

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430061

研究課題名(和文) クラスII ARFタンパク質のリソソームにおける役割の解析

研究課題名(英文) Analyses of class II ARF family proteins

研究代表者

定方 哲史 (Sadakata, Tetsushi)

群馬大学・テニュアトラック普及推進室・講師

研究者番号：90391961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が細胞内トラフィックに関与するsmall Gタンパク質であるクラスII ARF遺伝子のKOマウス(以下、Tremorマウス)を作製したところ、生後3週目から前脚と頸部に強い振戦を示した。各種薬剤を用いて検討した結果、本態性振戦モデルマウスの可能性が高いことが分かってきた。小脳プルキンエ細胞の電気生理学的解析を行ったところ、Tremorマウスの活動性が大きく低下していた。また、プルキンエ細胞におけるNav1.6の免疫反応性が著しく低下していた。

研究成果の概要(英文)：ADP-ribosylation factors (ARFs) constitute a family of small monomeric GTPases. The ARF family consists of three classes and a total of six members: class I, consisting of ARFs 1-3; class II, consisting of ARFs 4 and 5; and class III, which comprises ARF6. Little is known about the role of the class II ARFs in membrane trafficking. Here, we generated class II ARF knockout mice, and found that ARF4+/-/ARF5-/- mice showed severe tremor. Propranolol and gabapentin, which alleviate symptoms in essential tremor patients, reduced the amplitude of the pathologic tremor. Immunohistochemical studies showed that Nav1.6 proteins, normally localized in axon initial segment (AIS), was highly decreased in ARF4+/-/ARF5-/- Purkinje cell. These results indicate that the impairment of electrophysiological properties of Purkinje cell by Nav1.6 decrease is related to the onset of pathologic tremor of essential tremor patients.

研究分野：神経化学

キーワード：Tremor

1. 研究開始当初の背景

脳ではグルタミン酸や GABA などの神経伝達物質は小型のシナプス小胞に貯蔵されている。それに対し、ペプチド性の神経伝達物質は、電子顕微鏡で見ると大型で、中に電子密度の高い物質を含有する有芯小胞に貯蔵されている。

Ca²⁺-dependent activator protein for secretion (CAPS, CADPS) タンパク質は有芯小胞に会合し、その分泌を制御していることが知られている。疾患に関しては、糖尿病に関与することが報告されている。私は新規遺伝子として CAPS2 を同定した(Sadakata et al., *J. Neurosci.*, 2004)。CAPS2 タンパク質は C2 ドメイン、PH ドメインを持つ。私は、神経ネットワークの形成に重要である脳由来神経栄養因子(BDNF)を含む有芯小胞に CAPS2 が会合し、BDNF の分泌に関与することを明らかにした(Sadakata et al., *J. Neurosci.*, 2004)。

CAPS2 遺伝子はヒト 7 番染色体にある自閉症責任領域 (AUTS1) に位置している。自閉症は認知・記憶・行動の全てに異常が起きる精神疾患である。三歳までに発病し、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局、反復的で常同的な行動”を示すことが知られている。自閉症患者において CAPS2 の発現解析を行った結果、一部の患者では exon 3 のみがスキップする異常なスプライシングが起きていることが明らかになった。

exon 3 がスキップした CAPS2 タンパク質は軸索終末部に輸送されないことも明らかになり、exon 3 スキップ型の CAPS2 を発現する特定の自閉症患者においては、BDNF が健常者と異なったパターンで分泌されるために、神経ネットワークの形成に異常をきたす可能性が示唆された (Sadakata et al., *J. Clin. Invest.*, 2007; *J. Neurosci.*, 2007)。

私はこの仮説を証明すべく、exon 3 がスキップした CAPS2 タンパク質のみを発現する遺伝子改変マウスを作製した。このマウスは社会性行動の異常等、様々な自閉症様形質を示した(Sadakata et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012)。

自閉症患者においては、片方の対立遺伝子が欠損している患者の報告も相次いだ。そこで CAPS2 ヘテロマウスを解析したところ、一部の自閉症様形質を示すことが分かってきた(Sadakata et al., *PLoS One*, 2014)。

また、タンパク質の基礎的な働きに関しては、CAPS タンパク質は small GTPase である **クラス II ARF タンパク質** と結合することにより、ゴルジ体における有芯小胞の生成にも関与していることが明らかになった (Sadakata et al., *J. Biol. Chem.*, 2010; *FEBS J.*, 2012; *J. Neurosci.*, 2013)。

2. 研究の目的

ARF ファミリータンパク質はゴルジ体や形質膜近傍における小胞のトラフィッキングに重要な働きをしている small G タンパク質であり、クラス I (ARF1,2,3), クラス II (ARF4,5), クラス III (ARF6)の三つに分類される。申請者がクラス II ARF タンパク質のノックアウトマウスを作製したところ、このマウスは前脚と頸部に強い振戦を示し、多動や常同的な旋回運動を示すことも見出した。

不随意的な震えを起こす疾患である本態性振戦は 65 歳以上の有症率が 5-14%と高く、高齢化社会においては QOL を維持する上で大きな障害となっている。本態性振戦のモデルマウスとして知られているのは harmaline 投与マウスと GABA_A 受容体遺伝子の KO マウスのみであり (Schmouh et al., *Prog. Neurobiol.*, 2014)、新規モデルマウスの有用性は高い。

このクラス II ARF KO マウスに関して、ブルキンエ細胞を中心とした解剖学的・生理学的な形質を明らかにし、本態性振戦の発症メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

薬剤...β 遮断薬や抗てんかん薬に加えて、パーキンソン病治療薬等をクラス II ARF KO マウスに投与し、振戦に関する形質の変化を震度計により定量評価する。

解剖...クラス II ARF KO マウスの解剖学的な解析を行う。具体的には小脳における細胞死やブルキンエ細胞の樹状突起形成、インターニューロンの成熟を調べる。また、電子顕微鏡により、小脳のブルキンエ細胞に見られる異常を詳細に解析する。

行動...クラス II ARF KO マウスの多動性、常同行動、不安行動、社会性行動、サーカディアンリズム等の基本的な行動形質を解析する。

生理...クラス II ARF KO マウスの脳波解析および筋電図の解析を行い、振戦原性域の特定、振戦に伴う異常脳波の解析、および上記薬剤の影響を評価する。また小脳ブルキンエ細胞を電気生理学的に詳細に調べる。

4. 研究成果

我々が細胞内トラフィックに関与する small G タンパク質であるクラス II ARF 遺伝子の KO マウス(以下、Tremor マウス)を作製したところ、生後 3 週目から前脚と頸部に強い振戦を示した。我々がこのマウスの示す振戦がヒトのどの疾患の病態を示しているのかについて各種薬剤を用いて検討した結果、Tremor マウスに β 遮断薬である propranolol や抗てんかん薬である gabapentin を投与すると振戦の軽減が見られた。このことから本態性振戦モデルマウスの可能性が高いことが分かってきた。

この Tremor マウスに関する解剖学的解析を行ったところ、小脳プルキンエ細胞の樹状突起上に AMPA 受容体の免疫染色性の異常に大きな塊が見られた。これを電子顕微鏡にて観察したところ、多層化した小胞体のような殆ど報告例の無い構造物が見られた。

また、小脳の体積の減少、プルキンエ細胞の樹状突起上におけるスパイン密度の増加、小脳登上線維の長さの減少等、解剖学的な異常が小脳において集中してみられた。

小脳プルキンエ細胞の電気生理学的解析を行ったところ、Tremor マウスの活動性が大きく低下していた。この反応性がプルキンエ細胞の軸索起始部に局在する Nav1.6 の KO マウスの電気生理学的特性に似ていることから、我々は、Nav1.6 について解剖学的に調べてみた。その結果、Tremor マウスにおいては、プルキンエ細胞における Nav1.6 の免疫反応性が著しく低下していた。

そこで我々は、Tremor マウスにアデノ随伴ウイルスによりプルキンエ細胞でのみクラス II ARF を発現させ(rescue 実験)、形質の変化を解析した。その結果、Nav1.6 の発現量は上昇し、振戦の頻度は減少した。

以上の結果より、クラス II ARF の欠失により、プルキンエ細胞において Nav1.6 のトラフィック異常が起き、プルキンエ細胞の電気生理学的特性が変化することで震戦が起きる可能性が示唆された。

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 8 件)

- 1) Analysis of gene expression in Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion 2 (Cadps2) knockout cerebellum using GeneChip and KEGG

pathways.

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Yasuki Ishizaki, Teiichi Furuichi.

Neuroscience Letters. 639, p88-93 (2017).

査読有り

- 2) 「自閉症関連遺伝子 CAPS2 の解析」
定方哲史
生化学, p501-505、Vol.88、No.4、日本生化学会(2016)
査読無し
- 3) Interaction of Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with septin family proteins in mouse brain.
Mayu Hosono, Yo Shinoda, Touko Hirano, Yasuki Ishizaki, Teiichi Furuichi, Tetsushi Sadakata.
Neuroscience Letters. 617: p232-235 (2016).
査読有り
- 4) Axonal localization of Ca^{2+} -dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum.
Tetsushi Sadakata, Wataru Kakegawa, Yo Shinoda, Mayu Hosono, Ritsuko Katoh-Semba, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Yasuki Ishizaki, Michisuke Yuzaki, Masami Kojima, Teiichi Furuichi.
PLoS ONE. 9(6): e99524, p1-10 (2014).
査読有り
- 5) Mouse Models of Mutations and Variations in Autism Spectrum Disorder-Associated Genes: Mice Expressing Caps2/Cadps2 Copy Number and Alternative Splicing Variants.
Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Akira Sato, Hirotohi Iguchi, Chiaki Ishii, Makoto Matsuo, Ryosuke Yamaga, Teiichi Furuichi.
International Journal of Environmental Research and Public Health. 10 (12), p6335-6353 (2013).
査読有り
- 6) CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain.
Tetsushi Sadakata, Wataru Kakegawa, Yo Shinoda, Mayu Hosono, Ritsuko Katoh-Semba, Yukiko Sekine, Yumi Sato,

Mika Tanaka, Takuji Iwasato, Shigeyoshi Itohara, Kenichiro Furuyama, Yoshiya Kawaguchi, Yasuki Ishizaki, Michisuke Yuzaki, Teiichi Furuichi.

Journal of Neuroscience. 33 (44), p17326-17334 (2013).

査読有り

- 7) Animal Models of Autism Spectrum Disorder (ASD): A Synaptic-Level Approach to Autistic-Like Behavior in Mice.

Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi.

Experimental Animals. 62 (2), p71-78 (2013).

査読有り

- 8) Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the CAPS2/CADPS2 gene.

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Teiichi Furuichi.

FEBS Letters. 587(1), p54-59 (2013).

査読有り

〔学会発表〕(計3件)

- 1) 「CAPS2 の exon3 スキップと自閉症」
定方哲史
BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会 合同大会)神戸、神戸国際会議場、2015年12月1日
- 2) 「自閉症関連遺伝子 CAPS2」
定方哲史
第61回北関東医学会総会、前橋、群馬大学医学部 刀城会館、2014年9月26日
- 3) 「BDNF の分泌と自閉症」
定方哲史
第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会合同年会、奈良、奈良県文化会館、2014年10月1日

〔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

5. 研究組織

(1)研究代表者
定方 哲史 (SADAKATA, Tetsushi)
群馬大学・テニュアトラック普及推進室・
講師
研究者番号：90391961

(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 ()