

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293043

研究課題名(和文)非筋肉型ミオシンへの新たな結合分子群による脳機能制御の新展開

研究課題名(英文)Significance of novel non-muscle myosin-binding partners in the brain

研究代表者

佐藤 真 (Sato, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号：10222019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：非筋肉型ミオシンは記憶や学習の神経基盤であるスパイン(棘)に多く存在し、そこでアクチンとともにスパインの形態や神経伝達機能へ重要な役割を担うことが知られている。この非筋肉結合型ミオシンの働きがどのように制御されているか明らかとするべく、今回新たにその結合分子を同定し、機能解析を進めた。すると、同分子はNMDA受容体の機能に影響を与え、その機能不全マウスでは不安行動の増大が認められるなど、脳機能に重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Non-muscle myosin IIb plays a major role for regulation of actin dynamics in the dendritic spines. However, how myosin IIb alters cytoskeletal dynamics and how myosin IIb function is regulated during the spine maturation are still poorly understood. We found that one molecule (tentatively called as FRM) was a novel binding partner of myosin IIb and was expressed in the hippocampal and neocortical neurons. When endogenous FRM was knocked down in cultured hippocampal neurons, it inhibited spine shortening for spine maturation and changed the ratio of NMDA receptor expressions on spines. We generated FRM-conditional knockout mice in which loxP sites flank exon 4 in the FRM allele and crossed with Emx1-Cre mice for understanding of the roles of FRM in the brain. We found that these FRM mutant mice showed the anxiety-like behavior compared with the control mice. These data suggest that FRM is a novel myosin IIb modulator that controls spine maturation and synaptic function in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 脳・神経 解剖学 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

ミオシン II 分子に関する研究は世界中で活発に進められている。近年では、その分子量の大きさにもかかわらず、結晶レベルでの解析もすすみ、3次元分子構造も解き明かされている。一方、ミオシン II の神経系での機能については、特に神経伝達における役割について、スパインの形態制御(Ryu et al., *Neuron* 2006)や神経伝達の制御に関わる重要な分子(Rex et al., *Neuron* 2010)として着目され、大変ホットな領域として大いなる注目を浴びている。故に、ミオシン II が神経系において、どのように制御されているかを解き明かすことは、スパインの形態制御、神経伝達機構の制御の理解が大きく進むと期待される。

我々は脳の形成に関わる分子として、FILIP を独自に同定した(Nagano et al., *Nature Cell Biol.*, 2002)。FILIP は、アクチン結合蛋白フィラミンと結合して働くが、同時に、血管内皮を除き、脳では成長とともにフィラミンの発現が大きく減ずることを受け、新たに結合相手を検索したところ、ミオシン II を同定した。現在、その神経伝達での役割解明を進めている。FILIP は成体脳では海馬を除く辺縁系に強く発現する。そこで、FILIP 類似の分子が海馬において機能しているのではないかと検索を進めた結果、その類似分子として LUZP1 を同定した。LUZP1 の脳での機能は未知であるが、予備実験では、ミオシン II との結合は FILIP をはるかに凌ぐものであり、脳機能に重要な海馬に強く発現していた。

## 2. 研究の目的

LUZP1 の脳での機能を明らかとすることを目的とし、以下について検討を進め、具体的な成果を得た。

(1) LUZP1 の脳内分布を明らかにする。

(2) 我々は、LUZP1 が海馬には発現することをすでに観察している。さらに、LUZP1 がシナプス機構に関わることを示唆する予備的結果を得ている。そこで、培養海馬細胞を用いて、LUZP1 の機能を明らかにする。

(3) LUZP1 の *in vivo* での意義を conditional ノックアウトマウス作製と、その解析を行うことで明らかにする。特に、海馬での発現を認めているので、海馬機能との関連を、個体レベルで検討する。

(4) LUZP1 の大脳皮質での発現様式、特に領野特異的発現の様子について検討する。さらに、大脳皮質での機能を検討する。さらには行動などへの影響も検証する。

## 3. 研究の方法

実験(1) LUZP1 の細胞内局在・脳内分布の詳細な検討

LUZP1 の細胞内局在・脳内分布を詳細に検討する。

実験(2) 海馬における LUZP1 の機能、特にミオシン II 分布、受容体動態への影響の検討

予備実験にて、LUZP1 が海馬神経細胞のスパインにて機能し、同部位でのミオシン II の分布や NMDA 受容体のサブユニットの一つの局在制御に関わることを見出している。この点について、確定的なデータを得る。さらに、その他のサブユニットについても検証を行う。そこで、マウス海馬神経細胞を~3週間程度培養し、培養神経細胞同士でシナプスを形成させ、シナプス形成やスパインに対する LUZP1 の働きを検討する。

実験(3) LUZP1 ノックアウトマウスでの表現型の解析、学習・行動(特に社会性)の検討をすすめる。

脳特異的な LUZP1 conditional ノックアウト(cKO)マウスを作製し、その表現型を解析する。形態学・生理学・行動学の観点より解析を進める。

## 4. 研究成果

(1) 実験の都合上、実験(3)の LUZP1 ノックアウトマウス(変異マウス)の作製を優先して進めた。同時に同遺伝子座に発色遺伝子を組み込み、LUZP1 の発現部位を同定できるマウスを作製した。実験(1)は、このため、より確実に正確な同マウスを用いた方法にて実施した。その結果、大脳皮質内でも LUZP1 が均一でなく発現すること、さらには、大脳皮質外の脳内発現部位を同定できた(下図)。



(2) LUZP1 の結合分子を探索し、ミオシン II に強い結合を見出した(確定した)。ミオシン II はアクチンと分子複合体を作ることは良く知られているが、この事実は、LUZP1 がアクチンをも含む分子群とコンプレックスを形成していることを示唆した。LUZP1 の新たな結合分子(もしくは分子クラスター構成分子)として、その変異が自閉症をもたらすとして有名な Shank2 分子を同定した。また NMDA 受容体の NR2A サブユニットのシナプス膜上への発現が、LUZP1 により影響を受けることを見出した。さらに、LUZP1 とミオシン II の結合部位の

同定を進め、ミオシン II の ATPase 活性部位近傍へ LUZP1 が結合するとのデータを得た。なお、当初 NMDA 受容体 NR2B サブユニットのシナプス面への発現にも影響するとのデータが予備実験では得られていたが、この点については再実験で変化が確認できなかったため、現在では LUZP1 は NR2B に対して有意な影響は有しないと考えている。

(3) LUZP1 ノックアウトマウスについて行動学的な見地も含め、検討を進めた。個体差があるため、さらなる例を追加する必要があると考えているが、現時点では LUZP1 のノックアウトマウスは(対照群に比し)活動度に変化がみられ、かつケージにて飼育すると周辺部に移動する傾向がみられ、また新規マウスを同じケージ内に入れても、その新規マウスに対する探索行動の減弱がみられた。

上記をまとめ、現在投稿準備中である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Fujioka, T., Inohara, K., Okamoto, Y., Masuya, Y., Ishitobi, M., Saito, D.N., Jung, M., Arai, S., Matsumura, Y., Fujisawa, T. X., Narita, K., Suzuki, K., Tsuchiya, K. J., Mori, N., Katayama, T., Sato, M., Munosue, T., Okazawa, H., Tomoda, A., Wada, Y., Kosaka, H. (2016) Gazefinder® as a clinical supplementary tool for discriminating between autism spectrum disorder and typical development in male adolescents and adults. *7:19 Mol Autism*, doi:10.1186/s13229-016-0083-y

Yagi, H., Oka, Y., Komada, M., Xie, M.J., Noguchi, K., Sato, M. (2016) Filamin A interacting protein plays a role for proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. *Neurosci. Lett.* 26;612:18-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049

Okamoto, M., Iguchi, T., Hattori, T., Matsuzaki, S., Koyama, Y., Taniguchi, M., Komada, M., Xie, M.-J., Yagi, H., Shimizu, S., Konishi, Y., Omi, M., Yoshimi, T., Tachibana, T., Fujieda, S., Katayama, T., Ito, A., Hirotsune, S., Tohyama, M., Sato, M. (2015) DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J. Neurosci.* 35(7):2942-2958 doi:10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015

Komeda, H., Kosaka, H., Saito, D. N., Mano, Y., Jung, M., Fujii, T., Yanaka, H. T., Munosue, T., Ishitobi, M., Sato, M., Okazawa, H. (2015) Autistic empathy toward autistic others. *Soc. Cogn Affect*

*Neurosci.* 10 (2) 145-152. doi:10.1093/scan/nsu126

Yagi, H., Nagano, T., Xie, M.-J., Ikeda, H., Kuroda, K., Komada, M., Iguchi, T., Tariqur, R.M., Morikubo, S., Noguchi, K., Murase, K., Okabe, M., Sato, M. (2014) Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci. Rep.* 4, 6353; doi: 10.1038/srep06353

Lopatina O, Yoshihara T, Nishimura T, Zhong J, Akther S, Fakhrul AA, Liang M, Higashida C, Sumi K, Furuhashi K, Inahata Y, Huang JJ, Koizumi K, Yokoyama S, Tsuji T, Petugina Y, Sumarokov A, Salmina AB, Hashida K, Kitao Y, Hori O, Asano M, Kitamura Y, Kozaka T, Shiba K, Zhong F, Xie MJ, Sato M, Ishihara K, Higashida H. (2014) Anxiety- and depression-like behavior in mice lacking the CD157/BST1 gene, a risk factor for Parkinson's disease. *Front. Behav. Neurosci.* 8:133. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00133

Xie, M.-J., Yagi, H., Kuroda, K., Wang C.-C., Komada, M., Zhao, H., Sakakibara, A., Miyata, T., Nagata, K., Oka, Y., Iguchi, T. and Sato, M. (2013) WAVE2-Abi2 complex controls growth cone activity and regulates the multipolar-bipolar transition as well as the initiation of glia-guided migration. *Cereb. Cortex* 23(6):1410-1423. doi:10.1093/cercor/bhs123

Komeda, H., Kosaka, H., Saito, N-D., Inohara, K., Munosue, T., Ishitobi, M., Sato, M. and Okazawa, H. (2013) Episodic memory retrieval for story characters in high-functioning autism. *Mol. Autism* 4(1):20. doi: 10.1186/2040-2392-4-20

Komada, M., Iguchi, T., Takeda, T., Ishibashi, M. and Sato, M. (2013) Smoothed controls cyclinD2 expression and regulates the generation of intermediate progenitors in the developing cortex. *Neurosci. Lett.* 547:87-91. doi:10.1016/j.neulet.2013.05.006

Toba, S., Tamura, Y., Kumamoto, K., Yamada, M., Takao, K., Hattori, S., Miyakawa, T., Kataoka, Y., Azuma, M., Hayasaka, K., Amamoto, M., Tominaga, K., Wynshaw-Boris, A., Wanibuchi, H., Oka, Y., Sato, M., Kato, M. and Hirotsune, S. (2013) Post-natal treatment by a blood-brain-barrier permeable calpain inhibitor, SNJ1945 rescued defective neuronal migration and neuronal circuit formation in lissencephaly. *Sci. Rep.* 3:1224. doi:10.1038/srep01224

〔学会発表〕(計40件)

猪口 徳二、DBZ は Ndel1 のリン酸化修飾制御を通して軸索伸長および皮質神経細胞の配置に与える、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

小西 慶幸、微小管と軸索輸送の制御を介した軸索形態の維持システム、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

熊本 香名子、逆行性物質輸送が神経ネットワーク形成に与える影響について、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

森 泰丈、RNA 結合タンパク質 hnRNP K のアルギニンメチル化修飾を介した mRNA 輸送制御機構の解明、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

謝 敏カク、膜脂質結合タンパク質 Phldb2 を介した AMPA 受容体局在制御機構、第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2016 年 3 月 28 日~30 日、ビッグパレットふくしま(福島県郡山市)

Makoto, S. (招待講演) Development of Axon Collaterals as the Inter-Areal Connection in the Cerebral Cortex, 7th Asia Pacific International Congress of Anatomists, 2016 年 3 月 17 日~20 日、National University of Singapore (Singapore)

森 泰丈、RNA タンパク質 hnRNP K のアルギニンメチル化修飾が樹状突起への mRNA 輸送を制御する、第 91 回日本解剖学会 近畿支部学術集会、2015 年 11 月 28 日、京都工芸繊維大学(京都市)

Kuroda, K.、FILIP-related molecule binds to NMDA receptor and controls spine maturation and synaptic function of the hippocampal neuron、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日~21 日、McCormick Place(Chicago, U.S.A.)

Oka, Y.、Arginine methylated form of hnRNP K variant mediates a dendritic localization of  $\alpha$ CaMKII mRNA、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日~21 日、McCormick Place(Chicago, U.S.A.)

Iguchi, T.、DISC1-binding zinc finger protein (DBZ) regulates cortical cell positioning and neurite elongation through control of Ndel1 dual-phosphorylation、Neuroscience 2015 SfN's 45th annual meeting、2015 年 10 月 17 日~21 日、McCormick Place(Chicago, U.S.A.)

佐藤 真 (招待講演) Oxytocin and more: what we have learned from the brain development and its disorders、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日~13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

岡 雄一郎、Development of axon collaterals as the inter-areal connections in the cerebral cortex、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日~13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

森 泰丈、Functional analysis of protein arginine N-methyltransferase 8 (PRMT8) in activated microglia that are induced by spinal cord injury、第 58 回日本神経化学学会大会、2015 年 9 月 11 日~13 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

佐藤 真 (招待講演) 疾患に学ぶ脳内の情報統合基盤とその形成、第 59 回「脳の医学・生物学研究会」、2015 年 8 月 1 日、名古屋大学鶴友会館(愛知県名古屋市)

謝 敏カク、Phldb2 はスナプスの可塑性を制御する、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日~31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

黒田 一樹、海馬神経細胞における NMDA レセプタに結合する FILIP 関連分子の機能解析、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日~31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

岡 雄一郎、皮質ニューロン軸索側枝による領野間結合の発達、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日~31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

森 泰丈、hnRNP K のサブタイプ特異的なアルギニンメチル化が mRNA の樹状突起への輸送を制御する、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日~31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

猪口 徳二、受容体チロシンキナーゼとその反発性結合分子は脳内で相補的に発現することで軸索側枝の投射様式を制御し皮質 橋 小脳路の形成に関わる、第 38 回日本神経科学大会、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日~31 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県神戸市)

佐藤 真 (招待講演) 脳発達とその破綻に学ぶ脳の機能基盤への新たなアプローチ、第 31 回北海道大学脳科学研究教育センターシンポジウム、2015 年 7 月 21 日、北海道大学(北海道札幌市)

② 佐藤 真 (招待講演) 発達障害の病態解明に向けた新たなアプローチについて、第 57 回日本小児神経学会学術集会、2015 年 5 月 28 日、帝国ホテル大阪(大阪市)

- ② 佐藤 真 (招待講演) 進化と個体発生から見通す大脳皮質構築, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ③ 黒田 一樹, 神経細胞のスパンにおける NMDA 受容体と結合する FILIP 関連分子の機能解析, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ④ 岡 雄一郎, マウス大脳皮質領野間の軸索投射の解析, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑤ 猪口 徳一, 皮質脊髄路発達期の側枝形成に關する受容体分子の解析, 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015 年 3 月 21 日~23 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
- ⑥ 森 泰丈, 脊髄損傷時に出現する活性化マイクログリアにおけるアルギニンメチル化酵素 PRMT8 の機能解析, 第 19 回グリア研究会, 2014 年 12 月 6 日, 東京商工会議所 (東京都千代田区)
- ⑦ 謝 敏カク, 脂質関連分子は LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する, 第 41 回日本脳科学会, 2014 年 11 月 22 日~23 日, 福井県県民ホール (福井県福井市)
- ⑧ Yagi, H., A chaperone protein controls the morphology of neuronal spines via filamin-A interacting protein, Society for Neuroscience 2014, 2014 年 11 月 15 日~19 日, Walter E. Washington Convention Center (Washington D.C., U.S.A.)
- ⑨ 謝 敏カク (招待講演) Phldb2 は LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する, 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回神経化学大会合同大会, 2014 年 9 月 28 日~10 月 1 日, 奈良県文化会館 (奈良)
- ⑩ 岡 雄一郎, マウス大脳皮質長連合ニューロンの軸索投射, 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日~13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑪ 八木 秀司, FILIP とシャペロン分子によるシナプス形態調節, 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日~13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑫ 謝 敏カク, Phldb2 は樹状突起スパインの成熟およびスパインの可塑性を制御する, 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11 日~13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑬ 黒田 一樹, 神経細胞のスパンにおける FILIP 関連分子の生体における機能解析, 第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014 年 3 月 27 日~29 日, 自治医科大学キャンパス (栃木県下野市)
- ⑭ Xie, M.-J., Phld2 regulates the maturation

of dendritic spines and AMPA receptor endocytosis during long-term depression, Society For Neuroscience 2013, 2013 年 11 月 9 日~13 日, San Diego Convention Center (San Diego, U.S.A.)

- ⑮ Kuroda, K., FILIP-related molecule controls spine maturation and synaptic function in the hippocampal neuron via non-muscle myosin IIb, Society For Neuroscience 2013, 2013 年 11 月 9 日~13 日, San Diego Convention Center (San Diego, U.S.A.)
- ⑯ 猪口 徳一, 皮質脊髄路回路形成における軸索側枝形成因子の探索と解析, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都国際会館 (京都市)
- ⑰ 岡 雄一郎, マウス大脳皮質長連合ニューロンの選択的標識, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都国際会館 (京都市)
- ⑱ 服部 剛志, DBZ KO マウスにおける大脳皮質発達の解析, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都国際会館 (京都市)
- ⑲ 黒田 一樹, FILIP 関連分子による Myosin- b を介した神経細胞野間形成の制御とシナプス可塑性における機能解析, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都国際会館 (京都市)
- ⑳ 謝 敏カク, Phldb2 は樹状突起スパインの成熟および化学的 LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する, 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 20 日~23 日, 京都国際会館 (京都市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.anat2.med.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 真 (SATO, Makoto)

大阪大学・連合小児発達学研究所・教授

研究者番号: 10222019

### (2) 研究分担者

岡 雄一郎 (OKA, Yuichiro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 30614432

謝 敏カク (XIE, Min-Jie)

福井大学・医学部・助教

研究者番号: 40444210

猪口 徳一 (IGUCHI, Tokuichi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号: 60509305

黒田 一樹 (KURODA, Kazuki)  
福井大学・医学部・助教  
研究者番号： 60557966

尾身 実 (OMI, Minoru)  
福井大学・医学部・特命助教  
研究者番号： 60557966  
(平成26年度まで分担者として参画)