

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790227

研究課題名(和文) 中枢神経系における stathmin1 の生理機能と機能調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism and function of stathmin1 in the central nervous system

研究代表者

山田 浩平 (Yamada, Kohei)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・講師

研究者番号：50588879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)： Stathmin1は脳高次機能である恐怖不安学習との関連が示唆されているが、中枢における機能に関しては未だ不明な点が多い。そこで、本研究では中枢におけるstathmin1の詳細な機能、発現動態を検討した。Stathmin1は周産期に発現量が多く、特に大脳皮質、海馬、扁桃体に発現していた。また大脳皮質においてはstathmin1がリン酸化を受けていた。初代培養神経を用いた検討によりstathmin1リン酸化シグナルとしてBDNF-TrkB経路の関与が示唆された。細胞内のリン酸化stathmin1の増加によりfilopodia様の突起構造物が増加することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a neuropeptide involved in a variety of brain function. We demonstrated that PACAP regulates stathmin1 expression. Shumyatsky GP. et al. reported that mice without stathmin1 have deficiency in innate and learned fear. However, the detailed function and regulatory mechanism of stathmin1 in the central nervous system are unclear. In this study, we found that stathmin1 was phosphorylated during perinatal stage in the cortex. Phosphorylated stathmin1 was localized in the marginal zone of cortex, forming dot like fibers. In primary cultured neuron study, we detected dot-like phosphorylated stathmin1. And we indicated that BDNF was related to phosphorylation of stathmin1. PC12 cells over-expressed stathmin1 constitutive active form had longer thick neurites and numerous slight neurites as a filopodia. These results show that phosphorylated stathmin1 is related to filopodia or synapse constitution during perinatal period.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖一般(含組織学・発生学)

キーワード：stathmin1 神経 リン酸化タンパク質 脳発達 周産期

## 1. 研究開始当初の背景

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) はアデニル酸シクラーゼの活性化を指標に単離された神経ペプチドであり、統合失調症やうつ病との関連性を示唆する報告がなされ、精神疾患との関連性において注目されている因子の一つである。我々は統合失調症関連脆弱因子である Disrupted-In-Schizophrenia1 (以下 DISC1) の転座部位に結合する因子、DISC1 Binding Zinc-finger Protein (以下 DBZ) を発見し、DISC1 と DBZ の結合が PACAP により制御されていることを報告した。一方で PACAP KO マウスを用いた行動実験では、新規環境下において異常行動が観察され、その異常行動が向精神薬投与により改善されたとの報告があった。以上から勘案すると PACAP の機能不全が精神疾患発症に関与していることは揺るぎない。

そこで、我々は PACAP シグナル下流に存在する異常行動関連因子を探索する目的で、PACAP KO マウスの海馬歯状回において発現変動している因子の網羅的な解析を行った。その結果、発現量増加因子として stathmin1 を同定した。

統合失調症患者死後脳サンプルを用いた検討において、anterior cingulate cortex (ACC、Brodmann's area 24) 部位で stathmin1 の発現量が 1.8 倍になっているとの報告がなされている。また、stathmin1 KO マウスを用いた研究では社会性が低下することが確認されている。さらに、小脳のプルキンエ細胞の移動や突起伸展に stathmin1 が関与しているとの報告がなされている。近年、マウス線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast: MEF) に stathmin1 の発現を調節している bHLH 因子 Ascl1 を強制発現させると細胞の reprogramming が惹起され、神経様細胞 (iN cell) が誘導されるとの結果も報告されている。

中枢における stathmin1 の機能に関しては

不明な点が多く、上記の報告から鑑みても未だ明らかになっていない生理機能を有している可能性が十分に示唆される。今後、中枢神経系における stathmin1 の生理機能の解明は益々重要になると考えられる。

## 2. 研究の目的

精神疾患発症に関する発達障害仮説の観点から考えても、周産期における中枢神経系の発達機構の解明は非常に重要であると考えられる。プレリミナリーな結果ではあるが、我々はマウス大脳皮質における stathmin1 の発現量が胎生 18 日～生後 7 日の周産期にかけて最も高く、さらに、周産期の stathmin1 はリン酸化を受けていることを見出している (図 1)。これらのことは、周産期において stathmin1 が脳発達に関して非常に重要な機能を有していると示唆される。

そこで本研究では周産期における stathmin1 の生理機能、特にリン酸化制御やリン酸化 stathmin1 の機能解析の検討を行い、周産期における脳発達機構と stathmin1 との関連性を明らかにする。

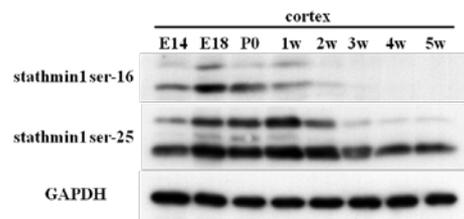


図 1. リン酸化 stathmin1 の発現変動

## 3. 研究の方法

### (1) 中枢における stathmin1 の発現解析

発達段階に応じた脳全体の stathmin1 の発現解析を行うため、以下の検討を行う。

- ① 胎生 18 日目 (E18)、生後 7 日目 (P7)、8 週齢 (8w) における stathmin1 の mRNA の発現分布を *in situ hybridization* 法を用い検討する。
- ② 上記の時期における stathmin1 のタンパク質の発現を免疫染色法を用い検討する。

また、神経マーカー (NeuN) との二重染色を行い stathmin1 陽性細胞の定性を行う。

③ 発達段階ごとの stathmin1 の発現をリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロッティング (W.B.) 法で検討する。併せて stathmin1 のリン酸化変動についても W.B.法で検討する。リン酸化 stathmin1 認識抗体を用い免疫染色することで大脳皮質におけるリン酸化 stathmin1 の局在を同定する。

## (2) Stathmin1 のリン酸化制御機構の解明

E16 のマウス大脳皮質由来の初代培養神経を用いリン酸化 stathmin1 に関する以下の検討を行う。

① マウス大脳皮質由来の初代培養神経においても stathmin1 のリン酸化がみられるかどうかを W.B.法で検討する。また、免疫染色法を用い神経細胞内での局在を観察する。

② Stathmin1 をリン酸化させる神経栄養因子を同定するため、BDNF (10 ng/ml)、NGF (50 ng/ml)、PACAP (10 nM)等の添加実験、K252a (trk レセプター阻害薬) の添加実験を行い stathmin1 のリン酸化変動を W.B.法で検討する。

## (3) リン酸化 stathmin1 の作用部位の同定

我々は PC12 培養細胞に NGF 刺激をした際、細胞質で stathmin1 がリン酸化を受けること、核内あるいは核周囲でリン酸化 stathmin1 が観察されることを見出している。より詳細な検討を行うため、PC12 培養細胞を用い以下の検討を行う。

① PC12 培養細胞へ NGF (50 ng/ml)を添加した後のリン酸化 stathmin1 の動態を免疫染色法で検討する。また刺激後の培養細胞から細胞質分画、核分画のタンパク質を回収し、リン酸化 stathmin1 が核内に発現するかどうかを W.B.法により検討する。

② Stathmin1 のリン酸化部位 (16Ser、25Ser、38Ser、63Ser) をアスパラギン酸に置換した

stathmin1 constitutive active form (sta-4CA)、またはアラニンに置換した stathmin1 constitutive negative form (sta-4CN) の発現ベクターを作成し、培養細胞に強制発現させた際の細胞内局在を免疫染色法で検討する。また形態学的変化も併せて観察する。

## (4) Ascl1 による MEF の reprogramming への stathmin1 の関与の検討

胎生 14 日目のマウス皮膚より MEF を採取し継代培養を行う。MEF へ Ascl1 発現ベクターをリポフェクション法でトランスフェクトし、トランスフェクション後 4 日、7 日、14 日目の MEF を回収する。回収したサンプルより mRNA を抽出し、cDNA を作成する。リアルタイム PCR (ABI PRISM 7900HT) を使用し stathmin1 の発現量を検出する。

## 4. 研究成果

### (1) 中枢における stathmin1 の発現解析

① 中枢における stathmin1 の発現分布を *in situ* hybridization 法を用いて検討した。E18 脳スライスサンプルでは cortical plate や視床で強いシグナルが観察された (Fig. 1)。P7 では大脳皮質、海馬 CA3 領域、CA1 領域、扁桃体外側核で際立ったシグナルが観察された (Fig. 1 矢印)。大脳皮質におけるシグナルは第 1、2 層において強かった。

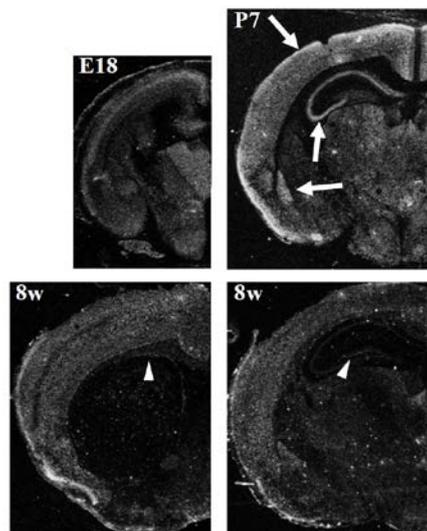


Fig. 1 Stathmin1 の発現分布

P56ではE18やP7程強いシグナルは観察されなかった。一方で海馬歯状回に存在する subgranular zone や脳室周囲の subventricular zone でシグナルが観察された (Fig. 1 矢頭)。

② ①の結果より、stathmin1 の mRNA の発現量は周産期において脳全体で高くなり、特に大脳皮質で発現量が多いことが明らかとなった。そこで大脳皮質における stathmin1 の発現局在を免疫染色法にて検討した。結果は①と同様で、大脳皮質第1、2層で強いシグナルが観察された。第1層では dot 状もしくは fiber 状のシグナルが観察された。第2層では神経細胞の細胞質や神経突起に存在する stathmin1 が観察された (Fig. 2)。

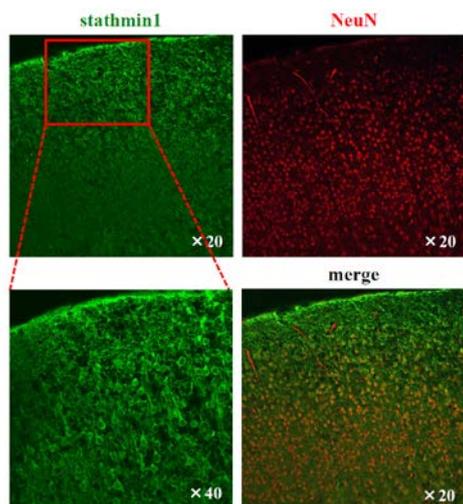


Fig. 2 大脳皮質における stathmin1 の発現

③ Stathmin1 の mRNA の発現量をリアルタイム RT-PCR で検討したところ、①の結果を裏付けるように、周産期で最も高い結果が得られた (Fig. 3 左図)。また、W.B.法でタンパク質の発現変動を検討したところ、タンパク質の発現も周産期に高いことが明らかとなった (Fig. 3 右図)。また、stathmin1 は周産期に発現量が多いだけでなく、リン酸化を受けていることも明らかとなった (fig. 3 右図)。P7の大脳皮質サンプルを stathmin1 の Ser25、Ser38 認識抗体で免疫染色しリン酸化 stathmin1 の局在を検討したところ、どちらのリン酸化抗体でも

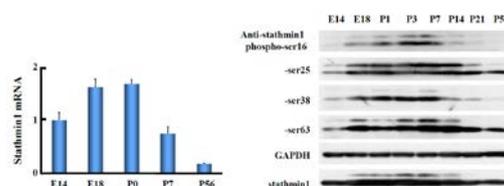


Fig. 3 大脳皮質における stathmin1 の発現変動  
大脳皮質第1、2層で dot 状のシグナルが観察された (Fig. 4)。

周産期に stathmin1 の一部のリン酸化部位がリン酸化を受けているとの報告はある。しかし、すべてのリン酸化部位に関し発達段階ごとのリン酸化を網羅的に解析した報告はない。また、大脳皮質におけるリン酸化 stathmin1 の局在に関する詳細なデータは我々が世界で初めて明らかにした。

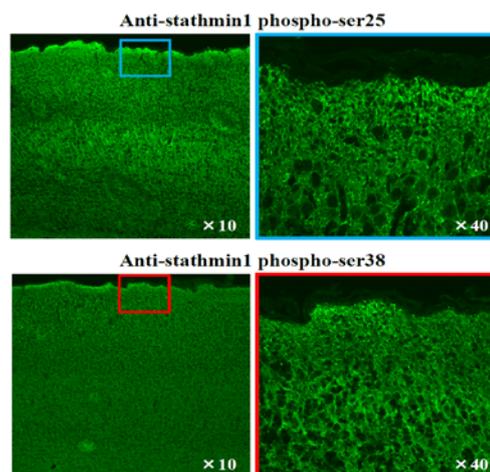


Fig. 4 大脳皮質におけるリン酸化 stathmin1 の発現分布

## (2) Stathmin1 のリン酸化制御機構の解明

① マウス大脳皮質由来の初代培養神経、培養日数 1、3、5、7 日目でのリン酸化 stathmin1 の発現を W.B.法で検討した。その結果、培養日数 1 日目ではリン酸化レベルは低かったが、培養日数 3~5 日目をピークに E18 マウス大脳皮質サンプルと同程度にまで stathmin1 はリン酸化を受けていた (Fig. 5 A)。培養日数 5 日目の初代培養神経のリン酸化 stathmin1 の発現局在を免疫染色法で検討したところ、神経突起に沿って dot 状もしくは fiber 状にシグナルが観察された (Fig. 5 B)。

② 初代培養神経培養 7 日目に trk レセプタ

一の阻害薬である K252a を添加したところ stathmin1 のすべてのリン酸化部位でのリン酸化が減弱した (Fig. 5 C, K252a 添加 0h)。一方で、培養日数 7 日目に BDNF を添加したところ、すべてのリン酸化部位がリン酸化を受けた。また、これらの効果は K252a 添加により阻害された (Fig. 5 C)。

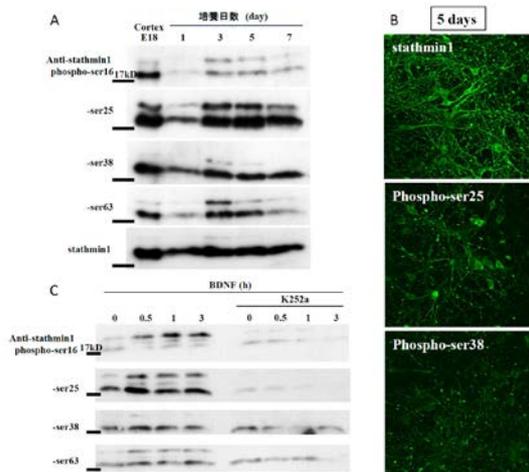


Fig. 5 初代培養神経におけるリン酸化 stathmin1 の発現解析

BDNF は神経の突起伸展やシナプス形成に関わる脳発達に非常に重要な神経栄養因子であり、精神疾患との関連も示唆されている。今回、trk レセプターを介するシグナルにより初代培養神経の stathmin1 がリン酸化を受けることを明らかにしたことは、stathmin1 の生理機能を考察するうえで非常に興味深い。

### (3) リン酸化 stathmin1 の作用部位の同定

① PC12 培養細胞に NGF を添加し時間経過ごとの stathmin1 のリン酸化変動を W.B. 法で検討した。結果、刺激 5 分後から Ser25、Ser38 がリン酸化を受けることが確認できた (Fig. 6 左図)。刺激 30 分後の PC12 培養細胞における Ser25 のリン酸化 stathmin1 のシグナルは核周囲で観察された (Fig. 6 右図赤矢印)。そこで、PC12 培養細胞に NGF を添加した後の核内タンパク質を時間経過ごとに採取し、リン酸化 stathmin1 が検出されるかを W.B.法で検討した。その結果、核

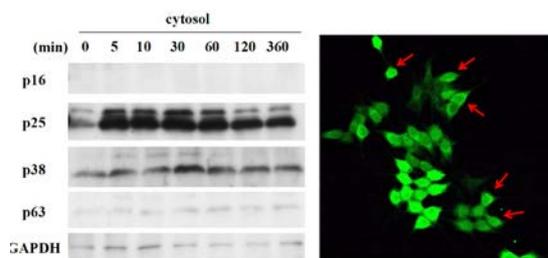


Fig. 6 NGF 刺激後の PC12 細胞におけるリン酸化 stathmin1 の発現解析

分画において Ser25 がリン酸化を受けた stathmin1 のシグナルだけがわずかに検出された (Fig. 7)。

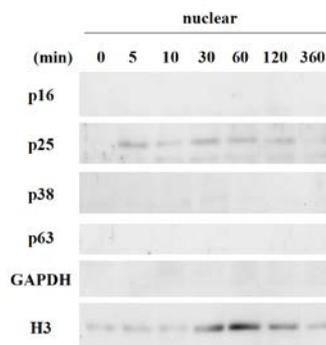


Fig. 7 核内におけるリン酸化 stathmin1 の発現

② PC12 培養細胞に sta-4CA 体を強制発現させ 48 時間後に形態観察を行ったところ、細胞体からでてくる神経様突起の数が増加し、さらに突起伸展が促進されていた (Fig. 8 左図 CA)。また、Ser16 認識リン酸化抗体で免疫染色したところ神経様突起にはさらに細かい突起物、filopodia 様の突起が存在していることが明らかとなった (Fig. 8 右図赤矢印)。

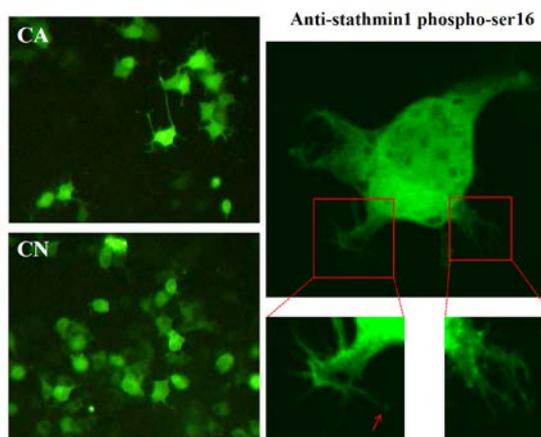


Fig. 8 疑似的 stathmin1 リン酸化体の PC12 細胞への影響

PC12 培養細胞では NGF 刺激によりリン酸化 stathmin1 が核周囲で増加することが明らかとなった。一方で、核内に移行するかどうかの真偽はさらなる検討が必要である。今回、初代培養神経や刺激後の PC12 培養細胞に存在するリン酸化 stathmin1 の相互作用因子の同定を試みたが発見には至らなかった。Stathmin1 の新規機能を考察するうえでもリン酸化 stathmin1 との新規相互作用因子の同定は今後とも続けていきたい。

#### (4) Ascl1 による MEF の reprogramming への stathmin1 の関与の検討

MEF へ Ascl1 をトランスフェクションした 7 日後において stathmin1 の発現量が約 2.7 倍になった (n=1)。しかし、トランスフェクト後 14 日目では stathmin1 の発現量に差は見られなかった (Fig. 9)。

MEF の iN 化に stathmin1 が関与している可能性が示されたことは大きな成果である。今後は n 数を増やし、さらにトランスフェクション効率を改善し検証していきたい。

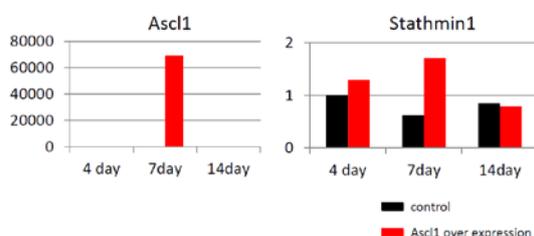


Fig. 9 iN cell 誘導時の stathmin1 の発現変動

#### 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 4 件)

- ①Hattori T, Shimizu S, Koyama Y, Emoto H, Matsumoto Y, Kumamoto N, Yamada K, Takamura H, Matsuzaki S, Katayama T, Tohyama M, Ito A. DISC1 (disrupted-in-schizophrenia-1) regulates differentiation of oligodendrocytes. *PLoS One*. 9(2):e88506, doi: 10.1371/journal.pone.0088506, 2014.

②Magome T, Hattori T, Taniguchi M, Ishikawa T, Miyata S, Yamada K, Takamura H, Matsuzaki S, Ito A, Tohyama M, Katayama T. XLMR protein related to neurite extension (Xpn/KIAA2022) regulates cell-cell and cell-matrix adhesion and migration. *Neurochem Int*. 63(6):561-569, doi: 10.1016/j.neuint.2013.09.011, 2013.

③Koyama Y, Hattori T, Shimizu S, Taniguchi M, Yamada K, Takamura H, Kumamoto N, Matsuzaki S, Ito A, Katayama T, Tohyama M. DBZ (DISC1-binding zinc finger protein)-deficient mice display abnormalities in basket cells in the somatosensory cortices. *J Chem Neuroanat*. 53:1-10, doi: 10.1039/c3cp43573c, 2013.

④Takamura H, Koyama Y, Matsuzaki S, Yamada K, Hattori T, Miyata S, Takemoto K, Tohyama M, Katayama T. TRAP1 controls mitochondrial fusion/fission balance through Drp1 and Mff expression. *PLoS One*. 7(7):e51912, doi: 10.1371/journal.pone.0051912, 2012.

[学会発表] (計 2 件)

①山田浩平、谷口学、松崎伸介、高村明考、服部剛志、遠山正彌、片山泰一、「中枢におけるリン酸化 stathmin1 の機能解析」Neuro2013、2013 年 6 月 22 日 (京都)

②山田浩平、松崎伸介、新谷紀人、橋本均、馬場明道、片山泰一、遠山正彌、「中枢神経系における stathmin1 の機能解析」第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012 年 3 月 28 日 (山梨)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩平 (YAMADA, Kohei)

浜松医科大学・子どものこころの発達研究センター・特任講師

研究者番号 : 50588879