

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07748

研究課題名(和文) 神経細胞の興奮・抑制を調節するBRINPタンパク質の機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of BRINP protein that regulates neuronal excitation and inhibition

研究代表者

小林 三和子 (Kobayashi, Miwako)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：30396329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経特異的ファミリー遺伝子BRINPは、欠損によりヒト精神疾患様の行動異常を示す。BRINP遺伝子は、成体マウス脳の興奮性およびほとんどの抑制性の神経細胞に発現していた。BRINP1またはBRINP3欠損マウスの脳では、神経伝達物質受容体やシナプス関連タンパク質、軸索伸長に関わるmRNAやタンパク質の発現が変化しており、これらが欠損マウスの示す行動異常をもたらす可能性が考えられた。またBRINPと相互作用するRab3、Rab11は活性型・非活性型で異なるBRINPと強く結合す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

脳の機能性障害である精神疾患は、変性疾患を含む器質性精神障害とは異なり、治療法がある程度確立されているものの、発症の原因についてはよくわかっていない。神経特異的に発現するBRINPファミリー遺伝子を欠損させたマウスはヒト精神疾患の症状と似た行動異常を示し、神経細胞および神経細胞がつくる神経回路の正常な機能に必要な遺伝子やタンパク質の発現が変化していた。今回得られた知見をもとにBRINPタンパク質の分子機能を明らかにすることにより、精神疾患の発症メカニズムの解明、新たな治療法の開発につなげることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neural-specific family gene, BRINP, exhibits abnormal behaviors analogous to symptoms of human psychiatric disorders due to its deficiency. The BRINP genes were expressed in both excitatory and most inhibitory neurons in the adult mouse cortex. In the brain of BRINP1 or BRINP3-deficient mice, mRNA and protein expressions of neurotransmitter receptors, synapse-associated proteins, protein-associated axonal outgrowth were altered, which may lead to the behavioral abnormalities exhibited by deficient mice. We also found that all BRINPs interact with Rab3 and Rab11, its binding preference differ by combination of BRINP member and G protein activation state of Rab.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：BRINP 精神疾患 欠損マウス 大脳皮質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

BRINP (BMP/Retinoic Acid-Inducible Neural Specific Protein)は、当グループが同定した神経特異的に発現するタンパク質ファミリーである。BRINP1 欠損マウスは、多動性、不安様行動の減少、社会性の低下といったヒト精神疾患の症状と類似した行動異常を示す。これら行動異常の発現は BRINP1 欠損マウスの脳内で、海馬歯状回の成体神経新生が亢進することによる海馬を含む神経回路網の形成・維持における異常、前頭前野で GABA 作動性のパルプアルブミンニューロンおよびソマトスタチンニューロン数が減少することによる前頭前野錐体ニューロンの興奮抑制の減弱などに起因すると考えられた。本研究では、BRINP タンパク質の分子機能を明らかにするために、細胞内の小胞輸送に着目した解析を行い、神経特異的遺伝子の異常がもたらす精神疾患発症の新たなメカニズムの解明を目標とした。

### 2. 研究の目的

本研究は、BRINP タンパク質の神経細胞における分子機能を明らかにすることを目的とした。BRINP は神経細胞の一生を通じて多様な作用を持つが、一見類似性・関連性のない個々の作用にどのように BRINP が関わるのか知見を集積し、BRINP の分子機能を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) in situ ハイブリダイゼーション (ISH) を用いた BRINP-mRNA とニューロンマーカーの mRNA の共発現の解析

これまでに、BRINP 遺伝子に対するアンチセンスプローブを用いた ISH により、マウス成体脳における BRINP-mRNA は各 BRINP で異なる発現パターンを示すこと(文献1)、マウスへのカイニン酸腹腔内投与におけるてんかん発作誘導により海馬の歯状回における BRINP1-mRNA の発現が顕著に増加することを明らかにしてきた(文献2)。また、マウス前頭前皮質において GABA 合成酵素である GAD67 の mRNA を発現する細胞は BRINP1-mRNA を共発現していた(文献3)。これら BRINP-mRNA を発現するニューロンの特徴を明らかにする目的で、興奮性ニューロンのマーカーである小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT1)、大脳皮質の抑制性ニューロンの代表的な3種類のサブタイプのマーカーであるパルプアルブミン (PV)、ソマトスタチン (SST)、セロトニン 3a 受容体 (5HT3aR) およびカルレチニン (CR) に対するアンチセンスプローブを作製し、BRINP-mRNA との共発現を解析した。成体マウス脳の切片に DIG またはフルオレセイン標識したアンチセンスプローブをハイブリダイズさせ、蛍光標識二次抗体と TSA PLUS system を使用して各 mRNA の局在を緑色または赤色の蛍光シグナルとして検出した。

(2) BRINP-KO マウス脳における遺伝子プロファイルの解析

成体 BRINP1-KO マウスおよび BRINP3-KO マウスの海馬・大脳皮質(海馬の上部付近)・前頭前皮質より total-RNA を抽出し、GeneChip を用いて野生型マウスと比較して mRNA の発現が変化した遺伝子を探索した。

(3) BRINP-KO マウス脳におけるタンパク質プロファイルの解析

成体の BRINP1-KO および BRINP3-KO マウスの前頭前皮質を含む大脳皮質よりタンパク質を抽出し、LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析を行い野生型マウスとタンパク質プロファイルを比較した。

(4) BRINP と相互作用するタンパク質の結合様式の解析

HA タグを付加した BRINP1,2,3, FLAG タグを付加した低分子量タンパク質 Rab3a, 3b, 11b, Myc タグを付加した APP ファミリータンパク質である APP, APLP1, APLP2 を NIH-3T3 細胞に共発現させ、タグに対する抗体を用いた IP-WB により BRINP との結合様式を解析した。共発現はいずれかの BRINP といずれかの Rab または APP ファミリータンパク質の2者、BRINP, Rab および APP の3者の組み合わせで行った。

### 4. 研究成果

(1) in situ ハイブリダイゼーション (ISH) を用いた BRINP-mRNA とニューロンマーカーの mRNA の共発現の解析

興奮性ニューロンのマーカー

海馬歯状回の顆粒細胞, CA1 と CA3 領域の錐体ニューロンの細胞体および大脳皮質の第 II ~ IV 層の錐体細胞において, 各 BRINP-mRNA を発現するほとんどの細胞で VGLUT1-mRNA との共発現が観察された(図 1)。小脳において各 BRINP-mRNA はプルキンエ細胞, VGLUT1-mRNA は顆粒細胞に発現がみられたが共発現は確認できなかった。

#### 抑制性ニューロンのマーカー

BRINP1-KO マウスの前頭前皮質において, GABA ニューロンのうち PV, SST を発現するニューロン数が野生型と比較して減少しており(文献 3), これらが BRINP1-KO マウスが示すヒト精神疾患様の行動異常(文献 4)に関連していることが考えられた。GABA ニューロンサブタイプのマーカー 4 種類について, アンチセンスプロンプを作製し, BRINP1-mRNA との共発現を ISH で解析した。成体マウス前頭前野のうち社会的行動に参与する prelimbic cortex (PrL) および medial orbital cortex (MO) 領域において, PV-mRNA, SST-mRNA, 5HT3aR-mRNA(図 2), CR-mRNA を発現している細胞は全て BRINP1-mRNA を発現していた。前頭前皮質の GABA 作動性ニューロンのほとんどが BRINP1-mRNA を発現していると考えられた。

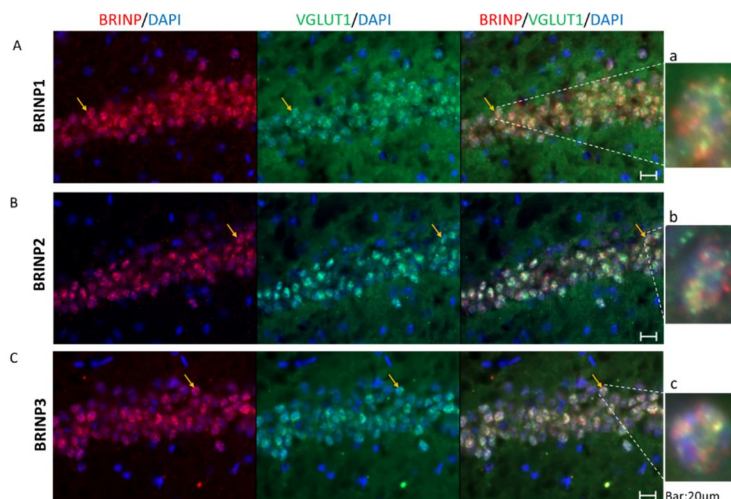


図 1. 海馬 CA1 における BRINP と VGLUT1 の 2 重 ISH  
A) BRINP1 と VGLUT1、B) BRINP2 と VGLUT1、C) BRINP3 と VGLUT1  
a) b) c) は矢印で示した細胞を拡大した図

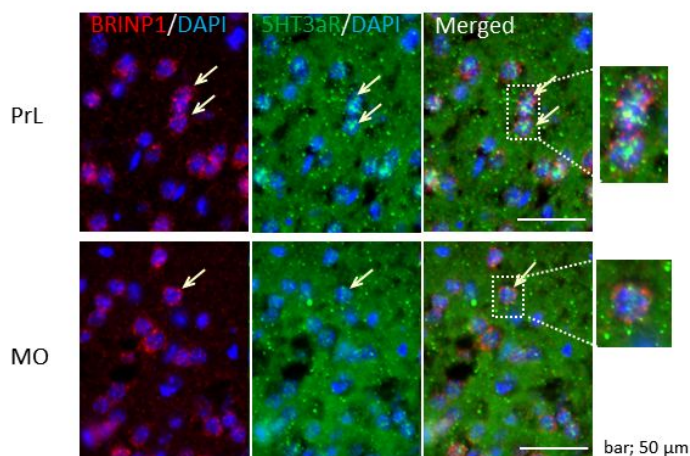


図 2 PrL、MO 領域における BRINP1 と 5HT3aR の 2 重 ISH  
BRINP1 (赤) 5HT3aR (緑) DAPI (青) を示す。矢印で示す細胞(ニューロン)において BRINP1-mRNA と 5HT3aR-mRNA の共局在が観察された。

#### (2) BRINP-KO マウス脳における遺伝子プロファイルの解析

成体 BRINP1-KO マウスおよび BRINP3-KO マウスの海馬・大脳皮質・前頭前皮質より total-RNA を抽出し, GeneChip を用いて野生型マウスと比較して発現の変化した遺伝子を探査した。

- ・BRINP1-KO 前頭前皮質 PV 陽性および SST 陽性の抑制性ニューロン数が減少している  
BRINP1-KO マウスの前頭前皮質においては, ドミナントネガティブとして働く NMDA 受容体サブユニットの 3a, Gly 受容体 2 サブユニットの発現低下が見られ, 神経回路の中で興奮性および抑制性の調節が変化していることが考えられた。ニューロピリン 1 の発現が減少していた。

- ・BRINP1-KO 大脳皮質 シナプス関連タンパク質である synaptopodin や CaMK1 の発現の増加がみられた。軸索ガイダンスに関わるネトリン G1 の発現が減少していた。

- ・BRINP1-KO 海馬 ニューロテンシンの発現低下と記憶や記憶の再生に関わる IGF2 の発現増加が見られた。

覚醒や不安に関わるニューロペプチド S の受容体 1 の大脳皮質における発現は BRINP1-KO マウスでは減少していたのに対し, BRINP3-KO マウスでは増加していた。

BRINP3-KO マウスにおいては, BRINP1-KO マウスと比べて神経系に関わる遺伝子の発現変化は少なかった。

- ・BRINP3-KO 前頭前皮質 ドパミン D2 受容体の発現が減少していた。

- ・BRINP3-KO 大脳皮質 セロトニン受容体 2c の発現が増加していた。また, 自閉症スペクトラムとの関与が示唆されているグルタミン酸受容体遺伝子のノンコーディングエクソン由来のマイクロ RNA である Mir592 が, BRINP3-KO マウスの大脳皮質で発現増加していた。

- ・BRINP3-KO 海馬 細胞周期の G1 から S 期への移行を阻害する Rb1 の発現が減少しており, BRINP1 の欠損が歯状回顆粒細胞下層で起こる神経新生を亢進させたことから BRINP3 に

同様の作用があることが考えられた。また、ミトコンドリアで PRKN のリン酸化を行う PINK1 タンパク質をコードする Pink1 遺伝子の発現が BRINP3-KO マウスの海馬で減少していた。PINK1 は PRKN と協働して質の低下したミトコンドリアの排除に関わり、Pink1 は若年性パーキンソン病の原因遺伝子の 1 つであるため、BRINP3-KO マウスの行動異常に Pink1 の発現減少による神経変性が起こっている可能性が考えられた。

これらの神経伝達物質やシナプス機能に関わる遺伝子の発現変化が、BRINP-KO の示す行動異常をもたらす可能性が考えられた。

### ( 3 ) BRINP-KO マウス脳におけるタンパク質プロファイルの解析

3065 種類たんぱく質のうち、遺伝子 KO により前頭前皮質を含む大脳皮質において発現が 2 倍以上または半分以下など大幅に変化するものはなかった。

・BRINP1-KO, BRINP3-KO の両方で同様の発現変化 BRINP1-KO および BRINP3-KO の両方で CaMKII の増加、ホスファターゼを阻害する Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1 の減少がみられ、Glu 受容体刺激に伴うシグナルやシナプスの伝達が亢進している可能性が考えられた。

・BRINP1-KO のみで発現変化 BRINP1-KO でのみ発現が増加しているタンパク質として、樹状突起に豊富に含まれる微小管関連タンパク質 MAP2、アクチン結合性タンパク質の非赤血球性スペクトリン、があった。また BRINP1-KO で軸索再生時や成長円錐に多く発現する GAP43 の発現増加が見られ、BRINP1-KO マウスの大脳皮質ニューロンにおいて軸索の成長・再生が亢進している可能性が考えられた。

・BRINP1-KO, BRINP3-KO で異なる発現変化 大脳皮質の GABA 作動性介在ニューロンに発現するカルシウム結合タンパク質であるカルレチニンは、BRINP1-KO マウスで増加していたが、BRINP3-KO マウスでは減少していた。これまでに BRINP1-KO マウスの前頭前野でバルブアルブミンおよびソマトスタチン陽性の GABA ニューロンの減少を明らかにしてきたが、カルレチニンニューロン数は BRINP1-KO マウスで増加、BRINP3-KO マウスでは減少している可能性が考えられた。

タンパク質発現の網羅的解析により、BRINP-KO マウス脳においてシナプス機能や軸索伸長に関わる遺伝子・タンパク質の発現が変化し、これらが欠損マウスのヒト精神疾患様行動異常の原因となっていることが考えられた。

### ( 4 ) BRINP と相互作用するタンパク質の結合様式の解析

BRINP タンパク質と相互作用するタンパク質の中で、神経細胞における小胞輸送に関するものとして Rab ファミリーの Rab3a, Rab3b, Rab11b と APP ファミリータンパク質 (APP, APLP1, APLP2) について BRINP との結合様式を解析した。各 BRINP といずれかの APP ファミリータンパク質 2 者の共発現において、いずれの BRINP も APP ファミリータンパク質と結合することが確認できた。各 BRINP といずれかの Rab タンパク質の 2 者の共発現においては、BRINP1 と Rab3, Rab11 は GDP 型で結合が強いが、BRINP2 と BRINP3 は GTP 型で結合が強いことが GMP-PNP を用いた解析により明らかとなった。BRINP ファミリー、APP ファミリー、Rab の 3 者の共発現を行った結果、2 者の共発現と同様に BRINP と APP または Rab が結合していることが確認できたが、APP と Rab が直接結合する可能性は低いと考えられた。

### < 引用文献 >

1. Identification and Characterization of Novel Developmentally Regulated Neural-Specific Proteins, BRINP (BMP/RA-Inducible Neural-Specific Protein) Family. Kawano, H., Nakatani, T., Mori, T., Ueno, S., Fukaya, M., Abe, A., Kobayashi, M., Toda, F., Watanabe, M., Matsuoka, I. Mol. Brain Res. 125: 60-75 (2004)
2. Activity-dependent regulation of BRINP family genes. Motomiya, M., Kobayashi, M., Iwasaki, N., Minami, A., Matsuoka, I. Biochem. Biophys. Res. Commun. 352: 623-629 (2007)
3. Decreased Parvalbumin and Somatostatin neurons in medial prefrontal cortex in BRINP1-KO mice. Kobayashi, M., Hayashi, Y., Fujimoto, Y., Matsuoka, I. Neuroscience Letters, 683: 82-88 (2018)
4. Absence of BRINP1 in mice causes increase of hippocampal neurogenesis and behavioral alterations relevant to human psychiatric disorders. Kobayashi, M., Nakatani, T., Koda, T., Matsumoto, K., Ozaki, R., Mochida, N., Takao, K., Miyakawa, T., Matsuoka, I. Molecular Brain, 7: 12, 16 pages (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	松岡 一郎  (Matsuoka Ichiro)  (40157269)	松山大学・薬学部・客員教員    (36301)	

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