

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06962

研究課題名(和文) 平面内細胞極性と蛋白質ユビキチン化の異常に基づく自閉症スペクトラム障害の発病機構

研究課題名(英文) Planar cell polarity, protein ubiquitination, and autism spectrum disorder.

研究代表者

岸 将史 (Kishi, Masashi)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・客員准教授

研究者番号：60573938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、Vangl2がPrickle2など細胞内蛋白のユビキチン化を引き起こすという生化学的機能について、その分子パスウェイの役割を個体レベルで明らかにし、自閉症スペクトラム障害の発病に関わるのかどうかを調べることを目的としている。Vangl2が引き起こすタンパク質ユビキチン化がシナプス構成因子の分解によってシナプスの除去を正常に行い自閉症発病の抑制を行うというモデルが想定され、Vangl2のコンディショナルノックアウトマウスとCre-ERT2を全身で発現するラインと交配し、成体となった後にタモキシフェンを投与する実験を行ったが、自閉症と関連した明らかな行動異常は観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス成体脳ではVangl2のパラログであるVangl1も発現しており、両者は相補的に機能している可能性がある。したがって、今回の結果から、Vangl2が自閉症の発病に無関係であると単純に結論づけることは難しく、本来であればVangl1との二重コンディショナルノックアウトマウスを解析する必要があるかもしれない。本研究の学術的意義や社会的意義を考えた場合、Vangl1/2とその下流に位置するE3ユビキチンリガーゼとの相互作用を修飾する薬剤の特定によって自閉症の予防薬や治療薬を開発できるという可能性は依然として残っており、医学的に今後の重要な課題であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify the role for the molecular pathway of Vangl2, which causes protein ubiquitination of the intracellular proteins such as Prickle2, in the onset of autism spectrum disorder. We were expecting that Vangl2 induces ubiquitination and proteasomal degradation of synaptic proteins to execute normal synapse elimination and to prevent autism. Using conditional KO mice of Vangl2 with a line that expresses Cre-ERT2 throughout the body, we deleted Vangl2 in the adult mouse brains. These cKO mice however did not show obvious behavioral abnormalities associated with autism.

研究分野：実験病理学

キーワード：Vangl2 Prickle2 タンパク質ユビキチン化 自閉症スペクトラム障害 条件特異的ノックアウトマウス タモキシフェン Creリコンビナーゼ Vangl1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、言語や社会的コミュニケーションの障害、及び限定された興味に基づく常同行動を中核症状とした神経発達障害である。これまで多数の遺伝子異常が ASD との関連を指摘されているが、そのような症状をもたらす生物学的機序は未だ不明であり、特異的な治療薬や予防薬の開発には至っていない。

申請者は、内耳有毛細胞の配向性などを司ることで知られる平面内細胞極性 (PCP) の制御因子 Vangl2 と Prickle2 がシナプスにおいて果たす生理機能について研究しているが、Prickle2 の遺伝子変異が ASD の発病と関連しているという報告に着目した研究も行っている。Vangl2 の過剰発現による Prickle2 のユビキチン化について解析する過程で、後述するように、Vangl2 が PDUL という E3 ユビキチンリガーゼを介し Prickle2 以外の蛋白質のユビキチン化をも引き起こしており、また、Prickle2 が恐らく Vangl2 に結合することでその機能をブロックするという可能性を見出した。

PDUL の遺伝子欠損は、重度精神発達障害、てんかん、失調性運動障害などの異常行動を特徴とするある精神疾患の原因として知られるが、興味深いことに ASD 患者の 1~3% に PDUL を含む染色体領域の重複が報告されており、実際トランスジェニックマウスを用いた解析では PDUL 遺伝子のコピー数増多により自閉症が発症/増悪する。そのシグナル伝達経路の研究により、自閉症発病に関わる分子メカニズムの一端を解明出来る可能性がある。

上記のように、Vangl2 が PDUL の活性を増強するという経路が Prickle2 により抑制されているのであれば、Prickle2 の遺伝子変異/機能低下 (Sowers, Mol Psychiatry 2013) がその抑制の解除に繋がり、結果として蛋白質ユビキチン化の増強とそれに基づく ASD が引き起こされるという発病モデルも考えられ、PDUL のコピー数/活性増加によって ASD が引き起こされるという解析結果と整合性が高い。本研究では、PCP 因子の異常による ASD の発病はどのような機序によるものなのか? という問いに対し、PDUL を関連分子の候補として用い、分子レベルと個体レベルの両方の解析から答えを導き出したい。ASD を引き起こすシグナル伝達経路の解明に繋がる可能性がある。また近年、複数の ASD 関連因子がシナプス構成蛋白のユビキチン化に関与しているという報告がなされているが (Tsai, Cell 2012)、それが ASD の病態として一般性の高いものであるのかどうか? という問いに対しても、本研究の解析結果がその検証材料の一つになる。

2. 研究の目的

最近では 50 人に 1 人の子供が ASD であるという調査結果もあり、この疾患が本人や家族は勿論のこと社会全体に強い負担は甚大である。現在、ASD に対する薬物治療は抗うつ薬や安定剤、抗てんかん薬などによる対症療法に留まっており、病態に即した薬剤の開発が望まれる。ASD の症状や原因となる遺伝子異常は多様であるが、今後、ASD の病因となる遺伝子異常が 1 つ 1 つ解き明かされ、また次世代シーケンサーを用いた個人ゲノムの情報取得が容易になってくれば、患者それぞれの異常に応じた薬物療法も現実味を帯びてくる。特に本研究における仮説である Vangl2-Prickle2-PDUL シグナルのように、同じ経路上の複数の分子に ASD の病因となる遺伝子異常が知られている場合、それらの分子 1 つ 1 つに対する薬剤ではなくても、シグナル伝達経路全体に影響を及ぼす 1 種の薬剤が見出されれば、比較的多数の患者に対する治療が計画的に行えるようになる可能性もある。

本研究の基礎医学的な目的は、上述したように PCP 因子の異常に起因する ASD の発病機構を解き明かすことであるが、臨床医学的な目標としては、PCP 因子と PDUL の関係や同経路の基質分子を調べることによって、PDUL の遺伝子異常を原因とする ASD に対する創薬ターゲットの範囲を広げ、有効な薬剤が得られ易くする、ということが挙げられる。もしもそのシグナル伝達経路が正しければ、Vangl2 から PDUL への作用を弱める薬剤や Prickle2 から Vangl2 への作用を強める薬剤も予防薬や治療薬となる可能性がある。Prickle2 の遺伝子異常を有する ASD 患者の報告は少ないが、もしも PDUL 遺伝子の重複に起因する ASD に対し PCP 因子との関連から薬剤の開発がなされたとすれば、それは ASD 患者全体の少なくとも 1~3%、単純計算で生まれてくる子供の 1700~5000 人に 1 人の QOL を改善しうる薬剤であることを意味し、社会的意義も小さくない。新規創薬ターゲットの開拓や比較的多数の患者に対する臨床応用が期待される点で本課題は創造性の高いものと考えられる。将来的には、発病シグナル経路に基づく ASD の分類やそれに応じた特異的創薬という内容でモデルとなるような研究に繋げて行きたい。

3. 研究の方法

Vangl2 が蛋白質ユビキチン化を促進し、その作用が Prickle2 の共発現、もしくは PDUL の発現低下によって抑制されるという観察結果は、培養細胞を用いた *in vitro* の実験系で得られたが、そのシグナル伝達経路が実際に生体内で機能し自閉症の発病に関与しているかどうかについては、個体レベルでの解析を必要とする。本研究では、これらの分子の遺伝子操作マウスを交配し遺伝学的相互作用が観察されるかどうかによってその検証を行う。遺伝学的相互作用とは、あるシグナル伝達経路に属する分子の遺伝子異常が複数の分子について起こると、それらの相乗効果を示すような表現型が得られるという現象である。ショウジョウバエ等を用いた研究で頻用されるが、両分子間の機能的な共役を示すものとされ、機能的な距離が近いほど相乗効果は大きいことが知られている。

本研究では、PDUL BAC トランスジェニックマウス(PDUL-Tg)が示す自閉症、具体的には、社会性相互作用の低下(初対面の野生型マウスに対し、被験マウスがその周辺に留まる時間が短縮する)、社会的コミュニケーションの低下(野生型マウスと被験マウスの間で観察される超音波啼鳴の頻度や継続時間が減少する)、常同行動の増加(セルフグルーミングの繰り返し頻度が増える)が、Vangl2 の正常遺伝子コピー数の減少(Vangl2+/-)によって軽減するかどうか、また、Prickle2 の正常遺伝子コピー数の減少(Prickle2+/-)によって、PDUL-Tg や Prickle2 ヘテロ、それぞれの単一遺伝子異常で観察される症状の和を超えるような強い表現型、すなわち相乗効果が観察されるかどうか、をそれぞれ調べる。ではBAC トランスジーンを2コピーとも有し比較的強い表現型を示す PDUL-2xTg マウスを用い、ではTgを1コピーだけ有し表現型の穏やかな PDUL-1xTg マウスを用いるなど、初めは症状増減の有無を観察しやすい実験系を工夫する。また、PDUL-Tg マウスで観察されるシナプス伝達の不全が増減するかどうかを確認する。

上記の行動解析において自閉症の表現型が増減した場合、PCP シグナルが PDUL を介しどのような下流分子の分解を制御しているのかを知ることによって、その具体的な発病メカニズムの解明に近付ける。本研究では、ポリユビキチン鎖に結合し、そのユビキチン化蛋白質をプロテアソームから守る、トリプシン抵抗性の人工蛋白質 TR-TUBE (Trypsin Resistant Tandem Ubiquitin-binding Entity: Yoshida, PNAS 2015) を用いた分子同定を行う。具体的には Vangl2 ヘテロ接合体(Vangl2+/-)、Prickle2 欠損マウス(Prickle2-/-)、PDUL-2xTg マウス、野生型マウス、それぞれから前脳初代培養ニューロンを調整し、AAV ウイルスの感染により FLAG-TR-TUBE を発現させる。次いで、各々の細胞抽出物に対し、抗 FLAG 抗体ビーズによる濃縮、トリプシン処理、抗 diGly 抗体を用いたユビキチン化ペプチドの免疫沈降、という3段階の処理を行い、沈降物を質量分析によって比較する。野生型と比較し遺伝子改変マウス由来のサンプルで検出スコアが変化する蛋白質は各分子の下流としてユビキチン化が変動する分子であると考えられる。本研究では、各遺伝子操作マウスから同定されたユビキチン化蛋白質群がどれくらいオーバーラップしているかを調べ、PCP 因子と PDUL が同じシグナル伝達経路に存在するかどうか分子的な検証を行う。更にもしも複数のサンプルにおいて共通して検出スコアの差が大きい蛋白質が得られた場合には、当発病経路の主要な下流分子として分解されている可能性を検証する。具体的には、まず上記遺伝子操作マウス脳内における当該蛋白質の発現量が実際に増減しているかどうかを確かめ、次いで、AAV 発現ベクターを用いた脳内蛋白質量の回復によって、上記症状や電気生理学的異常が部分的にでも軽減するかどうかを検証する。もしも軽減する場合には当蛋白質の分解が上記 ASD の発病に中心的な働きをしていると結論できる。

4. 研究成果

Vangl2 による Prickle2 ユビキチン化の亢進について研究する過程で(Nagaoka, Sci Rep 2019)、HEK293T 細胞に HA タグ付きのユビキチンと Vangl2 の両方を過剰発現させると、細胞抽出物中のユビキチン化蛋白質が顕著に増加し、更に Prickle2 の発現ベクターを加えるとこのユビキチン化がブロックされるという現象を見出した。一方、Vangl2 の発現量は通常 Prickle2 の存在によって増加せず、Vangl2 の蛋白質バンドはレーン間でほぼ一定、スミアにもなっておらず、ユビキチン化蛋白とは分子量が大きく異なる。従ってこのユビキチン化を受けている蛋白質は 293T 細胞に内因性の他分子であり Vangl2 ではない。当ユビキチン化は、Vangl2 の代わりに Stargazin や CD9 といった他の4回膜貫通分子を発現させた場合には起こらない特異性の高いものである。

Vangl2 の作用に必要な E3 ユビキチンリガーゼ PDUL 蛋白質ユビキチン化は、一般的に RING フィンガードメインを有する E3 リガーゼが基質特異性を決めている。Vangl2 は RING フィンガーを有さないため、上記のユビキチン化反応においては、Vangl2 の下流に未知の E3 リガーゼが関わっているものと考えられた。自閉症との関連が指摘されているものを中心に E3 リガーゼ 17 種を選択し発現抑制効率の高いことが期待される shRNA 発現ベクターを各々2種作製、それらのミックスを Vangl2 及び HA-Ubi の発現ベクターと共に 293T 細胞へ導入した。その結果、PDUL

に対する shRNA だけは上記の蛋白質ユビキチン化を強く抑制したが、他の shRNA は影響を及ぼさなかった。Vangl2 が PDUL を介し蛋白質ユビキチン化を惹起しているという経路が想定される。

本研究では、遺伝子改変マウスを用いた遺伝学的な解析が中核をなすが、研究期間に入っても新型コロナウイルス COVID-19 の世界的なパンデミックは終息せず、特に海外からの PDUL 遺伝子改変マウスの輸入は不可能な状態が続いた。そこで方針を転換し、既に入手していた Vangl2 の条件特異的欠損マウス (conditional KO; cKO) を用い、その異常が自閉症関連の行動異常を引き起こすかどうかを調べた。同系統と全身で ubiquitous に Cre-ERT2 を発現するマウス系統を交配し、生まれてきた個体のうち両改変遺伝子座を有するマウスが成体となった後にタモキシフェンを腹腔内投与することで、成体脳で Vangl2 を欠損するマウスを得た。それが自閉症様の行動異常を示すかどうか調べたが、少なくとも上記の「社会性相互作用の低下」と「常同行動の増加」といった明らかな行動異常は観察されなかった。同じく成体脳で発現が見られるパラログ Vangl1 が補完的に機能しており Vangl2 の条件特異的欠損だけでは期待するような行動異常が観察されないという可能性も考えられる。そのような Vangl 分子間の機能的代償に関する研究は今後の課題である。

Vangl2 と PDUL の機能的共役については、PDUL の遺伝子操作マウス無しでも可能な実験系として、マウス海馬初代培養ニューロンを用いた遺伝子発現抑制を行った。Vangl2 を抑制すると過去に報告した通りシナプス密度が低下するが (Nagaoka et al., Cell Rep 2014) 更に PDUL の発現を抑制すると軽度の相乗効果が認められ、更なる密度低下が観察された。一方で、Vangl2 を抑制した上で PDUL を過剰発現させた場合に、シナプス密度が回復するという機能的関連は認められず、両分子間の関係性は単純な上流下流というものではないと考えられる。Prickle2 との関連や Vangl1 の必要性なども検証しながら、論文にまとめる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagaoka Tadahiro, Katsuno Tatsuya, Fujimura Kyoka, Tsuchida Kunihiro, Kishi Masashi	4. 巻 13
2. 論文標題 Functional interaction between Vangl2 and N-cadherin regulates planar cell polarization of the developing neural tube and cochlear sensory epithelium	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-30213-x	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岸 将史、永岡 唯宏、勝野 達也、土田 邦弘
2. 発表標題 Vangl2とNカドヘリンの機能的な相互作用が神経組織の平面内細胞極性を制御する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

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

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