

令和 2 年 4 月 27 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08793

研究課題名(和文)CAMDIによる中心体制御とストレス時の脳高次機能に与える影響の解析

研究課題名(英文)Analysis of the centrosome function via CAMDI and higher brain function during stress in CAMDI knockout mice

研究代表者

福田 敏史 (Fukuda, Toshifumi)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：50372313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：CAMDI結合蛋白質としてAMPA受容体の輸送制御蛋白質KIBRAを同定し、CAMDIノックアウトマウスにおいてAMPA受容体の細胞膜表面への移行が阻害されていることを見出した。CAMDIノックアウトマウスは物体や社会的認知、空間認知行動に異常が認められた。

胎児期における大脳皮質での移動中の神経細胞において、CAMDIは中心体とともにdilationと呼ばれる先端突起内に形成される構造に局在していた。ライブイメージングを行ったところ、dilationにおいてCAMDIの輝度が安定不安定の状態を繰り返していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症などの発達障害は、幼児期や学童期はもちろん、「大人の発達障害」と呼ばれるように、日常生活に大きな支障をきたし社会的な問題となっている。しかしその根本的な発症要因は未だ解明されていない。そのため、治療や対処法に関しても統一的な解釈がなく、患者数、治療費などによる社会的な損失は計り知れない。

大脳皮質発生過程はマウスとヒトにおいて共通する分子メカニズムがあると考えられている。本研究は自閉症を含む精神疾患の病理と分子メカニズムの解明、将来的には精神疾患の予防、治療へとつながると考えており、その基礎研究として貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：KIBRA was identified as a novel CAMDI-binding protein that retains AMPAR in the cytosol after internalization. KIBRA inhibited CAMDI-dependent Rab11 activation, thereby attenuating AMPAR cell surface expression. Knockdown of CAMDI in hippocampal neurons increased the amount of internalized alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor (AMPA) and attenuated the chemical long-term potentiation (LTP)-dependent cell surface expression of AMPAR. CAMDI-deficient mice exhibited impaired recognition memory and spatial reference memory.

In migrating cortical neurons, CAMDI was localized at a structure, called dilation, with the centrosome. In dilation, it became clear that the oscillation of EGFP-CAMDI stable-unstable states was repeatedly during cortical migration.

研究分野：神経生物学

キーワード：CAMDI 記憶 学習 KIBRA 中心体 移動 dilation 自閉症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症などの発達障害は、脳の発生期における様々な異常が原因であると考えられている。大脳皮質の神経細胞の移動異常は発達障害の原因の一つと考えられており、細胞移動に関与する蛋白質の分子レベルでの機能解析は発達障害の発症メカニズムの解明に重要である。申請者は新規蛋白質 CAMDI が統合失調症関連蛋白質 DISC1 と結合し、胎児大脳の神経細胞移動を制御していることを明らかにした(Fukuda T. et al., *J. Biol. Chem.* 2010, corresponding author)。CAMDI ノックアウトマウスを作成し解析を行ったところ、神経細胞の移動異常と、自閉症様の行動(多動、繰り返し行動、新規環境への適応不全)を見出した。さらに、CAMDI は HDAC6 と結合して脱アセチル化活性を抑制するため、ノックアウトマウスでは HDAC6 の過剰な活性化が認められた。さらに CAMDI ノックアウトマウスの胎生期に HDAC6 特異的阻害剤(TubastatinA)を母体に投与することで、神経細胞移動とともに自閉症様行動が回復することを申請者は明らかにした(Fukuda T. et al., *EMBO Rep.* 2016, corresponding author)。しかし、CAMDI による神経細胞移動の詳細な分子メカニズムや、脳高次機能における役割はまだ不明な点が多く残されたままである。

### 2. 研究の目的

自閉症様行動を示すことが明らかとなった CAMDI ノックアウトマウスを用いて、記憶・学習行動への影響を探る。行動異常を示す組織学的な要因の一つとして大脳皮質神経細胞の移動異常が考えられる。CAMDI が HDAC6 を抑制することで、中心体を介して大脳皮質の神経細胞移動を制御する分子メカニズムを解明する。CAMDI ノックアウトマウスを自閉症モデルマウスとして捉え、自閉症の病理を組織学と発生学、行動学の面から解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### 1. CAMDI ノックアウトマウスの記憶・学習行動の解析

現在までに CAMDI ノックアウトマウスがストレス脆弱性を示すことを見出している。一方、HDAC6 によるグルココルチコイド受容体(GR)の制御が報告されている。CAMDI ノックアウトマウスでは、GR の過剰な安定化が起きている可能性が示唆される。精神疾患患者やモデルマウスでは、ストレス脆弱性やそれに伴う記憶・学習行動への影響が認められる。そこで CAMDI ノックアウトマウスを用いて、GR の安定化や HPA 軸へ与える影響や記憶・学習行動を解析する。

#### 2. ライブイメージング法を用いた神経細胞移動中の中心体と CAMDI の解析

CAMDI ノックアウトマウスにおいて神経細胞の移動に異常が生じていることが明らかとなっている。神経細胞の移動における中心体は、核の移動に先立って長距離を移動する特異な挙動を示す。CAMDI は中心体に局在することから、ノックアウトマウスでは中心体移動制御の異常に伴って神経細胞移動の異常が生じている可能性が示唆される。そこで、中心体のマーカーである mCherry-centrin2 や EGFP を付加した CAMDI を子宮内遺伝子導入法によりマウス胎児に導入し、スライスカルチャーとライブイメージング法を用いて中心体や CAMDI 自身の挙動を解析する。

### 4. 研究成果

酵母ツーハイブリッド法による結合タンパク質のスクリーニングを行ったところ、CAMDI 結合蛋白質として AMPA 受容体の輸送制御蛋白質 KIBRA を同定した。また、CAMDI ノックアウトマウスにおいて、記憶形成に重要な分子である AMPA 受容体の細胞膜表面への移行が阻害されていることを見出した。KIBRA は AMPA 受容体の移行を負に制御することから、CAMDI は KIBRA と結合することで KIBRA-AMPA 受容体間の連携を断ち切り、AMPA 受容体の細胞膜表面への移行を促していることが示唆された。

そこで、CAMDI ノックアウトマウスにおける記憶・学習行動への影響を解析した。新規物体の認識を評価する Novel object 認知試験において CAMDI ノックアウトマウスは、5 分間の短期記憶には問題が無かったことから、新規物体への関心は正常であることが示された。次に 24 時間後の新規物体への関心について、野生型マウスでは新規物体であることを認知することで新規物体への興味を示す時間が増加する。一方、CAMDI ノックアウトマウスは新規物体への興味を示す時間は増加しなかったことから、24 時間前の物体を記憶しておらず、新規物体への認知が低下していることが明らかとなった。物体のみならず、社会的な認知行動への影響を調べた。マウスは見知らぬマウスに対して興味を示すが、時間経過によりその興味が減少する。しかし、新規マウスと対面させることで新たな興味が増加することが知られている。CAMDI

ロックアウトマウスは、この新規マウスへの興味も減少しており、社会的認知行動に異常が認められた。バーンズ記憶試験を用いて、空間学習への影響を調べた。その結果、CAMDI ロックアウトマウスは連続した学習のみならず、最終試験から 2 週間後に残っている記憶の減弱が認められた。これらの結果から、CAMDI ロックアウトマウスは認知・記憶・学習に異常があることが明らかとなった。

CAMDI と結合して活性を抑制すると論文報告した HDAC6 は、基質の一つとしてグルココルチコイド受容体 (GR) の安定性を制御する HSP90 が知られている。HSP90 の脱アセチル化型は活性化型であり GR を安定化することが知られている。すなわち CAMDI ロックアウトマウスでは GR の安定化が促進されている可能性が示唆された。GR 蛋白質量を定量した結果、GR の安定化が認められた。一方、血中グルココルチコイド量は減少しており、日内変動の量も振幅の減少が認められた。これらの結果から、HPA 軸に異常が生じている可能性が考えられた。ストレス脆弱性を示す可能性が考えられたため、慢性的な社会的敗北ストレスを付加した後に生化学的、行動学的試験を行った。血中グルココルチコイド量を測定したところ、野生型マウスの 10 分の 1 程度にまで減少が認められた。これらの結果から、CAMDI ロックアウトマウスにおいて HPA 軸の過剰な負のフィードバックによる異常が生じている可能性が考えられた。

自閉症などの精神疾患の発症メカニズムとして、発生期における大脳皮質の構築の異常が原因の一つとして考えられているが、その詳細な分子メカニズムは未だ不明な点が多く残されている。大脳皮質発生期の神経細胞の移動に関与する事が知られている CAMDI 遺伝子のロックアウトマウスでは、多動や繰り返し行動の増加、社会性の減少などの自閉症様の行動とともに、神経細胞の移動異常に伴う異所的な軸索の投射が認められる。これらのことから、神経ネットワークを形成するうえで、正常な神経細胞の移動が重要なステップの一つであると考えられる。そこで、発生期の大脳皮質神経細胞に EGFP-CAMDI を発現させ、その挙動をライブイメージング法により解析した。その結果、移動中の神経細胞において CAMDI は中心体とともに dilation と呼ばれる先端突起内に形成される構造に局在していた。CAMDI のロックダウンにより dilation 形成率が減少することから、dilation の形成不全が神経細胞の移動異常の原因の一つである事が示唆された。また、dilation において CAMDI の輝度が安定-不安定の状態を繰り返していることが明らかとなった。さらに、安定化している状態の CAMDI が存在する dilation に中心体が入り込まれることで細胞体の移動が完了すること、その後 CAMDI が不安定化し次の移動のサイクルに移行することを見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukuda Toshifumi, Nagashima Shun, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 14
2. 論文標題 CAMDI interacts with the human memory-associated protein KIBRA and regulates AMPAR cell surface expression and cognition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0224967	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda T, Yanagi S.	4. 巻 74
2. 論文標題 Psychiatric behaviors associated with cytoskeletal defects in radial neuronal migration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-017-2539-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Shiiba Isshin, Higashi Mizuho, Fukuda Toshifumi, Tokuyama Takeshi, Matsushita Nobuko, Nagano Seichi, Araki Toshiyuki, Kaneko Mari, Shioi Go, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin- 3/AGAP3, in ELK1-dependent SRF activation at PML bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56559-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Ohno Nobuhiko, Ishido Satoshi, Aoki Motohide, Saitoh Yurika, Takada Takumi, Tokuyama Takeshi, Sugiura Ayumu, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 2
2. 論文標題 MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.201900308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Shiiba Isshin, Uda Aoi, Tokuyama Takeshi, Ito Naoki, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Ishido Satoshi, Iwawaki Takao, Uehara Takashi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress induced apoptosis by IRE1 ubiquitylation at ER ?mitochondria contact sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e100999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2018100999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福田敏史
2. 発表標題 CAMDIの動態を介した神経細胞移動とネットワーク形成
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会 [ワークショップ] (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 冴穂, 福田 敏史, 矢部 麻奈, 鈴木 千香子, 丸田 義也, 吉原 惇完 佐藤 志保, 佐藤 瑞月, 稲留 涼子, 柳 茂
2. 発表標題 神経細胞移動における精神疾患関連タンパク質CAMDIと Wnt/ -cateninシグナルとの関連
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田敏史、稲留涼子、柳茂
2. 発表標題 HDAC6特異的阻害剤によるCAMDI欠損マウスの細胞移動障害と自閉症様行動の回復
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福田敏史
2. 発表標題 CAMDI欠損マウスのHDAC6特異的阻害剤による大脳皮質神経細胞の移動異常と自閉症様行動の回復
3. 学会等名 第40回 日本分子生物学会（生命科学系学会合同年次大会、ConBio2017）[ワークショップ]（招待講演）
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----