

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 8 月 21 日現在

機関番号：83902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659532

研究課題名（和文） 知的障害の原因分子探索と病態メカニズムの解明

研究課題名（英文） Analyses of pathophysiology for molecules causing mental retardation

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）：

A2BP1 は、自閉性疾患、知的障害などで遺伝子異常が報告されている。本研究では、A2BP1 が大脳皮質形成に果たす役割を解析した。特異抗体を用いた解析では発達期の脳で特徴的な発現様式を示し、分化終了後の皮質神経細胞の核に局在した。海馬神経細胞では、核以外にも細胞質、軸索、樹状突起に局在した。特に樹状突起ではシナプス以外の斑点状の局所的集積が認められた。発生期のマウス大脳皮質で A2BP1 の発現を抑制すると、神経細胞の局在障害が観察された。一方、神経細胞極性関連分子 Lin7 についても同様の解析を行った結果、Lin7 はシナプスに局在し、A2BP1 同様に発生期のマウス大脳皮質神経細胞の局在への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A2BP1 is implicated in a variety of neurological and developmental disorders. We here prepared a specific antibody against A2BP1 and did protein expression and localization analyses in rodent brain tissues. A2BP1 was expressed in developmental stage-dependent manners in the brain. In cortical neurons, A2BP1 was accumulated mainly in the nucleus and diffusely distributed in the cell body and dendrites. In rat hippocampal neurons, while A2BP1 was found in a punctate distribution adjacent to synapses. Knockdown of A2BP1 caused abnormal neuronal migration during corticogenesis. We did similar analyses as for a polarity-related protein, Lin7, and found the importance of Lin7 in corticogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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

知的障害は全人口の 2～3% に認められ、重度知的障害の 50～60% は遺伝的要因の関与が想定される。当施設の中央病院でも、知的障害児の約 25% は病因が特定されず診断不能となっており、病因遺伝子の同定とその分子病態メカニズムの解明が喫緊の課題である。そのような状況下で申請者ら

は、子宮内エレクトロポレーション法（子宮内胎仔脳への遺伝子導入法）と共焦点レーザー顕微鏡イメージングを組み合わせ、知的障害原因遺伝子の探索と機能解析のための新規実験システムを構築した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 知的障害病因遺伝子

候補群の選別・確定と細胞機能の特定、2) 知的障害病因遺伝子の機能異常の分子メカニズムの解明、である。知的障害の多くが大脳皮質の低形成やシナプス・スパイン形成不全という形態的異常を伴う。したがって、先端的な画像解析技術を取り入れたアプローチを用いて、既知の自閉性障害病因遺伝子 A2BP1 と、私共が自閉性疾患と知的障害の患者検体を用いて世界で初めて見出した自閉性障害/知的障害病態関連遺伝子候補 Lin7 に着目して、機能を解析し、大脳皮質形成（すなわち神経細胞の移動と形態）の異常およびシナプス・スパイン形成不全への関与の実態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 目的の遺伝子産物に対する特異抗体を作成して、発達期の大脳皮質における分布を検証する。

(2) 独自に構築したマウス子宮内エレクトロポレーション法と共焦点レーザー顕微鏡イメージングを複合的に組み合わせた新規実験システムを用いて、知的障害原因遺伝子や知的障害との関連が予想される遺伝子の解析を行う。具体的には、目的とする遺伝子のノックダウンが、大脳皮質形成(神経細胞の移動・形態)やシナプス・スパイン形成の異常を引き起こすかどうかを形態的に解析する。大脳皮質形成過程の異常をきたす遺伝子については、その異常が神経細胞分裂・移動・分化のどの過程で起きているのかを検証する。

(3) 形態学的情報を基に当該遺伝子の機能を予測し、生理機能と作用機序を生化学・分子細胞生物学的手法で解明する。

4. 研究成果

(1) A2BP1 (Ataxin 2-binding protein 1) (別名 Fox-1) は RNA に結合して mRNA-splicing を制御することが知られている蛋白質である。近年の研究で、自閉性疾患 (ASD) に置けるハブ遺伝子であることが報告されると共に、知的障害、ADHD、統合失調症でも遺伝子レベルの異常 (遺伝子破壊、ハプロ不全) が報告されている。そこで本研究では、A2BP1 が大脳皮質形成に果たす役割を明らかにすることを最終目的として、特異抗体を作成しその性状解析を行った。作成した抗 A2BP1 抗体は、ウェスタンブロット (WB) で A2BP1 を認識すると共に免疫沈降実験にも使用可能であった。本抗体を用いた WB 解析で、A2BP1 は発達期の脳で特徴的な発現様式を示し他 (図 1)。また、脳以外の組織でも発現が認められた。ついで、大脳皮質組織染色を行ったところ、分化終了後の神経細胞の核に強い局在が認められ、分裂途中の神経幹細胞には存在しな

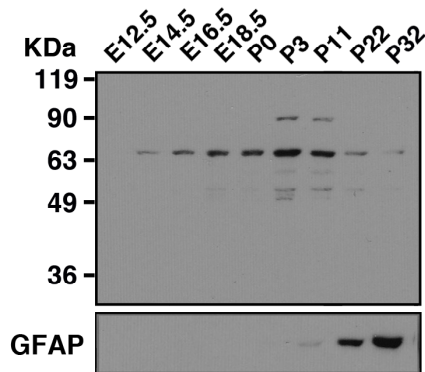


図 1 発達期マウス大脳での A2BP1 発現

かった。ラット初代培養海馬神経細胞を用いて詳細な細胞内分布を調べたところ、核以外にも細胞質、軸索、樹状突起に局在が認められた。特に樹状突起では斑点状の分布が観察されたが、シナプトフィジンや PSD95 との共局在は認められず、シナプス以外の局所的集積と考えられた (図 2)。

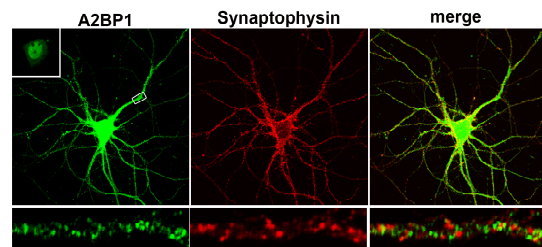


図 2 培養神経細胞における A2BP1 の局在

次いで、マウス子宮内エレクトロポレーション法を用いて発達期の大脳皮質神経細胞における A2BP1 の発現を抑制したところ、神経細胞の局在障害が観察された。このことから、A2BP1 は大脳皮質形成に重要な役割を果たし、その機能不全は大脳皮質形成障害に基づく知的障害の原因になると考えられた。

一方私共は、自閉性障害および知的障害の患者検体を用いて遺伝子多型解析を行った。その結果、神経細胞極性に関与する蛋白質 Lin7 が、自閉性障害の患者で重複し、知的障害の患者で欠失することを見出した。特異抗体を作製して、Lin7 (A-C のアイソフォームが存在する) の発現プロファイルを調べたところ、図 3 に示すように発達期マウス大脳において特徴的な発現パターンを示した。

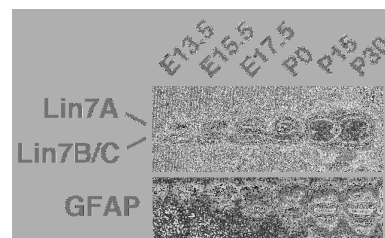


図 3 発達期マウス大脳での Lin7 発現

さらなる解析の結果、Lin7はシナプスに局在することが判明した。また、子宮内エレクトロポレーション法を用いて発達期のマウス大脳皮質神経細胞におけるLin7の発現を抑制したところ、神経細胞の局在障害が観察された。このことから、Lin7も大脳皮質形成に重要な役割を果たし、その機能不全は大脳皮質形成障害の原因になると考えられた。

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4件)

(1) Nishimura YV, Shinoda T, Ito H, Nagata K: Application of in utero electroporation and live imaging in the analyses of neuronal migration during mouse brain development. *Med. Mol. Morphol.* 45:22-28, 2012

DOI:10.1007/s00795-011-0557-0

(2) Murase K, Ito H, Kanoh H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Soubeyran P, Seishima M, Nagata K: Cell biological characterization of a multi-domain adaptor protein, ArgBP2, in epithelial NMuMG cells, and identification of a novel short isoform. *Med. Mol. Morphol.* 45:22-28, 2012

DOI:10.1007/s00795-010-0537-9

(3) Ito H, Morishita R, Sudo K, Nishimura YV, Inaguma Y, Iwamoto I, Nagata K: Biochemical and morphological characterization of MAGI-1 in the neuronal tissue. *J. Neurosci. Res.* 90: 1776-1781, 2012

DOI:10.1002/jnr.23074

(4) 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
DOI:10.1074/jbc.M110.195859

[学会発表] (計11件)

① 永田浩一: シンポジウム小児神経の「臨床」における「分子・形態」アプローチマリネスコ・シェーグレン症候群の原因遺伝子SIL1の分子形態学的解析. 第44回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 高知, 2012.9.28.

② Nagata K, Nishimura YV, Ito H, Taguchi A, Suzuki M, Iwamoto I, Morishita R, Hosokawa M, Kumagai T, Inaguma Y. SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. 8th FENS Forum, Barcelona, Spain, 7/14-7/18, 2012

③ Nagata K, Inaguma Y, Nishimura YV, Taguchi A, Ito H, Hosokawa M, Suzuki M, Kumagai T. Essential role of SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, in the neuronal migration during corticogenesis Neuroscience 2012, New Orleans 10/16, 2012

④ SIL1, a causative gene of Marinesco-Sjögren syndrome, plays an essential role in establishing the architecture of the developing cerebral cortex. Nagata K, Inaguma Y, Nishimura YV, Ito H, Suzuki M, Hamada N, Mizuno M, Iwamoto I, Morishita R, Kumagai T. 2012

American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, 12/14-12/19, 2012

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, 3/4, 2011

⑥ Nagata K: Regulation of neuronal development by Septin small GTPases and Dysbindin. MacGill University, Montreal, Canada, 12/1 2011

⑦ 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, 3/6-3/9, 2011

⑧ 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, 9/2-9/5, 2011

⑨ Ito H, Morishita R, Nishimura YV, Shinoda T, Iwamoto I, Nagata K. Functional analysis of Dysbindin, a schizophrenia risk factor, in dendritic spine formation. 2011 American Society for Cell Biology Annual Meeting, Denver, CO, 12/3-12/7, 2011

⑩西村嘉晃、星野幹雄、永田浩一、仲嶋一範、川内健史：ライブイメージングを用いた発生期大脳皮質における神経細胞移動の制御機構の解析，第 43 回日本臨床分子形態学

シンポジウム：分子と細胞のイメージング，大阪，2011

⑪ Shinoda T, Ito H, Kaibuchi K, Nagata K: Role of septin family molecules on cortical neuronal migration-Analyses using in utero electroporation and proteomic approaches 第 5 4 回日本神経化学会大会シンポジウム：Approaches for the elucidation of septin functions in neurons and glia. 石川，2011.9.26.

[その他]
ホームページ等
<http://www.inst-hsc.jp>

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

篠田 友靖 (SHINODA TOMOYASU)
名古屋大学・医学部・助教
研究者番号：80505652

西村 嘉晃 (NISHIMURA YOSHIAKI)
同志社大学・脳科学研究科・助教
研究者番号：50508603