

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460353

研究課題名(和文)ハンチントン病の病態におけるプロテインホスファターゼ2Cの関与

研究課題名(英文) Targeted disruption of the mouse protein phosphatase PPM1L gene leads to structural abnormalities in the brain.

研究代表者

田村 眞理 (Tamura, Shinri)

東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師

研究者番号：20124604

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまで、小胞体膜上に存在するプロテインホスファターゼであるPPM1Lが、SAPK経路やセラミド輸送の制御に関与していることを報告した。PPM1L KOマウスを解析したところ、成熟したホモKOマウスで、ハンチントン病モデルマウスで観察される前脚や後脚の握り込みが認められた。脳の組織学的な解析を行った結果、側脳室の拡大や線条体尾状核被殻の縮小が観察された。認められた異常は大脳皮質に入出力する軸索線維の異常であると考えられ、大脳皮質の神経細胞もしくは大脳皮質へ投射する神経細胞の軸索形成不全あるいは発達異常が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To explore function of protein phosphatase PPM1L in vivo, we disrupted the mouse gene by gene targeting. The mutant mice were backcrossed with two different inbred strains (C57/BL6 and CBA), but only homozygous mutant mice on CBA background survived to adulthood. The PPM1L^{-/-} mice showed impaired fine motor coordination and balance in the beam walking assay while Y-maze test did not reveal any specific alterations in their learning memory. Histological analyses revealed that PPM1L^{-/-} mice exhibit morphological abnormalities in the central nerve system including reduction of striatum, corpus callosum and anterior commissure. Histochemical analyses suggest that these structural abnormalities are caused by failure of elongation of axons but not by cell death of neurons. These results suggest that PPM1L may play important role during neural development.

研究分野：生化学

キーワード：プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) PP2C の細胞内局在と細胞における機能

プロテインホスファターゼ 2C (PP2C) は、ストレス応答シグナル伝達経路の制御因子として私達が初めて同定したものである。その後、PP2C が、膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質で、細胞質側に触媒ドメインを配した形で小胞体膜に局在するという、セリンスレオニンホスファターゼとしては、大変ユニークな存在様式を持っていることを明らかにした。さらに、PP2C が、セラミド輸送タンパク CERT を小胞体膜上で脱リン酸化し、セラミド輸送を正に制御するという知見を得た。プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの遺伝子数の違いから、プロテインホスファターゼには広い基質特異性を持つ分子種が存在することが予想されていたが、PP2C がストレス応答のみならず、小胞体における脂質輸送にも関わるとい知見は、この分子が固有の分子進化の過程で、多重基質特異性を獲得してきたことを示唆するものであった。

(2) PP2C 遺伝子欠損マウスの表現型

私達は、個体における PP2C の機能を明らかにする目的で PP2C 遺伝子欠損 (KO) マウスを作成した。KO マウスでの行動を観察した結果、ホモ欠損マウスを持ち上げた際に後脚を握りこむような行動が観察された。類似の異常行動は、ハンチントン病 (HD) のモデルマウスをはじめとする神経機能に異常を持つマウスで報告されていた。

2. 研究の目的

本研究課題では、HD 発症に PP2C の機能不全が関与するのではないかとの仮説のもと、私達が作出した PP2C 遺伝子欠損マウスについて、神経回路形成過程の組織学的解析や、成熟期、老齢期における行動学的解析を行い、HD 発症機序への関与の可能性を検討するとともに、神経細胞の各種細胞生物学的現象の制御における PP2C の役割を詳細に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス発生過程における発現解析

本研究で用いた KO マウスでは、 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子が PP2C 遺伝子のエクソン 1 に組み込まれているため、LacZ 遺伝子の発現を指標とした PP2C の発現の追跡が可能である。本研究では、マウス胎児における PP2C の発現を X-gal 染色で解析した

(2) マウス行動解析

遺伝子ノックアウトが活動・運動能力や空間学習・空間記憶などに与える影響を検討するため、ワイヤーハング試験、バランスビーム試験および Y 迷路試験を実施した。

(3) PP2C KO マウスの組織学的解析

PP2C KO マウスの神経構築を解析するため、以下の視点から脳の組織学的解析を行った。神経線維の走行を確認するために髄鞘タ

ンパク質 (myelin basic protein, MBP) を用いた免疫組織染色を施した

大脳交連線維が走行する前交連の冠状断面に対する電子顕微鏡解析を行った

4. 研究成果

(1) マウス発生過程における PP2C の発現の解析

PP2C ゲノムに組み込まれた LacZ 遺伝子の発現を指標としてマウス胚 (9.5 ~ 11.5 日胚) での、PP2C の発現を検討したところ、中枢神経系 (終脳、中脳、後脳、脊髄) および網膜に高い発現が認められた。神経系以外では、心臓血管内皮細胞に高い発現が認められたが、その他の領域では、ほとんど発現が観察されなかった。

(2) PP2C KO マウスの行動解析

実施した 3 種類の行動解析のうち、PP2C KO マウスは、バランスビーム試験において、異常な行動を示した。このことより、PP2C KO マウスでは、協調運動、平衡感覚が損なわれたことが示唆された。

(3) PP2C KO マウスの組織学的解析

PP2C KO と野生型マウスの神経構築を神経解剖学的に精査した結果、以下のような成果を挙げた。

PP2C KO における側脳室の拡大と大脳神経線維束の非薄化

野生型と PP2C KO の成熟期の脳矢状断と冠状断切片に対して、ニッスル染色および神経線維の走行を確認するために髄鞘タンパク質 (myelin basic protein, MBP) を用いた免疫組織染色を施した。その結果、図 1 で示すように PP2C KO の側脳室の著明な拡大が明らかになった。さらに、大脳交連線維が走行する脳梁と前交連、大脳皮質の投射神経線維 (例えば皮質脊髄路や皮質橋路) が走行する内包における MBP 陽性の神経線維の著明な減少が認められた。一方、脳神経核の配置や大脳皮質や小脳皮質などの皮質層構造の明らかな異常は認められなかった。

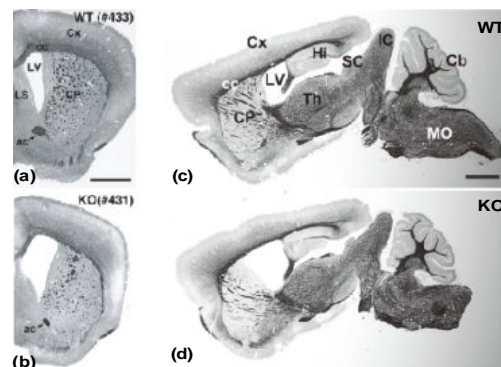


図 1 PP2C ϵ KOマウスの神経構造異常

野生型 (WT) と PP2C ϵ KOマウスの冠断面 (a, b) と矢状断面における MBP に対する免疫染色の結果を示す。側脳室 (LV) の拡大と線条体 (CP) 中を走行する内包の減少、前交連 (ac) や脳梁 (cc) の非薄化が認められた。Cb, 小脳; CP, 線条体; Cx, 大脳皮質; Hi, 海馬; IC, 下丘; MO, 延髄; OB, 嗅球; Th, 視床 scale bar, 1 mm

PP2C KO の前交連における有髄神経線維の減少

光学的顕微鏡レベルで検出された神経線維束の減少が、神経線維の減少あるいは髄鞘形成の障害のいずれに起因するかを明確にするため、大脳交連線維が走行する前交連の冠状断面に対する電子顕微鏡解析を行った。その結果、図2で示すように、単面積あたりの髄鞘を持つ軸索（有髄神経線維）の著明な減少が明らかになった ($p < 0.05$)。したがって、神経線維束の減少は有髄神経線維の数の減少に起因することが示唆された。

皮質神経細胞の減少によるものか、神経線維の回路形成の障害によるものかを確認するために、交連線維の起始である大脳皮質2/3層のマーカーのCux1を用いた免疫組織学的解析により、大脳皮質2/3層の神経細胞の密度を検討した。その結果、遺伝子欠損型と野生型との間に明らかな神経細胞の密度の差は認められなかった。これらの結果より、神経線維の減少は、発達過程の細胞死などによる大脳皮質の神経細胞の減少よりはむしろ、神経突起形成や神経回路形成の異常による可能性が考えられた。今後、Diなどのトレーサーを用いて大脳皮質の神経回路形成について、さらに詳細な神経解剖学的検討が必要と考えられる。

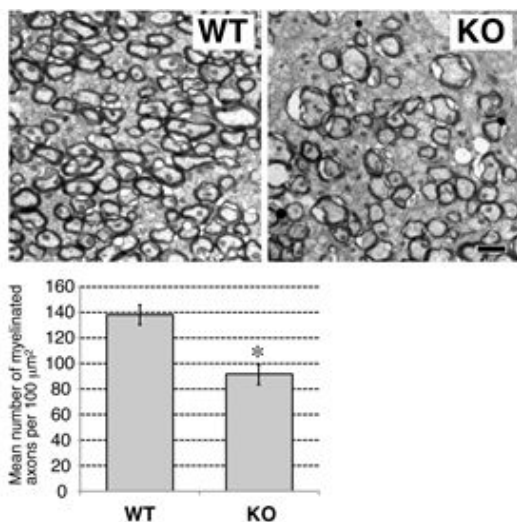


図2 PP2C^o KOマウスの有髄神経線維の減少
野生型(WT)とPP2C^o KOマウスの前交連の断面の電子顕微鏡観察像。グラフは単位面積当たりの有髄神経線維の比較を示す。 $p < 0.05$, scale bar, 100 μm

(4)今後の課題

本研究により、PP2C の神経回路形成における機能関与が個体レベルで初めて明確になった。従来、リン酸化酵素の神経機能の研究結果が多く蓄積されてきたが、脱リン酸化経路に関する知見は少ない。本研究によりPP2C を介する脱リン酸化経路の神経回路形成制御機構の解明への進展が大いに期待される。また、本遺伝子欠損マウスの神経行動学的異常として不随運動などのハンチントン病様の症状を示すことが明らかになっ

ており、本マウスが新たな疾患モデルマウスとして発展する可能性を秘めており、今後さらなる本マウスの表現系の解析が望まれる。

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5件)

1. Takeuchi, Y., Mishima, E., Shima, H., Akiyama, Y., Suzuki, C., Suzuki, T., Kobayashi, T., Suzuki, Y., Nakayama, T., Takeshima, Y., Vazquez, N., Ito, S., Gamba, G., Abe, T., Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* **26**, 271-279, 2015 査読有 DOI: 10.1681/ASN.2013091013
2. 小林孝安, 哺乳動物細胞のPPMファミリーの多彩な機能. *生化学.* **87**, 525-560, 2015 査読無 DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870525
3. Iwashita, S., Suzuki, T., Yasuda, T., Nakashima, K., Sakamoto, T., Kohno, T., Takahashi, I., Kobayashi, T., Ohno-Iwashita, Y., Imajoh-Ohmi, S., Song, S.Y., Dohmae, N., Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and Ser250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions. *Bioscience reports.* **35**, e00228, 2015 査読有 DOI: 10.1042/BSR20150111
4. Matsui, H., Fukuno, N., Kanda, Y., Kantoh, Y., Chida, T., Nagaura, Y., Suzuki, O., Nishitoh, H., Takeda, K., Ichijo, H., Sawada, Y., Sasaki, K., Kobayashi, T., Tamura, S., The Expression of Fn14 via Mechanical Stress-activated JNK Contributes to Apoptosis Induction in Osteoblasts. *J Biol Chem.* **289**, 6438-6450, 2014 査読有 DOI: 10.1074/jbc.M113.536300
5. Chida, T., Ando, M., Matsuki, T., Masu, Y., Nagaura, Y., Takano-Yamamoto, T., Tamura, S., Kobayashi, T., N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *Biochem J.* **449**, 741-749, 2013 査読有 DOI: 10.1042/BJ20121201

〔学会発表〕(計9件)

1. 小林孝安, プロテインホスファターゼ PPM1L の肥満形成への関与のメカニズムの解明. 第7回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会, 自然科学研究機構大会議室 岡崎, 2016年1月29日
2. 岩下 新太郎, 中島 健太郎, 鈴木 健裕, 安田 武嗣, 坂本 泰一, 河野 俊之, 高橋 一朗, 小林孝安, 大野 岩下 淑子, 今城 大海 忍, 堂前 直, 宋 時栄, Two post-translational modifications in mammalian B cnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor: S250 phosphorylation and K268 acetylation in the conserved C-terminal region 第88回日本生化学会大会/第38回日本

分子生物学会年会,神戸国際会議場 神戸,
2015年12月2日

3.藤田 宏介, 篠田 康晴, 永浦 裕子, 草野 理
恵, 渡邊 利雄, 松居 靖久, 阪上 洋行, 佐藤
達也, 舟橋淳一, 大西 素子, 田村 眞理, 小林
孝安, ノックアウトマウスを用いたプロテ
インホスファターゼPPM1Lの新規機能解明. 日
本生化学会東北支部会第81回例会, 東北大学
片平さくらホール仙台, 2015年5月9日

4. Fujita, K., Shinoda, Y., Nagaura, Y., Kusano,
R., Watanabe, T., Matsui, Y., Sakagami, H.,
Ohnishi, M., Tamura, S., Kobayashi, T., Targeted
disruption of the mouse protein phosphatase
PPM1L gene leads to structural abnormalities in
the brain. *11th International Conference on
Protein Phosphatases.*, Gonryo Kaikan Hall,
Sendai, 2014年11月14日

5.小林孝安, 藤田宏介, 篠田康晴, 永浦裕子,
草野理恵, 渡邊利雄, 松居靖久, 舟橋淳一, 佐
藤達也, 阪上洋行, 大西素子, 田村眞理, プロ
テインホスファターゼPPM1Lの欠損は大脳皮
質において軸索線維の異常を引き起こす. 第
87回日本生化学会大会, 国立京都国際会館
京都, 2014年10月16日

6.岩下新太郎, 鈴木健裕, 中島健太郎, 小林孝
安, 安田武嗣, 大野-岩下淑子, 今城-大海忍,
宋時栄, 堂前直, リン酸化クロマチン構成因
子Bcnt/Cfdp1の多様性の分子基盤. 第87回日
本生化学会大会, 国立京都国際会館 京都,
2014年10月15日

7.小林孝安, 千田透子, 安藤正勝, 松木佑, 柁
悠太郎, 永浦裕子, 田村眞理, N-ミリストイル
化はPP2C α およびPP2C β の生理的基質の認識
に必須である. 第86回日本生化学会年会, パ
シフィコ横浜 横浜, 2013年9月12日

8.小林孝安, 千田透子, 安藤正勝, 松木佑, 柁
悠太郎, 永浦裕子, 田村眞理, N-ミリストイル
化はPP2C α およびPP2C β の生理的基質の認識
に必須である. 日本生化学会東北支部会第79
回例会, 東北大学片平さくらホール仙台,
2013年5月11日

9.篠田康晴, 福永浩司, 藤田宏介, 永浦裕子,
田村眞理, 小林孝安, セリンスレオニンホス
ファターゼPP2C ϵ のゴルジ体局在タンパク
質GCP60との機能連関. 日本生化学会東北支
部会第79回例会, 東北大学片平さくらホール
仙台, 2013年5月11日

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 眞理 (TAMURA SHINRI)
東北大学・加齢医学研究所・非常勤講師
研究者番号: 20124604

(2)研究分担者

小林 孝安 (KOBAYASHI TAKAYASU)
東北大学・遺伝子実験センター・准教授
研究者番号: 10221970