

## 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24年4月16日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590606

研究課題名（和文）ニューログリカンC欠損マウスは薬物による異常行動を克服する

研究課題名（英文）Neuroglycan C, a chondroitin sulfate proteoglycan, overcomes the abnormal behavior induced by administration of some drugs?

研究代表者

青野 幸子 (AONO SACHIKO)

基礎生物学研究所・神経生理学研究室・特別協力研究員

研究者番号：20231780

研究成果の概要（和文）：脳に特異的に発現するニューログリカンC（NGC）は、高次神経機能に関与しているプロテオグリカン（糖鎖を持つタンパク）であり、覚せい剤による異常行動に関連した分子としても注目を集めている。NGCの細胞外ドメインは脳皮質由来の神経細胞の突起伸長活性をもつが、突起伸長に関連した分子としてプレイオトロフィン（PTN）をNGC結合タンパクとして同定することができた。一方、NGCノックアウトマウス（NGC-KOマウス）に覚せい剤・向精神薬を投与し行動解析を行ったところ、NGC-KOマウスは多動性症候群のモデル動物となる可能性が高いことが示唆された。現在、多動性症候群の発症機構を解明するため脳タンパクの解析を行っている。

研究成果の概要（英文）：Neuroglycan C (NGC), a chondroitin sulfate proteoglycan, is predominantly expressed in the brain. To clarify the roles of NGC in the brain development, we generated three strains of NGC-gene mutant mice, including NGC-knockout (NGC-KO) mice that are completely deficient in all splice variants of NGC. It has been reported that the behavioral sensitization to some psychotropic drugs is associated with up- and down-regulation of NGC gene expression. So we have investigated the relationship of several psychostimulants and the behavior of NGC-KO mice using the open field test. As expected, NGC-KO mice showed different behavior compared with wild mice. Together with that hyperactivity was observed in NGC-KO mice in the open field test, NGC-KO mice may be evaluated as an animal model of attention-deficit / hyperactivity disorder (ADHD). To make the mechanism of ADHD clear, the changes of protein patterns in the cerebral cortex of NGC-KO and wild mice were examined using two-dimensional gel electrophoresis after the administration of methamphetamine, a psychostimulant. A protein which may be related to hyperactivity induced by methamphetamine was found. As another trial for clarifying the roles of NGC, we studied the binding proteins and found that pleiotrophin was a NGC-binding protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学  
キーワード：薬物依存・薬剤感受性

## 1. 研究開始当初の背景

NGC は高次脳機能に関連したタンパクであると考えられている。NGC の機能を明らかにする目的で結合タンパクの探索が行われ、現在までにいくつかの結合タンパクが報告されているが、研究開始当初までに NGC の脳における機能は十分には解明されていなかった。新たな結合タンパクを探索しその意義を明らかにすることは、脳の発達における NGC の機能を知るうえで重要であると考えられた。

NGC は、脳の発達とともにコンドロイチン硫酸鎖が消失するパートタイムプロテオグリカンである。NGC のコンドロイチン硫酸鎖結合様式は細胞の種類によっても異なる。すなわち、初代培養神経細胞、株化神経細胞では NGC にコンドロイチン硫酸鎖が結合するが、初代培養グリア細胞、PC12、COS 細胞ではコンドロイチン硫酸鎖は結合しない (Aono *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004)。コンドロイチン硫酸鎖が神経回路網形成に関わっているという報告はあるが、コンドロイチン硫酸鎖の付加調節機構についての報告は現時点でもされていない。NGC のコンドロイチン硫酸鎖の付加調節機構を明らかにすることは、脳の発達におけるコンドロイチン硫酸鎖の機能を知るうえで重要であると考えられた。

研究開始当初には、NGC ノックアウトマウス (NGC-KO)、NGC の発現量が数%に減少したノックダウンマウス (NGC-KD ; 特願 2004-228692)、コンドロイチン硫酸鎖を持たない NGC を発現しているマウス (NGC-S123A) の 3 種類の NGC 遺伝子改変マウスを作製していた。最初に作製したターゲティングベクターの構築上、NGC-KO マウスではなく NGC-KD マウスができたことで、発現量の異なる 2 種類の NGC 遺伝子改変マウスを作製することができた。タンパクの発現を完全に抑制した場合、補償作用で表現型の発現がない場合があるが、この 2 種類の遺伝子改変マウスを比較することでその点をカバーすることができると考えられた。NGC のノックアウトマウスがドイツのグループから報告されている (Juttner *et al.*, *Neuron*, 2005)。彼らは、NGC-KO マウスでは一過性に GABA の放出が抑制されることを報告しているが、NGC には少なくとも 6 つのスプライシングバリエントがあり、彼らの方法では全ての NGC 分子をノックアウトしたとはいえない。我々が作製したノックアウトマウスは全てのバリエントをノックアウトしている。

NGC は脊椎動物以上の脳にしか存在しないこと、薬物常用や神経損傷において NGC の発

現に変化することから、NGC 遺伝子改変マウスでは情動あるいは知的な面での行動異常がでることが予想されていた。既に NGC-KD の大まかな解析を終えており、シナプス異常がみられること、学習・記憶に異常がみられることを明らかにしていた。また、アンフェタミン投与やコカイン投与によって脳内の NGC mRNA 量、タンパク量が変化することが報告されており (Toda *et al.*, *J. Neurochem.*, 2002; Ishikawa *et al.*, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2006)、NGC は薬物による異常行動に関連した分子であると考えられていた。NGC 遺伝子改変マウスにアンフェタミン等を投与することによって、薬物投与による異常行動誘引に NGC がどのように関与しているか明らかにすることができると考えられた。

## 2. 研究の目的

脳に特異的に発現するコンドロイチン硫酸 (CS) プロテオグリカンであるニューログリカン C (NGC) は、神経回路網形成期の神経細胞に強く発現していること、膜タンパクであること、リン酸化されること (総説として ; Aono and Oohira, *Neural Proteoglycans*, 2007) などより、回路網形成に寄与する分子であると思われる。また成熟脳では、神経細胞の樹状突起上に斑点状に存在する (Aono *et al.*, *J. Neurosci. Res.*, 2006) ことから神経伝達に関係している可能性が示唆される。コンドロイチン硫酸鎖が神経回路網形成に関与しているという報告が相次いでいるが、NGC は脳の成熟度、細胞の種類によってコンドロイチン硫酸鎖の付加が調節されているパートタイムプロテオグリカンであり、報告されている神経回路網形成・神経伝達関連分子の中でもユニークな分子である。また、覚せい剤であるアンフェタミンの投与によって脳内の NGC 量が増加する (Toda *et al.*, *J. Neurochem.*, 2002; Ishikawa *et al.*, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 2006) ことが報告されており、異常行動に関連した分子としても注目を集めている。

(1) 本研究の目的の一つは、神経回路網形成および神経伝達における NGC の役割を明らかにすることである。そのために、NGC の結合タンパクを探索し、NGC-結合タンパクが神経回路網形成においてどのように関わっているか明らかにする。また、NGC-KO マウス脳における形態学的変化、物質変化について解析を行う。NGC-KO マウスの行動変化についても詳細に解析を行う。

(2) 目的の二つめは、NGC の持つコンドロイチン硫酸鎖の神経回路網形成における役

割を明らかにすることである。そのために、株化神経細胞を用いて NGC コンドロイチン硫酸鎖の結合機構を明らかにする。また、NGC-S123A マウスの脳における形態学的変化、物質変化について解析を行うとともに、行動変化についても調べる。NGC の培養神経細胞突起伸長促進活性（特許出願番号；特願2004-228693）に及ぼすコンドロイチン硫酸鎖の影響について調べる。

(3) 目的の三つめは、覚せい剤投与によって引き起こされる異常行動に NGC がどのように関わっているのか明らかにすることである。そのために、NGC-KO マウスに覚せい剤の一つであるメタンフェタミンを投与し、行動解析を行う。また、その時の脳のタンパクの変化について解析を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 神経回路網形成および神経伝達における NGC の役割

既に NGC の細胞外ドメインが大脳皮質由来の神経細胞の突起伸長活性をもつことを明らかにしている (Nakanishi and Aono et al., J. Biol. Chem., 2006)。大脳皮質由来の神経細胞が突起を伸長させるためには、NGC に結合するタンパクが存在するはずである。リコンビナント NGC 細胞外ドメインを結合させたカラムに胎生 16 日目のラット脳膜画分を流し、ラット脳内のタンパクを吸着させた後、高塩濃度溶液で溶出した。溶出画分を SDS-PAGE を用いて解析した。観察された数本のバンドを同定するため、プレイオトロフィン (PTN) 抗体、ミッドカイン抗体を用いてニトロセルロース膜上のタンパクと反応させた。リコンビナント PTN と NGC の結合については、水晶発振子マイクロバランス法を用いて結合を確認した。次に NGC の細胞外ドメインをコンドロイチン硫酸鎖結合ドメイン、酸性アミノ酸ドメイン、EGF 様ドメインの 3 つに分け、それぞれリコンビナントタンパクをつくり、PTN との結合を調べた。

NGC-KO マウスおよび NGC-KD マウスでは学習・記憶に異常があることが明らかとなっている。神経伝達における NGC の役割を明らかにするため、海馬に焦点を絞り形態学的解析を行った。10 代にわたり戻し交配をしてほぼ C57BL/6 マウスの遺伝子背景を持つ NGC-KO マウスを用いて実験を行った。銀染色法によって脳を染め、NGC-KO マウス海馬でのシナプスの数を測定した。

(2) NGC のコンドロイチン硫酸鎖の付加機構の解明

NGC はパートタイムプロテオグリカンで、コンドロイチン硫酸鎖の NGC コアタンパクへの結合は脳の成熟度、細胞の種類によって異なる制御を受けている (Aono et al., J. Biol. Chem., 2004)。株化培養細胞では NGC へのコ

ンドロイチン硫酸鎖の結合はシャペロンタンパクである GRP78 によって制御されていることを明らかにしている。GRP78 と NGC タンパクとの関係を明らかにするため、NGC を発現している N2a 細胞に GRP78 遺伝子を導入し、両タンパクを発現した N2a 細胞の単離を試みた。

(3) 覚せい剤投与による異常行動誘発における NGC の役割

NGC-KO マウスおよび野生型マウスにメタンフェタミンを 1 日 1 回、5 日間連続投与し、オープンフィールドテストを用いて行動を観察し、ビデオによって行動解析を行った。

またヒトの多動性症候群において治療薬として用いられているメチルフェニデートを同様に投与し、行動解析を行った。

NGC のコンドロイチン硫酸鎖の行動に及ぼす影響を調べるため、NGC-123A マウスにメタンフェタミンを同様に投与し、行動解析を行った。

メタンフェタミン投与による異常行動抑制における物質的背景を調べるために、メタンフェタミンを 5 日間投与した後脳を採取し、二次元電気泳動法を用いて、脳のタンパク変化について調べた

### 4. 研究成果

(1) 神経回路網形成および神経伝達における NGC の役割

リコンビナント NGC 細胞外ドメインを結合させたカラムを用いて、胎生 16 日目のラット脳膜画分から結合タンパクを精製したところ、SDS-PAGE 上、数本のバンドが認められた。PTN 抗体、ミッドカイン抗体を用いてニトロセルロース膜上のタンパクと反応させたところ、それぞれ 18kDa、13kDa のバンドが認識された。ミッドカインについてはすでに NGC 結合タンパクとして報告されているため、PTN に焦点を絞って解析を行った。PTN と NGC の結合については、水晶発振子マイクロバランス法を用いて結合を確認した。これらの結果より、精製した結合タンパクの一つは PTN であることが明らかとなった。また NGC 細胞外ドメインのリコンビナントタンパクを用いた実験より、PTN は NGC の酸性アミノ酸ドメインに結合することが明らかとなった (Nakanishi, K., et al., Neurochem. Res., 35, 2010, 1131-1137.)。PTN は様々な細胞の増殖や分化に関与するヘパリン結合性成長因子として知られている。中枢神経系では、神経細胞の移動や神経突起伸長、細胞接着に関与することが報告されており、NGC-PTN 結合が神経突起伸長に関与している可能性が示唆された。

NGC-KO マウスおよび NGC-KD マウスでは学習・記憶に異常があることが明らかとなったので、海馬に焦点を絞って実験を行った。

銀染色法を用いて脳を染めたところ、NGC-KO マウス海馬でシナプスの数が増加していた。シナプスの形状は正常シナプスとは異なっていた。海馬におけるシナプス形成にNGCが関与していることが示唆されたが、学習・記憶にどのように関与しているかは、現時点では明らかとはなっていない。

(2) NGC のコンドロイチン硫酸鎖の付加機構の解明

N2a 細胞では NGC に半量のコンドロイチン硫酸鎖が結合している。一方、GRP-78 は単塩基置換の遺伝子異常をヘテロで持っている。GRP78 と NGC タンパクとの関係を明らかにするため、NGC を発現している N2a 細胞に正常な GRP78 遺伝子および異常な GRP78 遺伝子をそれぞれ導入したところ、両タンパクを発現した N2a 細胞を単離することができた。この細胞を用いてコンドロイチン硫酸鎖付加機構を解明するのは将来の課題である。

(3) 覚せい剤投与による異常行動誘発における NGC の役割

NGC-KO マウスにメタンフェタミンを投与し、オープンフィールドテストを用いて行動を調べたところ、投与後 1 時間では NGC-KO マウスと野生型マウスの間で違いは見られなかった。連続投与した 2 日目に、両者に行動パターンの違いが認められた。すなわち、野生型マウスでは多動が観察されたが、NGC-KO マウスでは興奮がおさまり、多動の抑制がおきていることが示唆された。5 日間連続投与し、同様の結果が得られている。NGC-KO マウスは薬物による異常行動に関連した分子であると考えられており、今回の結果はその考えを支持するものであった。

NGC-S123A マウスと野生型マウス間には大きな違いは認められなかった。メタンフェタミンによる異常行動は NGC のコアタンパクを介して行われることが示唆された。

向精神薬の一つであるメチルフェニデートを投与して行動実験を行ったところ、メタンフェタミンを投与した場合とほぼ同じ結果を得ることができた。NGC-KO マウスで活動量が昂進していることを考えあわせると、この結果は、NGC-KO マウスがヒトの多動性症候群のモデル動物となることを強く示すものであった。

メタンフェタミン投与後の NGC-KO マウスでみられる多動抑制の機構を明らかにする試みの一つとして、二次元電気泳動法を用いて脳タンパクの変化について検討した。最初に、メタンフェタミン投与後の NGC-KO マウス脳タンパクについて解析を行った。変化のみられたタンパクのうち、解析の容易な 4 つのタンパクに絞って同定を行ったところすべて解糖系のタンパクであった。次に、野生型マウスにメタンフェタミンを投与して、変化する脳

タンパクがあるかどうか調べた。分子量 < 30 万の酸性タンパクが増加していた。メタンフェタミン投与後の NGC-KO マウスではこのタンパクに変化が認められなかった。この結果は、この酸性タンパクがメタンフェタミン投与によって誘引される多動に関連している可能性を示唆するものであり、このタンパクを同定することは薬物投与による多動の機構を解明し、また多動性症候群の発症機構を解明するうえで重要であると思われる。

## 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 1 件)

① Nakanishi, K., Tokita, Y., Aono, S., Ida, M., Matsui, F., Higashi, Y., and Oohira, A., Neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan, interacts with pleiotrophin, a heparin-binding growth factor. *Neurochem. Res.* (査読有) 35, 2010, 1131-1137.

[学会発表] (計 9 件)

① 青野幸子、ニューログリカン C-KO マウスの脳タンパクに対する向精神薬の影響、日本神経化学会、2011. 9. 26. 瑠璃光 (加賀市)

② 山内忍、Molecular interaction between FGF and brain specific chondroitin sulfate proteoglycan、日本分子生物学会、2010. 12. 9. 神戸ポートアイランド (神戸市)

③ 青野幸子、脳に特異的に発現するニューログリカン C の遺伝子改変マウスに対する向精神薬の影響、Neuro2010、2010. 9. 4. 神戸コンベンションセンター (神戸市)

④ 中西圭子、脳特異的コンドロイチン硫酸プロテオグリカン、ニューログリカン C はプレオトロフィンと結合する、Neuro2010、2010. 9. 4. 神戸コンベンションセンター (神戸市)

⑤ 青野幸子、重症新生児黄疸を示したクリグラ・ナジャー症候群タイプ II の一家系、日本未熟児新生児学会、2009. 11. 30. パシフィコ横浜 (横浜市)

⑥ 周尾卓也、脳特異的プロテアーゼ MT5-MMP によるニューログリカン C の細胞外領域切り出し機構の解析、日本生化学会、2009. 10. 20. 神戸ポートアイランド (神戸市)

⑦ 青野幸子、脳に特異的に発現するニューログリカン C のコンドロイチン硫酸鎖の役割、日本神経科学学会、2009. 9. 18. 名古屋国際会議場 (名古屋市)

⑧ Nakanishi, K., Search for the binding protein of neuroglycan C, a brain-specific chondroitin sulfate proteoglycan., Inter-

national Congress of Physiological Sciences, 2009.7.29. Kyoto International Conference Center (Kyoto)

⑨青野幸子、ニューログリカンC遺伝子改変マウスの行動解析、日本神経化学会、2009.6.23. ホテル天坊 (渋川市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青野 幸子 (AONO SACHIKO)  
基礎生物学研究所・神経生理学研究室・特別協力研究員  
研究者番号：20231780

### (2) 研究分担者

時田 義人 (TOKITA YOSHIHITO)  
平成23年度  
愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・周生期学部・主任研究員  
研究者番号：50291175