

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06408

研究課題名(和文) 神経線維伸長を制御する核内分子機構の解明

研究課題名(英文) Function of a nuclear factor regulating neurites growth

研究代表者

勝山 裕 (Katsuyama, Yu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10359862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Sbno1は精神疾患と関連することがヒトゲノム解析から指摘されているが、その機能は明らかでない。そこで我々はSbno1ノックアウトマウスを作成した。このマウスで髄鞘染色を行うと、脳幹の錐体が全く染色されない。

そこで本研究ではまず大脳皮質錐体ニューロンの形態を観察するためにゴルジ染色を行った。核ニューロンの形態をトレースしたのちにSho11解析を行ったところ、Sbno1ノックアウトニューロンにおいて樹状突起は低発達だった。次に大脳皮質ニューロンを一次培養し、正常なニューロンよりSbno1ノックダウン(KD)では線維の伸長が遅いことがわかった。またSbno1の標的遺伝子座への結合を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神疾患に関連する遺伝子を明らかにするために、疾患患者を対象としたゲノム解析によって多くの疾患の原因となる候補遺伝子が示唆されているが、実際にその機能を調べた研究は少ない。我々自身のこれまでの研究によってSbno1が大脳皮質の発生に関与している可能性が示された。一方でSbno1がヒトゲノム解析で統合失調症や精神遅滞、正常な脳の発達に関与することが示唆されている。そこで本研究ではSbno1ノックアウトマウスやニューロンの一次培養における遺伝子ノックダウンによってSbno1の機能を調べた。その結果、正常なニューロンネットワーク形成にSbno1が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although involvement of SBN01 in psychiatric diseases has been suggested from human genome analyses, biological functions of SBN01 had not been examined. We constructed Sbno1 knockout mouse and performed myelin staining and found that pyramidal tract was abolished in Sbno1 KO brain.

We performed Golgi staining to visualize morphology of each cortical neuron, and Sho11 analysis told us that Sbno1 deficient cortical neurons grow neurites slower than control cortical neurons. Because Sbno1 is a nuclear factor, we compared gene expressions between control and Sbno1 deficient cortices and found that many genes were downregulated by Sbno1 deficiency. We selected a gene, yeats4, which exhibited biggest change in gene expression between control and Sbno1 deficiency. Utilizing Sbno1 specific antibody that we made, we carried out Cut & Run assay and confirmed that Sbno1 is physically binds to Yeats4 gene locus.

研究分野：神経解剖学

キーワード：神経発達障害 ヘリカーゼ 遺伝子発現調節 神経ネットワーク形成

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエの **Strawberry Notch(Sbno)**は眼や羽根の発生で **Notch** シグナルの下流で働いていることが示されている(Majumdar et al., 1997)。実際に **Sbno** タンパク質は転写因子 **Su(H)**(ヒト **RBPJ** の相同分子)と結合して働くことが報告されている(Tsuda et al., 2002)。我々は大脳皮質発生に関与する新規因子としてマウス相同遺伝子 **Sbno1** を同定した(Baba et al., 2006)。

我々は **Sbno1** の脳の発達における機能を明らかにするために **Sbno1** ノックアウトマウス(**KO**)を作成した。**Sbno1 KO** は脳梁や錐体路といった大脳皮質ニューロンからの出力線維の低形成を示していた。

我々は脳の発生過程で **Sbno1** が核に局在していることと、**Sbno1** と **Rbpj** が結合することを確認したが、変異マウスが示す表現型は **Notch** シグナルの欠損による脳の発生異常とは異なるため、哺乳類では **Sbno1** は **Notch** シグナルと関連しない働きを持つと考えられる。

Sbno1 はヘリカーゼスーパーファミリー2に属するが、このファミリー分子は転写制御、RNA 輸送、スプライシング、翻訳など多様な働きをするが、それぞれの機能は異なった因子との相互作用より行われることが報告されている(Legrand et al., 2019; Lennox et al., 2020 など)。そこで我々は **Sbno1** が **Rbpj** 以外にも相互作用する核内因子を持つことで神経線維の発達に関与すると考えた。

2. 研究の目的

ゲノム解析から **SBNO1** の精神疾患などへの関与が示唆されているが、正常な脳の発達での **Sbno1** の機能は不明である。そこで本研究計画では神経線維の発達という神経回路形成の根幹に働く分子機構に、**Sbno1** が相互作用分子と共に働く分子機構を明らかにすることを目的としている。神経回路形成において神経線維の発達に関わる分子がどのような発現制御を受けているかは不明である。変異マウスの解析から核内因子 **Sbno1** が神経線維発達に必要であることがわかった。そこで本研究では、**Sbno1** がどのような因子に作用し、神経線維発達に関わる分子の制御をおこなっているかを調べる。

3. 研究の方法

- 1) **Sbno1** タンパク質を高精度で検出する特異的な抗体を作成し、脳の発生過程における **Sbno1** の発現を詳細に調べる。
- 2) **Sbno1 KO** における形態的異常を免疫染色や Golgi 染色法などを用いて、詳細に調べる。
- 3) **Sbno1 KO** による大脳皮質における遺伝子発現変化を RNA シーケンス法で調べる。
- 4) RNA シーケンス法で発現変化が見られた遺伝子に対して **Sbno1** タンパク質がどのように作用するかを調べる。

4. 研究成果

本研究ではまず大脳皮質錐体ニューロンの形態を観察するためにゴルジ染色を行った。Golgi 染色では多くのニューロンの重なりあって染め出されるので、写真で各ニューロンの形態を示すのは不可能である。そこで顕微鏡観察下でステレオ描写装置を用いて各ニューロンの形態をトレースした。形態を詳細に描写したニューロンのスケッチ像を用いて **Sholl** 解析を行ったところ、**Sbno1** がノックアウトされた大脳皮質ニューロンにおいて樹状突起の発達が低くなっていることがわかった。

次に大脳皮質ニューロンを一次培養し経時的に顕微鏡写真で定点観察を行ったところ、正常なニューロンより **Sbno1** ノックダウン(KD)では神経線維の伸長が遅いことがわかった。

核内因子である **Sbno1** が大脳皮質において遺伝子発現制御を行っている可能性を調べるために RNA シーケンス法で全ゲノム的に遺伝子発現を調べたところ、多くの遺伝子に発現変化が認められた。

RNA シーケンス法で発現変化が示された遺伝子の中でもっとも正常なニューロンと **Sbno1** 欠

損ニューロンで発現の差が大きい遺伝子について Cut & Run 検定を行って Sbn1 が標的遺伝子座に直接結合していることを確認した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Erkhembaatar Munkhsoyol, Yamamoto Iroha, Inoguchi Fuduki, Taki Kosuke, Yamagishi Satoru, Delaney Leanne, Mariko Nishibe, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Hanashima Carina, Naka Kaneda Hayato, Ihara Dai, Katsuyama Yu	4. 巻 64
2. 論文標題 Involvement of strawberry notch homologue 1 in neurite outgrowth of cortical neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 379 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12802	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zolzaya Sunjidmaa, Narumoto Ayano, Katsuyama Yu	4. 巻 66
2. 論文標題 Genomic variation in neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuyama Yu, Hattori Mitsuharu	4. 巻 in press
2. 論文標題 REELIN ameliorates Alzheimer's disease, but how?	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Munkhsoyol Erkhembaatar, Dai, Ihara, Hayato Naka-Kaneda and Yu Katsuyama
2. 発表標題 Neurite growth regulating mechanism in the nucleus of developing neurons
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寒出 祐紀恵、成本彩乃、林朋樹、関秀樹、金田勇人、井原大、勝山裕
2. 発表標題 皮質ニューロンの軸索伸長制御機構
3. 学会等名 第68回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成本彩乃、寒出 祐紀恵、林朋樹、関秀樹、金田勇人、井原大、勝山裕
2. 発表標題 神経幹細胞のニューロン産生におけるp53の新規制御機構の解明
3. 学会等名 第68回 日本生化学会 近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 成本彩乃、井原大、寒出祐紀恵、林朋樹、中坊豪克、金田勇人、勝山裕
2. 発表標題 大脳皮質ニューロンにおけるアポトーシス関連遺伝子発現制御
3. 学会等名 第98回 日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井原大、金田勇人、勝山裕
2. 発表標題 神経幹細胞のニューロン産生における p53 の新規制御機構の解明
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会 全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 成本彩乃、井原大、寒出祐紀恵、林朋樹、中坊豪克、金田勇人、勝山裕
2. 発表標題 大脳皮質ニューロンにおけるアポトーシス関連遺伝子発現制御
3. 学会等名 第128回 日本解剖学会 全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sunjidmaa Zolzaya, Dai Ihara, Hayato Naka-Kaneda, Hidenori Tabata, Kimi Araki, Alberto Fernandez Juan, Yu Katsuyama
2. 発表標題 Functional significance of a point mutation inSBN01 gene found in an autistic patient
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会
4. 発表年 2024年

〔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	金田 勇人 (Kaneda Hayato) (40528212)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	
研究分担者	井原 大 (Ihara Dai) (40884367)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	

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
---------	---------