

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15331

研究課題名（和文）発生過程におけるSbno1のニューロンのエンドソームでの新規分子機能の解明

研究課題名（英文）Novel molecular functions of Sbno1 in neuronal endosomes during brain development.

研究代表者

井原 大 (Ihara, Dai)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：40884367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：Sbno1の脳の発生過程における機能解析を実施した。Sbno1は発生期のニューロンにおいて機能する事が我々の過去の研究から明らかになっていた。今回我々は独自に実施したパートナー分子の機能解析の結果から、Sbno1がエンドソームに発現する分子と強く相互作用する事を見出していた。しかしながら、Sbno1は核に発現しており、エンドソームでは一切発現が認められなかった。そこでSbno1の核における機能に着目したところ、転写因子と結合し、下流分子の転写レベルでの制御を行うことが明らかになった。今回我々は下流分子としてYeats4を発見し、DNA損傷とその修復に機能する事を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sbno1は自閉症患者で点突然変異が発見されている他、孤発性統合失調症や知的障害においてもその関連が報告されている。今回我々は、Sbno1の下流分子としてYeats4を同定し、ニューロンにおけるDNA損傷とその修復において機能する事を見出した。この発見はSbno1の変異によって生じる精神疾患等は、ニューロンのDNA修復能が低下することによってもたらされる可能性を示唆している。これは、これまでの精神疾患患者において観察される報告にないものとなっており、ニューロンのゲノムDNA維持機能が精神疾患の根幹となっている新たな病因の提示となる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Our previous studies have shown that Sbno1 functions in developing neurons. In this study, we found that Sbno1 strongly interacts with molecules expressed in endosomes, based on our own functional analysis of its partner molecules. However, Sbno1 is expressed in the nucleus and not at all in endosomes. We focused on the nuclear function of Sbno1 and found that Sbno1 binds to transcription factors and regulates the transcriptional level of downstream molecules. In this study, we identified Yeats4 as a downstream molecule and found that it functions in DNA damage and its repair.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：神経発生

キーワード：Sbno1 Yeats4 DNA修復 ニューロン 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

我々は大脳皮質形成に関与する新規因子として、*Sbno1* 遺伝子を同定した(Baba et al.,2006)。*Sbno1* ノックアウトマウスは卵割期から異常を生じるため着床しない(Watanabe et al., 2018)。そのため **Sbno1 の脳における機能は未だに明らかとなっていない。** 我々は、皮質ニューロン特異的に *Sbno1* を欠損させたコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを独自に作製し、組織学的に解析した。その結果、cKO マウスは大脳皮質の低形成を呈することがわかった(未発表データ)[図1]。cKO マウスの大脳皮質では細胞数は減少しておらず、低形成の原因がニューロン産生の低下や細胞死ではなく、各ニューロンの発達に影響があるのではないかと考えられた。そこでゴルジ染色を行った大脳皮質でニューロンの形態を観察すると、ニューロンの神経線維の発達が低下していることがわかった[図2]。

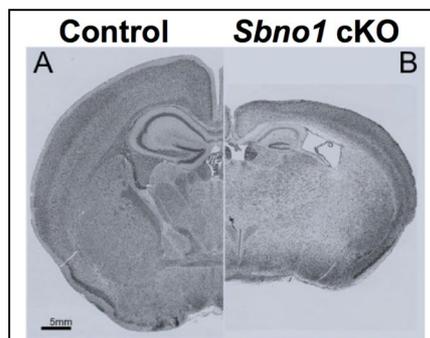
ニューロンは樹状突起、細胞体および軸索といった異なる働きを持つ部位に分かれており、それぞれの部位の働きを担う分子の細胞内局在にはエンドソーム経路が関わっている。またエンドソームを介して受容体分子が細胞表面へ提示され、シグナル伝達経路が働くことで、ニューロンの分化・成熟やニューロン機能が調節されることも報告されている(Kobayashi et al., 2019 など)。さらにはエンドソーム経路に関わる遺伝子の変異が精神疾患患者のゲノム解析で報告されている(総説;Patak et al., 2017)。しかし、ニューロン内でのエンドソーム制御機構は十分に明らかにされていない。

我々は *Sbno1* の分子機能について知見を得るため、マウス大脳皮質を用いて、抗 *Sbno1* 抗体によって免疫沈降した分子を LC/MS 法で網羅的に同定した。得られた分子を Gene Ontology 解析すると clathrin coat assembly や Golgi to endosome transport といった生物学的機能が抽出された[図3]。これら候補因子の中では、*Nsg1* および *Nsg2* が *Sbno1* と結合する可能性が最も高いことが示された。*Nsg1* と *Nsg2* は脳特異的に発現する膜タンパク質であり、エンドソーム経路に関与している(Lasiecka et al., 2010; Barford et al., 2017; Yap et al., 2018)。既に *Nsg1* 機能を阻害することにより、軸索伸長の低下(Lasiecka et al., 2014)と、シナプス伝達への影響(Steiner et al., 2005)が報告されている。**Nsg1 機能阻害実験の結果は、我々の予備実験で観察した *Sbno1* 欠損による神経線維発達の低下[図1, 図2]と関連する表現型といえる。** 遺伝子の欠損型ニューロンが酷似した形態異常を示すことから、***Sbno1* はニューロン形成において *Nsg1*・*Nsg2* と結合してエンドソーム経路に何らかの役割を持っていると考えられる。**

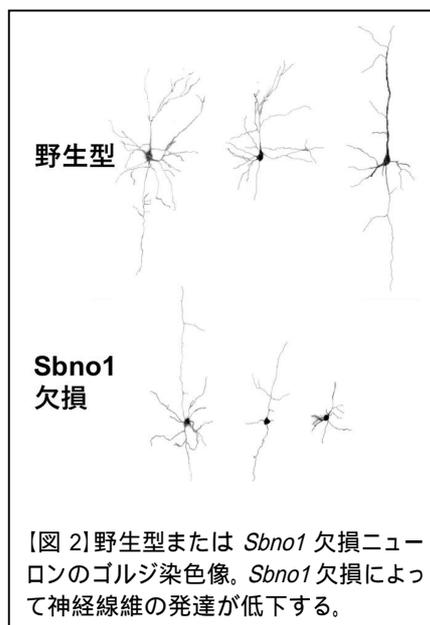
2. 研究の目的

本研究の目的は、次の2点である。

- Sbno1とNsg1およびNsg2 との結合様式解明。**
- Sbno1のエンドソームにおける分子機能解明。**



【図1】*Sbno1* の皮質ニューロン欠損マウスは大脳皮質の低形成を呈する。



【図2】野生型または *Sbno1* 欠損ニューロンのゴルジ染色像。*Sbno1* 欠損によって神経線維の発達が低下する。

Term	p-Value
clathrin coat assembly	0.0039
golgi to endosome transport	0.0057
protein oligomerization	0.0100
meiotic nuclear division	0.0110
positive regulation of sodium ion transport	0.0130
synapsis	0.0170

【図3】*Sbno1* のパートナー分子はエンドソームに関連するものが有意に多い。出生直後のマウス大脳皮質の *Sbno1* に対する免疫沈降後の LC/MS 解析結果。*Sbno1* のパートナー分子の生物学的機能を p 値順に示す。

3. 研究の方法

(1) *Sbno1* の細胞内局在解析(井原、金田、学生1)

ニューロン内での *Sbno1* タンパク質と *Nsg1* と *Nsg2* の発現とエンドソームとの関連を調べる。我々は *Sbno1* が海馬において強く発現していることを確認している。そこで、ニューロンの構造を明瞭に観察できる海馬ニューロンの低密度初代培養系を用いて以下の観察を行う。

1. 出生後すぐ(P0-P1)のマウスから海馬を摘出し、培養プレート上に海馬ニューロンを播種する。
2. 培養中でニューロンが軸索と樹状突起が十分に発達し、かつ1つ1つの神経線維を分けて観察できるタイミングで固定する。
3. 抗 *Sbno1* 抗体と抗 *Nsg1* 抗体もしくは抗 *Nsg2* 抗体を用いて、二重免疫染色を行う。共焦点顕微鏡を用いてニューロンの細胞体と軸索、樹状突起を撮影し、擬似的な 3 次元染色像で *Sbno1* が *Nsg1* と *Nsg2* と共局在するかを確認する。
4. 初期エンドソームマーカー (EEA1)、後期エンドソームマーカー (M6PR)、リサイクリングエンドソームマーカー (TfR) と *Sbno1* の共染色を行い、*Sbno1* が発現特異性を調べる。

(2) *Sbno1* と *Nsg1* および *Nsg2* との結合部位解析(井原、学生2)

1. (1)-3 で *Sbno1* と *Nsg1* および *Nsg2* の共局在が確認できた後、HEK293T 細胞に *Nsg1* および *Nsg2* と *Sbno1* を共発現させ免疫沈降(IP)実験を行う。
2. タンパク質間の直接的な結合の評価を行うために、*in vitro* で *Sbno1*, *Nsg1*, *Nsg2* を合成し生成する。タンパク質間結合を表面プラズモン共鳴を用いたバイオセンサー(ピアコア)で評価する。
3. *Sbno1* を各機能領域に分けた発現プラスミドを作製し、免疫沈降により *Nsg1* と *Nsg2* との結合部位を同定する。同様に *Nsg1* と *Nsg2* のデレーション変異シリーズを作成し、*Sbno1* との結合を IP 実験で調べ、*Nsg1* と *Nsg2* 側の *Sbno1* 結合に必要な配列を同定する。

(3) *Sbno1* 欠損ニューロンの形態・分子局在解析(井原、勝山、学生3)

1. 作成した *ERT2-Cre*; *Sbno1*^{*flx/flx*} マウスから回収したニューロン (17.5 日に脳を摘出)海馬ニューロンの初代培養を行い、タモキシフェン添加により *Sbno1* 欠損を誘導する。*Nsg1* と *Nsg2* の免疫染色と各形成段階のエンドソームマーカーを用い、ニューロンの免疫染色を行う。
2. ニューロン内では、輸送の方向性や輸送速度がエンドソームに発現している分子ごとに異なっている(Goto SL et al., 2019)。 *Sbno1* に mCherry を融合させたタンパク質をレンチウイルスで強制発現させ、神経線維の中での *Sbno1* の移動の方向性および移動速度を測定する。
3. *Nsg1* のノックダウンによって AMPA 受容体、L1cam およびニューロテンシン受容体 (Ngcam)の細胞内局在が変化する(Yap CC et al., 2008)。免疫染色を行い、*Sbno1* 欠損型ニューロンでもこれら分子の細胞内局在の変化が見られるか海馬ニューロンの免疫染色により解析する。
4. *Sbno1* への結合部位を欠損する *Nsg1* と *Nsg2* を海馬ニューロン初代培養へ過剰発現させ、膜輸送への影響を免疫染色で調べ、*Sbno1* と *Nsg1* および *Nsg2* との相互作用の必要性を解析する。

(4) エンドソームでの *Sbno1* と *Nsg1* および *Nsg2* の機能相関性解析(井原、勝山)

1. (3)で解析する 3 分子間の相関関係が制御する、エンドソーム膜輸送における分子機序を明らかにする必要がある。レンチウイルスを用いた CRISPR/Cas9 システムによって *Nsg1* と *Nsg2* のそれぞれをニューロン初代培養で欠損させ、*Sbno1* 欠損ニューロンとの形態的变化の差を観察する。
2. *Nsg1* と *Nsg2* は多くのニューロンで共発現している(Barford K et al., 2017)が、二重欠損によるニューロンの形態評価の報告はない。レンチウイルスを用いた CRISPR/Cas9 システムによる *Nsg1* と *Nsg2* の二重欠損ニューロンの形態および輸送される膜蛋白の細胞内局在の解析を行う。
3. *Nsg1* および *Nsg2* と *Sbno1* が共発現しているエンドソームの存在が確認できた場合、それ

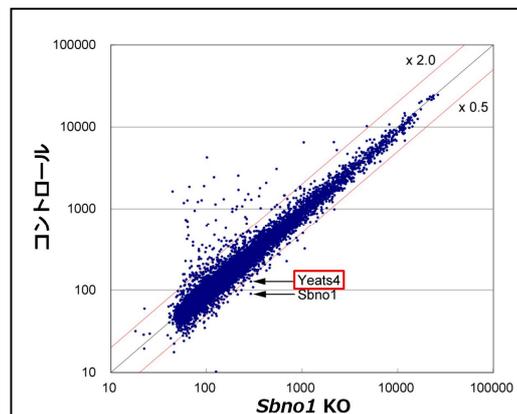
ぞれ単独の欠損によるエンドソームの移動をタイムラプスによって生細胞で観察する。また、2重欠損または3重欠損ニューロンを用いて同様の解析を行い、*Sbno1* との機能的な相関関係を明らかにする。

(5) 精神疾患との関連(井原、勝山)

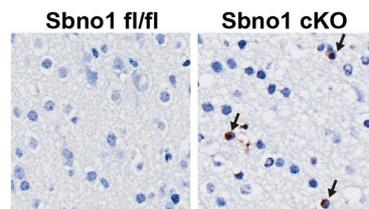
1. 大脳皮質ニューロンの初代培養でタモキシフェン添加によって *Sbno1* 欠損を誘導し、細胞膜に局在するセロトニン受容体、ドーパミン受容体、オキシトシン受容体を免疫染色によって検出する。各受容体を発現する細胞での *Nsg1* と *Nsg2* の分布、エンドソームの動態を解析する。
2. *CNTNAP2* はゲノム解析から自閉症や統合失調症との関連が示され、*CNTNAP2* 欠損マウスは自閉症様症状を示し、*CNTNAP2* タンパク質発現はエンドソーム経路によって制御されている (Varea et al., 2015)。*Sbno1* 欠損における *CNTNAP2* の細胞内局在を免疫染色によって解析する。

4. 研究成果

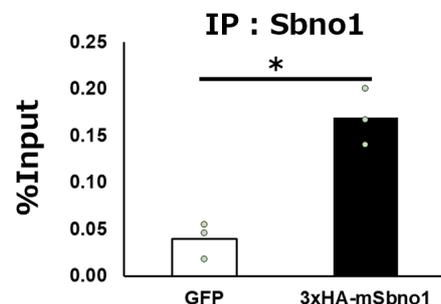
Sbno1 の脳の発生過程における機能解析を実施した。*Sbno1* は発生期のニューロンにおいて機能する事が我々の過去の研究から明らかになっていた。今回我々は独自に実施したパートナー分子の機能解析の結果から、*Sbno1* がエンドソームに発現する分子と強く相互作用する事を見出していた。しかしながら、*Sbno1* は核に発現しており、エンドソームでは一切発現が認められなかった。そこで *Sbno1* の核における機能に着目した。まず我々は、*Sbno1* の下流分子の解析を行うために、*Sbno1* 欠損線維芽細胞を用いたマイクロアレイを実施した【図4】。その結果、発現が最も有意に低下する核内因子として *Yeats4* を見出した。次に *Sbno1* 欠損マウスの大脳皮質を用いて RNA-seq を実施した。マイクロアレイと RNA-seq の複合解析を行ったところ、*Sbno1* の欠損によって細胞死に関連する遺伝子発現が有意に変化する事が明らかになった。*Sbno1* 欠損マウスの大脳皮質を用いて TUNEL 染色を実施したところ、*Sbno1* cKO マウスの TUNEL 陽性細胞が有意に増加する事が明らかになった。このことから *Sbno1* がニューロンの生存に機能する事が分かったが詳細なメカニズムは不明なままであった。我々は *Sbno1* の相互作用タンパク質の網羅的な解析結果から、*Sbno1* が転写因子と相互作用し、転写レベルで機能する事を明らかにした。そこで Cut & Run によって *Sbno1* が *Yeats4* のプロモーター領域に結合するか解析したところ、*Sbno1* の *Yeats4* のプロモーター領域への結合が観察された【図6】。次に *Sbno1* の欠損による細胞死を *Yeats4* の過剰発現によって回復するか検討したところ、*Sbno1* のノックダウンで伸長した DNA 断片化を *Yeats4* の過剰発現によって回復する事が分かった【図7】。これらのことから、*Sbno1* の下流分子として *Yeats4* がニューロンにおいて機能する事を証明した。



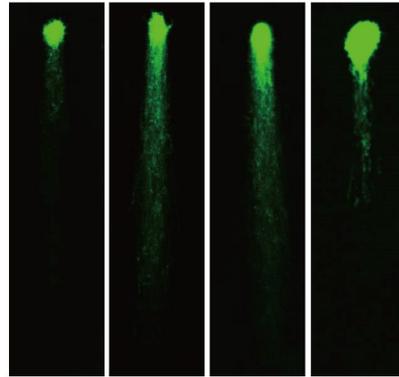
【図4】 *Sbno1* KO によって発現が最も低下した核内因子である *Yeats4*



【図5】 *Sbno1* cKO マウスで TUNEL 陽性ニューロン（死細胞）が見られる



【図6】ゲノム DNA への結合を解析する Cut & Run の結果。*Yeats4* のプロモーター領域に *Sbno1* が結合する。



shControl shSbno1 shYeats4 shSbno1
+ mYeats4

【図7】初代培養ニューロンを用いたコメットアッセイ。Sbno1のノックダウンによるDNAの断片化はYeats4の過剰発現によってレスキューされた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井原大
2. 発表標題 大脳形成におけるSbno1分子の機能の解明
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 井原大
2. 発表標題 Sbno1によるニューロンのDNA修復機構の解明
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井原大
2. 発表標題 神経幹細胞のニューロン産生における p53 の新規制御機構の解明
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------