

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290016

研究課題名(和文)成熟神経細胞の機能維持と老化を結ぶ転写抑制因子RP58の役割

研究課題名(英文)Transcriptional repressor RP58 as neuronal maturation and maintenance

研究代表者

岡戸 晴生 (OKADO, Haruo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：60221842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：RP58のナンセンス変異が知的障害患者で見つかり、また、ヒト老齢前頭葉でRP58の発現が1/4に低下していることから、RP58の発現量は、脳機能に重要であることが推察される。そこで、マウスを用いて検証した。RP58の発現抑制マウスを作製して、行動解析、組織解析を行った。その結果、RP58の発現を半減させる場合、脳形成異常は明確ではないが、行動異常がみられた。上流にStop配列を挿入し、発現を1/3にすると、脳形成異常も明らかとなり、より重篤な行動異常が見られた。従って、RP58の発現量が、行動と脳形成にきわめて重要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that nonsense mutation of transcriptional repressor RP58 is found in the patients of intellectual disability, and the expression of RP58 is reduced in aged prefrontal cortex. Therefore, we raise the hypothesis that the quantity of RP58 is important for brain function.

To examine the hypothesis, we generated the mice, in which RP58 expression is reduced. The RP58 hetero mice (RP58+/-) show the abnormal behaviors with little abnormality of brain formation. The mice, in which the expression of RP58 is reduced to one-third, shows more severe abnormal behavior and abnormal brain formation. These results indicate that quantitative expression of RP58 is involved in behavior and brain formation.

研究分野：神経科学

キーワード：RP58 転写抑制因子 脳形成 行動異常

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会になり、老化による脳機能障害の克服は急務である。しかし、ニューロンの老化のメカニズムは未だ不明である。ヒトの75歳以上の前頭葉で大きく変動する遺伝子が網羅的に解析された(Lu et al., 2004)。減少する遺伝子群としては、ナトリウムチャンネル、MAP1bに次いで第3位(1/5に減少)に転写抑制因子RP58が見出されている。ラット脳を用いた網羅的解析でも、加齢(1年以上)によって海馬CA1領域において発現が減少する遺伝子として、RP58が報告された(Kadish et al., 2009)。われわれは、RP58のノックアウトマウスを作製したところ、ホモでは出生直後に致死であるが、ヘテロマウスでは生存することを見いだした。若年時でもRP58ヘテロマウスの海馬のCA1で長期増強(LTP)が、野生型と比較して有意に減少していた。これはシナプスの可塑性の減弱を意味している。げっ歯類で加齢した海馬CA1のLTPが若年時に比べ減弱していること(Shankar et al., 1997)、また老化促進マウス(SAMP8)においてもLTPの減弱が報告されている(López-Ramos et al., 2012)。従って、RP58の発現が半減したヘテロマウスにおけるLTPの減弱は老化の性質を反映しているのではないか? このような文献的報告と、変異マウスの知見から、RP58の発現量が十分有ることが、ニューロンの可塑性を含む成熟の維持に重要であるという着想を得た。そこで、「RP58の発現低下が、ニューロン成熟維持不全を惹き起こし、それが老齢化に伴う神経系の機能低不全につながる」、という仮説を検証する。この検証のために、RP58の発現量を自在にコントロールする必要がある。

2. 研究の目的

我々は、RP58のノックアウトマウス、Floxマウスを作製したが、ヘテロマウスでは個々のニューロンで半減させることはできる。しかし、老齢化の場合、半減ではなく1/5に減少させる必要がある。一方、CRE-ER系で誘導的に欠落させる場合は、個々の細胞ではRP58の発現量は100%か0%であり、その発現を1/5にすることはできない。そこで、tetOをRP58のプロモータ部分に組み込み、トランスにtTSを発現させ、ドキシサイクリンの投与量を調節する方法により、可逆的にRP58の発現量を0%~100%にコントロールする。この方法により(FASTシステム、Tanaka et al., 2009(連携研究者田中謙二による)、RP58の発現を時期特異的にかつ可逆的にコントロールし、そのことによって引き起こされる可塑性を含む神経系の異常を解析する。とくに2ヶ月以降、RP58の発現を1/5-1/10に減少させマウスを作成する。これは、老齢脳のモデルとなるかもしれない。逆に、tTAをトランスに発現させれば、RP58の発現を野生型より増加させる事ができ、可塑性の増加、老齢化の防止、などが期待できる。また、発生後期でRP58を一過性に減少させることで、成熟不全脳をもつマウスを作成でき、これは発達異常のモデルとなると考えられる。我々はこれまで、RP58という転写抑制因子が、ニューロンの分化過程、とりわけ細胞周期離脱、放射状移動、に必須の因子であることを見いだした。さらにRP58が転写を抑制するターゲット遺伝子を同定し、新たな分子メカニズムを明らかにした。さらに最近、タモキシフェンによる誘導系を用いて、分化移動後にRP58を欠落させると軸索伸張が減弱し、細胞極性の異常が惹き起こされた。本研究の前半でこれらに、ニューロンの成熟維持機構に関わるRP58の下流

遺伝子を同定し、新たな分子メカニズムを同定する。このように、ニューロンの分化、移動、成熟に必須のRP58であるが、興味深いことに成熟後にも発現し続けるが、この機能的意義は不明である。とくに大脳皮質、とりわけ海馬では高い発現レベルが持続する。本研究では、この発現持続の意義を明らかにする。

本研究は、興奮性ニューロンの成熟、その維持機構の解析をRP58の機能解析を切り口に行なう。「RP58が成熟後ニューロンの可塑性などの成熟機構の維持に必須である、とくにその発現量が重要であるということ、従って老齢によりRP58の発現量が激減することが、ニューロンの機能不全を引き起こす」という仮説を検証する。この仮説の検証のために従来のノックアウトマウスではなく、可逆的に遺伝子量を増減できるシステムを用いることに特色がある。この仮説の一部が検証されれば、発達障害の原因究明、老化ニューロンの機能不全の抜本的な解決につながる。たとえば、発達障害脳のモデル、早期老化モデルマウスが作成されれば、創薬に利用できる。しかもRP58が転写抑制因子であることから、RP58の発現変動に伴う、直接のターゲット遺伝子が同定しやすく、ニューロン老化の新たなカスケードを同定することが容易である。

3. 研究の方法

RP58が半減しているヘテロマウスの海馬のマイクロアレイ解析を行い、成熟後ニューロンにおけるRP58の成熟維持機構を明らかにする。2RP58を成熟後誘導的に欠落させた時のニューロンの遺伝子発現変化をマイクロアレイで解析する。3FASTマウスの作成を開始し、Floxマウスと交配し、RP58の転写制御領域にtet0を組み込んだマウスを作成する。作

製したTet0マウスにCamKII-tTSマウスを交配し、2ヶ月以降にRP58の発現量を1/5-1/10に減少させる。そのフェノタイプを組織学的、電気生理学的、行動学的に明らかにする。さらに遺伝子の発現変動が老化脳と同じかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) これまで、RP58ヘテロマウスは作業記憶低下を示し、知的障害モデルとして有用であることが示された。通常のY迷路に加え、2-way Y迷路でも、ヘテロマウスでは成績が低いことを明らかにした。さらに、加齢期まで、経時的に行動解析を行ったところ、RP58ヘテロマウスは、加齢初期において物体位置認識テストによって、長期記憶が減弱していたこと、明暗テストで不安傾向が増加していることが明らかとなった。従って、RP58は、その十分な発現量が、脳機能維持に必要であることが示唆された。ヒトの加齢時、RP58の発現が減少することから、RP58ヘテロマウスは加齢性脳障害マウスモデルとして、有用であると推察できる。

(2) RP58のATG上流にFAST配列(Stop配列含有)を挿入して、そのマウスを交配して、FAST配列をホモにしたところ、RP58の転写量が1/3に減少した。離乳後、体重は1/3に減少し、死亡した。しかし、練り餌により、生存し、体重も正常近くまで回復した。ケージ内で明らかな多動を示し、上方を向いて手を揉むような異常行動をしめす個体も見られた。2-way Y迷路において作用記憶低下が示された。従って、本マウスは、知的発達障害と加齢性脳障害を結ぶモデルマウスとして、有用であると考えられる。さらに、Stop配列を除き、TetO配列マウスにCamKII-tTSマウスを交配することによってRP58の転写

を抑制したところ、予備的実験により、オープンフィールドで多動、作業記憶低下傾向を示した。

(3) RP58はどのようにして標的遺伝子の転写を抑制するのか？これまでRP58はDnmt3aを介してHDACをリクルートする事が想定されているが(Fuks et al.2001)、実際に脳でRP58とDnmt3aは結合していることを示す報告はない。そこでRP58側から探索し、RP58と結合する蛋白を網羅的に同定した。胎生18日の大脳皮質でRP58を免疫沈降後、質量分析解析(蛋白解析室)により、従来想定されていたDnmt3aは検出されず、代わりにCtBP1などいくつかの候補蛋白が同定された。CtBP1は種々のクロマチンリモデリング酵素と結合することが知られているので、RP58の転写抑制活性がDnmt3aではなく、CtBP1を介して機能している可能性がある。Ctbp1と結合しない変異RP58を作製したところ転写抑制能が減少した。従って、RP58の転写抑制活性の一部はCtbp1との結合を介していることが示された。

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7件)

Hirai S, Hotta K, Kubo Y, Nishino A, Okabe S, Okamura Y, Okado H. (2017) AMPA glutamate receptors are required for sensory-organ formation and morphogenesis in the basal chordate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114:3939-3944. doi:10.1073/pnas.1612943114.

(査読あり)

Ishigaki S, Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, Yokoi S, Endo K, Ikenaka K, Takagi S, Iguchi Y, Sahara N, Takashima A, Okano H, Yoshida M, Warita

H, Aoki M, Watanabe H, Okado H, Katsuno M, Sobue G. (2017) Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes.

Cell Rep. 18:1118-1131.

doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.013.

(査読あり)

Nonaka T, Suzuki G, Tanaka Y, Kametani F, Hirai S, Okado H, Miyashita T, Saitoe M, Akiyama H, Masai H, Hasegawa M. (2016) Phosphorylation of TAR DNA-binding Protein of 43 kDa (TDP-43) by Truncated Casein Kinase 1 δ Triggers Mislocalization and

Accumulation of TDP-43. *J Biol Chem*. 291:5473-83.

doi: 10.1074/jbc.M115.695379.

(査読あり)

Nakajima K, Hirai S, Morio T, Okado H (2015) Benzodiazepines induce sequelae in immature mice with inflammation-induced status epilepticus. *Epilepsy & Behavior*. 52:180-6.

doi: 10.1016/j.yebeh.2015.08.012.

(査読あり)

Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. (2015) Fus regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behavior via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun*. 6:7098

doi: 10.1038/ncomms8098.

(査読あり)

Heng JI, Qu Z, Ohtaka-Maruyama C, Okado H, Kasai M, Castro D, Guillemot F, Tan SS. (2015) The Zinc Finger Transcription Factor RP58 Negatively

Regulates Rnd2 for the Control of Neuronal Migration During Cerebral Cortical Development. *Cereb Cortex*. 25:806-16.

doi: 10.1093/cercor/bht277.

(査読あり)

Ohtaka-Maruyama C, Okado H. (2015) Molecular Pathways Underlying Projection Neuron Production and Migration during Cerebral Cortical Development. *Front Neurosci*. 9:447.

doi: 10.3389/fnins.2015.00447.

(査読あり)

[学会発表] (計 17 件)

新保裕子、平井志伸、神寄誠司、田中謙二、岡戸晴生 RP58/ZNF238 のバリエーション選択的欠失による脳形態および脳機能異常第 39 回日本神経科学大会 2016,7,22 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

神寄誠司、平井志伸、新保裕子、岡戸晴生 知的障害を持つ患者群から発見された RP58/ZNF238 変異体の機能解析 第 39 回日本神経科学大会 2016,7,22 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

新保裕子、平井志伸、神寄誠司、松本良江、田中謙二、岡戸晴生 RP58 の適切なバリエーションと発現量が脳発達に重要である 第 39 回日本分子生物学会 2016,11,30 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

高沢克子、平井清華、進藤真由美、新保裕子、岡戸晴生 転写抑制因子 RP58 に結合する蛋白の網羅的な探索 第 39 回日本分子生物学会 2016,12.2 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Kanzaki Seiji, Hirai-Sakamoto Shinobu, Hirai Sayaka, Shinmbo Hiroko,

Oakdo Haruo Functional Analysis of Mutated RP58/ZNF238 Observed in Patients with Intellectual Disability 第 38 回日本神経科学学会 2015 年、7 月 29 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Nakajima Keisuke,

Hirai-Sakamoto Shinobu, Okado Haruo

The seizure combined with inflammation in immature mice induces the aberrant fear memory 第 38 回日本神経科学学会 2015 年、7 月 30 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

岡戸晴生 組織分化の複雑化に伴って発達した POK ファミリー分子群 第 38 回日本分子生物学会 2015 年、12 月 3 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

平井志伸、神寄誠司、岡戸晴生 大脳皮質の発生には RP58 による適切な転写抑制を必要とする 第 38 回日本分子生物学会 2015 年、12 月 3 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

中島啓介、平井清華、平井志伸、岡戸晴生 けいれん重積の際のベンゾジアゼピン系薬剤持続投与は後遺症の重症化に影響するか? 日本小児科学会総会(大阪)2015 年 4 月 17-19 日大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Keisuke Nakajima, Sayaka Hirai, Shinobu Hirai, Haruo Okado Does continuous benzodiazepine injection for status epilepticus exacerbate the sequela? 小児神経学会総会 2015 年 5 月 28-30 日帝国ホテル大阪(大阪府大阪市)

丸山千秋、岡本麻友美、岡戸晴生、宮田卓樹、前田信明 サブプレートニューロンのマウス大脳皮質形成期における新規の機能第 38 回日本分子生

物学会 2015 年、12 月 1 日神戸国際
会議場（兵庫県神戸市）

中島啓介、平井清華、平井志伸、岡
戸晴生 けいれん重積による抑制
性システムと認知機能の変化 第
37 回日本神経科学大会パシフィ
コ横浜（神奈川県横浜市）

Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M,
Okado H, Maeda N, The subplate layer
plays critical roles in the radial
neuronal migration in the developing
mouse neocortex 第 37 回日本神経
科学大会 2014,9,12 パシフィコ横
浜（神奈川県横浜市）

Shinobu Hirai, Koji Hotta, Yoshihiro
Kubo, Atsuo Nishino, Yasushi
Okamura, Kotaro Oka, Haruo Okado.
Exploring the novel AMPAR function
from evolutionary point of view 第八
回発生討論会 2014 年 3 月 20,21 日
九州大学（福岡県福岡市）

Shinobu Hirai, Koji Hotta, Yoshihiro
Kubo, Yasushi Okamura, Haruo
Okado. Exploring the original function
of AMPA receptor 第 92 回日本生
理学会 2014 年 3 月 21~23 日 神戸
ポートアイランド（兵庫県神戸市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：脳組織の異常を伴う非ヒト動物
の作製方法およびその利用
発明者：平井志伸 岡戸晴生 松本良
江
権利者：公益財団法人東京都医学総合
研究所
種類：特許
番号：特願 2016-238899
出願年月日：平成 28 年 12 月 8 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ

[http://www.igakuken.or.jp/project/
detail/differentiation.html](http://www.igakuken.or.jp/project/detail/differentiation.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡戸晴生 (OKADO, Haruo)
公益財団法人東京都医学総合研究
所・脳発達・神経再生研究分野・ブ
ロジェクトリーダー
研究者番号：60221842

(2) 研究分担者

平井志伸 (HIRAI, Shinobu)
公益財団法人東京都医学総合研究
所・脳発達・神経再生研究分野・研
究員
研究者番号：00625189

平井清華 (HIRAI, Sayaka)
公益財団法人東京都医学総合研究
所・脳発達・神経再生研究分野・研
究員
研究者番号：80606434
(2014~2015 年度)

(3) 連携研究者

田中謙二 (TANAKA, Kenji)
慶応義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：30329700

(4) 研究協力者

神崎誠司 (KANZAKI, Seiji)
高沢克子 (TAKASAWA, Katsuko)
新保裕子 (SHIMBO, Hiroko)
田中智子 (TANAKA, Tomoko)