker ラットから海馬ニューロンを初代培養し、その樹状突起を野生型と比較したところ、Eker ニューロンはスパインを形成せず、フィロポディアのみであることが確認された。さらに、mTOR の阻害薬であるラパマイシンを添加しても、スパイン形成は回復しなかった。

そこで、結節性硬化症におけるスパイン形成障害には mTORC1 は関与しないと考え、上流の Rheb と結合する蛋白質を探索し、Rheb-binding protein (RBP) を同定した。RBP を Eker ラットのニューロンでノックダウンすると、フィロポディアがスパインへ分化し、興奮性シナプスが形成された。逆に、RBP を野生型ニューロンに過剰発現させるとフィロポディアが増加した。さらに、野生型と Eker の RBP 量を比較したところ、Eker のシナプトニューロソームにおける RBP 量は野生型に比べて増加していることが分かった。以上の結果から、結節性硬化症においては RBP が増加し、その結果スパイン形成障害が生じていると考えられた。

次に、RBP がスパイン形成を抑制するメカニズムを解析した。RBP はスパイン形成制御蛋白質と結合することが知られているが、同じ蛋白質にもう一つの因子 (A と仮称) が結合することも報告されている。そこで、RBP が A と競合してスパイン形成制御蛋白質に結合するため、スパイン形成が障害されると考えた。実際、Eker ニューロンに A を過剰発現させても、RBP をノックダウンした時と同様、スパイン形成が回復した。さらに、RBP と A がスパイン形成制御蛋白質に対して競合的に結合していることも確かめた。以上の結果から、RBP と A の量的バランスによってスパイン形成がコントロールされていると考えられた。

### (4) 結節性硬化症におけるシャフトシナプスの増加とそのメカニズム

結節性硬化症ではスパイン形成が障害されているため、樹状突起に直接興奮性シナプスを作る (シャフトシナプス形成) ことを見出した。RBP がその機序にも関与していると考えられ、そのメカニズムを解析した。その結果、RBP は興奮性シャフトシナプス形成を促進する ephrinB3 と結合し、シャフトシナプスを増加させていることを明らかにした。

結節性硬化症ではスパインが減少しているが、実際のシナプス伝達がどのように変化しているかは明らかでなかった。そこで、培養ニューロンの電気生理学的解析を行ったところ、意外にも、結節性硬化症におけるシナプス伝達は、野生型とほとんど変わらなかった。これは、上述したシャフトシナプスが代償的にシナプス伝達を担っているためと考えられた。

### 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 6 件)

- ① 安田新、杉浦弘子、山形要人 過剰興奮によって生じるシナプス減少のメカニズム 日本薬理学雑誌、査読無、140:141, 2012.  
<http://plaza.umin.ac.jp/JPS1927/fpj/issue/TOC12-140%283%29/12-140-3.htm>
- ② Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takigami S, Yamagata K. p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases. Cent Nerv Syst Agents Med Chem. 査読有, 11(1):45-59, 2011.  
<http://www.eurekaselect.com/87633/article>
- ③ Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca<sup>2+</sup> levels. Neurochem Int. 査読有, 58(4):489-96, 2011. 10.1016/j.neuint.2011.01.003
- ④ Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K. Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1

exacerbates neuronal loss induced by kainate. *J Neurosci Res.* 査読有, 88(2):381-90, 2010. doi: 10.1002/jnr.22195.

- ⑤ Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K. Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. *Neuroscientist.* 査読有, 15(1):90-104, 2009. doi: 10.1177/1073858408324024.
- ⑥ Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. Mek3. UCSD-Nature Molecule Pages 査読有, doi:10.1038/mp.a001507.01, 2009. <http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A001507>

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hino O and Yamagata K. Novel mechanism for dendritic spine abnormality in tuberous sclerosis, The 11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry, The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry (2012-9-30, Kobe)
- ② 山形要人 杉浦弘子 安田新 桂林秀太郎 高崎浩太郎 岩崎克典 樋野興夫 結節性硬化症におけるスパイン形成不全の分子メカニズム、第 63 回日本薬理学会北部会 (2012-9-14, 新潟)
- ③ 安田新、杉浦弘子、樋野興夫、山形要人 TSC 変異モデルにみられる興奮性シナプス形成異常のメカニズム、第 54 回日本神経化学学会大会、山代 (2011-9-26)
- ④ 杉浦弘子、安田新、樋野興夫、山形要人、結節性硬化症における樹状突起スパイン形成異常の分子メカニズム、BMB2010 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、神戸コンベンションセンター、(2010-12-08)
- ⑤ 安田新、杉浦弘子、田中秀和、竹宮孝子、山形要人 カイニン酸によって生じる樹状突起スパイン減少における p38 MAP キナーゼの役割 第 44 回 日本てんかん学会、岡山コンベンションセンター「ママカリフォーラム」(2010-10-14)
- ⑥ 安田新、杉浦弘子、樋野興夫、山形要人、結節性硬化症モデル動物における樹状突起スパイン形態異常のメカニズム、Neuro2010 第 33 回日本神経科学大会 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 合同大会、神戸コンベンションセンター、(2010-09-02)
- ⑦ Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H,

Takemiya T, Yamagata K. Protocadherin arcadlin regulates seizure-induced synaptic loss by activating p38 MAP kinase signaling. BIT Life Sciences' 3'rd Annual Protein and Peptide Conference (Pepcon)-2010, Beijing, People's Republic of China, (2010-03-21)

- ⑧ Takigami, S. Yasuda, S. Sugiura, H. Yoshimura, Y. Takemiya, T. Yamauchi, T. Hino, O. Yamagata, K. Morphological alterations of neuronal dendrites in developmental disorder model., 第 3 2 回日本神経科学大会, 愛知県名古屋市, (2009-09-18)
- ⑨ Takigami, S. Yasuda, S. Sugiura, H. Yoshimura, Y. Takemiya, T. Yamauchi, T. Hino, O. Yamagata, K. Electron microscopic studies on neuronal dendritic abnormality caused by TSC-2 mutation. 第 52 回日本神経化学学会大会, 群馬, (2009-06-24)
- ⑩ 瀧上周、杉浦弘子、安田新、吉村好之、竹宮孝子、山内卓、樋野興夫、山形要人、結節性硬化症モデルラットにおける神経細胞樹状突起の形態異常, 第 1 4 7 回日本獣医学会学術集会, 栃木県総合文化センター, (2009-04-03)

[図書] (計 2 件)

- ① Mek3. Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, in press. 査読無
- ② Activity-dependent spine remodeling and brain disorders. Takigami S, Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H and Yamagata K. in "Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties", pp91-112, Nova science publishers, New York, 2009. 査読無

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: スパイン形成異常を抑制するための医薬品組成物

発明者: 山形要人 杉浦弘子 安田新

権利者: 山形要人 杉浦弘子 安田新

種類: 特許

番号: 2012-1630780

出願年月日: 2012 年 09 月 07 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 弘子 (SUGIURA HIROKO)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤  
技術研究センター・基盤技術研究職員  
研究者番号：40162870

(2) 研究分担者

田中 秀和 (TANAKA HIDEKAZU)  
大阪大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：70273638

(3) 連携研究者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：50435145