

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700319

研究課題名(和文) ストレス応答タンパク質M6aのエピジェネティクスからみる神経可塑性とその異常

研究課題名(英文) The neuronal plasticity and its abnormality through epigenetics of a stress-regulated protein, M6a

研究代表者

本多 敦子 (Honda, Atsuko)

新潟大学・研究推進機構 超域大学院・特別研究員

研究者番号：40467072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、ストレス応答タンパク質M6aが、発生過程において神経成長円錐で最も多く発現する膜タンパク質の一つであり、細胞内外のシグナル伝達分子との相互作用により、細胞外基質依存的な神経極性決定を制御することを見出した。M6aは、海馬にも大脳皮質にも発現し、両神経細胞において極性決定を制御していた。マウス胎児脳でのM6aノックダウン実験は、大脳皮質での急激なM6aの発現低下が、中間帯における遊走神経細胞の極性決定や、軸索伸長も遅延させることを示した。本研究により、M6aのエピジェネティクスな発現抑制が、脳神経回路形成に不可欠な神経極性決定の遅延を引起し得ること、及びその分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that the stress-regulated protein M6a is one of the most abundant membrane protein in the axonal growth cone during the neuronal development, and it regulates the extracellular matrix-dependent determination of neuronal polarity through its interaction with intra-, extracellular signal transduction molecules. M6a was expressed in the cortices as well as hippocampi, and regulates the neuronal polarity determination in both neurons. shRNA knockdown experiment of M6a in the embryonic mice brain showed that acute suppression of M6a in the cerebral cortex delayed morphological transition of migrating cortical neurons from multipolar to mono-(bi-) polar in the intermediate zone and their axon formation. Our data suggest that epigenetic depression of M6a delay the determination of neuronal polarity essential for neuronal network in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経発生 神経極性 神経成長円錐 脳回路形成 RNAi

1. 研究開始当初の背景

神経発達の制御機構の解明は、胎児期の脳の発生過程だけでなく、成体脳における神経の可塑性を理解する上でも重要な意味を持つ。

申請者らはこれまでに、神経発生、特に軸索伸長形成において重要なタンパク質を同定するため、軸索成長円錐のプロテオミクス解析を行った [Nozumi, Honda et al., Proc Natl Acad Sci U S A. Vol. 106(40), p17211-17216(2009)]。その結果、本研究において扱う『糖タンパク質 M6a』が、成長円錐に最も多く発現する膜タンパク質の一つとして同定された。

M6aタンパク質は、ストレス応答タンパク質として発見され [Frasch et al., Biol. Psychiatry, 59, p244-251(2006)]、慢性ストレスにより、その発現が低下することが知られており、主に中枢神経系、海馬の苔状線維のシナプス前終末に豊富に分布している。近年、ストレスや神経可塑性異常の関与する『大うつ病』患者にM6aのSNPsが多いことも明らかになっている [Boks et al., American J. Med. Genetics, 147(6), p707-711(2008)]。さらに、神経可塑性に不可欠な神経新生も、M6aの発現抑制により阻害されることが、マウスES細胞を用いた研究により報告されている [Taniguchi et al. Stem Cells Dev, 17(4)p641-651(2008)]。しかし、M6aの神経細胞における役割や、脳回路形成等における重要性は、全く明らかになっていない。

我々はこれまでに、M6a が、神経極性決定に関与する因子 (M6BP and Rap2) と複合体を形成する事を見出している。

2. 研究の目的

本研究では、ストレスに伴う、糖タンパク質 M6a のエピジェネティックな発現抑制と、脳海馬での神経可塑性異常との関係を明らかにし、神経可塑性に関与するエピジェネティックの標的としての M6a の役割を解明する。

本研究により、M6a の脳神経回路形成への関与が示せるだけでなく、脳形成異常・神経可塑性異常の診断マーカーや治療法など今後の臨床への応用が展望される研究を目指す。

3. 研究の方法

海馬及び大脳皮質神経細胞におけるM6a発現、生体マウス脳の神経発達や神経回路形成におけるM6aの役割の解明。

海馬及び大脳皮質神経細胞におけるM6a発現と神経発達(可塑性)の関係を明らかにするため、海馬、大脳皮質神経細胞において、M6aに対するsiRNAをエレクトロポレーションにより導入し、M6aの発現を急性にノックダウンした神経細胞を作製。M6a発現変化は、ウエスタンブロットにより確認する。これまでの我々の研究から示唆される、M6aの「神経極性決定」や「突起伸長作用」における役割に焦点をおいて、M6aの発現抑制による軸索-樹状突起形成への影響を、免疫組織学や、Green Fluorescent Protein (GFP)融合タンパク質と、siRNA との共発現系を用いたイメージング法により形態学的に解析する。培養神経細胞を用いることにより、細胞外環境を人為的に変化させ、M6aの細胞外環境に応じた神経極性決定や突起伸長における作用を明らかにし、神経発生や可塑性における重要性を示す。

生体マウス脳におけるM6a発現量と神経回路形成の関係を明らかにするため、M6aに対するsiRNAを、マウス 胎児脳の子宮内エレクトロポレーションにより導入し、M6aの発現を急性にノックダウンしたマウスを作製。遺伝子導入後のマウス海馬領域におけるM6a発現量を、リアルタイムPCR (RT-PCR)解析や脳組織の免疫染色で確認、神経極性決定や突起伸長の変化による神経回路や可塑性への影響を、形態的变化、電気生理学的変化により解析する。脳内の神経細胞の動態を可視化するため、GFPをコードするDNA配列を含むプラスミドを

エレクトロポレーションにより導入し、脳スライスでの蛍光観察による解析を行う。

以上の1、2より、神経可塑性が強く観られる海馬や、神経発達や神経回路形成過程が研究されている大脳皮質におけるM6a発現の重要性を示し、ストレス応答などによるM6aの発現低下が、神経可塑性や脳神経回路形成に影響する可能性を提示する。

4. 研究成果

海馬並びに大脳皮質の神経細胞において、M6a に対する siRNA をエレクトロポレーションにより導入し、M6a の発現を急性にノックダウンした神経細胞を作製。M6a 発現低下の神経発生における作用を解析した。ポリ-L-リシン(PLL)コート上での培養では、神経発生への大きな変化は認められなかったが、一方で、細胞外基質ラミニンコート上での神経極性決定や、軸索形成が著しく抑制される事が分かった。通常、海馬及び大脳皮質の神経細胞は、ラミニン基質上において、非常に早い時間過程で、極性決定や軸索形成が行なわれており、特に、神経極性決定過程の stage2 と呼ばれる多極性形態の段階が非常に短く、急速に stage3 と呼ばれる(単)極性形態に移行する事が分かった。M6a の発現低下は、この急速な stage3 への移行を阻害しており、ラミニン基質依存的な神経極性決定や突起伸長において重要な役割を持つ事を明らかにした。又、同様な作用は、海馬、大脳皮質のいずれの神経細胞でも生じる事を明らかにした。

さらに M6a をノックダウンした神経細胞の免疫染色により、M6a の局在化が、以前我々が同定した相互作用分子 (M6BP, Rap2) の共局在化を誘導し、神経極性決定シグナル経路を制御する事を明らかにした。

M6a に対する shRNA を、マウス胎仔脳に

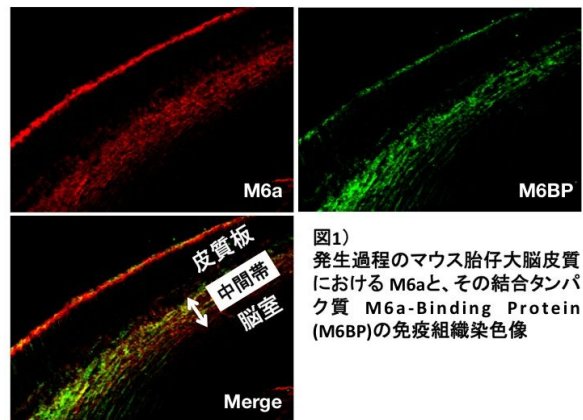


図1) 発生過程のマウス胎仔大脳皮質における M6aと、その結合タンパク質 M6a-Binding Protein (M6BP)の免疫組織染色像

子宮内エレクトロポレーションにより導入し、M6a の発現を急性にノックダウンしたマウスを作製した。

神経発達や神経回路形成過程が研究されている大脳皮質での、shRNA による M6a 発現抑制の作用を解析したところ、導入した M6a ノックダウン神経細胞における軸索伸長の遅延が見られた。更に発生過程初期で解析したところ、大脳皮質の中間帯において、神経細胞の多極から単極細胞への極性変化が遅延している事が明らかになった。M6a は、発生過程の大脳皮質において中間帯に多く発現しており、M6a の発現が大脳皮質中間帯における極性決定過程に重要な役割を持つ事が分かった。

細胞レベルにおける我々の知見は、M6a が大脳皮質だけでなく、海馬においても同様に細胞外基質依存的な極性決定に関与している事を示しており、ストレスによる M6a のエピジェネティクスな発現低下が、脳形成過程において神経回路決定に不可欠な神経極性決定を抑制・遅延させる事が示唆された。

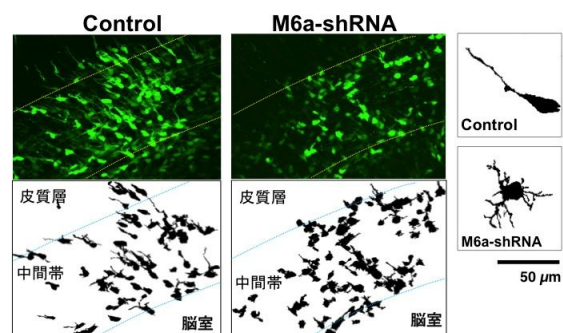


図2) 発生過程のマウス胎仔大脳皮質における GFP発現遺伝子導入神経細胞。コントロール細胞 (control) とM6aノックダウン細胞 (M6a-shRNA)。コントロール細胞では、中間帯から皮質層に遊走する際、多極性から、単・双極性の形態(像: 右上)に変化するが、ノックダウン細胞では、多極性の形態(像: 右下)をするものが多く、皮質層への遊走、および中間帯での軸索形成が遅延する。

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 0 件)

[学会発表](計 10 件)

1) 本多 敦子、伊藤 泰行、五十嵐 道弘

M6aタンパク質複合体の脂質ラフト様膜領域における分布と神経極性決定での役割

第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学会大会合同年会

2014年9月29日(奈良県文化会館)

2) Atsuko Honda, Yasuyuki Ito, Kosei Takeuchi, Michihiro Igarashi.

Laminin-dependent regulation of the neuronal polarity determination via M6a-M6BP-Rap2 ternary complex

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting

Axon Guidance, Synapse Formation & regeneration

2014年9月17日(Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA)

3) 本多 敦子、伊藤 泰行、武内 恒成、五十嵐 道弘

ラフト膜領域における M6a 複合体形成による神経極性決定機構の解明

第 55 回新潟生化学懇話会

2014年6月28日(長岡技術科学大学[新潟])

4) 武内 恒成、本多 敦子、伊藤 泰行、峯田 克彦、五十嵐 道弘

神経極性決定に關与する 4 回膜貫通 glycoprotein M6a の機能解析

第 36 回日本分子生物学会年会

2013年12月3日(神戸国際展示場)

5) 本多 敦子、武内 恒成、五十嵐 道弘

ラミニン刺激に基づく神経極性決定の分子機構

第 36 回日本分子生物学会年会

2013年12月5日(神戸国際展示場)

6) 本多 敦子、武内 恒成、五十嵐 道弘

M6a-M6BP-Rap2 タンパク質複合体を介した大脳皮質におけるラミニン依存性の神経極性決定制御

Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会、第 56 回日本神経化学会大会、第 23 回日本神経回路学会大会)

2013年6月20日(国立京都国際会館)

7) 本多 敦子、武内 恒成、五十嵐 道弘

Asymmetric Localization of Glycoprotein M6a is Involved in Laminin-dependent Determination of Neuronal Polarity

第 35 回日本分子生物学会年会

2012年12月12日(福岡国際会議場)

8) Atsuko Honda, Kosei Takeuchi, Michihiro Igarashi

Glycoprotein M6a-organized protein complex contributes to determination of Society for Neuroscience Annual Meeting; Neuroscience 2012

Glycoprotein M6a-organized protein complex contributes to determination of neuronal polarity

Society for Neuroscience Annual Meeting; Neuroscience 2012

2012年10月14日(New Orleans, LA, USA)

9) 本多 敦子、武内 恒成、五十嵐 道弘

テトラスパニン M6a 糖タンパク質の非対称性局在による神経極性の決定

第 35 回日本神経科学大会; Neuroscience 2012

2012年9月19日(名古屋国際会議場)

10) 本多 敦子、武内 恒成、五十嵐 道弘

Role of Glycoprotein M6a in Neuronal Polarity Determination

第 53 回新潟生化学懇話会

2012年6月30日(新潟大学)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

〔その他〕所属研究室ホームページ

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/bc2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 敦子 (HONDA Atsuko)
新潟大学 研究推進機構 特別研究員
研究者番号：40467072

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：