

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21240031

研究課題名（和文） LRR膜貫通型タンパク質ファミリー機能不全による神経疾患発症機序の解明

研究課題名（英文） Clarification of the pathogenesis of the neurological disorders caused by impaired neuronal leucine-rich-repeat-containing transmembrane proteins.

研究代表者

有賀 純 (ARUGA JUN)

独立行政法人理化学研究所・行動発達障害研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10232076

研究成果の概要（和文）：

自閉症、統合失調症などの神経疾患を対象として、比較ゲノムを利用した発生発達障害、精神神経疾患動物モデルの系統的開発を行った。機能が未知の脳に発現するロイシンリッチリピート（LRR）膜タンパク質を標的とした解析を行うことにより、神経疾患に関連のある行動異常を示す新たな遺伝子変異マウス 15 系統を樹立することができた。これらのマウスを形態学、神経化学、電気生理学、薬理学に用いられる手法を用いて解析した結果、自閉症、統合失調症、不安障害、感覚障害の発症機序について、重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

We developed animal models for neurological disorders including autism and schizophrenia by utilizing comparative genomics. Focusing brain-enriched Leucine-rich repeat containing transmembrane proteins with unknown functions, we successfully generated new 15 strains of mouse mutants exhibiting neurological abnormalities. We collected important facts that underlie the pathogenesis of autism, schizophrenia, anxiety disorders and sensory disturbance through morphological, neurochemical, electrophysiological and pharmacological analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2010 年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2011 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
総計	29,100,000	8,730,000	37,830,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：比較ゲノム解析 LRR 膜タンパク質 疾患モデル動物 神経発達障害 精神神経疾患 シナプス形成 抑制性シナプス

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、これまでにさまざまな神経疾患関連遺伝子を発見し、その遺伝子機能をモデル動物を利用して明らかにすることにより、明らかにしてきた (ZIC1-Dandy Walker 奇形原因遺伝子、ZIC2-全前脳症原因遺伝子、ZIC3-内臓左右不定位原因遺伝子、SLITRK1-Tourette 症候群原因遺伝子など)。これらの研究で培った比較ゲノム解析技術を用いて遺伝子配列データベースのコンピューター解析を行うことにより、Leucine-rich repeat (LRR) を持った膜貫通タンパク質スーパーファミリーが高次脳機能に重要な働きを持っているのではないかとこの作業仮説を得た。2001 年から脊椎動物の神経組織に発現する LRR 膜タンパク質の系統的な機能解析を進め、これまでに、Slitrk ファミリー、Lrfr ファミリーを誌上発表した。

この研究の過程でこれらの遺伝子の一部を欠損するうち変異マウスを作製し、形態、行動からの解析を行ったところ、多くのものに行動異常が認められ、神経化学的異常 (脳の特定領域のモノアミン含量変化)、組織学的異常 (大脳皮質の組織構築異常) を伴うものも見いだされた。この結果は標的とした遺伝子が確かに高次脳機能に重要であるということを示唆している。そこで、この作業仮説に基づいて、新たに LRR 膜タンパク質を標的とした遺伝子変異マウス群を作成して、系統的な行動解析を行うことを計画した。これらのマウスに行動異常が表れた場合には、それをヒトの神経発達障害、精神神経疾患の症状と対応づけることが効率的な神経疾患モデル動物の作製につながるのではないかと考えられた。

国外では、米国、欧州ともに、変異マウスの系統的な神経学的異常 (行動異常) を持つ変異マウスの探索が進行しており、共通のプロトコルを利用するコンソーシアムも登場している。国内ではいくつかの理研脳センター、国立精神神経センター、大学などの研究機関で活発に変異マウスの行動解析が進められており、これらの動きと協調的に研究計画を遂行することが、効率性の点から重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は自閉症や統合失調症などの神経疾患の発症機序を新たな動物モデルを作製し、解析することにより明らかにすることである。神経組織に発現する LRR 膜タンパク質を対象として、遺伝子変異マウス動物群を作製して、その行動特性の解析を専用実験装置を用いて系統的に行う。これらの解析の結果、神経疾患のモデルとなると考えられた動物に対して、詳細な分子レベルでの解析

を行うことにより、行動異常の分子的基盤を明らかにする。更に、解析の結果得られた仮説の妥当性を検討するために、疾患モデル動物に向中枢薬を投与して、その異常行動への影響を評価する。最終的に絞り込まれた疾患候補遺伝子については、患者由来遺伝子材料の解析を共同研究者に依頼して、実際にヒトの神経疾患発症に関係するかどうかを遺伝学・統計学的手法を用いて検討する。

本研究の特色は独自の基準で選抜した遺伝子群について、遺伝子変異動物を集中的に作製することにより、効率的に高次脳機能に異常のある動物を作製し、解析を行う点にある。多くの場合、構造的に近縁の分子は機能的にも何らかの関連を持つ。このことは変異マウス解析に対して用いられるひとつの解析手法がほかの変異マウスの解析にも有効となる場合が多いことを示唆している。また、遺伝子ファミリーは、進化の過程のある時点で祖先の遺伝子の重複によって、形成されてきたものが多く、機能的には冗長である場合、相補的である場合が多く観察される。このような関係性を明らかにするためには複合変異マウスの作製が、不可欠であり、この点にも、構造的な関連性を持った特定の遺伝子ファミリーを標的としたモデル動物の作製、解析のメリットがある。

本研究の作製により、作製され、解析された変異マウスは、すべて、解析終了後に理研バイオリソースセンターに委託され、国内の研究者に広く利用されるようにする予定である。研究基盤の提供という観点から考えた場合、高次脳機能に重要な遺伝子の変異マウスを公的研究機関でまとまった数を維持しておくことは、特にマウスゲノム解析で先導的な役割をつとめてきた日本の生物学研究の流れと相まって、日本の基礎科学の競争力の向上に大きく貢献するはずである。

3. 研究の方法

本研究では相同組換えを利用した遺伝子変異マウスの作製・多角的解析が研究計画の中核となる。専用実験装置を用いた系統的行動解析、分子プローブを用いた組織学的解析、電気生理学的解析を基本として、標的遺伝子産物の分子細胞生物学的解析、脳内モノアミン分析等が行われた。実験の進展状況に応じて、向精神薬投与の影響評価、マウスの遺伝学的手法を用いた部位・時期特異的遺伝子変異の作製、複合変異の作製、他のモデル動物を併用した解析も行われた。

第一段階では、in silico 解析による標的遺伝子の設定が行われた。評価基準はコードされる仮想タンパク質のドメイン構造 (LRR ドメインと膜貫通ドメイン、そのほかの機能ドメインの存在)、系統発生的に新しいか、

発現データベースから予想される遺伝子発現傾向、ほかのグループによりすでに解析がなされているかである。

第二段階では標的候補遺伝子に関する予備調査が行われた。発現傾向については、多くの場合、データベースにある情報だけでは十分でないので補足的な *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。さらに、タンパク質コード領域をエピトープタグ付きほ乳類細胞用遺伝子発現に挿入して、予備的に仮想タンパク質の細胞内局在、PC12 における突起伸展への影響を検討した。

第三段階では標的遺伝子の変異マウスの作製が行われた。作製されたマウスは C57BL/6 以外の胚性幹細胞で作製されたものについては、最低 5 世代以上 C57BL/6 系統に戻し交配された。始めに出生率、生後発達の体重増加率の測定、通常の組織切片作製後の形態学的解析が行われた。しかし、解析の対象とした変異マウスの多くは、一目でわかるような外見的、組織学的異常を示さなかった。

第四段階では変異マウスの多角的解析を行った。系統的行動解析では理研ゲノムセンターで用いられている modified SHIRPA 法といくつかの基本的な行動実験装置（ホームケージ内活動性、オープンフィールド、明暗箱、高架式十字迷路、音刺激驚愕反応とプレパルス阻害、恐怖条件づけ刺激、回転棒、Morris 水迷路、強制水泳など）が行われた。これらの解析には理研脳センターリサーチリソースセンターの山田一之氏とそのスタッフの協力を得た。これらの定型的な行動試験の後に、評価を行い、必要に応じて関連した検査（社会性、攻撃性、母性養育行動、超音波発声などの評価を含む）を行った。

第五段階ではタンパク質機能と観察された表現型の結びつけが行われた。特異抗体を用いて組織内分布の精査が行われた。変異マウス由来組織を利用して脳内における標的遺伝子産物の分子性状・分子機能の検討を行った。行動異常の分子基盤を明らかにするために、モノアミンを含む各種伝達物質の脳内含量の測定が行われた。

第六段階では実際に標的とした遺伝子でその変異により行動異常が引き起こされるものについて、患者由来ヒト遺伝子材料の中に変異が無いかを集中的に探索した。これらの解析に必要な遺伝子材料は理研脳センター分子精神科学研究チームの吉川武男チームリーダーらによって、集められているので、同チームとの共同研究として進められた。

4. 研究成果

Slitrk ファミリー、Lrfr ファミリー、Lrrtm ファミリーなどを含む 15 種類の遺伝子について、ノックアウトマウスが作製され、行動・形態・生理などの多角的な解析が進めら

れた。その結果、これらのマウスはすべてヒトの精神神経疾患と関連した行動異常を示すことが明らかになり、遺伝子産物の一部は神経突起伸展、シナプス形成、シナプス機能維持などの神経回路形成の過程で重要な役割をもつことが明らかになった。いくつかの系統については行動薬理的な解析を行い、グルタミン酸を介するシナプス伝達、セロトニンなどのモノアミン代謝の変化が行動異常と関係することを示す結果が得られた。

これらの発見を基にして国内の神経疾患患者の遺伝子材料の再シーケンス解析が行われ、新たに見いだされた 1 塩基置換変異のうち、タンパク質機能に影響の及ぶ可能性のあるものについては、詳細な解析が続けられている。一方、プロジェクトの進行と同時に外国のグループが患者 DNA を用いた大規模な遺伝子マッピング解析により、本研究の解析対象遺伝子のいくつかは、疾患の発症と関連する可能性を示した。これらには統合失調症、躁うつ病、自閉症、トゥレット症候群などが含まれている。マウスに現れた脳機能の異常から考えれば、今後も本研究の標的とした遺伝子が精神疾患の原因遺伝子と確認される可能性は高いと考えられる。以下の項目については既に誌上発表した。これ以外にも自閉症、多動症、てんかんなどの疾患モデルとなる新たな実験動物が開発され、現在、論文発表の準備が進められている。

(1) 内耳の神経回路形成に重要な役割を持つ膜タンパク質 Slitrk6 を発見 (Katayama et al. 2009)。

内耳は、耳の最内部にある器官で、蝸牛、前庭・三半規管などから構成され、聴覚・平衡感覚などにかかわる。これまでに内耳の神経回路形成では、ニューロトロフィン（神経栄養物質）と呼ばれる分泌性タンパク質を介した情報伝達系が重要な役割を果たすことが知られていた。ニューロトロフィンやその受容体を欠損したマウスは、内耳の神経細胞が正しく突起を伸ばすことができない、細胞死を起こしてしまう、などの異常を示し、正常な神経回路を形成できない。

我々は、主に脳神経系に存在し、神経突起の伸展を調節する機能を持つとされている細胞膜貫通型タンパク質 Slitrk ファミリーの 1 つ Slitrk6 を欠損するマウスを作製したところ、ニューロトロフィン欠損マウスに似た内耳の異常を観察した。Slitrk6 は、内耳の神経細胞がシナプスを作る標的である感覚上皮という組織に存在している。Slitrk6 欠損マウスから単離した感覚上皮細胞は、培養皿の中でも神経突起を引きつける働きが弱く、感覚上皮で産生されているニューロトロフィンの発現を調べたところ、Slitrk6 欠損マウスでは内耳のニューロトロフィン発

現量が低下していた。この培養皿に外部からニューロトロフィンを加えると、神経突起は正常マウスと同じ程度に伸びた。これらのことから、Slitrk6 は、内耳のニューロトロフィン量を調節することで、内耳の神経回路形成に関与していることが明らかとなった。

この発見は、感音性難聴の発症機構の理解や治療法の改善に役立つものと期待された。実際に Slitrk6 欠損マウスの聴力検査を行ったところ、感音難聴が認められた (Matsumoto et al., 2010)。また、前庭動眼反射を評価することにより、このマウスの前庭期間の回転の検知能力には水平方向・垂直方向の違いがあることを見いだした。これらの発見を基に、現在共同研究者と共に SLITRK6 のヒト遺伝性神経疾患発症への関与を検討している。

(2) 統合失調症関連遺伝子 Lrrtml 欠損マウスで見られた行動異常 (Takashima et al., 2011)。

LRRTM1 は、LRR 膜タンパク質の一種で、統合失調症の発症に関連することが、イギリスの研究グループから報告されている。我々は Lrrtml 欠損マウスを作製し、その行動や薬剤の効果を検討した。その結果、新規環境での適応行動開始の遅延、空間記憶の異常など認知機能の障害が認められた。一部の異常は選択的セロトニン取り込み阻害薬で解消されること、NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬に対する反応が野生型と異なることを見出した。一方、電子顕微鏡を用いた解析により、海馬の興奮性シナプスの形態に異常が生じていることを見出した。これらの所見は Lrrtml 欠損によって引き起こされたシナプスの機能異常が行動異常の原因となることを示唆していた。

(3) 抑制性シナプス形成に重要なタンパク質を発見 (Takahashi et al., 2012)。

近年の研究から興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスが正常な脳機能活動に重要で、いくつかの神経疾患ではこのバランスが乱れていると考えられている。我々は培養神経細胞を用いた実験により、LRR 膜タンパク質の一つ Slitrk3 が Ptprd と結合して、抑制性シナプス前部の構造を誘導することを見いだした。また生体内での Slitrk3 の役割を明らかにするために、Slitrk3 欠損マウスを作製し、そのシナプスの異常を調べたところ、海馬の錐体細胞で、抑制性シナプスが減少することを確認された。Slitrk3 欠損マウスは、時々てんかんの発作に似た異常行動を示し、振幅の大きい異常脳波が観察され、おそらく抑制性シナプスの機能が失われたために起きる神経細胞の過活動が原因であろうと考えられた。Slitrk3 を含む抑制性シナ

プスの形成・維持に関わる分子機構を解明できれば、てんかんや多動症など神経細胞の過活動と関連した神経疾患の病態の理解や改善に役立つと期待できる。

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 19 件)

1. Selective control of inhibitory synapse development by Slitrk3-PTPdelta trans-synaptic interaction. / H. Takahashi, K. Katayama, K. Sohya, H. Miyamoto, T. Prasad, Y. Matsumoto, M. Ota, H. Yasuda, T. Tsumoto, J. Aruga, A.M. Craig. - Nat. Neurosci. 2012. DOI: 10.1038/nn.3040.
2. Comparative anatomy of marmoset and mouse cortex from genomic expression. / H. Mashiko, A. Yoshida, S. Kikuchi, K. Niimi, E. Takahashi, J. Aruga, H. Okano, T. Shimogori. - J. Neurosci. 2012. 32:5039-5053
3. Xenopus Zic3 controls notochord and organizer development through suppression of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. / T. J. Fujimi, M. Hatayama, J. Aruga. - Dev. Biol. 2012. 361:220-231. [IF 4.094]
4. Impaired Cognitive Function and Altered Hippocampal Synapse Morphology in Mice Lacking Lrrtml, a Gene Associated with Schizophrenia. / N. Takashima, Y.S. Odaka, K. Sakoori, T. Akagi, T. Hashikawa, N. Morimura, K. Yamada, J. Aruga. - Plos One 2011. 6.
5. A role for Zic1 and Zic2 in Myf5 regulation and somite myogenesis. / H. Pan, M.K. Gustafsson, J. Aruga, J.J. Tiedken, J.C.J. Chen, C.P. Emerson, Jr. - Dev. Biol. 2011. 351:120-127.
6. Impaired Auditory-Vestibular Functions and Behavioral Abnormalities of Slitrk6-Deficient Mice. / Y. Matsumoto, K.-i. Katayama, T. Okamoto, K. Yamada, N. Takashima, S. Nagao, J. Aruga. - Plos One 2011. 6.
7. Zic2 hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and ZIC2 mutations identified in schizophrenia patients. / M. Hatayama, A. Ishiguro, Y. Iwayama, N. Takashima, K. Sakoori, T. Toyota, Y. Nozaki, Y.S. Odaka, K. Yamada, T. Yoshikawa, J. Aruga. - Scientific

Reports 2011. 1.

8. IP(3) signaling is required for cilia formation and left-right body axis determination in *Xenopus* embryos. / M. Hatayama, K. Mikoshiba, J. Aruga. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. 410:520-524.

9. *Slitrkl*-deficient mice display elevated anxiety-like behavior and noradrenergic abnormalities. / K. Katayama, K. Yamada, V.G. Ornthanalai, T. Inoue, M. Ota, N.P. Murphy, J. Aruga. - *Mol. Psychiatry* 2010. 15:177-184.

10. Excessive ingestion of long-chain polyunsaturated fatty acids during developmental stage causes strain- and sex-dependent eye abnormalities in mice. / M. Maekawa, Y. Iwayama, A. Watanabe, Y. Nozaki, T. Ohnishi, H. Ohba, M. Toyoshima, K. Hamazaki, N. Osumi, J. Aruga, T. Yoshikawa. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. 402:431-437.

11. Characterization of the tandem CWCH2 sequence motif: a hallmark of inter-zinc finger interactions. / M. Hatayama, J. Aruga. - *BMC Evol. Biol.* 2010. 10.

12. Expression of ZIC family genes in meningiomas and other brain tumors. / J. Aruga, Y. Nozaki, M. Hatayama, Y.S. Odaka, N. Yokota. - *BMC Cancer* 2010. 10.

13. Stability of folding structure of Zic zinc finger proteins. / K. Sakai-Kato, Y. Umezawa, K. Mikoshiba, J. Aruga, N. Utsunomiya-Tate. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. 384:362-365.

14. Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of *Slitrk6*-deficient mice. / K.-i. Katayama, A. Zine, M. Ota, Y. Matsumoto, T. Inoue, B. Fritsch, J. Aruga. - *Plos One* 2009. 4:A151-A162.

15. Role of BMP, FGF, Calcium Signaling, and Zic Proteins in Vertebrate Neuroectodermal Differentiation. / J. Aruga, K. Mikoshiba. *Neurochem. Res.* 2011. 36:1286-1292.

10.1007/s11064-011-0422-5

16. GLI protein nuclear localization signal. / M. Hatayama, J. Aruga.

Vitamins and Hormones 2012. 88: in press

17. 統合失調症モデルとしての Zic2 低発現マウスと統合失調症患者にみられる ZIC2 の

変異 / 有賀純 2011. *分子精神医学* 11: 47-49.

18. *Lrrtml* と統合失調症 / 佐郡和人、有賀純 2012. *分子精神医学* 12: 47-49.

19. LRR シナプスオーガナイザーと神経疾患 / 有賀純、松本圭史 2012. *実験医学* 30:364-369.

[学会発表] 計 (23) 件 うち招待講演 計 (0) 件

1. Kabayama-Ogawa M., Ornthanalai V., Yamada K., Murphy N. P., Katayama K., and Aruga J.: "A role of Rines, a neuronal membrane-bound ubiquitin ligase in higher brain function", 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), San Diego, USA, Nov. 13-17 (2010).

2. Corbett D. C., Katayama K., Matsumoto Y., Morimura, N., Yamada K., Ota M., Ornthanalai V., Honma C., Murphy N. P., and Aruga J.: "Characterisation of *Slitrk2*-deficient mice", 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), San Diego, USA, Nov. 13-17 (2010).

3. Matsumoto Y., Katayama K., Zine A., Ota M., Inoue T., Fritsch B., Yamada K., and Aruga J.: "Disorganized innervation and neuronal loss in the inner ear of *Slitrk6*-deficient mice", 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), San Diego, USA, Nov. 13-17 (2010).

4. Aruga J., Hatayama M., Takashima N., Sakoori K., Nozaki Y., Odaka Y., Yamada K., and Ishiguro A.: "Zic2 hypomorphic mutant mice exhibit cognitive impairment and social behavior abnormalities with an altered distribution of basal forebrain cholinergic neurons", 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2010), San Diego, USA, Nov. 13-17 (2010).

5. Moore-Barton H., Chioza B. A., Matsumoto Y., Cross H., E., Sakoori K., Odagawa M., Gurtz K., Patton M. A., Aruga J., and Crosby A. H.: "Molecular and pathological characterisation of an inherited condition amongst the Amish involving high myopia and sensorineural hearing loss", British Human Genetics Conference 2011, Coventry, UK, Sept. 5-7 (2011).

6. Tomioka-Hara N., Yamada K., Odagawa M., Odaka Y., and Aruga J.: "Characterization on

Elfn family in the central nervous system", 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011), Washington DC, USA, Nov. 12-16. (2011).

7. Aruga J., Takashima N., Odaka Y., Sakoori K., Akagi T., Hashikawa T., Morimura N., and Yamada K.: "Executive function deficits and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking Lrrtm1, a gene associated with schizophrenia", 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011), Washington DC, USA, Nov. 12-16 (2011).

8. Matsumoto Y., Takashima N., Nozaki Y., Nishioka C., Kudoh M., and Aruga J.: "Zic2 knock down mice show the higher response to auditory stimulus and size reduction of DCoN", 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience (Neuroscience 2011), Washington DC, USA, Nov. 12-16 (2011).

他

[その他]

機関および研究室ホームページでの研究成果紹介

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2012/120130/index.html>

http://lcn.brain.riken.jp/Slit3_inhibitorysynapse.html

http://lcn.brain.riken.jp/Takashima_Lrrtm1.html

http://lcn.brain.riken.jp/Hatayama_Zic2_SCZ_2011.html

http://lcn.brain.riken.jp/Matsumoto_Slit36_vestibular_function.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有賀 純 (ARUGA JUN)

独立行政法人理化学研究所・行動発達障害研究チーム・チームリーダー

研究者番号：10232076

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし