

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650199

研究課題名(和文)精神遅滞関連タンパク質複合体による生後脳発達の制御メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Postnatal brain development regulated by intellectual disability-associated protein complex

研究代表者

酒井 康成 (SAKAI, YASUNARI)

九州大学・大学院・講師

研究者番号：10380396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：精神遅滞関連タンパク質DEAF1の生後発達の脳内発現パターンを明らかにするために、野生型マウスの脳を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、DEAF1は大脳皮質、海馬ニューロンの樹状突起に強く発現し、MAP2と局在性が一致していた。市販抗体を用いた免疫沈降法では、DEAF1の濃縮が得られず、マウス脳抽出液中の内在性DEAF1-FMRP複合体は検出できなかった。Neuro2a細胞を用いたDEAF1のノックダウン、および過剰発現系では、DEAF1が軸索伸長に関与する可能性が示唆された。現在、これらのフェノタイプに関わる分子メカニズムを解析している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression patterns of intellectual disability-associated protein DEAF1 in the postnatal period of wild-type mouse brain. Immunofluorescence study revealed that DEAF1 was highly expressed in the neuronal dendrites of cerebral cortex and hippocampus. Commercially available antibodies were not able to enrich DEAF1 in the immunoprecipitation assays using the mouse brain extracts. Thus DEAF1-FMRP complex was not detected in this study. Knockdown and overexpression of DEAF1 in Neuro2a cells suggested that DEAF1 is involved in the process for extension of dendrites. We are currently investigating the molecular mechanisms underlying these neuronal phenotypes.

研究分野：小児神経学

キーワード：精神遅滞 DEAF1 複合体 FMRP 分子シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 精神遅滞患者や自閉症など発達障害を対象にした大規模なゲノムワイド解析が盛んになり、欧米の複数の施設で研が進められている (Cooper, *Nat Genet*, 2011; Pinto, *Nature*, 2010; Sebat, *Science*, 2007)。しかしながら大多数の患者については、遺伝的な原因が不明のままである (Beaudet, *Nat Med*, 2007; Schaaf, *Neuron*, 2011)。また発達障害に関わる生物学的メカニズムは解明されていないため、治療法の開発は大きく遅れている。

(2) このような研究情勢の中で、申請者は先行研究として自閉症のタンパク質結合ネットワーク (自閉症インタラクトーム) を世界に先駆けて報告した。異なる複数の自閉症関連タンパク質が、発症に関与する共通の分子経路を共有することを証明し、疾患概念の進展に貢献した (Casici, *Nat Rev Genet*, 2011; Geschwind, *Trends Cogn Sci*, 2011)。

(3) とくに申請者は上記自閉症インタラクトームから得られた様々な知見の中で、二つの精神遅滞関連タンパク質、Fragile X mental retardation protein 1 (FMRP) と Deformed epidermal autoregulatory factor 1 (DEAF1) が複合体を形成する結果に着目した。両者がタンパク質レベルで結合することは、同一のシグナル伝達経路内で協調的に機能し、下流遺伝子の活性化やシグナル経路の調節を担う、「高次脳機能関連」ユニットを形成する可能性を示唆していた。

## 2. 研究の目的

- (1) マウス脳内における FMRP-DEAF1 複合体の存在
  - (2) DEAF1 の生後脳内発現と局在性
  - (3) DEAF1 が調節する分子経路
- 以上、3点について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 6週齢の野生型 C57Bl/6 雄マウスを安楽死させ、全脳摘出後、1% Triton-X 含有 TS バッファー (140mM NaCl 10mM Tris·HCl, pH7.4) を用いて、タンパク質粗抽出液を作成。市販 FMRP および DEAF1 抗体を用いて、免疫沈降を行う。2次抗体ビーズ (プロテイン A または G アガロース) で沈降させた免疫複合体を TS バッファーで4回以上洗浄後に、5% 2ME 入り SDS バッファーで溶出。ウェスタンブロッティングで FMRP および DEAF1 シグナルを確認する。

(2) 上記野生型マウスを鎮静後、氷冷生食で灌流し、4% PFA で固定。全脳を摘出し、シヨ糖・グリセリン混合溶液で凍結保護、OCT

コンパウンドによる包埋、ミクロトームでの切片作成を行った。従来の方から従って、蛍光免疫染色を行い、ニコン A1 システムによる共焦点レーザー画像を取得した。

(3) 培養細胞 Neuro2a を用いて、DEAF1-GFP および MAP2 発現プラスミドを導入し、両者の細胞内局在性およびインビトロ免疫沈降を行った。

## 4. 研究成果

(1) 野生型マウス脳抽出液を用いて、免疫沈降を行った。抗 FMRP 抗体による免疫沈降・ウェスタンブロッティングの結果、FMRP 複合体内に DEAF1 シグナルを同定できなかった。DEAF1 (clone 3C12) による免疫沈降は、有意な抗原濃縮が得られなかった。本研究期間中に、内在性 DEAF1-FMRP 複合体は検出できなかったが、現在組み替え GST 融合タンパク質を用いた DEAF1 複合体の検出を試みている。

(2) 6週齢の野生型マウスの脳を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、DEAF1 は大脳皮質 (図1)、海馬ニューロン (図2) の樹状突起に高く発現し、軸索マーカーである MAP2 と局在性が一致していた (図1および2)。

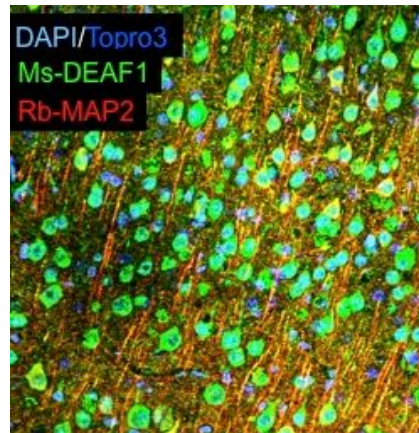


図1 大脳皮質における DEAF1 発現

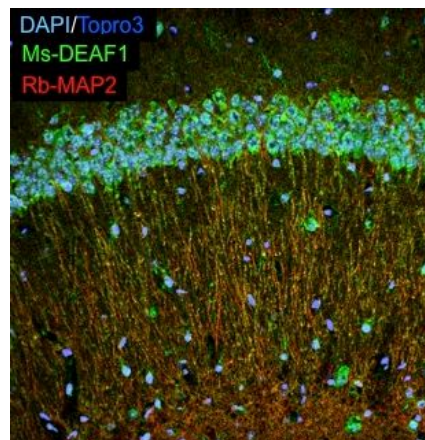


図2 海馬 CA1 領域での DEAF1 (緑) と MAP2 (赤)

## の共存シグナル

(3) 既存のトランスクリプトームデータ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profile/?term=deaf1+wnt>) を参照し、DEAF1 が関与する分子経路を探索したところ、Wnt シグナル系が下流標的として存在する可能性が示唆された。TOPFLASH ベクターを用いた解析で、DEAF1 は Tcf/Lef1 に対する転写抑制効果を示し、Wnt-catenin シグナルの抑制分子として機能することが明らかになった。さらに、Neuro2a 細胞を用いた DEAF1 のノックダウン、および過剰発現系では、DEAF1 が軸索伸長に関与する可能性が示唆された。現在、これらのフェノタイプに関わる分子メカニズムを解析している。

### 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 9 件)

1) Saitsu H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, Suzuki Y, Monden Y, Saito H, Tziperman B, Torio M, Akamine S, Takahashi N, Osaka H, Yamagata T, Nakamura K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur J Hum Genet.* 2015 May 13. doi: 10.1038/ejhg.2015.92

2) Isobe N, Sakai Y, Kira R, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakata A, Sasazuki M, Torio M, Akamine S, Torisu H, Hara T. Periodic Epileptiform Discharges in Children With Advanced Stages of Progressive Myoclonic Epilepsy. *Clin EEG Neurosci.* 2015 Mar 30. pii: 1550059415579767.

3) Kusuda T, Nakashima Y, Murata K, Kanno S, Nishio H, Saito M, Tanaka T, Yamamura K, Sakai Y, Takada H, Miyamoto T, Mizuno Y, Ouchi K, Waki K, Hara T. Kawasaki disease-specific molecules in the sera are linked to microbe-associated molecular patterns in the biofilms. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11):e113054

4) Sanefuji M, Yamashita H, Torisu H, Takada Y, Imanaga H, Matsunaga M, Ishizaki Y, Sakai Y, Yoshida K, Hara T. Altered strategy in short-term memory for pictures in children with attention-deficit/hyperactivity

disorder: a near-infrared spectroscopy study *Psychiatry Res.* 2014 Jul 30;223(1):37-42

5) Sakai Y, Souzaki R, Yamamoto H, Matsushita Y, Nagata H, Ishizaki Y, Torisu H, Oda Y, Taguchi T, Shaw CA, Hara T. Testicular sex cord-stromal tumor in a boy with 2q37 deletion syndrome. *BMC Med Genomics.* 2014 Apr 22;7:19. doi: 10.1186/1755-8794-7-19

6) Chong PF, Haraguchi K, Torio M, Kirino M, Ogata R, Matsukura M, Sakai Y, Ishizaki Y, Yamamoto T, Kira R. A case of pontine tegmental cap dysplasia with comorbidity of oculoauriculovertebral spectrum. *Brain Dev.* 2015 Jan;37(1):171-4

7) Uike K, Matsushita Y, Sakai Y, Togao O, Nagao M, Ishizaki Y, Nagata H, Yamamura K, Torisu H, Hara T. Systemic vascular phenotypes of Loeys-Dietz syndrome in a child carrying a de novo R381P mutation in TGFBR2: a case report. *BMC Res Notes.* 2013 Nov 12;6:456

8) Sakai Y, Ohkubo K, Matsushita Y, Akamine S, Ishizaki Y, Torisu H, Ihara K, Sanefuji M, Kim MS, Lee KU, Shaw CA, Lim J, Nakabeppu Y, Hara T. Neuroendocrine phenotypes in a boy with 5q14 deletion syndrome implicate the regulatory roles of myocyte-specific enhancer factor 2C in the postnatal hypothalamus *Eur J Med Genet.* 2013 Sep;56(9):475-83.

9) Torisu H, Watanabe K, Shimojima K, Sugawara M, Sanefuji M, Ishizaki Y, Sakai Y, Yamashita H, Yamamoto T, Hara T. Girl with a PRRT2 mutation and infantile focal epilepsy with bilateral spikes *Brain Dev.* 2014 Apr;36(4):342-5.

[学会発表](計 6 件)

第 55 回日本小児神経学会学術集会(大分)

- 自閉症発症に関与する分子シグナルの探索 酒井康成、他

第 56 回日本小児神経学会学術集会(浜松)

- Weaver 症候群の女児例に対する EZH2 シークエンスおよびマイクロアレイ CGH 解析 酒井康成、他

第 57 回日本小児神経学会学術集会(大阪)

- てんかん性脳症関連遺伝子 TRIM8 は FMRP 複合体による翻訳調節を受ける 酒井康成、他

第 59 回日本人類遺伝学会(東京):

- もやもや病感受性遺伝子 RNF213 の機能解析 大久保一宏、他
- GNAO1 に de novo G203R 変異を有し、乳児悪性移動性部分てんかんを発症した女兒 鳥尾倫子、他
- MAGEL2 および NF1 遺伝子にデ・ノボ変異を認めたてんかん性脳症後の成人女性 酒井康成、他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K002524/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
酒井康成 (SAKAI, Yasunari)  
九州大学 小児科・診療准教授  
研究者番号: 10380396

(2) 研究分担者: なし  
(3) 連携研究者: なし