

## 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 6 月 20 日現在

機関番号：34518

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591899

研究課題名（和文）プロテアーゼ群による運動機能の制御機構

研究課題名（英文）REGULATORY MECHANISM OF FUNCTION IN PHYSICAL EXERCISE BY A GROUP OF PROTEASES

研究代表者

小林 俊博（KOBAYASHI TOSHIHIRO）

神戸国際大学・リハビリテーション学部・理学療法学科・准教授

研究者番号：40153621

研究成果の概要（和文）：脊髄前角に局在する運動ニューロンにおいて、セリンプロテアーゼであるネクシン-1 の過剰発現は、神経筋接合部における異常構造の起因となる。しかしながら、脊髄前角の運動ニューロンから分泌されるセリンプロテアーゼをコードする組織プラスミノゲンアクチベータ遺伝子あるいはモトプシン遺伝子の欠損は、運動機能に影響を与えない。このことから、これらのプロテアーゼは運動機能障害を互いに補正していることが示唆される。我々は神経筋接合部の発生過程におけるタンパク分解機能を解析する目的で、プラスミノゲンアクチベータ遺伝子およびモトプシン遺伝子を欠損する二重遺伝子欠損マウスを作成した。この二重遺伝子欠損マウスでは、対照として用いたヘテロ遺伝子マウスと同等の行動パターンを示し、また、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体も正常の局在を示した。したがって、神経筋接合部形成におけるタンパク分解機能を解明するためには、さらに詳細な解析が必要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The overexpression of serine protease inhibitor, protease nexin-1, in motor neurons in the anterior horn causes abnormal structure of neuromuscular junctions (NMJ). However, the deletion of either tissue plasminogen activator (tPA) or motopsin gene, which encodes a serine protease secreted by motor neurons in the anterior horn, shows no effect on motor function. This suggests that these proteases compensate dysfunction each other. We produced double knockout mice lacking both tPA and motopsin genes, to analyze the proteolytic function on the development of the neuromuscular junction. Double knockout mice appeared to move comparable to heterogenic mice and show normal morphology of acetylcholine receptors at the NMJ. Detailed analyses should be necessary to reveal proteolytic functions on the NMJ formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1100 千円	330 千円	1430 千円
2010 年度	1500 千円	450 千円	1950 千円
2011 年度	900 千円	270 千円	1170 千円
年度			
年度			
総計	3500 千円	1050 千円	4550 千円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：シナプス・セリンプロテアーゼ・プラスミノゲンアクチベータ・プロテアーゼ・モトプシン・脊髄運動ニューロン・軸索再生・運動機能・運動障害・遺伝子欠損マウス

### 1. 研究開始当初の背景

発生時の神経筋接合部の除去の過程でセリンプロテアーゼの一種である組織プラスミノゲンアクチベータ(tPA)が蓄積してくることやセリンプロテアーゼインヒビターである nexin の過剰発現マウスは筋萎縮や運動機能低下を示すことから、神経筋接合部の健全な発達維持にセリンプロテアーゼが重要な役割を果たしていると考えられている。我々は中枢神経系に発現するセリンプロテアーゼについて性状と機能について研究を行ってきた。例えば、中枢神経系で唯一の膜貫通型セリンプロテアーゼ spinesin が脊髄運動ニューロンのシナプスに局在することや motopsin が脳神経核および脊髄前角の運動ニューロンに高発現していることを明らかにしてきた。また、顔面神経を軸索損傷すると motopsin の発現は一過的に減弱するが、神経機能の回復と共に発現も回復することから、motopsin が運動機能の制御に重要であると考えた。しかしながら、我々が作製した motopsin 欠損マウスには運動障害は認められなかった。加えて、tPA 欠損マウスにも運動障害は認められないことから、神経筋接合部の形成・維持はいくつかのセリンプロテアーゼ群によって制御されていると考えられる。Spinesin に関する報告は我々のグループ以外からはなされておらず、motopsin 欠損マウスを独自に作製し、また、ニューロンの細胞膜上に存在する motopsin 相互作用蛋白質も見いだしているなど、ニューロンに発現するセリンプロテアーゼの機能解析は重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

中枢神経系におけるセリンプロテアーゼの機能解析に関する実績をもつ我々が、いくつかのプロテアーゼの相互作用を念頭に置きながら解析を行うことで神経筋接合部の形成・維持におけるセリンプロテアーゼ群の機能を統合的に理解するが可能になると考えて本研究を着想した。

運動機能における motopsin, spinesin, tPA の役割を明らかにするために種々の遺伝子操作マウスを用いて以下の事柄を計画した。

(1) 神経筋接合部の発達過程、および損傷神経の軸索再生過程における motopsin, spinesin, tPA の発現の時空間的解析を行う

(2) 多発性硬化症などの疾患モデルマウスでの motopsin, spinesin, tPA の発現の時空間的解析を行う

(3) 培養筋芽細胞の神経筋接合部の発達に及ぼす各プロテアーゼ発現細胞との共存培養の効果をみる

(4) Motopsin と tPA の二重欠損マウスにおける神経筋接合部の形態学的異常と運動機能の異常を明らかにする

(5) 理化学研究所の保有する変異マウスライブラリー [7] より spinesin 変異マウスを同定し、運動障害の有無の検討する

(6) Motopsin, spinesin, tPA の三重遺伝子変異マウスにおける神経筋接合部の形態学的異常と運動機能の異常を明らかにする

### 3. 研究の方法

(1) 正常での発現解析；正常マウスの生後 5 日から成体までのマウスより灌流固定後、腰髄およびヒラメ筋を摘出する。抗 motopsin 抗体、抗 tPA 抗体、抗 spinesin 抗体を用いた免疫染色法によって脊髄前角および神経筋接合部での各種プロテアーゼの局在変化を時空間的に解析する。得られた結果の定量性を高めるために抽出液を用いたウェスタンブロット解析を行う。抗原抗体反応が不調なものについては、in situ hybridization 法を行い、spinesin については独自の研究材料であるので、組換え蛋白質を抗原に再度抗 spinesin 抗体の作製を行う。

(2) 病態モデルでの発現解析；病態モデルとして作製が容易な多発性硬化症 (MS) モデルについて検討を行う。マウスに myelin oligodendrocyte glycoprotein ペプチド、Freund's complete adjuvant および

*Mycobacterium tuberculosis* H37RA の混合液を皮下に免疫する。2日後、百日咳毒素を腹腔内に投与し、経時的に歩様、足跡を元に運動能を測定する。また、マーカー遺伝子の発現を指標とした病態確認も行う。正常マウスの場合と同様に経時的に motopsin, tPA, spinesin の発現・局在動態を明らかにする。さらに、細胞質膜ホスファチジルセリン局在変化、ミトコンドリア膜電位変化および活性酸素産生能を指標として、本病態における細胞死についても検討を行う。本モデルで大きな変化が認められない場合、遺伝性筋萎縮性脊索硬化症 (ALS) モデルマウス (SOD1 G93A マウス) を購入し、検討を行う。

(3)Spinesin 遺伝子変異マウスの探索；先頃、理化学研究所より点突然変異マウスライブラリーがバイオリソースとして公表された。Spinesin 遺伝子のプロモーターおよびコード領域に対する PCR プライマーを理化学研究所に送付すれば、spinesin 遺伝子の変異マウスの同定を行ってくれる。これにより spinesin 遺伝子変異マウスを探索する。当該ライブラリーはおよそ 8000 匹のマウスゲノムの探索が可能であり、理論的には全ての遺伝子座に変異が導入されていることになるので、spinesin 変異マウスが同定される可能性は極めて高い。万が一、変異マウスが見つからなかった場合、遺伝子欠損マウスの作製に着手する。

(4)軸索損傷モデルにおける spinesin の発現動態の解析；以前に我々が行った顔面神経の軸索損傷はヒゲや眼輪筋の運動によって軸索再生を評価できる利点を持つ。この系における spinesin の発現動態を先と同様の方法によって検討し、神経機能の再生との関連を明らかにする。顔面神経において軸索再生との関連が認められない場合には、坐骨神経の損

傷実験を行う。

(5)Motopsin/tPA 二重欠損マウスの作製；tPA 欠損マウスを Jackson 社より購入し、我々が保有する motopsin 欠損マウスと交配させる。PCR 法にて両遺伝子の欠損を確認し、各遺伝子型の出生率、生存率、等を確認する。二重欠損マウスが胎児期、新生児期に死亡するようなならば、運動ニューロンの生存率、軸索投射、神経筋接合部などを重点的に解析し、死因を同定する。

(6)Motopsin/tPA 二重欠損マウスの表現系解析；二重欠損マウスを用いて、foot print test, open field test, rotarod test, beam walking test, hanging wire test, vertical pole test 等を行い、運動機能の異常を検出する。行動学試験のために rotarod を新たに購入する。また、 $\alpha$ -bungarotoxin を用いてヒラメ筋のアセチルコリン受容体の局在・密度等を測定し、神経筋接合部の形態学的異常を検討する。また、MS および ALS モデルを二重変異マウスにて作製し、プロテアーゼの役割を明らかにする。

(7)Spinesin 遺伝子変異マウスの表現系解析；spinesin 遺伝子変異マウスについて上と同様の行動学試験および形態学的検索を行い、運動機能の異常を明らかにする。

(8)筋芽細胞分化におよぼすプロテアーゼ群の影響；Motopsin, tPA, spinesin を2種類、あるいは3種類同時に発現できるベクターを作製する。マウス運動ニューロン細胞株 NSC-34 に遺伝子導入後、C2C12 筋芽細胞株と共培養する。C2C12 の分化を細胞形態、クレアチンキナーゼの発現量、アセチルコリン受容体の集積、情報伝達系の動態等により判定する。

(9) Motopsin/tPA/spinesin 三重遺伝子変異マウスの作製と解析； motopsin/tPA 二重欠損マウスに spinesin 変異マウスを交配して、運動機能の異常と運動疾患モデルの病態を解析し、単独欠損、二重欠損、と比較して各プロテアーゼの機能を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 脳内に存在する分泌型セリンプロテアーゼである motopsin/neurotrypsin について遺伝子欠損マウスを用いて脳高次機能との関連を研究した。今回、我々は motopsin 欠損マウスでは社会行動の異常が認められることがわかった。tPA 欠損マウスにおいては学習障害をはじめとする種々の行動異常が報告されているが、社会行動に関する報告はなく、また、セリンプロテアーゼインヒビターである nexin を運動ニューロンで過剰発現させたマウスでは運動障害が見られるのに対して、脊髄運動ニューロンに発現する tPA 欠損マウスではそのような障害が認められないことがわかった。motopsin も脊髄運動ニューロンにも発現しており、tPA の欠損をお互いに相補しあっていると考えられる。

(2) マウス脳の海馬領域における motopsin の局在について motopsin 抗体を用いて免疫電子顕微鏡下にて可視化した。可視化には二次抗体として金コロイド標識抗体により行った。その結果、motopsin は神経細胞内に局在する小胞状構造に局在する知見を得た。

(3) motopsin の脳組織内に存在する基質の種類を解析するために、神経細胞の破碎液を Triton 可溶性画分と Triton 不溶性画分に分画する操作を行った。また、液体クロマトグラフィーと質量分析器を用いて得た結果をデータベースをもとに motopsin の基質を同定する操作条件を検討中である。

(4) カテコールアミンは、脳機能および脳発達において重要な役割を持っており、また、振戦、筋強剛、寡動などの神経症状に関与している。カテコールアミンの脳内含量を motopsin 欠損マウスにおいて検討した。中枢神経系の海馬、帯状回、扁桃体の各部位におけるカテコールアミンを定量し、野生型のものと比較した。

(5) 単独のセリンプロテアーゼ欠損マウスでは運動障害を認められないために、tPA 欠損マウスと motopsin 欠損マウスを交配し、tPA と motopsin を欠損する二重欠損マウスの作製について検討した。また、tPA 欠損マウスの行動観察を行った。tPA 欠損マウスの同定には、プライマーとして t-PAWT S (5' ACCTGTGGCCTGAGGCAGTACAAACGGCCT3')、t-PAWT A (5' TCTGCCCAAG ACCACTTTAAGATGATT3')、および t-PAKOS (5' GTGCGAGGCCAGAGGCCAC TTGTGTAGCG3') を用い、PCR 法にて遺伝子解析を行った。

(6) 精神遅滞原因遺伝子 motopsin と Seizure related protein-6 が相互作用することにより神経突起の伸張が制御されることを検討した。motopsin が単独に存在する場合には、神経突起は正常に伸張するが、Seizure related protein-6 を発現させた培養神経細胞では、motopsin に Seizure related protein-6 が結合することにより、突起の伸張が抑制されることがわかった。

(7) 内在性セリンプロテアーゼ阻害剤 protease nexin-1 の過剰発現によって神経筋接合部 (NMJ) の発達が阻害されることから、NMJ の発達にはプロテアーゼの作用が必須で

あることが示唆される。しかし、NMJ に局在するセリンプロテアーゼ tPA 欠損マウスでは NMJ の構造的な異常は認められていない。そこで、NMJ に局在するセリンプロテアーゼ motopsin との二重欠損マウスを作製した。tPA 欠損マウスを新たに導入して繁殖を行った上で、motopsin 欠損マウスと交配を行い、motopsin+/-, tPA+/-マウスを作製した。遺伝子型の決定は PCR 法を用いたが、両遺伝子欠損マウス共に pGKneo カセットを有するために欠損 motopsin 遺伝子に対する新たな PCR プライマーの設計を 3 種類設計し、グラジェント PCR によって条件権等を行った。最も明瞭なバンドを検出したプライマーと温度条件を用いて遺伝子型の決定を行った。両遺伝子ともヘテロ欠損マウスを交配すると二重欠損マウスが誕生する確率は 1 / 16 となるので、motopsin-/-, tPA+/-と motopsin+/-, tPA-/-とを交配することとした。二重欠損マウスが誕生する確率は 1 / 4 となる。二重欠損マウスは外見上大きな異常を認めずに少なくとも 8 週齢までは生存している。この二重遺伝子欠損マウスでは、対照として用いたヘテロ遺伝子マウスと同等の行動パターンを示し、また、神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体も正常の局在を示した。したがって、神経筋接合部形成におけるタンパク分解機能を解明するためには、さらに詳細な解析が必要であると考えられる。

#### 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 1 件)

Mitsui S, Osako Y, Yokoi F, Dang MT, Yuri K, Li Y, Yamaguchi N A mental retardation gene, motopsin/neurotrypsin. prss12, modulates hippocampal function and social interaction Eur J Neurosci 2009, 30: 2368-2378

[学会発表] (計 1 件)

三井真一：“精神遅滞原因遺伝子 motopsin と Seizure related protein-6(Sez-6)の相互作用による神経突起伸制御” 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会・全国学術集会合同大会、(20110328) パシフィコ横浜・会議センター

[その他]

ホームページ等

<http://kaken.nii.ac.jp/ja/p/21591899>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者 小林 俊博

(KOBAYASHI TOSHIHIRO)

神戸国際大学・リハビリテーション学部・理学療法学科・准教授

研究者番号：40153621

(2) 研究分担者 三井 真一

(MITSUI SHINICHI)

群馬大学大学院・保健学研究科・教授

研究者番号：20295661