

平成21年 5月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591014
 研究課題名（和文） 運動失調症に關与する小脳発達障害候補遺伝子BRAP2の機能解析
 研究課題名（英文） Targeting the brap2, a candidate gene for ataxia caused by developmental defects of the cerebellum
 研究代表者
 浅田 穰 (ASADA MINORU)
 日本医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60366755

研究成果の概要：

小脳発達障害候補遺伝子 BRAP2 の生化学的解析をおこない、BRAP2 は現在までに知られているプロテアソームによるタンパク質分解系とは異なる様式でポリユビキチン化することを見出した。さらに個体レベルでの機能解析を目指して Gene trap 法によるマウス ES 細胞のデータベースより、brap2 遺伝子の領域にターゲティングされたクローンを見つけた。ノックアウトマウスを作成する目的でヘミ接合子マウスを作製した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

脊髄小脳変性症をはじめ、小脳に異常を来す運動失調症には原因不明のことが多い。解明されている原因遺伝子ではCAGリピート伸長によるSCA1、細胞周期関連のATM等がある。毛細血管拡張性運動失調症(AT)の原因遺伝子ATMは、DNA損傷に応答する細胞周期チェックポイントとして機能している。チェックポイント分子の遺伝子組換えマウスを用いた研究から運動失調の原因として、発達過程における小脳の神経系細胞の細胞死が考えられるという報告がある。神経細胞においては

発達の初期に増殖を停止してしまうためそれ以前に限定して細胞周期を回転させる必要がある。その際に、細胞周期チェックポイントがブレーキとして機能しているため。その分子の機能をオフにするメカニズムが存在するのではないか、と仮説を立てた。また、パーキンソン病やアルツハイマー病など老化に伴う神経変性疾患には、タンパク質のユビキチン化が関与している。一方、ataxin3(ATXN3)のポリQ伸長による脊髄小脳運動失調症においては、異常蛋白の蓄積とともに脱ユビキチンの障害がみられる。後述するよう

に BRAP2 分子はユビキチンに結合できる分子であり、自己ユビキチン化する分子である。BRAP2 はがん抑制遺伝子 BRCA1 の機能を抑制すると想定される分子としてクローニングされたが、乳がん細胞における BRCA1 との直接の関係は見出されず、生化学的に NLS と結合できる分子で、細胞質に局在するという報告が 1998 年に JBC に載せられて以来 (Li et al. JBC 1998) その生理機能に関する報告はなかった。我々は、BRAP2 は p21 分子の NLS に結合してその核移行を阻害する分子、すなわち p21 の細胞質保持タンパクとして機能できるということを世界に先駆けて明らかにした。我々が解明した細胞質 p21 以外にも近年、PML や p53 を初め核内で機能すると考えられていた分子が、細胞質においても重要な機能分子として存在することが明らかにされつつある。それら分子の中に BRAP2 分子と相互作用することにより細胞質に発現するようになる分子も発見できる可能性がある。BRAP2 は核内分子に新たな機能を付加できる分子であり、同時にある場合には核内における機能をオフにする可能性も考えられる。高等動物においては一つの分子が細胞内局在の異なる場所において、別々の機能を発揮することが報告されている。核内の分子を細胞質に保持できる BRAP2 の生物学的意義を明らかにすることは非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

神経系細胞において細胞周期チェックポイント分子と BRAP2 分子が相互作用し、その制御破綻が小脳発達障害に関与している可能性、およびユビキチン化蛋白との相互作用により BRAP2 が神経変性疾患や小脳運動失調に関与する可能性を検討する。

我々は p21 以外の分子とも相互作用する可能性のある BRAP2 分子のさらなる機能を明らかにするべく、以下の 3 点を明らかにすることを目的とする。

- (1) 脳神経系における BRAP2 分子の発現解析
- (2) BRAP2 分子と相互作用する神経疾患関連分子の探索およびユビキチン修飾の解析
- (3) BRAP2 ノックアウトマウスを作製し、個体レベルでどのような小脳運動関連異常を示すか解析する。発生段階の神経系細胞において細胞死および細胞周期チェックポイント分子の細胞質局在に及ぼす BRAP2 の関与を解明する。

3. 研究の方法

遺伝子組換えにより brap2 遺伝子をターゲットティングし、組換えマウスを作製を試みた。ヘテロ接合性、ホモ接合性の変異体マウスで、変異の結果を解析した。

(1) BRAP2 及び細胞周期チェックポイント分子の発現及び細胞内局在の解析

我々は BRAP2 の C 末を抗原にして抗体を作製した。BRAP2 分子は C 末領域が細胞質局在を規定している。本抗体を用いて個体のどのような組織、特に脳神経系のどの部位、どの発生分化段階における細胞に BRAP2 は発現しているのか免疫組織染色法により解析を試みた。

(2) BRAP2 の機能解析

BRAP2 ノックアウトマウス作製を行うためにターゲットティングベクターをデザインした。開始コドンを含むエクソンをターゲットティングし、BRAP2 欠損マウスを作製する。また、gene trap 法により brap2 をターゲットティングした ES 細胞を Sanger Institute Gene Trap Resource (SIGTR) より入手した。Gene trap された部位、コピー数を確認して brap2 遺伝子がターゲットティングされていれば、この ES 細胞を用いてノックアウトマウス作製を試みた。BRAP2 遺伝子は、種を越えて保存された遺伝子であるが、それぞれの種において類似遺伝子を持たず、1 つしか存在しない。そのため胎生致死となる可能性もあるので、Cre-lox P の系を用いたコンディショナル・ターゲットベクターを作製する計画を立てた。作製したターゲットティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、相同組み換えを起こした細胞を選択する。ES 細胞の染色体異常の有無、未分化状態を確認できた ES 細胞をマウス初期胚へ導入し、キメラマウス、ヘテロマウスを経てノックアウトマウスを作製する。

4. 研究成果

作製したターゲットティングベクターをマウス ES 細胞に導入し、薬剤選択を行った。数百の耐性クローンをサザンブロットによりスクリーニングしたが、相同組み換えを起こした細胞を得られなかった。

SANGER INSTITUTE より入手した ES クローンに関して、確かに brap2 遺伝子領域に gene trap vector が挿入されていることを RT-PCR 法、シーケンス法、サザンブロットにより確認した。常法に従って、クローン ES 細胞を C57BL/6 マウス胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスの作製を試みた。

六匹の♂キメラマウスを得た。♀の C57BL/6 マウスと交配し、ヘミ接合子マウスを得た。さらに、サザンブロットにより germ line transmission していることを確かめた。ヘミ接合子マウスは、野生型と比較して、表現系に特に異常は観察できない。成育過程での体重変化を比較すると図1のようである。

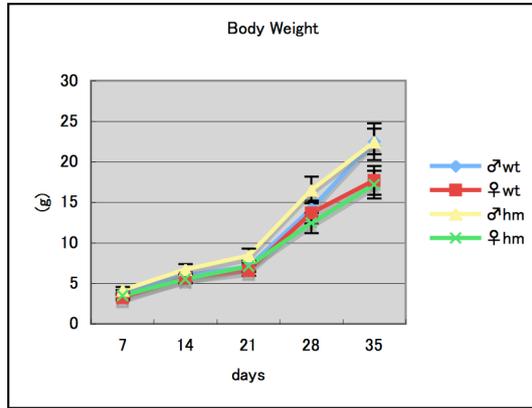


図1. 出生後のマウスの体重

ノックアウトマウスを得るためにヘミ接合子マウスの交配を行った。野生型、ヘミ接合子マウスはメンデル則通りに生まれるが、ホモ接合子マウスは現在まで1匹もえられなかった。出生前致死なので、胎生期での観察を行った。胎生8.5日においてホモ接合子の胎児が観察できた。また、胎生7.5日の段階では野生型とホモ接合子マウス胎児においてとくに異なる表現型はみられなかった。Brp2 遺伝子産物は発生初期の過程で重要な役割を果たしていることが判明した。胎生致死のメカニズムを検討することが、Brp2 の機能を探る上で欠かせない。

生化学的解析の結果、Brp2 はポリユビキチン化されることが判明した。プロテアソームによる分解系では通常ユビキチンの48番目のリジンを経てポリユビキチン化される。Brp2 においては、48番目ではなく63番目のリジンを経るポリユビキチン化が起こっていることを見つけた。このことは、ユビキチン化されたBrp2は何らかの情報伝達系に関与しているのではないかと考えられる。

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. Sakai, A., Asada, M., Seno, N., Suzuki, H. Involvement of neural cell adhesion molecule signaling in glial cell line-derived neurotrophic factor-induced analgesia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 137, 378-388, 2008、査読有

2. Sato, C., Sakai, A., Ikeda, Y., Suzuki, H., Sakamoto, A. The prolonged analgesic effect of epidural ropivacaine in a rat model of neuropathic pain. *Anesth. Analg.* 106, 313-320, 2008、査読有

3. Nagano, M., Ozawa, H., Suzuki, H. Prenatal dexamethasone exposure affects anxiety-like behaviour and neuroendocrine systems in an age-dependent manner. *Neurosci. Res.* 60, 364-371, 2008、査読有

4. Ikeda, Y., Yahata, N., Ito, I., Nagano, M., Toyota, T., Yoshikawa, T., Okubo, Y., Suzuki, H. Low serum levels of brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor in patients with chronic schizophrenia. *Schizophr. Res.* 101, 58-66, 2008、査読有

5. Kobayashi, K., Ikeda, Y., Haneda, E., Suzuki, H. Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci.*, 28, 6272-6280, 2008、査読有

6. Matsumura, T., Sakai, A., Nagano, M., Sawada, M., Suzuki, H., Umino, M., Suzuki, H. Increase in hemokinin-1 mRNA in the spinal cord during the early phase of a neuropathic pain state. *Br. J. Pharmacol.* On line, 2008、査読有

7. Yamasaki, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kajii, Y., Maeda, J., Soma, M., Takao, K., Tanda, K., Ohira, K., Toyama, K., Kanzaki, K., Fukunaga, K., Sudo, Y., Ichinose, H., Ikeda, M., Iwata, N., Ozaki, N., Suzuki, H., Higuchi, M., Suhara, T., Yuasa, S., Miyakawa, T. Alpha-CaMKII deficiency causes immature dentate gyrus, a novel candidate endophenotype of psychiatric disorders. *Mol Brain*, 1, 6, 2008 査読有

8. Katayama, M., Aoki, E., Suzuki, H., Kawana, S. Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model. Exp. Dermatol. 16, 553-560, 2007、査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅田 穰 (ASADA MINORU)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：6 0 3 6 6 7 5 5

(2) 研究分担者

鈴木 秀典 (SUZUKI HIDENORI)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：3 0 2 2 1 3 2 8

(3) 連携研究者