

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460385

研究課題名(和文) SPAL-1の高次脳機能における役割と精神疾患の分子機構

研究課題名(英文) Role of SPAL-1 in Higher Brain Function and Molecular Mechanism of Psychiatric Disorders

研究代表者

松浦 憲 (Matsuura, Ken)

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・スタッフサイエンティスト

研究者番号：10625742

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)：本研究では脳高次機能で重要な役割を果たしているSPAL-1が関わる分子機構解明を目的とした。我々は脳内SPAL-1結合因子スクリーニングで生理的結合因子の網羅的解析に成功した。その中でGPCR機能を制御する事が知られているNeurabin2を主要な結合因子として同定し、さらにSPAL-1欠損マウスはNeurabin2欠損マウスとGPCRアゴニスト刺激に対する応答で逆方向の表現型を示し、SPAL-1がNeurabin2を介してGPCRを正に制御している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：SPAL-1 has been proposed to play critical roles in synaptic function in cultured neurons. However, physiological role of SPAL-1 in vivo remains unknown. To tackle this issue, we generated SPAL-1 KO mice. SPAL-1 KO mice showed hyperactivity, learning impairments and autistic-like social behaviour. In search of a clue for molecular role of SPAL-1 in the brain, we performed a rigorous proteomic screen for native complex of SPAL-1 in mouse forebrain and identified the Neurabin family of proteins, which are known for their involvement in GPCR regulation. Subsequent phenotypic analyses revealed that Spal-1 KO mice show opposite phenotypes of Neurabin1 KO and Neurabin2 KO mice in epileptic seizure susceptibility and reduced or enhanced sedative response to agonist stimulations in the GPCR pathway dependent manner. Our results uncover critical roles of SPAL-1 in the higher brain function and may provide novel insight into Neurabin mediated regulation of GPCR signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

(1)本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

SPAL-1 (SPA-1-like-1)はシナプス後肥厚(PSD)に局在し、NMDA 受容体および PSD-95 などと複合体を形成するとされる、低分子量 G タンパク質 Rap に特異的な GTPase 活性化タンパク質である。私たちは、PSD-95 ファミリー結合タンパク質として SPAL-1 を同定し、その基本的な機能解析を行った(*Genes Cells* 7, 607-61, 2002)。SPAL-1 の神経系における研究は、これまでアメリカの Morgan Sheng のグループが中心となり、SPAL-1(別名 SPAR)がスパインの形態制御やシナプス強度のホメオスタシス制御に関与している事などを報告している(*Neuron*, 31, 289-303, 2001; *Neuron*, 58, 571-583, 2008 など)。しかし、これらはすべて神経初代培養細胞に SPAL-1 やその変異体を強制発現させることにより得られた結果であり、生体内での本来の生理機能を反映しているとは言い難い。また、これまでの SPAL-1 の結合因子に関する複数の報告は、どれも酵母ツーハイブリッド法などによる同定であり、真の生理的結合因子の網羅的な解析は行われていない。私たちは、当初より SPAL-1 の生理機能の解明を目指し、SPAL-1KO マウスの作成に成功し、さらに Co-IP MS 解析法により、脳内生理的結合因子の網羅的解析に成功している。

(2)これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

SPAL-1KO マウスは健康で寿命は野生型と相違なかった。私たちは、SPAL-1 が海馬、扁桃体、大脳皮質など高次脳機能を司る領域の神経細胞で特に多く発現していることを見出し、これに着目し種々の行動実験を行った。その結果、海馬依存的な学習実験で KO マウスに著しい障害が見られ、SPAL-1 が海馬に関連した高次脳機能で重要な働きをしている

ことが判明した。当初私たちは、研究報告が多く、SPAL-1 が多量に発現している海馬 CA1 に着目し研究を進めた。しかし、組織学的解析(神経線維の走行、非対称性シナプスの基本構造、スパイン面積・密度、PSD 長など)や基礎的な電気生理学的解析では野生型マウスとの大きな相違は認められなかった。私たちは次に海馬 CA3 に着目し、Rap の下流で働いているとされる MAPK の内、p42/44 の活性が KO マウスの CA3 透明層で著しく落ちている事を発見し、さらに CA3 の苔状線維(MF)-LTP が著しく阻害されている事を明らかにした。また、CA3 領域と関連が深いかんのかんの感受性が KO マウスで大きく亢進し、さらに社会的相互作用テストや居住者・侵入者テストでは自閉症様症状を示すという重要な予備的なデータが得られた。次いで SPAL-1 の生理機能の背景の分子メカニズムに迫るために、野生型と KO マウスの大脳皮質や海馬から、SPAL-1 特異的抗体を用いた Co-IP MS 解析を行い、クラスリン依存的なエンドサイトーシス複合体構成要素(複数)、Na⁺/K⁺-ATP アーゼのサブユニットなど、ノックアウトマウスの表現型と結びつく可能性のあるものを多数同定した。一方、MF-LTP のメカニズムでは Eph 受容体(後シナプス)/ephrin(前シナプス)シグナルが誘導に必要という報告があり(*Science*, 296, 1864-1869, 2002)、SPAL-1 は EphA4 受容体と PDZ ドメインを介して *in vivo* で結合する事が報告されていることから(*J Neurosci*, 27, 14205-14215, 2007)、EphA4 受容体の下流で制御されているグルタミン酸トランスポーター(*Nat Neurosci*, 12, 1285-1292, 2009)の発現を調べたところ、KO マウスの海馬でグルタミン酸トランスポーター-GLAST の発現が、カイニン酸刺激により低下するという予備的データが得られていた。これらの研究成果を踏まえ、SPAL-1 が神経機能を制御するメカニズムとその破綻がヒト精神疾患様表現型

を生じるメカニズムの解析をさらに推進するため、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では SPAL-1 依存的なシグナルの分子機構を明らかにし、その異常が SPAL-1KO マウスの学習・行動障害を引き起こすメカニズムに迫る事を目的とした。

分子機構解明における作業仮説

これまでのデータから、SPAL-1 ノックアウトマウスの最もコアな表現型は、てんかん感受性の著しい増加に代表される、脳神経細胞の興奮性の異常な亢進と考えられた。この表現型に寄与するメカニズムとして、当初は以下の二つを想定した。

1. EphR/Ephrin シグナルを介したグルタミン酸トランスポーターの発現制御
2. Na⁺/K⁺-ATP アーゼ(別名 Na⁺ポンプ)の機能制御

グルタミン酸トランスポーターの発現低下は、細胞外のグルタミン酸濃度上昇に繋がり、てんかん感受性を増進する事が知られている(*Nat Neurosci*, 12, 1285-1292, 2009)。また Na⁺/K⁺-ATP アーゼの機能低下は中枢神経の興奮性亢進、てんかん発作を誘導する(*PNAS*, 106, 14085-90, 2009)。EphR/Ephrin を含めたこれらタンパク質は全て膜タンパク質で、その活性はクラスリン依存的なエンドサイトーシスによる制御を受けているとされる(*Genes Dev*, 24, 2480-2492, 2010; *PNAS*, 97, 3242-3247, 2000 など)。これらの背景から、SPAL-1 の欠損により EphR/Ephrin、グルタミン酸トランスポーター、Na⁺/K⁺-ATP アーゼの膜表面での発現および/あるいは機能が低下している可能性、さらにその低下がクラスリン依存的なエンドサイトーシスの亢進によるものである事などを想定した。

3. 研究の方法

(1)SPAL-1 依存的なシグナルの分子機構解明

野生型および SPAL-1KO マウスの脳組織を用いた生化学的解析および超解像顕微鏡オリンパス SD-OSR を用いた免疫染色など組織学的解析により相互作用候補因子の解析を行った。

(2)個体レベルの表現型の特性解析

GPCR アゴニスト感受性実験では 2 アドレナリン受容体やアデノシン A1 受容体アゴニストの濃度依存的鎮静作用を加速ロータッド装置で解析した。

4. 研究成果

Na⁺/K⁺-ATP アーゼサブユニットの発現量を WB や免疫染色で確認したところ予想に反して SPAL-1 KO 脳組織で大きな差はみられず、さらに ATP アーゼ活性も有意に減じていなかった。そこで、クロスリンク Co-IP MS 解析で 100 以上の生理的相互作用因子候補が得られたが、その真実性の確認のために、MS 上位候補因子およびこれまで報告されている SPAL-1 相互作用候補因子群から WB による二次スクリーニング、超解像顕微鏡を用いた脳内共局在解析による三次スクリーニングを行った。その結果上位候補の多くは WB で特異性を示したが、Na⁺/K⁺-ATP アーゼサブユニットやクラスリン関連因子は他の候補に比較して IP 効率が一桁低かった。MS で検出されなかったあるいは低かった、これまで報告されている PSD-95 や EphA4 を含む相互作用候補因子は特異性を示さなかった(図1)。

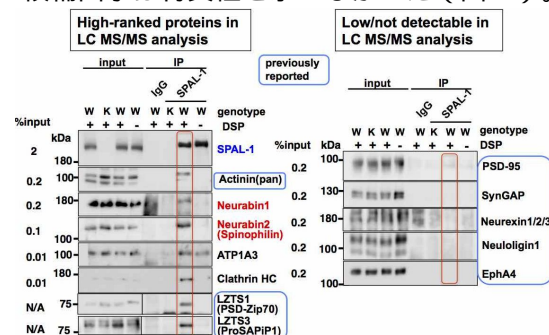


図1: WBによる二次スクリーニング

三次スクリーニングでも Na⁺/K⁺-ATP アーゼサブユニットやクラスリン関連因子およびこ

れまで報告されている PSD-95 や EphA4 を含む相互作用候補因子群はほとんど共同在を示さず、少なくとも大部分は超解像顕微鏡の解像限界 100nm の範囲内では相互作用していない事が示された。MS 解析の上位候補の中で Neurabin ファミリーは全てのスクリーニングで好結果を出し、特に Neurabin 2 は脳全体で高い頻度で SPAL-1 と共同在していた。Neurabin ファミリーは GPCR の機能を制御していることが知られ、Neurabin 2 は $\alpha 2$ アドレナリン受容体の機能を負に制御している。そこで SPAL-1KO マウスで $\alpha 2$ アドレナリン受容体シグナルに影響があるか調べるために、アゴニスト刺激で感受性を調べた。その結果、アゴニスト刺激による鎮静効果に抵抗性がある事が分かった。Neurabin 2 が関与しない別の GPCR アデノシン A1 受容体アゴニスト刺激に対しては逆に鎮静効果が亢進していた(図2)。この事は SPAL-1KO マウスが一

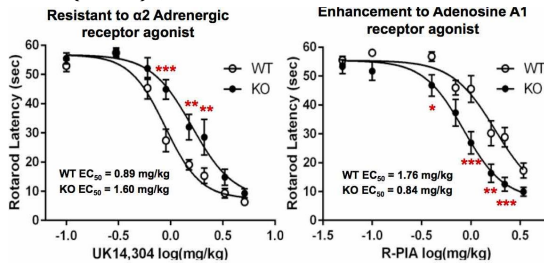


図2: GPCR経路依存的な鎮静効果の変化

般的に鎮静効果に対して抵抗性があるのではなく GPCR 経路依存的な異常が出ていることを示している。 $\alpha 2$ アドレナリン受容体変異マウスなど $\alpha 2$ アドレナリン受容体シグナルの阻害状態ではてんかん感受性が大きく上昇する事が分かっている。逆に Neurabin 2 KO マウスはてんかん感受性が低下している。また $\alpha 2$ アドレナリン受容体シグナルは学習とも関係しており、attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) の治療に $\alpha 2$ アドレナリン受容体アゴニスト guanfacine が用いられている。よって、てんかん感受性増大、活動過多、学習障害などの SPAL-1KO マウスの表現型は $\alpha 2$ アドレナリン受容体シグナルの阻害に起因している可

能性があり、それは SPAL-1 と Neurabin2 の相互作用に依存している可能性が示唆された。また、一連の解析過程で SPAL-1 の少なくとも大部分は PSD には局在せず、PSD-95/NMDAR 複合体にも含まれないという、これまでの認識を大きく変更する実態が明らかになった。その局在は PSD 外の膜直下に広がっており、これは報告されている $\alpha 2$ アドレナリン受容体の局在と一致していた。

日本では医療政策基本指針に精神疾患を新たに加えるなど、現在、精神疾患研究の重要性に対する認識は一段と高まっている。同一家族の同じ遺伝子変異でも異なる精神疾患に罹患する事があるなど (*Nature*, 455, 903-11, 2008)、精神疾患は複雑で、その発症機構は良く分かっていないものが多い。自閉症患者の 70%は知的障害を伴い、30%はてんかんを併発する。逆に知的発達障害の代表的な遺伝性疾患である脆弱 X 症候群では 20-30%が自閉症を、10-20%がてんかんを併発する。このことは、異なる病態の精神疾患が共通の分子機構を基盤としている可能性も示唆している。SPAL-1 ノックアウトマウスの表現型はこれに符合して、学習障害、てんかん感受性亢進、自閉症様症状、加えて多動性や驚愕反応の増大など、注意欠陥多動性障害 (ADHD) や統合失調症等の症状とも類似している。これらの事実から SPAL-1 は高次脳機能における必須の重要因子であり、その生理的機能解明は精神疾患の本態や発症機序の解明に重要な意義を持つと考えられる。本研究で得られた結果から、今後さらに SPAL-1 の機能に関わる詳細な分子メカニズムが明らかになる事が期待される。

尚、本研究で得られた内容については第 39 回日本分子生物学会年会で発表し、また現在学術論文を投稿準備中である。

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 件)

研究者番号：

〔学会発表〕(計 1件)

(4)研究協力者 ()

Ken Matsuura, Kei Iwasaki, Rumi Negishi, Takao Senda, Tsutomu Nakamura, Shigenori Kawahara, Yutaka Kirino, Tadashi Yamamoto, Toshiya Manabe, Tetsu Akiyama

SPAL1 interacts with the Neurabin family of proteins and is involved in a regulation of G Protein-Coupled Receptor signaling

第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 憲 (MATSUURA, Ken)
沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・スタッフサイエンティスト
研究者番号：10625742

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()