

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430033

研究課題名(和文) 神経突起の分岐を制御するシグナル分子とその変異体マウスの脳組織に関する解析

研究課題名(英文) Targeted disruption of a gene that encodes a signaling molecule for a neurite branching.

研究代表者

岸 将史 (Kishi, Masashi)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：60573938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脳内にて発現する蛋白キナーゼBranckについてin vivoでの解析を行った。遺伝子欠損マウスを作製し解析した結果、Branckは中枢・末梢神経ニューロンの正常な神経突起の形成や分岐に重要な役割を担う分子であることが判明した。更に形態学的、行動学的、生化学的解析を行った結果、疾患関連の表現型や結合因子を見出した。これらの結果は、脳内蛋白リン酸経路がヒト脳や精神疾患の発生に果たす役割を明らかにしうるものである。

研究成果の概要(英文)：A protein kinase called Branck expressed in the mouse brain was analyzed in vivo. Targeted disruption of Branck in mice revealed that this molecule is important for normal formation and branching of the neurites of the neurons of the central and peripheral nervous systems. We further analyzed morphological, behavioral, and biochemical defects of the mutant mice, and identified a disease phenotype and binding proteins. These results shed light on the role for a protein kinase signaling in the development of human brain and psychiatric diseases.

研究分野：神経発生

キーワード：神経突起 蛋白質リン酸化 行動解析

1. 研究開始当初の背景

- (1) 代表者は、以前、哺乳類シナプス前構造の分化を司る分子機構を明らかにするため、線虫の神経発生異常を引き起こす遺伝子変異の解析結果を利用した。すなわち、線虫のシナプス前構造の確立に異常を呈する変異体 SAD-1 の責任遺伝子がコードする蛋白キナーゼに関し、そのマウス相同体 SAD-A/B の同定と遺伝子ターゲットングを用いた機能解析を行った。
- (2) その結果、SAD-A もしくは-B の単独ノックアウトでは大きな異常がみられなかったものの、SAD-A/B ダブルノックアウトマウスは出生後致死となった。
- (3) SAD キナーゼは神経系に強く発現しているため、その脳組織を詳細に調べたところ、前脳神経細胞の極性化、すなわち神経突起の軸索突起と樹状突起への分化に異常のあることが判明した。この解析から、SAD キナーゼが、正常な神経細胞の極性化に不可欠なシグナル分子であることが明らかとなった (Kishi M. et al., Science 2005)。
- (4) この解析結果は、後に LKB1-SAD kinase 経路という軸索突起の分化やその伸長促進を司る主要なシグナル伝達経路の確立につながっている (Barnes et al., Cell 2007)。
- (5) これらの結果は、神経細胞の極性化機構と上皮細胞や受精卵の極性形成に関わる機構との間に、極めて似通った分子メカニズムが存在し、その根底で SAD キナーゼと Par-1 キナーゼの相同性が重要な役割を担っているという可能性を示唆している。
- (6) また、医学的には、SAD キナーゼがアルツハイマー病を含むタウオパチーと呼ばれる一連の神経変性疾患に顕著に観察される微小管結合因子 tau のリン酸化に関与するキナーゼ分子であることが明らかになった。
- (7) 代表者は他の蛋白キナーゼで、同様に神経突起の形態形成にかかわる分子が存在するだろうと考え、その同定を試みた。
- (8) すなわち、多数の蛋白キナーゼについて cDNA 発現ベクターを用意し GFP 発現ベクターと共に神経細胞に発現させるといったスクリーニングを行った。その細胞形態を観察する際には、細胞の発する蛍光シグナルを細胞の固定なしに capture し、可能な限り生細胞の形態を観察するよう心掛けた。

- (9) その結果、あるキナーゼ分子が神経突起形成とその filopodia 状の分岐を激しく誘導するということが分かったので、それを Branching Kinase (BrancK) と名付け解析を検討した。BrancK には種を超えて相同体が存在し、その普遍的な役割が予想されたが、その機能的役割については不明なままであった。

2. 研究の目的

- (1) BrancK の生理的役割を明らかにするため、遺伝子ノックアウトマウスを作製し loss-of-function による機能解析を試みる。
- (2) 本研究では、上記の仮説、すなわち BrancK が神経突起の形成や分岐に重要な役割を果たしているという仮説を証明するため、その脳組織を解剖学的に解析する。
- (3) 個体内の神経細胞形態を観察するのは簡単ではなく詳細を調べるのが難しいため、初代培養ニューロンの形態解析も同様に行う。
- (4) また、マウス個体の行動解析を行い、異常がないかどうかを調べる。
- (5) 行動異常が観察された場合、その表現型に類似のヒト疾患との関わりを明らかにする。
- (6) 生化学的には、BrancK に結合する因子や下流因子を探索しその機能を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 脳組織のゴルジ染色や神経突起マーカーに対する特異的抗体を用いた免疫染色により、神経突起の形態や伸長の程度が、遺伝子変異の結果どのように変化しているかを調べる。
- (2) また、通常の飼育環境では特に目立った行動異常が見出されないため、以下のようなテストの組み合わせである行動テストバッテリーによる行動異常のスクリーニングを行い、何らかの表現型が見出されないかどうかを調べる。
 - ・一般身体初見スクリーニング
 - ・神経学的スクリーニング
 - ・明暗選択テスト
 - ・オープンフィールドテスト
 - ・高架式十字迷路テスト

- ・ホットプレートテスト
- ・社会的行動テスト
- ・ローターロッドテスト
- ・社会性テスト
- ・聴覚性驚愕反応テスト
- ・プレパルス抑制テスト
- ・ポーソルト強制水泳テスト
- ・8方向放射状迷路テスト
- ・モリス水迷路テスト
- ・バーンズ迷路テスト
- ・T字型迷路テスト
- ・尾懸垂テスト
- ・24時間ホームケージ社会的行動テスト
- ・恐怖条件付けテスト

- (3) ヒト疾患との関わりが見出された場合には、薬剤による行動異常の回復の可能性を調べ、疾患モデルマウスとしての有用性を検討する。
- (4) 酵母 two-hybrid 法を用いた結合因子の探索を行う。また、神経突起の制御に関わる分子の調節に関わる可能性を、リン酸化反応の有無や分子動態の変化から検証する。
- (5) 得られた関連分子については、生体内での共役もあるのかどうかをノックアウトマウスを用いて調べることにする。具体的には、遺伝学的な相互作用が観察されるかどうかを、複数の遺伝子欠損マウスの掛け合わせによって検証する。

4. 研究成果

- (1) 抗ニューロフィラメント抗体を用いた免疫染色やゴルジ染色によって、末梢から中枢に到るまで調べた限り全ての神経突起形成・分岐形成に、強弱の違いはあれども低形成を観察した。
- (2) 行動テストバッテリーによる行動異常のスクリーニングによって軽度の行動異常が観察されたが詳細については追試が必要であるかもしれない。薬剤の投与による回復なども再検討が必要である。
- (3) BrancK の結合分子などについては、アスパラギナーゼや SOCS2、ミトコンドリアの構成因子などとの相互作用が観察された。また、BrancK の有無にこれらについては *in vivo* での結合や上下関係、実際のリン酸化反応の有無などを調べていく予定である。

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6件)

- (1) The planar cell polarity protein Vangl2 is involved in postsynaptic compartmentalization.
Nagaoka T, Kishi M
Neuroscience Letters 612 251-255
2016年1月
(査読有)
doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.009.
- (2) PDZ interaction of Vangl2 links PSD-95 and Prickle2 but plays only a limited role in the synaptic localisation of Vangl2.
Nagaoka T, Tabuchi K, Kishi M
Scientific Reports 5 12916 2015年8月
(査読有)
doi: 10.1038/srep12916.
- (3) Vangl2 regulates E-cadherin in epithelial cells.
Nagaoka T, Inutsuka A, Begum K, Hafiz KM, Kishi M
Scientific Reports 4 6940 2014年11月
(査読有)
doi: 10.1038/srep06940.
- (4) A simple and highly efficient method to identify the integration site of a transgene in the animal genome.
Uemura S, Nagaoka T, Yokoyama M, Igarashi M, Kishi M
Neuroscience Research 80 91-94
2014年3月
(査読有)
doi: 10.1016/j.neures.2013.11.007.
- (5) The Wnt/planar cell polarity pathway component Vangl2 induces synapse formation through direct control of N-cadherin.
Nagaoka T, Ohashi R, Inutsuka A, Sakai S, Fujisawa N, Yokoyama M, Huang YH, Igarashi M, Kishi M
Cell Reports 6 916-927 2014年3月
(査読有)
doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.044.
- (6) SAD kinases control the maturation of nerve terminals in the mammalian peripheral and central nervous systems.
Lilley BN, Krishnaswamy A, Wang Z, Kishi M, Frank E, Sanes JR
Proceedings of the National Academy of

Sciences of the United States of
America 111 1138-1143 2014年1月
(査読有)
doi: 10.1073/pnas.1321990111.

[学会発表](計5件)

- (1) Role of planar cell polarity protein Vangl2 in synapse formation.
T. Nagaoka, M. Kishi
2015 cell biology ascb annual meeting.
San Diego, CA, USA
2015/12/15
- (2) Planar Cell Polarity in the Neural Circuit.
Masashi Kishi, Tadahiro Nagaoka
第38回日本分子生物学会年会
第8回日本生化学会大会 合同大会
Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo,
Japan
2015/12/03
- (3) Planar Cell Polarity in Synapse Formation.
Masashi Kishi, Tadahiro Nagaoka
Neuro2015
(The 38th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society)
Kobe Convention Center, Kobe, Hyogo,
Japan
2015/07/28
- (4) Identification of S1 antigen which interacts with and enhances the internalization of N-cadherin.
Kishi M, Nagaoka T, Uemura S., Ohashi R., Inutsuka A., Sakai S., Fujisawa N., Yokoyama M., Igarashi M.
XXIII International Symposium on Morphological Sciences
(symposium organization: Neuron and Circuit Formation)
Toki Messe Niigata Convention center,
Niigata, Niigata, Japan
2013/09/10-2013/09/13
- (5) Roles of Cell Polarity Regulators at Mammalian Synapses.
Kishi M, Nagaoka T, Uemura S., Inutsuka A., Sakai S., Fujisawa N., Yokoyama M., Igarashi M.
Neuro2013
(The 36th annual Meeting of the Japan Neuroscience Society)
Kyoto International Conference Center,
Kyoto, Kyoto, Japan
2013/06/20-2013/06/23

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0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0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

<http://researchmap.jp/kishim/>

http://www.nips.ac.jp/dcs/MEMBER_files/member.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者
岸 将史(KISHI, Masashi)
生理学研究所・生体機能調節研究領域・
特別協力研究員
研究者番号: 60573938

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
古瀬 幹夫(FURUSE, Mikio)
生理学研究所・生体機能調節研究領域・
教授

永岡 唯宏(NAGAOKA, Tadahiro)
生理学研究所・生体機能調節研究領域・
特別協力研究員