

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591501

研究課題名(和文) 抗社会行動を伴う発達障害の分子機構を通じた診断・治療法開発戦略の創成

研究課題名(英文) The creation of novel treatment and testing for developmental disorders based on the mechanisms of a developmental disorder model accompanying social abnormality.

研究代表者

三井 真一 (Mitsui, Shinichi)

群馬大学・保健学研究科・教授

研究者番号：20295661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は既に機能不全が知的発達障害を引き起こす脳内プロテアーゼmotopsinの欠損が社会行動の亢進を引き起こすことを遺伝子組換えマウスを使って明らかにしている。本研究では、神経芽細胞腫への遺伝子導入実験から、motopsinとmotopsinへの結合能を有する膜蛋白質sez-6が協調して神経細胞の形態を制御している可能性を明らかにした。さらに、別の脳内プロテアーゼであるtissue plasminogen activatorの欠損マウスでは社会的不安が亢進している結果を得たことから、脳内プロテアーゼによる社会行動の制御機構はある程度の一般性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The principal investigator has reported that the loss of motopsin, a serine protease in the brain, enhances social behaviors. In this research, we analyzed the effects of motopsin and sez-6, which was identified as a motopsin-binding protein, on the cell morphology when they were transfected in neuroblastoma cells. The results suggested that these proteinases coordinately modulate the morphology of neuronal cells. Further, we showed a possibility that serine proteases in the brain ordinarily modulate social behaviors, since the mice lacking tissue plasminogen activator, another protease in the brain, showed enhanced social anxiety in behavioral tests.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：知的発達障害 プロテアーゼ 社会行動 motopsin neurotrypsin sez-6

1. 研究開始当初の背景

申請者は、遺伝子欠損が重篤な精神遅滞を引き起こす脳内プロテアーゼ motopsin (neurotrypsin, prss12 と呼ばれる)の発現と機能について解析を行ってきた。最近では、motopsin 欠損マウスの異常な社会行動の亢進や海馬ニューロンの構造と機能の異常を明らかにした。すなわち、motopsin 欠損マウスは同種他個体に対して有意に長い接触行動を示し、社会行動によって野生型マウスの海馬ニューロンで誘導される CREB のリン酸化が著しく減弱していた。また、海馬錐体ニューロンでのシナプス密度が低下していた。一方、スイスの Sonderegger らは、神経活動依存的に神経終末から放出された motopsin が細胞外基質 agrin を切断して生じた agrin の C 末端フラグメントが Na⁺K⁺-ATP ポンプを抑制することでシナプス形成を制御しているとするモデルを提唱している。これにより、motopsin 欠損マウスに見られるシナプス密度の低下は説明されるが、社会行動異常の分子機構については依然不明のままである。

以上の学術的背景から、申請者は抗社会行動を伴う発達障害の診断・治療法開発に資するために、脳高次機能における脳内プロテアーゼの役割を分子レベルで明らかにすることを目的に研究を進めている。過去のプロテアーゼ研究から motopsin にも agrin 以外に複数の成体内基質が存在することが強く示唆されることから、近年プロテアーゼの基質を網羅的かつ高感度に探索する方法として開発された網羅的解析による motopsin の生体内基質の探索を着想した。また、Motopsin 結合蛋白として見いだしたニューロンの膜蛋白質 seizure related protein-6 (sez-6) について、その相互作用の生物学的意義を解析し、motopsin の分子レベルでの作用を明らかにする。さらには他の脳内プロテアーゼとして tissue plasminogen activator (tPA) を対象に社会行動との関連を検討した。

2. 研究の目的

遺伝子欠損が遺伝性精神遅滞を引き起こす脳内プロテアーゼ motopsin の欠損マウスが社会行動の異常と海馬ニューロンの構造的機能的異常を示すことを申請者らは既に明らかにしている。

本研究は、1) motopsin の生理的基質の探索、2) テトラサイクリン motopsin 発現制御マウスの作製、3) motopsin と motopsin 結合蛋白質 sez-6 による神経突起進展の制御機構の解明、4) 脳内プロテアーゼの機能不全に起因する社会行動不全の分子病態の解析、等を通じて、社会行動に異常を伴う発達障害の新たな診断・治療法の開発戦略の創成を目指して行った。

3. 研究の方法

(1) Motopsin の生理的基質の探索

10 日齢の motopsin 欠損マウスおよび野生型マウスの海馬を摘出し、氷冷した 4 mM HEPES-OH (pH7.4), 0.32 M Sucrose 中でホモゲナイズした。遠心分離法によって抽出液をさらに可溶性画分、Triton 可溶性画分、及び Triton 不溶性画分に分画した。各画分 100 µg をミニゲルにて SDS-PAGE にかけてクマシーブリリアントブルーによる染色後、各泳動レーンの上端から下端までを 5 mm 間隔でスライスしていった。トリプシンを用いてゲル内消化し、ペプチドフラグメントは 2% acetonitrile, 1% formic acid に溶解・凍結した。フーリエ変換型質量分析装置を用いてゲル片に含まれるペプチドを同定して motopsin 欠損マウスと野生型マウスでの同定フラグメントを比較した。

(2) テトラサイクリン motopsin 発現制御マウスの作製

pTRE-Tight-BI-AcGFP1 (クロンテック) に HA-tag と融合した motopsin cDNA を連結した

ベクターを定法に従って受精卵にマイクロインジェクションしてトランスジェニックマウス (Tg) TRE-motopsin を得た。Cam kinase II プロモータ下で tTA を発現する Tg マウス (CamK-tTA) を TRE-motopsin と交配し、二重 Tg マウス (CamK-tTA/TRE-motopsin) を作製した。このマウスの終脳に対して western blot 法および免疫組織化学法によって GFP の発現を検討した。

(3) Motopsin と motopsin 結合蛋白質 sez-6 による神経突起進展の制御機構の解明
神経突起の形態を観察するために膜移行性 GFP とともに motopsin、および sez-6 を単独あるいは両者を発現する 4 種類のベクター (pCAG-GFP, pCAG-GFP/EF1-motopsin, pCAG-GFP/CMV-sez-6, pCAG-GFP/EF1-motopsin/CMV-sez6) を作製した。これらをリポフェクション法によってマウス神経芽細胞腫 Neuro2a に導入して 2 日後に免疫細胞化学的に導入遺伝子の発現を確認した。導入した遺伝子の全てを発現していた細胞について神経突起の数、長さ、分岐数、およびフィロポディア数、細胞体の大きさについて Image J ソフトウェアを用いて解析を行った。

(4) 脳内プロテアーゼの機能不全に起因する社会行動不全の分子病態の解析
tPA 欠損マウス (KO) および tPA ヘテロジェニックマウス (Het) の雄の社会行動について解析を行った。行動実験を開始する 1 週間前より、群中での社会的な影響をなくすために、被験マウスは個別に飼育した。実験は resident-intruder test、social memory test、3 chamber test、免疫染色の順に行った。

① Resident-intruder test

照度 15 lux 下で被験マウス (tPA KO n=15, tPA Het n=15) のケージに刺激マウスとして

オスマウスを置き、10 分間上部よりビデオ撮影した。Active behavior、passive behavior、aggressive behavior に要した時間、及び刺激マウスに最初に接触するまでの潜時を測定した。

② 3 chamber test

小原医科産業(株)の装置を使用し、11 lux 下で行った。各セッションごとに 10 分間被験マウスを自由に探索させ、被験マウスの行動を装置天井に設置されたビデオカメラで記録した。セッション 1 は左右の area に空の cage (E) を置いた。セッション 2 ではどちらか一方の area に刺激マウス (M1) を收容した cage を置いた。セッション 3 は、M1 に加えて空だった cage に新しい刺激マウス (M2) を收容した cage を置いた。各 cage のそばで過ごした時間、各 cage に近づいた回数、各 cage 近傍での移動距離、各 area で過ごした時間、各 area に入った回数、各 area 内の移動距離を Image J ソフトウェアを用いて解析した。

③ 社会行動により活性化される脳領域の同定
tPA KO (n=6)、tPA Het (n=6) に対し各々のホームケージ内で刺激マウスと 10 分間接触させた。90 分間経過後、灌流固定して脳を摘出し、厚さ 30 μm の凍結切片を作製した。切片に対して抗 cFos 抗体による免疫組織化学染色を行い、得られた画像について ImageJ にて cFos 陽性細胞数をカウントした。

4. 研究成果

(1) Motopsin の生理的基質の探索

Triton 不溶性画分で同定できた 1390 種の蛋白質のうち、野生型マウスのみで同定できた蛋白質は 312 種で、motopsin 欠損マウスのみで同定できた蛋白質は 147 種であった。Triton 不溶性画分では 1227 種類の蛋白質を同定し、motopsin 欠損マウスで増加が示唆された蛋白質は 153 種で、減少が示唆された蛋白質は 369 種であった。可溶性蛋白質では 1474 種の蛋白質を同定した。Motopsin 欠損

マウスで検出数が高かったものは75種存在で、検出数が少ない蛋白質は104種であった。

LC-MS/MSによる検出回数の差異を見出したもののうち、NR1, APP, Camk2a, CamK4, Rab5b, GRIA1, GFAPをwestern blotにより motopsin 欠損マウスと野生型マウスとで発現量の比較を行ったが、両方で有意な差がみられたものはなかった(図1)。

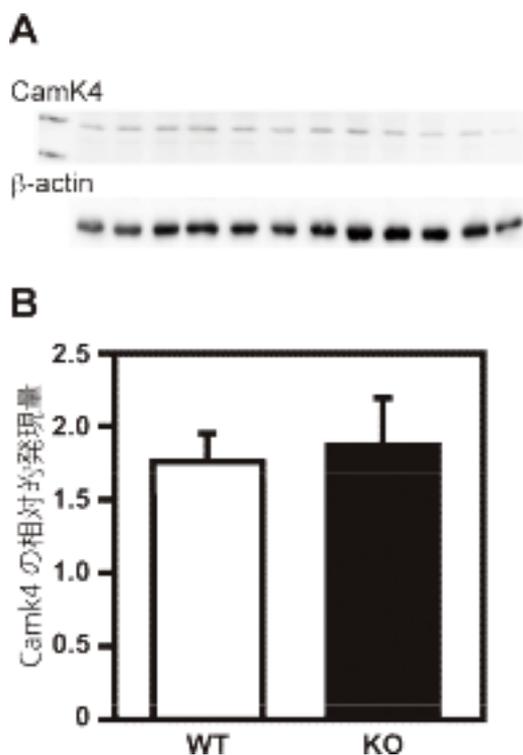


図1

A) Western blot 法における Camk4(上)と β -actin(下)の検出。B) 野生型(WT)と motopsin KO マウス海馬の可溶性蛋白画分における Camk4 相対量。

(2) テトラサイクリン motopsin 発現制御マウスの作製

テトラサイクリン応答性プロモーター下に連結した motopsin cDNA をもつ TRE-motopsin トランスジェニック (Tg) マウスと CamK-tTA Tg マウスを交配して得た二重 Tg を得たが、脳内での motopsin および GFP の発現は western blot および RT-PCR 法で確認できなかった。現在、CamK-tTA のホモトランスジェ

ニックマウスを取得中で、この個体の生殖細胞を用いて作製した受精卵に TRE-motopsin のインジェクションを行って得たマウスを用いて二重 Tg マウスを作成する予定である。

(3) Motopsin と motopsin 結合蛋白質 sez-6 による神経突起進展の制御機構の解明

マウス神経芽細胞腫 Neuro2a に膜移行性 GFP とともに motopsin、および sez-6 を単独あるいは両者を導入し、GFP の蛍光を指標に細胞形態について観察を行った。その結果、motopsin を単独で発現させた場合には神経突起の数、分枝数、長さのいずれもが有意に増加したが、sez-6 と共発現させるとこれらの効果は抑制された(図2)。現在、初代神経細胞を用いてさらに検討を進めている。

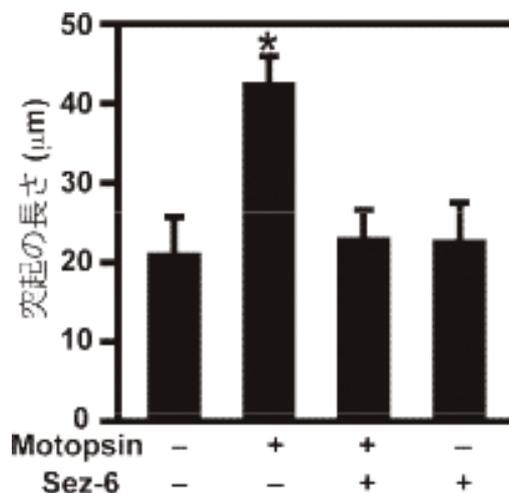


図2 Neuro2a 細胞の神経突起の長さおよび motopsin および sez-6 の発現効果 Motopsin を過剰発現させると突起の伸長が促進されるが、sez-6 を共発現させるとその効果は抑制される。

(4) 脳内プロテアーゼの機能不全に起因する社会行動不全の分子病態の解析

tPA KO マウスの社会行動について解析を行った。Resident-intruder test では、tPA KO マウスは刺激マウスに初めて接触するまでの潜時が Het マウスと比べて遅かったが、嗅ぎ行動などの active behavior の時間は長かった。

3-chamber test では空ケージ (セッション 2)、あるいは、既知マウスの入ったケージ (セッション 3) に近づいた回数は tPA KO マウスの方が Het マウスより多かった。これらのケージがおかれたエリアでの tPA KO マウスの移動距離も Het マウスに比べて有意に長かった。そこで、社会行動後 90 分を経過した時点で脳を摘出し、cFos 蛋白質の免疫応答性によって社会行動に対して反応した脳領域の検索を行った。その結果、前頭前野での cFos 陽性細胞数が Het マウスより tPA KO マウスで多いことが示された (論文作成中)。これらの結果は脳内プロテアーゼによる社会行動の制御はある程度の一般性をもった減少であることを示唆している。

さらに、環境中の化学物質がもたらす発達や成長への影響や発達障害との関わりを明らかにするため、モデル化した室内環境中でのそれら化学物質の吸着・脱着に注目した計測を行った。一方、自閉症に着目した早期発見のためのバイオマーカーの検索について、唾液試料を用いる精密質量分析の差異解析からアプローチした。

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 3 件)

1. Mistui, S., Osako, Y., Yuri, K., The mental retardation-related protease, motopsin (prss12), binds to the BRICHOS domain of the integral membrane protein 2a., Cell Biology International 38, 117-123, 2014. doi: 10.1002/cbin.10164 (査読有)
2. Mitsui, S., Hidaka, C., Furihata, M., Osako, Y., Yuri, K., A mental retardation gene, motopsin/prss12,

modulates cell morphology by interaction with seizure-related gene-6. Biochemical Biophysical Research Communications 436, 638-644, 2013.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.112> (査読有)

3. Higashi, K., Hasegawa, M., Yokoyama, C., Tachibana, T., Mitsui, S., Saito, K., Dermokine- β impairs ERK signaling through direct binding to GRP78. FEBS Letters 586, 2300-2305, 2012.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.022> (査読有)

4. 蒲生啓司, 須貝一貴, 唾液試料を用いた自閉症スペクトラム障害のメタボローム解析, 高知大学学術研究報告 60, 241-252, 2011.

<http://hdl.handle.net/10126/4848>

[学会発表] (計 7 件)

1. Mitsui, S. Serine proteases modulating social behavior. Advanced Micro-Device Engineering (AMDE2013), Dec. 19, 2013, Kiryu, Japan.
2. Hidaka, C., Mitsui, S. Function of seizure-related gene-6 (sez-6) in neurite elongation and branching. Advanced Micro-Device Engineering (AMDE2013), Dec. 19, 2013, Kiryu, Japan.
3. Mitsui, S. A serine protease in the brain modulates social behaviors. Brain and Health Informatics (BHI 2013), Oct. 30, 2013, Maebashi, Japan.
4. 蒲生 啓司, 須貝 一貴, 唾液試料を用いる自閉症スペクトラム障害のメタボローム解析, 第 61 回質量分析総合討論

会, 2013年9月10日. つくば国際会議場.

5. Mitsui, S., Nakamura, K., Takabe, A., Shimizu, F., Okada, K., Matsuo, O. Tissue-type plasminogen activator modulates social anxiety. 日本神経科学学会(Neuro2014), 2013年6月21日. 京都.
6. 三井 真一. 脳内プロテオリシスの破綻による精神発達障害の発症機構, 第59回北関東医学会総会(招待講演), 2012年9月28日, 前橋市.
7. Gamoh, K., Sugai, K., Metabolomic Analysis of Saliva of Autism Spectrum Disorders, 19th International Mass Spectrometry Conference, Kyoto International Conference Centre, Sept. 20, 2012, Kyoto.
8. Hidaka, C., Mitsui, S., Yuri, K. Modulation of neurite extension and branching by the interaction of a mental retardation gene, motopsin/neurotrypsin, and seizure related gene (sez)-6. Neuroscience 2011, Nov. 13, 2011, Washington DC, USA.
9. 三井 真一, 由利 和也. 精神遅滞原因遺伝子 motopsin/neurotrypsin と Seizure related gene (Sez)-6 との相互作用によるニューロンの形態の制御. 第34回日本神経科学大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜.
10. 蒲生 啓司, 須貝 一貴. 唾液試料を用いた自閉症のメタボロミクス研究(2), 日本分析化学会第60年会, 2011年9月16日, 名古屋.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

蒲生 啓司 (GAMOH Keji)
高知大学・総合科学系・教授
研究者番号: 90204817

(3) 連携研究者

由利 和也 (YURI Kazunari)
高知大学・医歯学系・教授
研究者番号: 10220534

大迫 洋治 (Osako Yoji)
高知大学・医歯学系・准教授
研究者番号: 40335922