

平成 23 年 6 月 13 日現在

機関番号：36301  
研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2008 ～ 2010  
課題番号：20300126  
研究課題名（和文） 神経細胞の分化と生存維持に対する BRINP ファミリータンパク質の生理機能解明  
研究課題名（英文） Physiological roles of BRINP family proteins in neuronal development and survival  
研究代表者  
松岡 一郎（MATSUOKA ICHIRO）  
松山大学・薬学部・教授  
研究者番号：40157269

研究成果の概要（和文）：我々が同定した BRINP ファミリー（BRINP1, 2, 3）は、既知のタンパク質と類似性を持たない全く新規のタンパク質であり、神経系特異的に発現する細胞周期抑制因子である。本研究は、BRINP ファミリーの生理機能と病態における役割を解明することを目的とした。その結果、BRINP1 遺伝子欠損マウスの解析を通じて、BRINP1 遺伝子は神経活動依存的に誘導されて過興奮による神経変性を防いでいること、および BRINP1 欠損マウスは特定の精神疾患に類似した行動を示すことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have identified BRINP family genes encoding three novel proteins that are specifically expressed in the nervous system and possess an ability to suppress cell cycle transition. In the present study, to gain insight into the physiological roles of BRINP family proteins, we raised and analyzed BRINP1-knockout mice. As a result, we found BRINP1 is induced remarkably in dentate gyrus in an activity dependent manner, and rescue hippocampal CA3 neurons from excitotoxic degeneration. Moreover, BRINP1-knockout mice showed specific behaviors such as hyper locomotive activity, lack of endurance and sociality that resembles some forms of psychiatric disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学・神経薬理学

キーワード：神経分化、神経新生、神経細胞保護、精神疾患、神経活動依存性

1. 研究開始当初の背景

従来、終末分化して細胞分裂しない神経細胞においては、細胞周期制御機構は意味を持たないと考えられていた。もちろん、神経細胞を生み出す神経幹細胞において細胞周期の調節機構は、発達期の神経細胞の分化や成体における神経新生を調節する上で重要な働きを示していることには疑いがない。しかし近年、神経活動の昂進、神経栄養因子の除去、神経細胞脱落性疾患によって引き起こされる神経細胞死などに伴い、細胞周期関連タンパク質の変動が見いだされている。このことは、細胞分裂し得ない神経細胞においても細胞周期の抑制機構は重要な役割を果たしており、その破綻は細胞死や腫瘍化を通じて神経系の重篤な疾患を引き起こす可能性を示している。

一方、我々は、骨形成因子とレチノイン酸による神経分化に伴って神経系特異的に誘導される新規細胞周期抑制タンパク質ファミリー、BRINP (BMP/Retinoic acid-Inducible Neural specific Protein)を発見した (Mol. Brain Res. (2004)). BRINP ファミリーは、種間で保存性が極めて高いが既知のタンパク質と類似のモチーフを全く持たない全く新規のタンパク質ファミリーである (図 1). 各 BRINP 遺伝子は、中枢および末梢神経系の広範な領域において発達期より神経細胞特異的に発現する。中でも BRINP1 の発現は、成体の海馬において神経活動依存的に誘導される。また強制発現実験より、増殖性の細胞に対して顕著な細胞周期抑制能を有することを明らかにした。また、BRINP1 の発現制御領域には、神経系特異的遺伝子の非神経組織における発現を抑制するサイレンサー結合領域 (NRSE/RE-1) が見つかっており、髄芽腫のような脳腫瘍では、NRSE に結合する転写因子 (NRSF/REST) の発現異常 (発現昂進) と BRINP の発現消失が合わせて見つかった。さらに各 BRINP は、種々

のシグナル伝達タンパク質や神経疾患関連タンパク質と特異的に相互作用することを見いだしている。

これらの知見より BRINP ファミリーは、(1) 神経幹細胞からの分化に伴って誘導されて神経細胞の細胞周期抑制に作用する。(2) 成体においても神経活動昂進あるいは神経新生に伴う細胞保護や細胞周期制御に関与する。(3) さらに成体における BRINP の発現は神経回路の可塑性に関与する。(4) また、BRINP 自身、あるいは BRINP の発現を制御する転写因子の発現異常は、細胞の腫瘍化もしくは細胞死を通じて重篤な神経疾患をもたらすことなどが推定される。

## 2. 研究の目的

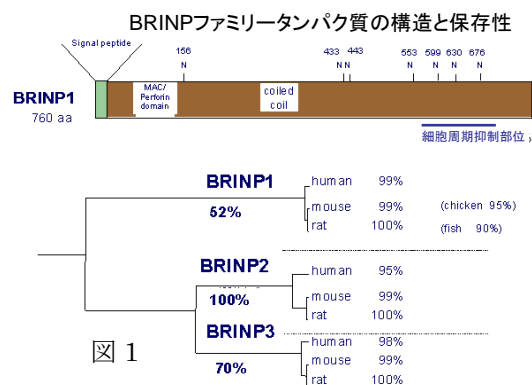


図 1

このように BRINP ファミリーは脳神経系の形成と維持において重要な生理的役割を担うとともに、BRINP の発現異常は重要な神経疾患に関わる可能性が示された。そこで、本研究では、ES 細胞由来の神経幹細胞 (Neural Stem Cell, NSC) を用いて BRINP の発現パターンと作用を解析するとともに、BRINP1 ノックアウト (KO) マウスの解析を行うことにより、BRINP ファミリー遺伝子の脳神経系における生理的役割を解明して神経疾患との関わりを明らかにしようと試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) ES 細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) の

作成と解析： 通常のフィーダー細胞上で維持されたマウス ES 細胞 (TT2 クローン) を bFGF, EGF を加えたアストロサイト (新生マウスの脳由来) の条件培地を用いて浮遊培養 (4 日間) を行い、神経幹細胞へとプライミングされた細胞塊 (Neural Stem Sphere) を得た。続いて bFGF, EGF を加えた Neurobasal-B27 培地を用いてマトリゲル上で付着培養を行い 7 日間後、細胞塊より遊走してきた神経幹細胞 (ES-NSC) を集めた。

この ES-NSC を種々の条件で培養・分化させた後、RT-PCR 法を用いて各 BRINP-mRNA レベルを定量した。

また、リポフェクション法を用いて BRINP-EGFP 発現プラスミドを ES-NSC に導入した (24 時間)。この細胞集団を用いて BRINP-EGFP を発現する ES-NSC と発現しない ES-NSC における細胞周期の分布をフローサイトメーターを用いて測定した。

(2) BRINP1-KO ノックアウトマウスの作成と解析： ①ノックアウトマウスの作製 BRINP1 遺伝子のコーディング領域の 50%以上を占めるエクソン 8 をネオマイシン耐性遺伝子で置換したものをターゲティングベクターとしてエレクトロポレーション法により ES 細胞 (TT2 株) に導入した。多数のネオマイシン耐性 ES 細胞株を PCR 法により一次スクリーニングした後、サザンブロット解析により予想された相同組み換えを確認した。組み換え ES 細胞株をマウス 8 細胞期胚と凝集させることによりキメラマウスを得た。キメラマウスと野生型 C57/BL6J マウスとを交配した。組み換え ES 細胞の生殖系列への導入により得られた BRINP1 欠損ヘテロマウスと野生型 C57/BL6J マウスとの戻し交配を繰り返して遺伝子背景を純化した。ヘテロマウス同士を交配して得られた野生型、

ヘテロ、ホモノックアウトマウスの遺伝子型を PCR 法により確認して解析に用いた。

②組織化学的解析 神経変性の解析： 成体マウスにカイニン酸を初濃度 20 mg/Kg で腹腔内投与し、その後激しくけいれんを起こすまで追加投与を行った。投与 48 時間後に麻酔下 PFA で灌流固定し、摘出後凍結した脳から凍結切片を得た。神経細胞の変性は Fluoro-Jade C を用いた染色により確認した。

未成熟海馬神経細胞の解析： 成体マウスから作製した凍結切片を、免疫染色により解析した。分裂細胞のマーカーとして Ki-67、未成熟ニューロンのマーカーとして Doublecortin (DCX)を用いた。

③行動解析 同時期に出生した雄の野生型およびホモノックアウトマウスを用いて種々の行動実験を行った。観察者の主観に影響されないように、マウスの遺伝子型が観察者にわからないように実験を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ES 細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) における BRINP ファミリー遺伝子の発現： 本研究により得られた ES-NSC は、継代培養 (6 代以上) を繰り返しても神経幹細胞の性質を安定に維持していることが、マーカー遺伝子、ネスチンの発現を指標として確かめられた。この ES-NSC は、レチノイン酸と脳由来神経栄養因子 (BDNF) の存在下で神経細胞へ、またアストロサイトの条件培地のもとではアストロサイトへと、それぞれ安定に分化させることができた。定量的 RT-PCR 法を用いることにより、ES 細胞では全ての BRINP-mRNA がほとんど発現していないが、ES-NSC においては一定レベルの BRINP2 と BRINP3 の mRNA が発現していることが確かめられた (図 2)。また、ES-NSC を神経細胞へと分化させると、全ての BRINP-mRNA が

著しく誘導されることが明らかになった。一方、ES-NSC をアストロサイトへ分化させると、BRINP2-, BRINP3-mRNA は全く誘導されなかった（あるいは抑制された）が、BRINP1-mRNA は若干誘導されていることが明らかになった。

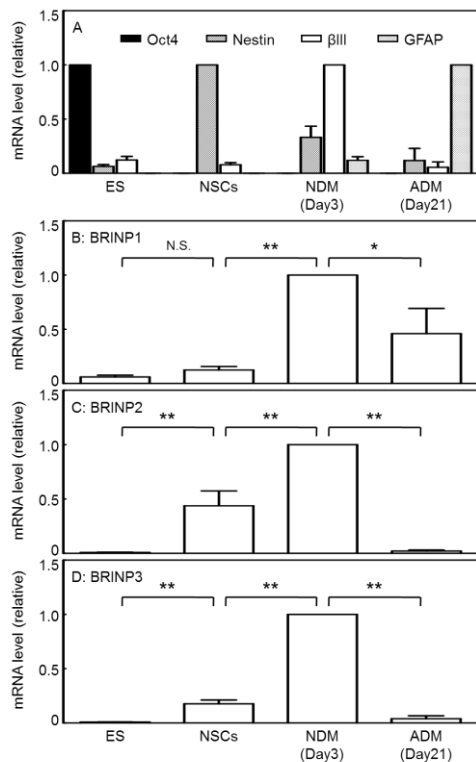


図2. NSCの分化に伴うBRINP-mRNAの発現変化

(2) ES 細胞由来神経幹細胞 (ES-NSC) の細胞周期に対する BRINP の作用: 次に、リポフェクション法を用いて ES-NSC に BRINP-EGFP 発現プラスミドベクターを導入して、対数増殖期における細胞周期の分布を解析した (図3). その結果、対照細胞では約7%のG2期がいずれのBRINP導入細胞でも完全に消失していた。また対照細胞では約25%のS期がいずれのBRINPの導入によっても12-14%に顕著に減少した。このことは、各BRINPがES-NSCの細胞周期の移行をG1→Sにおいて抑制していることを強く示唆している。

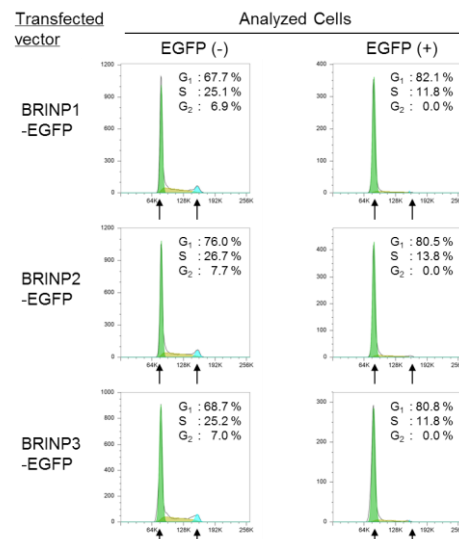


図3. NSCの分化に対するBRINPの細胞周期抑制作用

(3) BRINP1 ノックアウトマウスにおける活動依存的神経変性と神経新生の異常: BRINP1 遺伝子 Exon8 ヘテロ欠損マウスの交配により得られたホモ欠損マウスは、見かけ上正常に発達して、生殖能力を有していた。カイニン酸の投与による脳内神経活動全体の昂進によって、3種あるBRINPファミリー遺伝子の中でBRINP1の発現が海馬歯状回において強く誘導されることは既に報告した通りである。そこでBRINP1 ノックアウトマウス (ホモ) および野生型マウスにカイニン酸投与を行い、海馬組織を観察した。その結果、カイニン酸を投与したBRINP1 ノックアウトマウスの海馬 CA3 領域において顕著な神経細胞の変性が観察された。一方、カイニン酸を投与されていないノックアウトマウスや、野生型マウスでは、カイニン酸の投与によらずこのような神経細胞の変性は観察されなかった (図4)。

さらに、BRINP1 ノックアウトマウスの海馬歯状回では、細胞分裂を示す細胞 (Ki-67 陽性) が多く観察されるとともに、DCX 陽性を示す幼若な神経細胞が顕著に増加していた (図4)。これらの結果は、神経活動の昂

進によって歯状回の顆粒神経細胞に誘導される BRINP1 は、苔状繊維を通じて CA3 領域の神経細胞を興奮毒性による変性から保護していることが強く示唆される。さらに、BRINP1 遺伝子の欠損は、歯状回に存在する神経幹細胞の細胞周期抑制を解除するとともに神経分化（神経新生）を促進するが、その後の成熟過程や神経回路形成に異常をきたすことを強く示唆している。

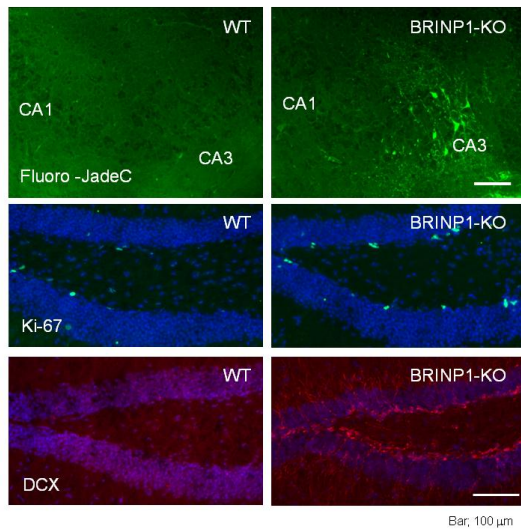


図4. 組織化学的解析と海馬の模式図

(4) BRINP1 ノックアウトマウスが示す行動異常について： このホモ欠損マウスの行動上の特徴を解析した結果、極めて興味深い特徴が見いだされた (図 5)。第 1 に極めて多動性であることが挙げられる (図 5. 明暗箱試験)。また、感覚能力や運動能力は正常であるにも関わらず、他の個体に対する興味や社会的行動が欠落していた (図 5. 新奇環境)。さらにこのマウスは忍耐力に欠けており、あきらめが早い傾向が見られた (図 5. 懸垂試験)。これら BRINP1 ノックアウトマウスの行動的特徴は、ヒトにおける ADHD (注意欠陥性多動障害) や統合失調症等の精神疾患に類似するといえる。

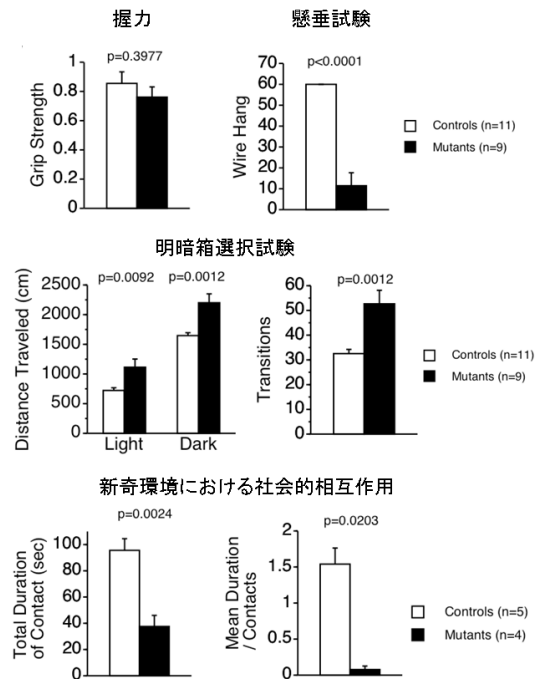


図5. BRINP1ノックアウトマウスの行動解析実験

(5) まとめ： 成体において神経活動依存的に海馬に誘導される BRINP1 遺伝子は、神経幹細胞の細胞周期を抑制するとともに神経細胞への分化（神経新生）を制御している可能性が高いことが示唆された。また幼弱な神経細胞の成熟に対する作用や興奮毒性に対する細胞保護作用も明らかになった。BRINP1 の欠損によって海馬歯状回を中心に引き起こされるこれら組織異常や行動異常は、宮川らが精神疾患における中間表現型（エンドフェノタイプ）として提唱する「未成熟歯状回」とも共通する部分が多い。今後、BRINP1 ファミリーの生理機能をタンパク質レベルで明らかにすることにより、神経新生から神経回路形成を経て個体の行動形成を導く新しい分子概念を築くとともに、精神疾患の治療法に対しても基礎神経科学の側から新たなアプローチを取ることが可能になると期待される。

## 5. 主な発表論文

(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 1 件)

Terashima, M., Kobayashi, M., Motomiya, M., Inoue, N., Yoshida, T., Okano, H., Iwasaki, N., Minami, A. and Matsuoka, I. Analysis of the expression and function of BRINP family genes during neuronal differentiation in mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells. *J. Neurosci. Res.*, 査読あり 88, 1387-1393 (2010)

〔学会発表〕(計 14 件)

① 小林三和子(代表)、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 4 名 BRINP1 欠損による海馬神経新生の異常と精神疾患の関わり、日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡

② 松岡一郎(代表)、宮川剛、幸田敏明、小林三和子 他 1 名 Roles of activity-induced BRINP1 gene in alteration of mouse behavior、第 40 回米国神経科学学会年会、2010 年 11 月 14 日、サンディエゴ (アメリカ)

③ 小林三和子(代表)、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 2 名 神経活動依存的に誘導される BRINP1 のマウス行動における役割、第 53 回日本神経化学大会、2010 年 9 月 4 日、神戸

④ 小林三和子(代表)、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 3 名 神経活動依存的に誘導される BRINP1 のマウス行動における役割、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山

⑤ 小林三和子(代表)、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 3 名 Roles of activity-induced BRINP1 in behavioral alteration in mouse、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜

⑥ 松岡一郎(代表)、小林三和子 他 1 名 Roles of BRINP and BRINP-Interacting Proteins in Neuronal Differentiation、日米セミナー・第 2 回 CDK5 国際シンポジウム、2009 年 6 月 27 日、東京

⑦ 小林三和子(代表)、幸田敏明、宮川剛、松岡一郎 他 6 名 Roles of BRINP family proteins in differentiation, cell cycle regulation and plasticity of the CNS、CREST Neuroscience International symposium、2009 年 6 月 3 日、淡路島

⑧ 小林三和子(代表)、幸田敏明、松岡一郎 他 2 名 神経特異的ファミリータンパク質、BRINP の脳の発達および疾患における役割、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 30 日、京都

⑨ 小林三和子(代表)、幸田敏明、松岡一郎 他 2 名 神経特異的タンパク質 BRINP1 の神経活動依存的な神経細胞保護作用、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 10 日、神戸

⑩ 本宮真(代表)、小林三和子、松岡一郎 他 3 名、神経興奮モデルにおける BRINP ファミリー遺伝子の役割、第 23 回日本整形外科基礎学術集会、2008 年 10 月 23 日、京都

⑪ 寺島理代(代表)、小林三和子、松岡一郎 他 4 名、ES 細胞由来神経幹細胞の分化過程における神経特異的遺伝子 BRINP ファミリーの発現誘導と機能の解析、第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 12 日、富山

⑫ 松岡一郎(代表)、小林三和子 他 2 名 神経特異的 BRINP ファミリーのタンパク質相互作用の解析、第 51 回日本神経化学学会大会、2008 年 9 月 11 日、富山

⑬ 松岡一郎 Physiological roles of BRINP family genes in cell cycle regulation and plasticity of the central nervous system、Symposium on Synaptic Development and Plasticity、2008 年 8 月 12 日、ヘルシンキ (フィンランド)

⑭ 小林三和子 Insights into the analysis of BRINP gene deleted mice、Symposium on Synaptic Development and Plasticity、2008 年 8 月 12 日、ヘルシンキ (フィンランド)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松岡 一郎 (MATSUOKA ICHIRO)  
松山大学・薬学部・教授  
研究者番号： 40157269

### (2)研究分担者

幸田 敏明 (KODA TOSHIAKI)  
北海道大学・先端生命科学研究院・教授  
研究者番号： 20170186

小林 三和子 (KOBAYASHI MIWAKO)  
松山大学・薬学部・助教  
研究者番号： 30396329

### (3)連携研究者

宮川 剛 (MIYAKAWA TSUYOSHI)  
藤田保健衛生大・総合医科学研・教授  
研究者番号： 10301780

### (4)研究協力者

高雄 啓三 (TAKAO KEIZO)  
生理研・行動代謝分子解析セ・特任准教授  
研究者番号： 80420397