

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25年 5 月 3 日現在

機関番号：32663
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500315
 研究課題名（和文） 脳の性差形成におけるコラプシン応答メディエーター蛋白質4（CRMP4）の機能解析
 研究課題名（英文） The role of Collapsin Response Mediator Protein 4 (CRMP4) in sexual differentiation of the brain
 研究代表者
 金子 律子（大谷 律子）(OHTANI-KANEKO RITSUKO)
 東洋大学・生命科学部・教授
 研究者番号：00161183

研究成果の概要（和文）：性的二型核である前腹側脳室周囲核（AVPV）に着目し、性分化過程に発現量が雌雄で異なるタンパク質をプロテオミクスにより同定し、さらに遺伝子欠損マウスを用いて、そのタンパク質の機能を明らかにする一連の研究を行った。プロテオミクス解析により、Collapsin Response Mediator Protein 4（CRMP4）が性差蛋白質の1つと同定され、さらにCRMP4タンパク質がAVPVのTH細胞の数の調節に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Proteomics analysis of protein expression in the sexually dimorphic AVPV on postnatal day 1 (PD1; the early phase of sex differentiation) identified collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) as a protein exhibiting sexually dimorphic expression. This sexually differential expression of CRMP4 protein and mRNA in the AVPV was not detected on PD6. Next, we used CRMP4-knockout (CRMP4-KO) mice to determine the in vivo function of CRMP4 in the AVPV. The number of tyrosine hydroxylase (TH)-ir neurons increased in the AVPV of adult female CRMP4-KO mice as compared with the adult female wild-type mice. No significant difference in the number of TH-ir neurons was detected between sexes or genotypes on embryonic day 15, but a female-specific increase in TH-ir neurons was observed in CRMP4-KO mice on PD1. These results indicate that CRMP4 regulates the number of TH-ir cell number in the female AVPV.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：（分科）脳神経科学／（細目）神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳の性分化、前腹側脳室周囲核、CRMP4、プロテオミクス解析、ノックアウトマウス、ドーパミン作動性ニューロン、

1. 研究開始当初の背景

視索前野～視床下部は、生理学的所見から性周期や性行動に関係すると考えられ、また

形態学的にも明瞭な性差が見られる前腹側脳室周囲核（AVPV）や視索前野性的二型核

(SDN-POA)などの神経核(性的二型核)が幾つか存在している。SDN-POAについては、細胞死が神経核の性差を形作るという説が現在出されている。一方、AVPVについては、神経増殖、神経細胞死、神経細胞移動など幾つかの原因が出されているが、性差形成メカニズムはまだ不明のままである。

2. 研究の目的

本研究代表者はAVPVでの性差形成メカニズムを明らかにするために、本研究を計画した。

げっ歯類のAVPVは、オスに比べてメスの方が大きく、また神経細胞の密度もメスの方が多いことが知られている。さらに、AVPVの内に存在するドーパやドーパミンを合成するための酵素(tyrosine hydroxylase, TH)を細胞内に持つTH陽性細胞や、キスペプチンを分泌するキスペプチン細胞も、メスの方がオスより数が多いことが既に報告されている。これらのAVPVに見られる雌雄差は、出生前後の性ステロイドホルモンの環境によって生み出されることがわかっている。つまり、出生前後の時期に、胎仔の精巣から男性ホルモンが分泌されるオスでは、AVPVが小さくなり、TH細胞の数やキスペプチン細胞の数が減少する。一方、出生前後の時期に性ステロイドを分泌しないメスでは、AVPVはメス型(AVPVが大きく、TH細胞やキスペプチン細胞の数が多い)になる。しかし、どのようなメカニズムで、AVPVの雌雄差が生じるかは不明であった。そこで、AVPVで出生前後の時期(周生期)に雌雄差がある蛋白質に着目して、AVPVでの雌雄差形成のメカニズムを明らかにしようと考えた。

3. 研究の方法

周生期のAVPVからタンパク質を抽出し、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動解析(Two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DEGE)を行った。この時、AVPVとともに、SDN-POAについても同様の解析を行った。さらに、AVPVでの性差が決定した時期(出生後6日目, PD6)についても、AVPVならびにSDN-POAについて、2D-DIGE法による解析を行った。その後、雌雄差が優位であった蛋白質スポットに関して、質量分析を行い、蛋白質を同定した。

次に同定した蛋白質について、それぞれのmRNAの発現量についてリアルタイムPCR法により雌雄差を、AVPVの周生期、PD6およびSDN-POAの周生期とPD6のサンプルについて、比較した。

本研究では周生期のAVPVでのみ発現に雌雄差が見られたCollapsin Response Mediator Protein (CRMP)4に注目し、CRMP4ノックアウトマウスの脳のAVPVでの形態変

化を調べた。方法としては、ニッスル染色、THおよびキスペプチンに対する抗体を用いた免疫染色を、8週齢マウスを用いて実施した。さらに野生型マウスと比べて異常がみつかったTH陽性細胞については、PD1および胎生15日のAVPVについても、TH陽性細胞数を調べた。

またCRMP4ノックアウトマウスの性周期、思春期発来、出生率なども調べ、CRMP4蛋白質の欠損によって生殖機能に異常が現れないかを検討した。

4. 研究成果

プロテオミクス解析から、周生期のAVPVで発現に雌雄差がある蛋白質として、6つのタンパク質が同定された。このうち、mRNAにも発現に雌雄差が認められたものは、CRMP4とインターネキシンであった。CRMP4は、周生期のAVPVでのみ、蛋白質スポットおよびmRNAの発現に雌雄差が見られたが、PD6では両者に雌雄差はなかった。またSDN-POAでは、CRMP4のスポットとmRNAの両方で、周生期およびPD6共に、雌雄差は認められなかった。

以上のことからCRMP4は、周生期のみAVPVで発現に雌雄差がある蛋白質であることが分かった。そこで、CRMP4が性差形成中のAVPVでどのような機能を果たしているか、CRMP4ノックアウトマウスを使って調べた。

(1)CRMP4ノックアウトに見られたAVPVの性差について

AVPV神経核サイズは、野生型ではメスの方がオスより大きく、ノックアウトマウスでもメスの方がオスより大きい傾向であった(図1)。

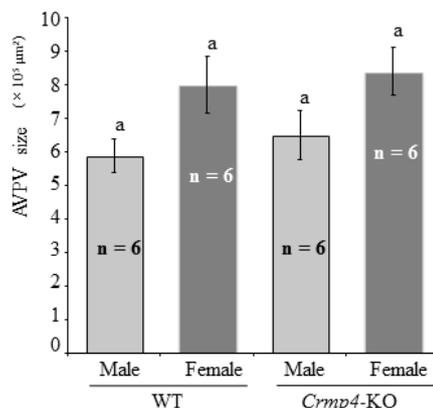


図1. 野生型およびCRMP4ノックアウトマウスでのAVPVの大きさ(8週齢)

またAVPVでの神経細胞数は、野生型ではメスの方がオスより有意に多かったが、ノックアウトマウスでも有意にメスの方がオスより神経細胞数が多かった(図2)。

5. 主な発表論文等

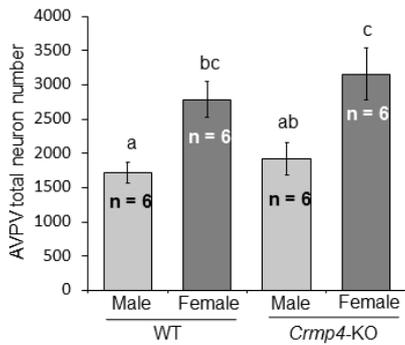


図2. 野生型およびCRMP4ノックアウトマウスAVPVでの神経細胞数 (8週齢)

キスペプチン細胞数について AVPV で調べたところ、野生型でもノックアウトマウスでも、メスの方が有意に多かった。CRMP4 蛋白質が欠損しても、キスペプチン細胞数には殆ど変化がなかった (図 3A, 3B)。

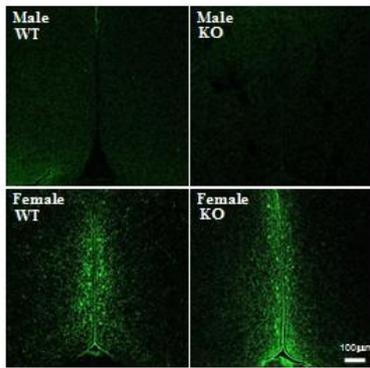


図3A. 野生型およびCRMP4ノックアウトマウスAVPVのキスペプチンニューロン (緑) 8週齢

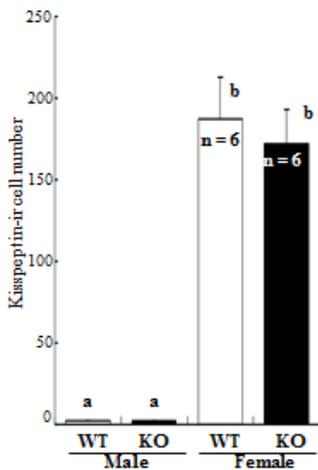


図3B. AVPVのキスペプチンニューロン数 (8週齢)

一方、TH ニューロンを調べたところ、野生型ではこれまでの報告通り、メスの方がオスより TH 細胞の数が多かった。ノックアウトマウスでは、TH 陽性細胞数はメス>オスであったが、メスで TH 細胞の数が増えており、雌雄差は拡大していた (図 4A, 4B)。

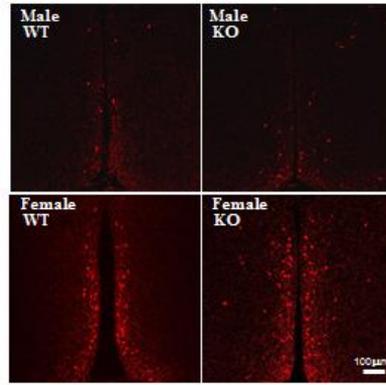


図4A. 野生型およびCRMP4ノックアウトマウスAVPVでのTH細胞 (赤) (8週齢)

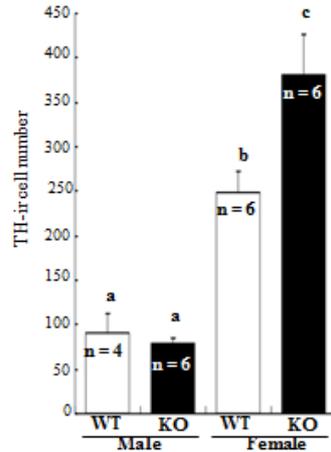


図4B. AVPVでのTH細胞 (8週齢)

CRMP4 蛋白質の欠損により TH 細胞がメスで増加するという現象が見出された。そこで、次に、この現象が発生期のどこで出現するかを明らかにするために、胎生期および出生直後の AVPV の TH 細胞数を調べた (図 5)。

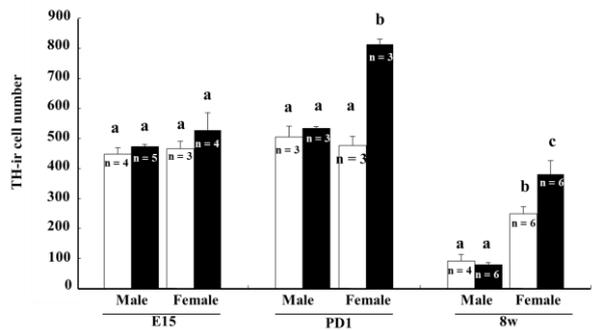


図5. 野生型およびCRMP4ノックアウトマウスAVPVでのTH細胞数 (胎生15日、PD1、8週齢)

その結果、胎生15日では野生型およびCRMP4ノックアウトマウス共、TH陽性細胞数に雌雄差はなかった。PD1では、野生型には雌雄差がなく、胎生15日とほぼ同様の細胞数であったが、CRMP4ノックアウトマウスではメスのTH細胞数がオスに比べて著しく増加していた。このことから、CRMP蛋白質の欠損は、メスのTH細胞を胎生15日から出生ま

での間に増加させることが明らかになった。
(2)CRMP4 蛋白質の欠損による生殖機能への影響

野生型およびCRMP4 ノックアウトマウスの思春期発来日、膣開口日、性周期（各ステージ）の長さ、出生率を調べた。思春期発来日、膣開口日、性周期各ステージの長さ、野生型とノックアウトマウス間に有意な差は見られなかった。

出生率については、ホモノックアウトの出生率が野生型に比べて低く、特にメスのホモノックアウトマウスの出生率が低かった。

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5件）

論文はすべて査読有り。

- ① Iwakura T, Sakoh M, Tsutiya A, Yamashita N, Ohtani A, Tsuda M, Ogawa S, Tsukahara S, Nishihara M, Shiga T, Goshima Y, Kato T, Ohtani-Kaneko R. Collapsin response mediator protein 4 affects the number of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the sexually dimorphic nucleus in female mice. *Dev Neurobiol.* 2013 Feb 18. doi: 10.1002/dneu.22076. [Epub ahead of print]
- ② Tsutiya A, Ohtani-Kaneko R. Postnatal alteration of collapsin response mediator protein 4 mRNA expression in the mouse brain. *J Anat.* 2012, 221:341-51. Doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01544.x.
- ③ Koseki N, Kitaoka Y, Munemasa Y, Kumai T, Kojima K, Ueno S, Ohtani-Kaneko R. 17 β -estradiol prevents reduction of retinal phosphorylated 14-3-3 zeta protein levels following a neurotoxic insult. *Brain Res.* 2012, 1433:145-52. doi: 10.1016/j.brainres.2011.11.034.
- ④ Kuramochi A, Tsutiya A, Kaneko T, Ohtani-Kaneko R. Sexual dimorphism of gonadotropin-releasing hormone type-III (GnRH3) neurons and hormonal sex reversal of male reproductive behavior in Mozambique tilapia. *Zoolog Sci.* 2011, 28:733-9. doi: 10.2108/zsj.28.733. PMID: 21967220
- ⑤ Wu Y, Moriya-Ito K, Iwakura T, Tsutiya A, Ichikawa M, Ohtani-Kaneko R. Sexually dimorphic effects of estrogen on spines in cultures of accessory olfactory bulb. *Neurosci Lett.* 2011, 500(1):77-81.

doi: 10.1016/j.neulet.2011.06.005.

〔学会発表〕（計6件）

- ① 金子（大谷）律子, 前腹側脳室周囲核での周生期における雌雄差発現タンパク質の同定とその機能解析, 日本生理学会（招待講演）, 2013年03月27日～2013年03月29日, タワーホール船堀（東京）
- ② 渡邊ひかる, 金子（大谷）律子, 海馬由来細胞（HT22細胞）でのCRMP4ノックダウンの影響, 日本動物学会, 2012年09月13日～2012年09月15日, 大阪大学豊中キャンパス（大阪）
- ③ 土屋 貴大, 山下 直也, 西原 真杉, 五嶋 良郎, 大谷-金子 律子, CRMP4 遺伝子欠損が 新生仔マウスの嗅覚 および嗅球に及ぼす 影響, 日本動物学会, 2012年09月13日～2012年09月15日, 大阪大学豊中キャンパス（大阪）
- ④ Tsutiya A, Yamashita N, Goshima Y, Ohtani-Kaneko R. Effect of collapsin response mediator protein 4 (CRMP4) knockout on the olfactory bulb, The International Symposium on Olfaction and Taste (ISOT), 2012年06月23日～2012年06月27日, ストックホルム, スウェーデン
- ⑤ A. Tsutiya, M. Sakoh, N. Yamashita, Y. Goshima & R. Ohtani-Kaneko, Postnatal expression of CRMP4 mRNA in the brain and structural changes in the olfactory bulb of CRMP4-knockout mice, 8th IBRO world congress of neuroscience, 2011年7月14日～2011年7月17日, Fortezza da Basso, Florence - Italy
- ⑥ M. Sakoh, T. Iwakura, A. Tsutiya, N. Yamashita, T. Shiga, Y. Goshima & R. Ohtani-Kaneko, Collapsin response mediator protein-4 (CRMP4) affects dopaminergic neurons in the AVPV, 8th IBRO world congress of neuroscience, 2011年7月14日～2011年7月17日, Fortezza da Basso, Florence - Italy

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計0件）
- 取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

http://ris.toyo.ac.jp/details/index.php?user_id=777

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 律子 (大谷 律子)

(OHTANI-KANEKO RITSUKO)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：00161183

(2) 研究分担者

山下 直也 (YAMASHITA NAOYA)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：40508793

(3) 連携研究者 (0)