

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670089

研究課題名(和文) 新たなアクチン線維制御分子によるシナプスパイオロジーと自閉症の解明

研究課題名(英文) Analysis of novel actin filament binding protein on the synaptic biology and autism.

研究代表者

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：60557966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々が見出したFILIPは成体の脳において梨状皮質の神経細胞で発現し、アクチン線維の動態を制御し、樹状突起上のスパインの形態や機能を制御していることを示した。このFILIPの関連分子であるFRM1 (FILIP-related molecule 1)は大脳皮質や海馬の神経細胞で発現しており、海馬神経細胞におけるFRM1の機能解析が重要であると考えた。海馬培養神経細胞においてFRM1はスパインの形態や細胞膜上のNMDAレセプタ2Aの発現に参与することを見出した。また大脳皮質や海馬の神経細胞でFRM1を欠損したcKOマウスは行動解析において不安様行動を示すことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Non-muscle myosin IIb plays a major role for regulation of actin dynamics in the dendritic spines. However, how myosin IIb directly alters cytoskeletal dynamics through ATPase-driven contraction of actin networks and how myosin IIb function is regulated during the spine maturation are still poorly understood. We found that FRM was a binding partner of myosin IIb and was expressed in the hippocampal and neocortical neurons. We next examined the effects of altered endogenous FRM expression in cultured hippocampal neurons, the knockdown of FRM expression induced the spine length shortening and changed the ratio of cell surface and total expressing NMDA receptor. Recently, we generated FRM conditional knockout mice for understanding of the roles of FRM in the hippocampus and the cerebral cortex. When FRM conditional knockout mice crossed with Emx1-Cre mice, these FRM mutant mice showed the anxiety-like behavior compared with the control mice.

研究分野：Neuroscience

キーワード：myosin actin spine hippocampus

1. 研究開始当初の背景

自閉症の原因となる遺伝子はシナプス関連分子が多く、ミクロな視点からはシナプスでの神経伝達の異常が自閉症と深く関わるものと考えられている。一方、マクロな視点からは、自閉症では大脳皮質の領野間における神経連絡が健常者と比較して減弱していることが指摘されている。これらの事から、自閉症を理解する為にはシナプスの変化と大脳皮質の領野間での神経連絡の異常を関連付けて理解する必要があると考えるに至った。

我々は、アクチン線維と相互作用する非筋肉型ミオシン 2b に結合する新たな分子として FRM1 を見出した。FRM1 は大脳皮質や海馬の神経細胞で発現し、培養した海馬神経細胞においてスパインの形態変化に関与し、また NMDA レセプタの膜移行を制御することを報告してきた。最近、健常者において大脳皮質の領野間で発現量に差が有る遺伝子の中で、自閉症の患者においてはその発現量の差が減少するものが報告され、FRM1 は自閉症の脳において領野間での発現量の差が減少する遺伝子の上位に位置した。これらの事から、FRM1 は大脳皮質において神経細胞のスパインの機能を制御し、自閉症においては FRM1 の発現部位が変化し、大脳皮質の領域間における神経連絡の異常の発端となると考えた。

2. 研究の目的

自閉症の原因となる遺伝子はシナプス関連分子が多く、シナプスでの神経伝達の異常が原因と考えられるが、その発症メカニズムは未だ不明な点が多い。神経伝達においてシナプスの機能変化は重要で、後シナプスである樹状突起上の棘突起(スパイン)の変化はシナプスの可塑性等に深く関わる。我々は新た

なアクチン線維関連分子 FRM1 の解析から、FRM1 がスパインの形態や機能を制御することを見出した。最近、自閉症の患者において、FRM1 が大脳皮質の領野間で発現量に差がある遺伝子群の上位に位置することが報告された。以上の事から、自閉症における FRM1 の発現変化はスパインの機能に影響し、大脳皮質の領域間における神経連絡の異常を生じさせると考えられ、FRM1 の機能解析は自閉症の発症/病態メカニズムの新たな解明に繋がると期待されるものである。

3. 研究の方法

- (1) 大脳皮質や海馬における FRM1 の発現部位を FRM1-*lacZ* マウスを用いて詳細に解析する。
- (2) スパインにおける FRM1 の機能解析を培養神経細胞で行う。
- (3) 生体における FRM1 の機能解析は FRM1 コンディショナル(c) ノックアウト(KO) マウスを用い行い、自閉症に関連した行動学的解析を行う。

4. 研究成果

- (1) FRM1-cKO マウスの作成において、その作成過程で得られた FRM1-*lacZ* マウスは、X-gal 染色により FRM1 遺伝子の発現が解析出来ることが分かった。この FRM1-*lacZ* マウスを用いて FRM1 遺伝子の脳における発現パターンを詳細に解析した。この解析には固定した脳をピプラトームでスライスを作成し、X-gal 染色を行って解析を行った。FRM1 は生体の海馬の神経細胞で発現が認められ、また大脳皮質の特定の層の神経細胞で発現していた。また他の領域の神経細胞にも

lacZ のシグナルが認められた。今後は自閉症モデルマウスで FRM1 の発現を解析することにより、自閉症と FRM1 の関連が明に出来ると考えている。

- (2) 海馬培養神経細胞において FRM1 の発現を抑制すると、スパインの全長が変化し、また細胞膜上の NMDA レセプタ 2A の発現が増加することを見出した。また生化学的な解析により、FRM1 は NMDA レセプタの細胞内領域に結合することも示した。この FRM1 と NMDA レセプタの結合にはアクチン線維が関わっていることも見出した。
- (3) 大脳皮質や海馬神経細胞で FRM1 を欠損したマウスを作成するために、FRM1 の flox マウスと大脳皮質や海馬の神経細胞で Cre 組換え酵素を発現する Emx1-Cre マウスと交配し、FRM1 コンディショナルノックアウトマウス(cK0)を作成した。大脳皮質や海馬の神経細胞で FRM1 を欠損した cK0 マウスでは、オープンフィールドを用いた行動解析によって FRM1-cK0 マウスが不安様行動を示すことを見出した。

FRM1 は NMDA レセプタの細胞内領域に結合し、神経細胞の膜表面に発現する NMDA レセプタの数を制御する分子と考えられる。また FRM1-cK0 マウスで観察される不安様行動の原因は、神経細胞の細胞膜上に発現する NMDA レセプタの数が変化することにより引き起こされているのではないかと考えて解析を進めている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

- (1) Yagi H, Oka Y, Komada M, Xie MJ, Noguchi K, Sato M. Filamin A interacting protein plays a role in proper positioning of callosal projection neurons in the cortex. *Neurosci Lett*. 2016 Jan 26;612:18-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.049. Epub 2015 Dec 2. (査読有)
- (2) Okamoto M, Iguchi T, Hattori T, Matsuzaki S, Koyama Y, Taniguchi M, Komada M, Xie MJ, Yagi H, Shimizu S, Konishi Y, Omi M, Yoshimi T, Tachibana T, Fujieda S, Katayama T, Ito A, Hirotsune S, Tohyama M, Sato M. DBZ regulates cortical cell positioning and neurite development by sustaining the anterograde transport of Lis1 and DISC1 through control of Ndel1 dual-phosphorylation. *J Neurosci*. 2015 Feb 18;35(7):2942-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5029-13.2015. (査読有)
- (3) Yagi H, Nagano T, Xie MJ, Ikeda H, Kuroda K, Komada M, Iguchi T, Tariqur RM, Morikubo S, Noguchi K, Murase K, Okabe M, Sato M. Filamin A-interacting protein (FILIP) is a region-specific modulator of myosin 2b and controls spine morphology and NMDA receptor accumulation. *Sci Rep*. 2014 Sep 15;4:6353. doi: 10.1038/srep06353. (査読有)
- (4) Jiang C, Wen Y, Kuroda K, Hannon K, Rudnicki MA, Kuang S. Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy. *Dis Model Mech*.

2014 Aug;7(8):997-1004. doi:

10.1242/dmm.015917. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

- (1) Kazuki Kuroda, Hideshi Yagi, Min-Jue Xie, Yugo Fukazawa, Yuichiro Oka, Tokuichi Iguchi, Makoto Sato, FILIP-related molecule binds to NMDA receptor and controls spine maturation and synaptic function of the hippocampal neuron、ポスター、Society For Neuroscience 2015、2015年10月17日～21日、米国シカゴ
- (2) 黒田一樹、謝敏カク、深澤有吾、猪口徳一、岡雄一郎、八木秀司、佐藤真、海馬神経細胞における FILIP 関連分子の機能解析、口頭発表、第 75 回日本解剖学会中部支部会、2015 年 10 月 3 日～4 日、福井県永平寺町
- (3) Kazuki Kuroda, Hideshi Yagi, Min-Jue Xie, Minoru Omi, Yuichiro Oka, Tokuichi Iguchi, Makoto Sato, FILIP-related molecule binds to NMDA receptor and controls spine maturation and synaptic function of the hippocampal neuron、ポスター、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日～31 日、兵庫県神戸市
- (4) 謝敏カク、八木秀司、猪口徳一、岡雄一郎、黒田一樹、柚崎通介、松田信爾、石川保幸、佐藤真、Phldb2 は LTD 誘導後のシナプスでの AMPA 受容体のエンドサイトーシスを制御する、口頭発表、第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学大会、2014 年 9 月 29 日～10 月 1 日、奈良県奈良市

- (5) 謝敏カク、八木秀司、猪口徳一、黒田一樹、岡雄一郎、柚崎通介、松田信爾、石川保幸、佐藤真、Phldb2 は樹状突起スパインの成熟および可塑性を制御する、ポスター、第 37 回日本神経科学大会、2014 年 9 月 11 日～13 日、神奈川県横浜市
- (6) 黒田一樹、八木秀司、謝敏カク、尾身実、猪口徳一、岡雄一郎、佐藤真、神経細胞のスパインにおける NMDA 受容体と結合する FILIP 関連分子の機能解析、第 120 回日本解剖学会、第 92 回日本神経化学会大会、2014 年 3 月 21 日～23 日、兵庫県神戸市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒田 一樹 (Kuroda, Kazuki)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：60557966

(2)研究分担者

佐藤 真 (Sato, Makoto)
大阪大学・連合小児発達学研究所・教授
研究者番号：10222019

八木 秀司 (Yagi, Hideshi)・教授
兵庫医科大学・医学部
研究者番号：10303372

謝 敏カク (Xie, Min-Jue)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：40444210