

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650170

研究課題名(和文) ローランド型てんかん発症機構解明のためのショウジョウバエモデルの作成

研究課題名(英文) Drosophila model for Rolandic epilepsy

研究代表者

浜 千尋 (HAMA, Chihiro)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50238052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは、SRPX2遺伝子に変異が生じることにより、遺伝性のローランド型てんかんが発症することが知られている。この疾患の発症機構を解明するために、遺伝学的な解析がより容易なショウジョウバエを疾患モデルとして用いて解析を行った。

ショウジョウバエには、SRPX2と類似したHigタンパク質が神経系に特異的に発現しており、その中でもコリン作動性シナプスの間隙に局在することが明らかとなった。その欠損により活動性の低下および寿命の短縮が観察され、またアセチルコリン受容体のシナプスにおける存在量が減少することが判明した。この発見は、ローランド型てんかんの発症機構を理解するための基礎的知見を提供している。

研究成果の概要(英文)：Human SRPX2 gene is responsible for the congenic Rolandic epilepsy and oral dyspraxia. To understand the molecular mechanism underlying these genetic defects, we study Drosophila as a model system, because a variety of genetic tool is available.

As the Drosophila hig gene is similar to SRPX2 in domain organization, hig is the target of our genetic analysis. The encoded protein Hig is extracellularly secreted and specifically localized to the synaptic cleft of cholinergic synapse in the brain. The absence of Hig results in reduced locomotion and longevity, and also causes a decrease in the amount of acetylcholine receptor subunits Da6 and Da7 in the synaptic regions. Thus, Hig regulates the organization of cholinergic synaptic structure. This finding indicates a possible avenue for understanding the mechanisms underlying Rolandic epilepsy in the human brain, and also for providing insights into how extracellular matrix proteins organize synaptic structures.

研究分野：分子神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：てんかん SRPX2 Hig ショウジョウバエ シナプス アセチルコリン受容体 シナプス間隙 マトリックス

1. 研究開始当初の背景

ヒトのローランド型てんかんは、家系解析により *SRPX2* がその原因遺伝子として同定されており、その遺伝子上のミスセンス変異により生じることが知られている。また、その変異は、野生型に対して優性を示すことが報告されている。*SRPX2* タンパク質と *in vitro* で相互作用するタンパク質が数個同定され、そのタンパク質の種類から細胞外におけるタンパク質分解系が *SRPX2* の機能に関わることが推測されている。また、*SRPX2* タンパク質のように CCP ドメインを複数持つタンパク質(以下、CCP タンパク質)が、線虫、昆虫からヒトにいたるまで脳神経系に多量存在することから、CCP タンパク質は種を超えて神経系で共通の機能をもつと考えられる。したがって、ショウジョウバエで明らかにされた CCP タンパク質に対する知見は、ヒトのローランド型てんかんの原因となる *SRPX2* タンパク質の機能を理解する上で重要な情報をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

(1) ヒトの野生型および変異型 *SRPX2* 遺伝子をショウジョウバエに導入して形質転換株を確立し、その形態的、行動的異常の有無を解析する。異常が存在するときには、サプレッサー変異を分離し、*SRPX2* タンパク質と相互作用する分子の同定を試み、*SRPX2* がどのような情報の流れの中で機能するのか明らかにする。

(2) ショウジョウバエの *hikaru genki (hig)* 遺伝子がコードする Hig タンパク質は最大 5 個の CCP ドメインと 1 個の免疫グロブリンドメインをもつ分泌性のタンパク質であり、*SRPX2* タンパク質と類似した構造をもつ。また、中枢神経系のシナプス間隙に局在すること、および神経発生途上で機能することがわれわれの以前の研究により明らかとなっている。そこで、この Hig タンパク質のシナプスにおける機能をさらに解明するとともに、Hig と相互作用する分子を同定し、シナプス間隙を通したシナプスの構築機構を明らかにしていく。また、これらの解析を通して *SRPX2* タンパク質の機能解明およびてんかんが発症する機構についてアプローチする。

3. 研究の方法

(1) ヒトの野生型および変異型 *SRPX2* 遺伝子を酵母の UAS 配列とともにショウジョウバエの形質転換用ベクターに組み込み、常法により形質転換体を作成する。さらに Gal4/UAS 発現システムを用いて、*SRPX2* を神経系の全体および一部で発現させ、行動および神経系の形態に異常が生じるか解析する。

(2) 既に分離されている *hig* 変異体の脳における種々のシナプスタンパク質の存在量

を抗体染色により明らかにする。さらに、*hig* 変異に対するサプレッサー変異を分離、同定し Hig と相互作用する分子を明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) ヒト *SRPX2* 遺伝子のショウジョウバエへの導入

ヒトの野生型および変異型 *SRPX2* 遺伝子上流に UAS 配列を接続させ、この融合遺伝子を発現するショウジョウバエのトランスジェニック系統を作成することに成功した。しかしながら、神経系の種々の領域で発現させても明確な形態的、行動学的異常を検出することはできなかった。*SRPX2* 遺伝子を 2 コピーにして解析したが、やはり同様に異常を検出することはできなかった。

(2) Hig タンパク質が局在するシナプスの特異性

Hig タンパク質は中枢神経系のシナプス領域に広く分布するが、その局在するシナプスの種類については不明であった。そこで、種々のシナプスマーカーを用いて Hig が局在するシナプスを調べたところ、Hig はアセチルコリン受容体やコリンアセチルトランスフェラーゼの分布とほぼ一致することから、コリン作動性シナプスの間隙に局在することが明らかとなった。このことは、さらに超高解像度レーザー顕微鏡 (SIM) を用いた解析によっても確認された。グルタミン酸作動性、GABA 作動性シナプスには Hig の顕著な局在は検出されなかった。

(3) Hig タンパク質がコリン作動性シナプスに局在する機構

Hig タンパク質はコリン作動性シナプスのシナプス間隙に局在する。ところが、Hig はグルタミン酸作動性神経を含む非コリン作動性神経でも発現していることが判明した。そこで、細胞外に分泌された Hig タンパク質がどのような挙動を示すのか明らかにするため、グリア細胞で Hig を発現させたところ、細胞外に分泌した Hig は、コリン作動性シナプス間隙に捕捉されることが示された。このことは、この局在のためにシナプス間隙で特異的な機構が働いていることを示唆する。

そこで、アセチルコリン受容体 (AChR) サブユニットの変異体および RNAi を用いて Hig のシナプス局在量を調べた。*Da6* 遺伝子と *Da7* 遺伝子については既存の変異が存在していたため、これらの遺伝子の 2 重変異を作成して Hig の存在量を調べたところ、6 割程度に減少していることが判明した。さらにこれらの 2 重変異株にそれぞれ他のサブユニット遺伝子に対する RNAi を発現させサブユニット遺伝子のノックダウンを行ったところ、少なくとも 3 種類のサブユニット遺伝子に対する RNAi が Hig の存在量をさらに低下させた。これらのことから、少なくとも 5 種類のサブユニットが Hig のコリン作動性シナプス間隙への局在に関与していることが明らか

となった。

(4) Hig タンパク質のシナプス間隙における機能

Hig タンパク質の欠損変異体は、活動性が低下していることから、神経機能に異常が生じていることが予想される。そこでその変異体の脳におけるシナプスタンパク質の局在を調べたところ、AchR サブユニットの D α 6 と D α 7 の量が減少し、一方、シナプス後部内の足場タンパク質である DLG が増加していた。すなわち、シナプス間隙に存在する Hig タンパク質はシナプス後部タンパク質の編成に関わることが判明した。シナプス間隙に局在する Hig とシナプス後部に存在する AchR サブユニットは互いにコリン作動性シナプスにおける局在を調節していることになる。

(5) *hig* 変異体は D α 6 アゴニストであるスピノサドに対して耐性を示す

ネオニコチノイドであるスピノサドは、D α 6 サブユニットに特異的に結合することにより、AchR チャンネルを恒常的に開口させ、神経活動を昂進させることにより昆虫を死に至らしめる。*hig* 変異体は、このスピノサドに対して耐性を示すことから、D α 6 を介した神経伝達が低下していることが示唆される。このことは、*hig* 変異体において D α 6 の局在量が減少していることと矛盾しないデータである。

(6) *hig* 変異のサプレッサー変異の分離

hig 変異体は寿命が短く、また活動性が低下している。そこで、この低下した活動性の回復を指標としてサプレッサー変異の分離を試みた。その結果、2種の劣性変異を独立に分離することに成功した。これらの変異は遺伝的解析により、同じ遺伝子上に生じている可能性が高い。原因遺伝子の同定により、Hig と関連した因子を同定することが期待される。現在、1種類のサプレッサー変異体に対して全ゲノム配列決定を行ったところ、候補となる変異は4種類存在した。そのうちの1つは、AchR サブユニット D α 5 をコードする遺伝子上に生じたアミノ酸置換変異であった。そこで第二のサプレッサー変異株の D α 5 遺伝子の DNA 配列を調べたところ、タンパク質コード領域内の別の位置にアミノ酸置換変異が生じていることが明らかとなった。異常のことから、D α 5 遺伝子内に生じた2種類の変異がそれぞれ *hig* のサプレッサー変異である可能性が高い。したがって Hig と D α 5 が示す遺伝的相互作用は、物理的にも近傍に存在することを示唆している。

以上、今年度は、Hig がコリン作動性シナプス間隙に特異的に局在し、シナプス後部に存在する AchR サブユニット D α 6 と D α 7 および足場タンパク質 DLG の局在を制御しているという、Hig の機能についての重要な結果を得ることができた(図、中山ら 投稿中)。また、Hig のコリン作動性シナプスのシナプス間隙への特異的局

在のためには、AchR サブユニットが関与していることが明らかになった。さらに、Hig と D α 5 の間に機能的関係性が存在することがサプレッサー変異の分離により示された。

中枢のコリン作動性シナプス間隙に特異的に局在するマトリックスタンパク質の研究は、本研究が初めての例であり、この分野にインパクトをもたらすことが期待される。

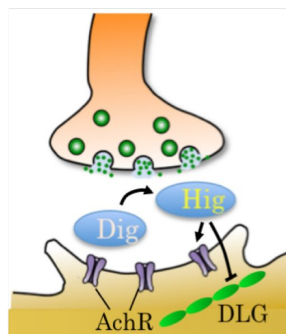


図 コリン作動性シナプスにおける Hig の役割

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4件)

H. Ito, K. Sato, M. Koganezawa, M. Ote, K. Matsumoto, C. Hama and D. Yamamoto: Fruitless recruits two antagonistic chromatin factors to establish single-neuron sexual dimorphism. *Cell* **149**(6):1327-1338 (2012). 査読あり

S. Maruyama, N. Ohkita, M. Nakayama, E. Akaboshi, T. Shibata, E. Funakoshi, K. Takeuchi, F. Ito and K. Kawasaki: RecQ5 interacts with Rad51 and is involved in resistance of *Drosophila* to cisplatin treatment. *Biol Pharm Bull.* **35** (11):2017-2022 (2012). 査読あり

M. Nakayama, H. Sato, T. Okuda, N. Fujisawa, N. Kono, H. Arai, E. Suzuki, M. Umeda, H. O. Ishikawa and K. Matsuno: *Drosophila* carrying *pex3* or *pex16* mutations are models of Zellweger syndrome that reflect its symptoms associated with the absence of peroxisomes. *PLoS One* **6**(8):e22984 (2011). 査読あり

M. Nakayama and C. Hama: Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neuroscience Research* **69**(2):87-92

(2011). 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

Hikaru genki protein, localized to the synaptic clefts, is required for the normal function of cholinergic synapses.

M. Nakayama and C. Hama

第36回日本分子生物学会年会、神戸市国際会議場、2013.12.3-6

A Novel Synaptic Protein Dig Regulates the Localization of Hig to the Synaptic Clefts in *Drosophila*. M. Nakayama, Emiko Suzuki and C. Hama

第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場、2012.12.11-14

Hig protein as a possible component of the synaptic cleft extracellular matrix in *Drosophila*. M. Nakayama, C. Hama

第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011.12.13-16

〔その他〕

ホームページ URL

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~hama/homepage-j.html/toppu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜 千尋 (HAMA, Chihiro)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50238052

(2) 研究分担者

中山 実 (NAKAYAMA, Minoru)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：40449236