

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790311

研究課題名(和文) SPAL-1の脳機能における役割と精神疾患の分子機構

研究課題名(英文) Role of SPAL-1 in higher brain function and molecular mechanism of psychiatric diseases

研究代表者

松浦 憲 (Matsuura, Ken)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：10625742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：SPAL-1は神経細胞の興奮性シナプスに局在する生理的機能未知のタンパク質である。我々はこれまでにSPAL-1のマウスにおける欠損が学習障害や自閉症様行動を引き起こすなど、SPAL-1が脳高次機能に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。本研究ではSPAL-1が関わる分子機構解明を目的とした。

私達は今回マウス脳内でSPAL-1と相互作用する因子をMS解析により網羅的に分析した。その結果、SPAL-1欠損による表現型に寄与する可能性のある因子群として、エンドサイトーシス関連因子とナトリウムポンプのサブユニット群を同定するなど、分子機構解明に繋がる有力な情報が得る事に成功した。

研究成果の概要(英文)：SPAL-1 is a neuronal protein abundantly expressed in excitatory synapses. However, its physiological function is poorly understood. We have previously shown that SPAL-1 KO mice exhibit intellectual disabilities and autism-like behaviors, which suggest an important role of SPAL-1 in higher brain function. In this research, we further attempted to elucidate molecular mechanism involving SPAL-1. We performed comprehensive screening of physiological interactants of SPAL-1 in mouse forebrain using IP-MS analysis. SPAL-1 was cross-linked to the adjacent proteins prior to cell lysis to preserve the original complex and avoid artificial binding in the later procedures. Sample from SPAL-1 KO mice was used as negative control. As a result, we have identified several promising interactants such as endocytotic factors and subunits of sodium-potassium pump, that may lead to an elucidation of the molecular function of SPAL-1 in the brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

SPAL-1 (SPA-1-like-1)はシナプス後肥厚(PSD)に局在し、NMDA 受容体および PSD-95 などと複合体を形成するとされる、低分子量 G タンパク質 Rap に特異的な GTPase 活性化タンパク質である。私たちは、PSD-95 ファミリー結合タンパク質として SPAL-1 を同定し、その基本的な機能解析を行った(*Genes Cells* 7, 607-61, 2002)。SPAL-1 の神経系における研究は、これまでアメリカの Morgan Sheng のグループが中心となり、SPAL-1(別名 SPAR)がスパイン(樹状突起に無数に見られる棘状の小突起で、興奮性シナプス形成の場)の形態制御やシナプス強度のホメオスタシス制御に関与している事などを報告している(*Neuron*, 31, 289-303, 2001; *Neuron*, 58, 571-583, 2008 など)。しかし、これらはすべて神経初代培養細胞に SPAL-1 やその変異体を強制発現させることにより得られた結果であり、生体内での本来の生理機能を反映しているとは言い難い。これに対して私たちは、当初より SPAL-1 の生理機能の解明を目指し、早期に SPAL-1 ノックアウトマウスの作成に成功している。

(2)これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

SPAL-1 ノックアウトマウスは健康で寿命は野生型と相違なかった。私たちは、SPAL-1 が海馬、扁桃体、大脳皮質など高次脳機能を司る領域の神経細胞で特に多く発現していることを見出し、これに着目し種々の行動実験を行った。その結果、海馬依存的な学習実験でノックアウトマウスに著しい障害が見られ、SPAL-1 が海馬に関連した高次脳機能で重要な働きをしていることが判明した。当初私たちは、研究報告が多く、SPAL-1 が多量に発現している海馬 CA1 に着目し研究を進めた。しかし、組織学的解析(神経線維の走行、非対称性シナプスの基本構造、スパイン面積・密度、PSD 長さなど)や基礎的な電気生

理的解析では野生型マウスとの大きな相違は認められなかった。私たちは次に海馬 CA3 に着目し、Rap の下流で働いているとされる MAPK の内、p42/44 の活性がノックアウトマウスの CA3 透明層で著しく落ちている事を発見し、さらに CA3 の苔状線維(MF)-LTP が著しく阻害されている事を明らかにした。また、CA3 領域と関連が深いんかんの感受性がノックアウトマウスで大きく亢進し、さらに社会的相互作用テストや居住者・侵入者テストでは自閉症様症状を示すという重要な予備的なデータが得られた。これらの研究成果を踏まえ、SPAL-1 依存的なシグナルがシナプス可塑性を制御するメカニズムとその破綻がヒト精神疾患様表現型を生じるメカニズムの解析をさらに推進するため、本研究の着想に至った。

(3)分子機構解明における作業仮説

MF-LTP のメカニズムは CA1 の LTP とは大きく異なり、一般的には NMDAR 非依存的で誘導・発現の場は前シナプスであるとされているが、Eph 受容体(発現は後シナプス)/ephrin(発現は前シナプス)シグナルが誘導に必要という報告がある(*Science*, 296, 1864-1869, 2002)。SPAL-1 は Eph 受容体と PDZ ドメインを介して *in vivo* で結合する事が知られていることから(*J Neurosci*, 27, 14205-14215, 2007)、SPAL-1 欠損で Eph 受容体の発現・局在および ephrin の活性、またその下流シグナルに異常が出る可能性が考えられた。

同様に SPAL-1 は PDZ ドメインを介して Neurexin(発現は前・後シナプス)および Neuroligin(発現は後シナプス)に結合する事が酵母ツーハイブリッド法スクリーニングの結果分かっている(*Genome Res* 12, 1773-84, 2002 など)。Neurexin と Neuroligin は相互作用するシナプス接着分子で、知的障害や自閉症、統合失調症などの原因遺伝子として、近年多くの注目を集めている(*Nature*, 455, 903-11, 2008)。Neurexin はさ

らに Neuroligin とは独立した機能として GABAA 受容体と結合し抑制性シナプス応答を抑制するという報告もある(*Neuron*, 66, 403-416, 2010)。抑制性シナプス応答の異常はてんかんをはじめ様々な精神疾患の背景と考えられている。これらのことから Neurexin, Neuroligin の下流シグナル異常が SPAL-1 ノックアウトマウスの表現型の原因である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

私たちは SPAL-1 の生体内における生理機能解明を目指し SPAL-1 ノックアウトマウスを作成、多角的な解析を行ってきた。これまでに SPAL-1 の欠損が海馬 CA3 領域のシナプス可塑性の異常、および海馬依存的な学習の障害に繋がることを明らかにし、さらに自閉症様行動、てんかん感受性の増大を引き起こすなど、重大な予備的データを得ている。本研究では SPAL-1 依存的なシグナルの分子機構を明らかにし、その異常が学習・行動障害を引き起こすメカニズムに迫る事を目的とする。また個体レベルの表現型の詳細な特性解析を更に発展させていく。

3. 研究の方法

(1) SPAL-1 依存的なシグナルの分子機構解明

野生型および SPAL-1 ノックアウトマウスの脳組織を用いた生化学的解析および免疫染色など組織学的解析により相互作用候補因子の解析を行った。さらに、IP-MS 解析により新規生理的相互作用因子の網羅的スクリーニングを行った。

(2) 個体レベルの表現型の特性解析

てんかん発作感受性実験

カイニン酸に加えて、GABAR 阻害薬 pentylenetetrazole (PTZ) 投与によるてんかん感受性を検討した。

社会性行動実験

これまでの社会的相互作用テスト、居住者・侵入者テストに加えて、三室社会性テスト (*Nature*, 472, 437-442, 2011) を行った。

4. 研究成果

SPAL-1 依存的なシグナルの分子機構解明を目的として、当初は報告されている既知の結合因子からなる EphR/ephrin シグナルや Neurexin/Neuroligin シグナルに着目をした。しかしながら、生理的な結合を Co-IP や免疫染色で検証する段階で、多くはネガティブな結果だったり、十分な感度の良い抗体がなかったりと難しい状況に直面した。そこで我々は方向転換し、研究室に設置されたばかりの MS 解析装置を用い、生理的結合因子を自分達で網羅的に解析することにした。生理的結合因子を得るには、優れた抗体と十分なコントロールが重要であるが、我々には自ら作成した特異性の高い抗体とノックアウトマウスという優れたコントロールがあった。SPAL-1 は後シナプスで強固な複合体を作っているため、可溶化には強力な界面活性剤が必要である。しかし、それでは多くの結合は離れ、界面活性剤中和後にアーチファクトで結合をする懸念も生じる。そこで我々は架橋剤 Dithiobis[succinimidyl propionate] (DSP) や Dithiobismaleimidoethane (DTME) を用いて、複合体をクロスリンクで予め結び付けた上で、強力な可溶化条件 (2% SDS) で溶出し、抗体で単離する系の立ち上げに成功した (図 1)。その結果、SPAL-1 欠損による表現型

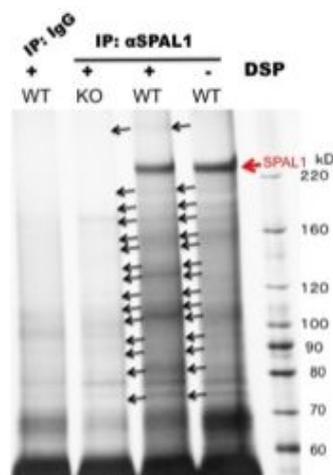


図1: SPAL-1抗体によるIP産物の銀染色 (矢印は切り出してMS解析したバンド)

に寄与する可能性のある因子群として、エンドサイトーシス関連因子とナトリウムポンプのサブユニット群を同定するなど、分子機構解明に繋がる有力な情報が得る事に成功した。さらに

EphR/ephrin シグナルに関係する解析では、シグナル下流のグルタミン酸トランスポーターの発現に変化があることを見いだした。

個体レベルの特性解析では、三室社会性テストで確かにノックアウトマウスが自閉症様症状を示すこと(図2)、てんかん感受性試験

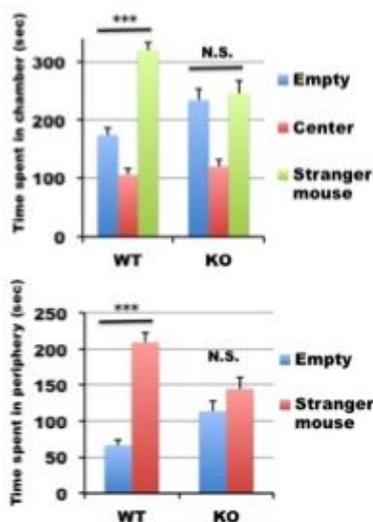


図2: 3室社会性試験におけるKOマウスの社会性欠如

でも、野生型では十分は痙攣発作が起きない低濃度投与で、ノックアウトマウスは全身性の激しい痙攣を起こすことを明らかにし、着実に特性解析も進展させた。

日本では医療政策基本指針に精神疾患を新たに加えるなど、現在、精神疾患研究の重要性に対する認識は世界的に高まっており、その進展は緊急を要する。同一家族の同じ遺伝子変異でも異なる精神疾患に罹患する事があるなど(Nature, 455, 903-11, 2008)、精神疾患は複雑で、その発症機構は良く分かっていないものが多い。自閉症患者の70%は知的障害を伴い、30%はてんかんを併発する。逆に知的発達障害の代表的遺伝性疾患である脆弱X症候群では20-30%が自閉症を、10-20%がてんかんを併発する。このことは、異なる病態の精神疾患が共通の分子機構を基盤としている可能性も示唆している。SPAL-1 ノックアウトマウスの表現型はこれに符合して、学習障害、てんかん感受性亢進、自閉症様症状、加えて多動性や驚愕反応の増大など、注意欠陥多動性障害(ADHD)や統合

失調症等の症状とも類似している。これらの事実から SPAL-1 は高次脳機能における必須の重要因子であり、その生理的機能解明は精神疾患の本態や発症機序の解明に重要な意義を持つと考えられる。本研究で得られた結果から、今後さらに SPAL-1 の機能に関わる詳細な分子メカニズムが明らかになる事が期待される。

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 件)

〔学会発表〕(計 2件)

Ken Matsuura, Takafumi Jigami, Kenzui Taniue, Yasuyuki Morishita, Shungo Adachi, Takao Senda, Hiroyuki Aburatani, Tsutomu Nakamura, Tetsu Akiyama

Identification of a link between Wnt / β -catenin signaling and the cell fusion pathway

EMBO Conference: 30 Years of Wnt Signaling
2012年 6月29日、オランダ

Ken Matsuura, Takafumi Jigami, Kenzui Taniue, Yasuyuki Morishita, Shungo Adachi, Takao Senda, Hiroyuki Aburatani, Tsutomu Nakamura, Tetsu Akiyama

Regulation of cell fusion through Wnt signaling
~Novel insight into cell fusion biology~

第35回 日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 憲 (MATSUURA, Ken)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：10625742

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：