

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 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591327

研究課題名（和文）：アンジェルマン症候群原因遺伝子 UBE3A トランスジェニックマウスの解析

研究課題名（英文）：Molecular and behavioral analysis of transgenic mice of Angelman syndrome gene, Ube3a

研究代表者

木住野 達也 (KISHINO TATSUYA)

長崎大学・先導生命科学研究支援センター・准教授

研究者番号：70315232

研究成果の概要（和文）：AS原因遺伝子 *UBE3A* トランスジェニック(Tg)マウスを作製し、脳の発生・成熟段階における *UBE3A* の機能を解析した。Tgマウスによる *Ube3a* 欠失マウス（ASモデルマウス）の Tg rescue を解析した所、Tgにより不安様行動、社会的行動がある程度回復していることが示された。免疫組織学上、Tgによる外来性 *UBE3A* の発現が脳線条体でつよかったことから、同部位におけるASモデルマウスの症状がTgにより緩和されたものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：To address the role of *UBE3A* in brain development, we generated transgenic *UBE3A* mice expressing a full length *UBE3A* cDNA under control of the rat enolase 2, gamma, neuronal (*Eno2*) promoter. *UBE3A*-overexpressing transgenic mice showed normal phenotype. Neurobehavioral phenotypes in anxiety-related behaviors and social interactions of AS model mice were partially rescued by transgene expression in striatum neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：UBE3A、アンジェルマン症候群、トランスジェニックマウス、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

アンジェルマン症候群(AS)は精神発達遅滞、てんかん、失調性歩行を主症状としゲノムインプリンティングが発症に関与する代表的な先天異常症候群の1疾患である。これまで我々はその責任遺伝子 *UBE3A* を同定し (Nature Genetics, 1997)、その KO マウスを作成し AS モデルマウスとして報告してきている (Neurobiol. Dis. 2002)。AS は主に脳に

限局した症状を主徴とする事から、*Ube3a* の脳特異的インプリンティング機構をマウスの胎仔脳初代培養神経細胞を用いて解析し、神経細胞でのみ *Ube3a* はインプリンティングを受け、神経前駆細胞、グリア系細胞ではインプリンティングを受けていないことを報告している (Hum. Mol. Genet. 2003)。これら申請者らの結果から、AS で見られる精神発達遅滞は、神経幹細胞から神経細胞への成熟過

程における UBE3A の異常によるものではなく、神経細胞での UBE3A の異常によって生じる可能性を示してきた。一方、*UBE3A* は AS の原因遺伝子としてだけでなく、他の疾患への関与も報告されている。レット症候群の脳では *UBE3A* の発現低下が報告されており、自閉症患者の一部には母親由来染色体 15q11-13 領域の重複が認められている。精神発達遅滞を症状にもつプラダーウィリー症候群は母親由来 15q11-13 領域のダイソミーにても発症する。15q11-13 領域は *UBE3A* の存在する領域であるため、母親由来染色体 15q11-13 領域の重複・ダイソミーにより患児の脳神経細胞では *UBE3A* が正常の 2 倍発現している事になり、神経細胞における *UBE3A* の過剰発現が精神発達、行動に異常を引き起こす可能性が示唆されている。

これら AS の発症機序の解明と神経細胞における過剰 *UBE3A* の影響を検討するためには神経細胞特異的に *UBE3A* を発現する *UBE3A* Tg マウスの作製が不可欠であると考えた。国内外で *Ube3a* KO マウスを作製し報告している研究室は当教室と米国・ベイラー大学の 2 施設存在するが、Tg マウスの報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

神経細胞特異的に *UBE3A* を発現する Tg マウスを作製し、神経細胞において *UBE3A* 過剰発現が行動上影響を及ぼすかどうかを観察する。一方、既に作製し系統維持している AS モデルマウスである *Ube3a* KO マウスと今回の Tg マウスを交配し、AS モデルマウスの症状が神経細胞特異的に発現する *UBE3A* によって rescue されるかどうかを検討する。

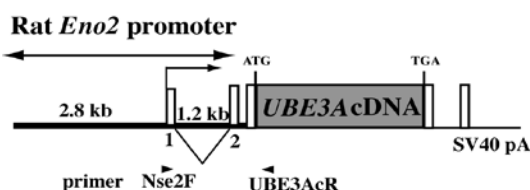
3. 研究の方法

AS 原因遺伝子 *UBE3A* が神経細胞特異的に発現する Tg マウスを作製し、Tg 由来 *UBE3A* の発現部位を確認し、その行動を解析するとともに、AS モデルマウスである *Ube3a* ノックアウト (KO) マウスとかけあわせ、どの程度 AS の症状が rescue できるかを検討する。

4. 研究成果

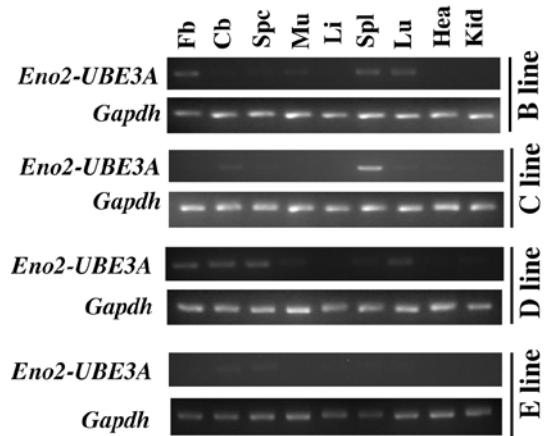
(1) 神経細胞特異的に *UBE3A* を発現する Tg マウスの作製

ラット Neuron-specific Enolase (*Eno2*) プロモーター下流にヒト *UBE3A* cDNA をつないだプラスミド (下図) を作成し Tg マウスを作製した。



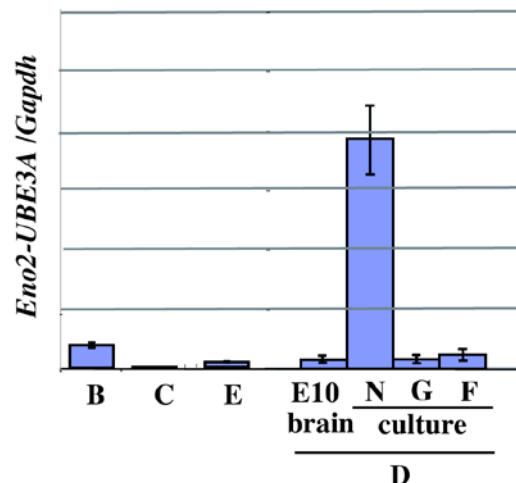
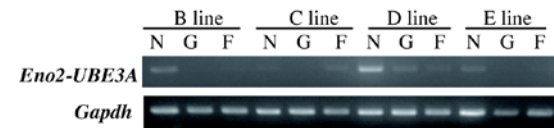
gemline transmission を次世代マウスの 4 系統 (A~D line) で確認した。

作成された Tg マウスで神経細胞特異的にヒト *UBE3A* が発現しているかどうか、各組織から RNA を抽出し RT-PCR により確認したところ line D において脳特異的に発現が見られた (下図)。



Fb: 前頭葉, Cb: 大脳, Spc: 脊髄, Mu: 筋, Li: 肝臓, Spl: 脾臓, Lu: 肺, Hea: 心臓, Kid: 腎臓

さらには初代神経系細胞培養をおこない、分散培養された神経細胞、グリア細胞から RT-PCR を行ったところ、line D にて神経細胞特異的な発現を確認した (下図)。

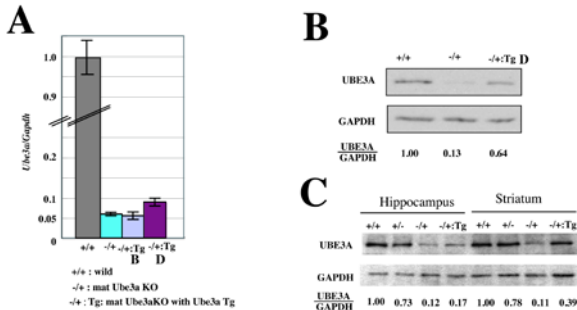


N: 神経細胞, G: グリア細胞, F: 線維芽細胞

(2) 正常 *UBE3A* と Tg 由来 *UBE3A* の発現量の比較

Tg 由来の *UBE3A* の RNA/タンパク量を正常内在性 *UBE3A* と以下の方法で比較した

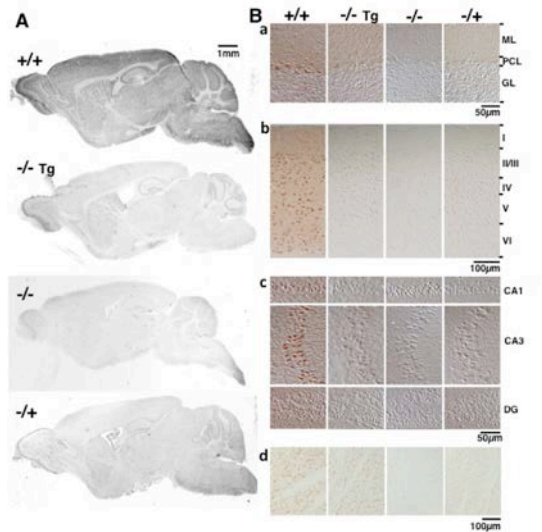
①培養細胞及び組織における定量比較
分散培養した野生型(+/+), AS モデルマウス (-/+), AS+Tg (-/+;Tg) の培養神経細胞において、Ube3a/UBE3A の mRNA 発現と蛋白量を比較し、脳組織において蛋白量を比較した(下図)



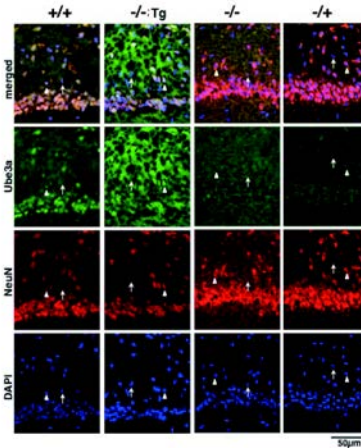
培養神経細胞における Tg 由来 *UBE3A* mRNA 正常の 10%程度であった (A) が、蛋白質量は 50%程度認められた (B)。脳の部位で解析した所、線条体で約 40%、海馬では 5%程度の蛋白量であった (C)。

②免疫組織染色による比較

Ube3a KO マウスと Tg マウスを交配して産出したマウスの脳における UBE3A の発現を免疫染色にて比較した。



Tg 由来 UBE3A の発現は海馬、大脳ではそれほど強くなく、線条体で正常内在性 UBE3A と同程度に染色された。一方細胞レベルでの発現状態を見るために神経細胞特異的抗体 (NeuN) とともに染色したところ、神経細胞特異的に Tg 由来 UBE3A を認めた。



以上の結果より、線条体神経細胞に特に UBE3A 発現の強い Tg マウスを作製できた事を確認した。

(3) 神経行動学的解析

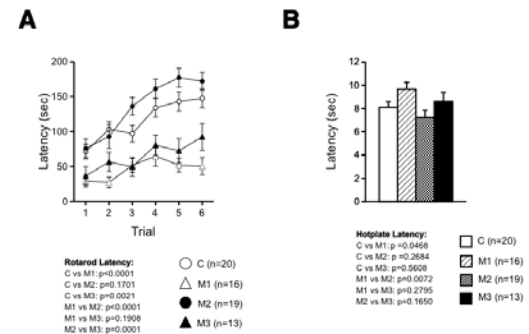
神経細胞特異的に *UBE3A* を発現する Tg マウスの行動解析と AS モデルマウスである *Ube3a* KO マウスの表現型を Tg により緩和できるかを、京都大学大学院医学研究科 HMRO 生体遺伝子機能研究グループにて解析した。

Ube3a KO マウス(父親由来アレルの *Ube3a* 欠失マウス: *Ube3a* +/-) 雌と Tg マウス雄を交配し、F1 を以下の 4 パターンの遺伝子型を持つマウスに分類し、オス各約 20 匹ずつを作製し解析に用いた

	Ube3a	Tg UBE3A
C (WT)	(+/+)	-
M1 (AS)	(-/+)	-
M2 (WT Tg)	(+/+)	+
M3 (AS Tg)	(-/+)	+

① Rotarod テスト、HotPlate テスト

運動機能、痛覚感受性を見るために Rotarod テスト (A)、HotPlate テスト (B) を行った。

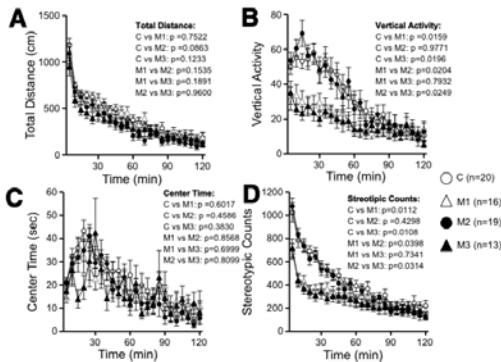


以前の報告でも示した様に、AS は WT に比較して運動機能の低下、痛覚（熱さ）感受性の低下が見られたが、Tg マウスは WT と比較して変化なく、また AS Tg において AS の上記症状の改善傾向は有意には見られなかった。

②不安様行動

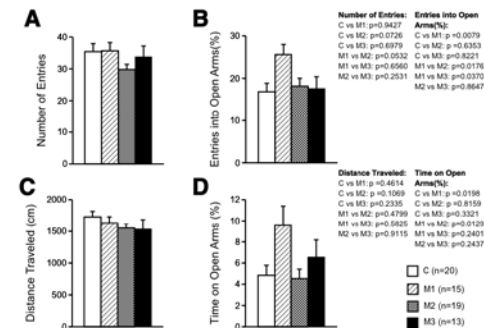
不安様行動を解析するために Opne field テスト及び Elevated plus maze テストをおこなった。

Opne fieldテスト



AS は WT に比較して Vertical activity (B) 及び Stereotypic Count (D) において立ち上がりの低下が見られたが、Tg マウスは WT と比較して変化なく、また AS Tg において AS の上記症状の改善傾向は有意には見られなかった。

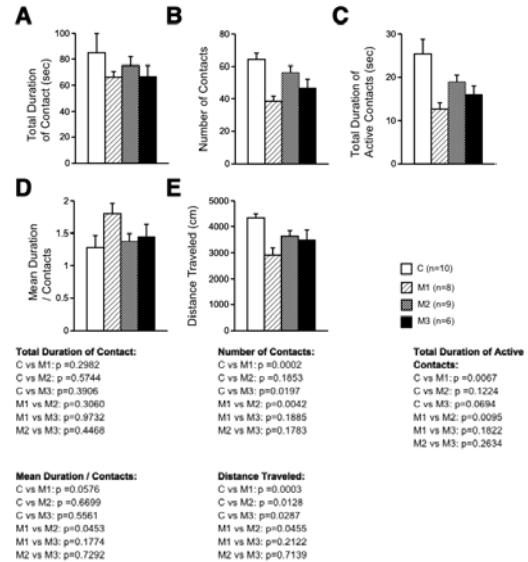
Elevated plus mazeテスト



AS は WT に比較して Open arm 入る回数 (B) が多く及び時間 (D) も長いですが、において AS Tg において AS の上記症状の改善傾向が見られた。

③社会的行動

以下の様な新規環境における社会行動を観察した。



AS は WT に比較して接触回数・期間の低下 (B, C)、探索距離の低下 (E) が見られたが、AS Tg において AS の上記症状の改善傾向が見られた。

以上の行動解析により、主に不安様行動の改善が Tg によって見られたが、これは不安様行動の中核である線条体における Tg 由来 UBE3A が高かったことにより、線条体における Ube3a 欠失による不安様行動に改善がみられたものと考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

2009 10 月 米国人類遺伝学会 (ハワイ)

2011 5 月 日本小児神経学会 (横浜)

2011 10 月 日本人類遺伝学会 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 木住野 達也

長崎大学・先端生命科学支援センター・准教授

研究者番号: 70315232

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし