

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591426

研究課題名 (和文) 自閉症モデル動物における行動異常および分子病態の解析

研究課題名 (英文) The molecular mechanism and behavioral abnormality in autism models

研究代表者 安田 新 (YASUDA SHIN)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：20392368

研究成果の概要 (和文)：

結節性硬化症の原因遺伝子 *tuberous sclerosis complex (TSC)-2* の変異は遺伝性の自閉症発症要因となる。TSC2は低分子量G蛋白質rhebに対するGAP (GTPase activating protein) 活性を持つ。TSC2がRhebをGTP型 (活性型) からGDP型 (不活性型) に変換することにより、下流のセリン-スレオニンキナーゼmTOR (ラパマイシンのターゲット分子) の活性が低下する。我々は、*tsc2* 変異モデル動物Ekerラットの海馬ニューロンにおけるスパイン形成が阻害されることを既に見出している。スパイン形成異常は正常ラットのニューロンにGTP型Rhebを強制発現した際にも見られた。更に、EkerラットのRheb-mTORの活性をrapamycinを投与することにより抑制したところ、下流のp70 S6のリン酸化は抑制されたが、シナプス形成異常には効果を示さなかった。そこで、Rhebに結合する新たなスパイン形成制御蛋白質をyeast two-hybrid systemを用いて探索し、Rheb binding protein (RBP) と名付けた。EkerニューロンのRBPをsiRNAによりノックダウンしたところ、スパイン数が増加した。逆に、RBPを正常ニューロンに発現したところスパイン形成が抑制された。これらの結果は、新しく同定したRBPがスパイン形成に重要な役割を持つことを示唆している。Ekerラットの海馬ニューロンにGDP型Rhebを発現したところ、RBPが減少すると同時にスパイン形成を促進した。以上の結果から、*tsc2*変異がrhebをGTP型に変換することにより、ニューロンに於いてRBPを増加させること、また、RBPの増加が*tsc2*変異による自閉症モデルに見られるスパイン形成異常の原因となることが考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Dendritic filopodia are most abundant during periods of rapid synaptogenesis, but the number of filopodia declines thereafter. When filopodia contact presynaptic sites and form synapses, filopodia convert into dendritic spines. Normal spine formation may underlie learning and memory function, and abnormal spine formation may be associated with the pathogenesis of mental retardation and/or autism.

Mutation of tuberous sclerosis complex (TSC)-2 causes a hereditary autistic disorder in tuberous sclerosis. TSC2 has GAP activity towards small GTPase rheb, and TSC2 antagonizes mTOR pathway by stimulation of GTP hydrolysis of rheb. We analyzed Eker rats heterozygous for a mutation in the *tsc2* to examine an involvement of TSC pathway in synaptogenesis. TSC2 mutation caused an inhibition of spine formation in cultured hippocampal neurons. A similar abnormality in spine formation was also observed in wild-type neuron expressed with a GTP-bound form of rheb. Thus, the excessive activation of rheb may cause the disturbance of the dendritic spinogenesis. We next attenuated such excessive activity of rheb-mTOR pathway with an mTOR inhibitor rapamycin. Rapamycin suppressed a phosphorylation of mTOR-downstream p70 S6 kinase, but did not increase the spine formation in *tsc2*-disrupted neurons, indicating that mTOR pathway may not be involved in spinogenesis. To identify another downstream target of rheb, we performed yeast two-hybrid screening and found a rheb-binding protein (RBP). Knockdown of RBP induced the spine formation in *tsc2*-mutated neurons. Conversely, overexpression of RBP abolished the maturation to spines in wild-type neurons. Furthermore, the expression of dominant-negative rheb reduced the amount of RBP, and increased dendritic spinogenesis in *tsc2*-mutated neurons. These results suggest that TSC2 may regulate the dendritic spine formation by controlling neuronal RBP amount in a rheb-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：精神神経科学

キーワード：脳神経疾患、神経科学、行動科学

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラムを含む発達障害患者において、行動異常とともにスパイン(シナプス後部の樹状突起棘)形態やスパイン数の異常がみられる (Fiala et al, Brain Res Rev, 39:29-54, 2002)。その物質的背景について、自閉症多発家系を対象とした遺伝子多系の解析により、神経接着分子 Neurologin-3 の451番目のアミノ酸変異が見出された (Jamain et al, Nature Genet, 34, 27-29, 2003)。また、この変異体をラットの海馬ニューロンに遺伝子導入したところ、スパイン形態異常が観察された。これらの結果は、ヒトにおいてシナプス形成に関与している蛋白質(分子)の異常と精神症状発現が直接関与することを示している。従って、シナプス形成に関わる分子の詳細な解析を行うことは、学習や記憶のメカニズムのみならず、ヒトの発達障害や精神疾患の病態解明に繋がると考えられる。申請者らは、発達期に発現誘導され、シナプス形成に関与していることが予想される遺伝子産物(蛋白質)を多数見出し、分子および細胞レベルで解析してきた。その中で、発達障害の分子メカニズムを解明するため、特に神経接着分子 Arcadlin と結節硬化症関連分子 Rheb に焦点を絞り解析を行う。

2. 研究の目的

結節性硬化症(TS)に自閉症スペクトラムを合併しやすいことは以前から知られており、TS 患児の 25-50%に合併するとの報告がある。TS は tuberous sclerosis complex-2 (TSC2)の変異によって生じることが知られている。2003年に TSC2 が Rheb (Yamagata et al, J Biol Chem, 269:16333-16339, 1994) に対する GTPase-activating protein であることが報告された (Zhang Y et al, Nat Cell Biol, 5:578-81, 2003)。すなわち、TS 患者では TSC2 に変異があるため、Rheb が活性化型となり、その下流の mTOR (ラパマイシンの標的分子)をリン酸化するため、細胞内の蛋白質合成が亢進する。この合成系はニューロンの樹状突起内にも存在し (Tang et al, Proc Natl Acad Sci USA, 99:467-492, 2002)、シナプス局所で蛋白質を合成することにより(局所翻訳)、発達期のシナプス形成に直接関与する。また、このカスケードの異常によりスパイン形態異常や LTP や LTD の異常が観察される (von der Brellie et al, Eur J Neurosci, 23:686-92, 2006)。申請者らも TSC2 に異常がある Eker ラット (Rennebeck G, Proc Natl Acad Sci U S A. 95:15629-34, 1998) を用いて、スパイン形態

異常を既に見出している。

以上の知見から、「発達期に発現制御される様々な蛋白質の異常が、スパイン形態異常を引き起こし、自閉症スペクトラムの発症メカニズムに関わる」ことが予想される。そこで、Arcadlin KO マウスやEkerラットの分子病態明らかにすることにより、自閉症の分子メカニズムの一端に迫りたい。

3. 研究の方法

予備実験として、正常およびEkerラットのシナプトソーム分画を2次元電気泳動により解析した。正常ラットと比較して、Ekerラットで発現が増加している蛋白スポットを複数見出すことに成功している。そこで、スポットを切り出して蛋白質を抽出する。抽出物をトリプシンにより切断し、研究所に設置されている Applied Bioscience社製質量分析計を用いてペプチドのアミノ酸配列を決定する。データベースを用いて検索することにより、Ekerラットで増加している蛋白質群を同定する。同時にRhebと結合し、シナプス形成に関与する蛋白質をyeast two-hybrid systemを用いて同定した。同定した蛋白質がシナプス形態に関与するかどうかを明らかにするために、発現ベクターを作成し海馬初代培養ニューロンに遺伝子導入する。スパインの形態学的な変化を、共焦点顕微鏡を用いて観察する。スパインの長さ、幅および単位長さあたりのスパイン数について正常対照と比較する。見出した蛋白質に既知のドメイン構造が存在する場合、生化学的実験を行うことにより分子の機能や別の調節因子との相互作用などについても明らかにしていく。

4. 研究成果

正常およびEkerラットのシナプトソーム分画を2次元電気泳動により解析した。さらに、スポットを切り出して蛋白質を抽出し、質量分析計を用い

て正常ラットと比較してEkerラットで発現が増加しているペプチドのアミノ酸配列についてデータベース検索したところ、複数のミトコンドリア代謝酵素を見出した。正常およびEkerラット初代培養ニューロンのミトコンドリアをDsRed2-Mitoを強制発現することにより可視化し、樹状突起におけるミトコンドリアの分布量を比較したところ、正常ラットに比べてEkerラットではミトコンドリアが有意に増加していた。以上の結果からEkerラットにおいてミトコンドリア分布異常がスパイン形成異常に関与することが考えられた。

更に、EkerラットのRheb-mTORの活性をrapamycinにより抑制したところ、下流のp70 S6のリン酸化は抑制されたが、シナプス形成異常には効果を示さなかった。そこで、Rhebに結合する新たなスパイン形成制御蛋白質をyeast two-hybrid systemを用いて探索し、Rheb binding protein (RBP)と名付けた。EkerニューロンのRBPをsiRNAによりノックダウンしたところ、スパイン数が増加した。逆に、RBPを正常ニューロンに発現したところスパイン形成が抑制された。これらの結果は、新しく同定したRBPがスパイン形成に重要な役割を持つことを示唆している。Ekerラットの海馬ニューロンにGDP型Rhebを発現したところ、RBPが減少すると同時にスパイン形成を促進した。以上の結果から、*tsc2*変異がRhebをGTP型に変換することにより、ニューロンに於いてRBPを増加させること、また、RBPの増加が*tsc2*変異による自閉症モデルに見られるスパイン形成異常の原因となることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

①Association of RGS2 variants with panic disorder in a Japanese population. Otowa T, Shimada T, Kawamura Y, Sugaya N, Yoshida E, Inoue K, Yasuda S, Liu X, Minato T, Tochigi M, Umekage T, Kasai K, Tani H,

Okazaki Y, Kaiya H, Sasaki T, American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics 156 430-434 2011年6月、査読有

②Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 facilitates neurotoxicity by elevating astrocytic Ca(2+) levels. Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K Neurochemistry international 58 489-496 2011年3月、査読有

③p38 Map Kinase Inhibitors as Potential Therapeutic Drugs for Neural Diseases. Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takigami S, Yamagata K Central nervous system agents in medicinal chemistry 11 45-59 2011年3月、査読有

④Non-clustered protocadherin. Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, Yamagata K, Kim H Cell adhesion & migration 5 97-105 2011年3月、査読有

⑤ Replication of a genome-wide association study of panic disorder in a Japanese population. Otowa T, Tani H, Sugaya N, Yoshida E, Inoue K, Yasuda S, Shimada T, Kawamura Y, Tochigi M, Minato T, Umekage T, Miyagawa T, Nishida N, Tokunaga K, Okazaki Y, Kaiya H, Sasaki T Journal of human genetics 55 91-96 2010年2月、査読有

⑥Endothelial microsomal prostaglandin E synthase-1 exacerbates neuronal loss induced by kainate. Takemiya T, Matsumura K, Sugiura H, Maehara M, Yasuda S, Uematsu S, Akira S, Yamagata K Journal of neuroscience research 88 381-390 2010年2月、査読有

⑦Mek3 Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K UCSD-Nature Molecule Pages 2009年12月、査読有

⑧Genome-wide association study of panic disorder in the Japanese population. Otowa T, Yoshida E, Sugaya N, Yasuda S, Nishimura Y, Inoue K, Tochigi M, Umekage

T, Miyagawa T, Nishida N, Tokunaga K, Tani H, Sasaki T, Kaiya H, Okazaki Y Journal of human genetics 54 122-126 2009年2月、査読有

⑨ Transducing neuronal activity into dendritic spine morphology: new roles for p38 MAP kinase and N-cadherin. Sugiura H*, Tanaka H*, Yasuda S*, Takemiya T, Yamagata K (* equal contribution) The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry 15 90-104 2009年2月、査読有

[学会発表] (計8件)

①結節性硬化症における樹状突起スパイン形成異常の分子メカニズム、杉浦弘子、安田新、樋野興夫、山形要人 BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月、神戸市

②カイニン酸によって生じる樹状突起スパイン減少における p38 MAP キナーゼの役割 安田 新、杉浦弘子、田中秀和、竹宮孝子、山形要人、第44回 日本てんかん学会、2010年10月、岡山市

③結節性硬化症モデル動物における樹状突起スパイン形態異常のメカニズム、安田 新、杉浦弘子、樋野興夫、山形要人、Neuro2010 第33回日本神経科学大会 第53回日本神経化学会大会 第20回日本神経回路学会大会 合同大会、2010年9月、神戸市

④ Protocadherin Arcadlin Regulates Seizure-induced Synaptic Loss by Activating p38 MAP Kinase Signaling、Yasuda S, Sugiura H, Tanaka H, Takemiya T, Yamagata K, 3'rd BIT Peptide and Protein Conference (Pepcon)-2010 2010年3月、中華人民共和国、北京市

⑤発達障害モデル動物における神経細胞樹状突起の形態変化、瀧上 周、安田 新、杉浦弘子、吉村 好之、竹宮 孝子、山内 卓、樋野 興夫、山形 要人、第32回 日本神経科学大会、2009年9月、名古屋市

⑥Tsc2 変異による神経細胞樹状突起形態異常の電子顕微鏡解析、瀧上 周、安田 新、杉浦 弘子、吉村 好之、竹宮 孝子、山内 卓、樋野 興夫、山形 要人、第52回日本神経化学会、2009年6月、群馬県渋川市

⑦発作により発現する神経接着分子 Arcadlin のてんかん病態における役割、安田 新、竹宮孝子、杉浦弘子、瀧上周、田中秀

和, 山形要人、第 42 回日本てんかん学会、
2008 年 10 月、東京都新宿区

⑧ The role of two Arcadlin splicing variants in synaptic remodeling. Yasuda S, Sugiura H, Maeno-Hikichi Y, Takemiya T, Tanaka H, Yamagata K. 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月、東京都千代田区

[図書] (計 2 件)

① Mek3. Yasuda S, Sugiura H and Yamagata K. Encyclopedia of Signaling Molecules, in press. 査読無

②Activity-dependent spine remodeling and brain disorders. In Dendritic Spines: Biochemistry, Modeling and Properties Takigami S*,Yasuda S*, Sugiura H, Tanaka H, Yamagata K (*equal contribution) Nova Science Publishers 2009 年 査読無

[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/saba_shibaru/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 新 (YASUDA SHIN)
財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員
研究者番号：20392368

(2) 研究分担者

竹宮 孝子 (TAKEMIYA TAKAKO)
東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：70297547

(3) 連携研究者

なし