

5. 神経制御学部

研究の概況

永田 浩一

神経制御学部門は、神経機能障害の病態やそれらを引き起こすメカニズムを分子レベルで明らかにし、関連する分子の遺伝子解析や蛋白質の測定等による診断法の確立を目指している。さらに、薬剤を用いた効率的な神経機能の改善や、神経変性の予防、進行防止等の治療法確立を目標に研究を進めている。今年度は、4月に岡本賢一が神経変性予防研究室長として赴任したが、10月にマウント・サイナイ病院ルネンフェルド研究所（カナダ）へ転出した。

発達障害の多くは染色体や遺伝子の異常が原因となっており、知的障害に関しては原因遺伝子の多くが神経シナプスの形成や機能発現に関与することが知られている。臨床薬理研究室では、神経細胞の形態とシナプスの形成を制御する細胞内情報伝達機構の解析を行っている。特に、神経細胞におけるシグナル伝達分子と極性関連分子に焦点を当てている。これらの分子群には神経組織の機能発現において重要な役割を果たし、構造・機能における異常が知的障害を引き起こすものが報告されている。そこで、知的障害の病因解明と治療法開発に貢献すべく、神経におけるシグナル伝達分子と極性関連蛋白質の機能解析を進めた。本年度は、セプチンやアダプター蛋白質（vinexin と p140Cap）の研究を継続発展させることに加え、遺伝学的に統合失調症との関連が確実視されている dysbindin-1 の解析に取り組んだ。

セプチンは神経組織に多量に存在し、神経細胞の発達や極性維持・決定に重要な役割を果たすと考えられている GTP 結合蛋白質である。ダウン症での発現異常が報告されるなど、神経疾患や遺伝性疾患との関連においても注目を集めている。セプチン研究に関しては、Sept8 による神経伝達物質の放出制御メカニズムの生化学分子細胞生物学的解析を行った。一方、子宮内胎仔脳遺伝子発現法を導入し、発達期における神経回路網構築における Sept 4 と Sept14 の機能を、マウス個体および分子レベルで解析した。また、Sept12 の性状・機能を解析するために特異抗体の作成を試みた。

アダプター蛋白質（vinexin と p140Cap）は神経シナプスに多量に存在し、神経伝達物質の放出やシナプスにおけるシグナル伝達に関与すると考えられている。神経伝達物質の放出とインスリン分泌で機能する分子機構は共通性が高いことが知られている。そこで、神経伝達物質の放出におけるこれらの蛋白質の機能を解析するために、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞由来の INS-1 細胞によるインスリン分泌をモデル系として立ち上げた。さらに、p140

Cap の結合蛋白質 Abi-1 および dysbindin-1 の性状解析をすすめ、特異抗体の作製を行うとともに結合部位の同定を行った。

dysbindin-1 は種々の組織で発現し蛋白質輸送への関与が報告されている。私共は、dysbindin-1 が p140Cap と相互作用し、前シナプスにおける神経伝達分子の放出に関与する可能性を示した。一方、私共は、dysbindin-1 が後シナプスにも存在し、神経発達期のスパイン形成に関与する可能性を示した。従来、dysbindin-1 の遺伝子異常は、シナプスにおける情報伝達障害を惹起することで統合失調症の病態に関連すると考えられていたが、私共の知見は、dysbindin-1 が神経回路網の発達障害を原因とする統合失調症の病態にも深く関連することを示したことになる。現在、dysbindin-1 の機能解明を目指しては、dysbindin-1 欠損マウスを用いた個体レベルの解析も遂行中である。

自閉症の発症には遺伝子の異常が深く関係すると考えられ、最近、いくつかの関連遺伝子が研究されている。神経変性予防研究室稲熊主任研究員は、CADPS2 (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion) 遺伝子の発現と自閉症との関連性を調べるため、昨年度に引き続き中央病院児童精神科、同内科及びこばと学園の共同研究者とともにコロニー・プロジェクト研究を行った。中央病院の入院及び外来患者を対象に保護者への説明を行い、同意の得られた方について CADPS2 遺伝子の発現解析を行った。その結果、中央病院にかかる自閉症児・者の中にも CADPS2 エクソン 3 スキップ型を発現する例があることがわかり、このタイプをひとつのクラスターとして捉えられる可能性が示唆された。また、このプロジェクト研究を通じて中央病院、こばと学園、研究所が連携して行う診断態勢を整えることができた。

今年度は文部科学省科学研究費補助金（特定領域研究 1 件、若手研究 B 2 件）、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 C 1 件、若手スタートアップ研究 1 件）、コロニー・プロジェクト研究 1 件、その他の財団より 2 件の助成を受けた。

神経伝達物質の放出における p140Cap の性状・機能解析

永田浩一、伊東秀記、篠田友靖、須藤香織、岩本郁子、森下理香

p140Cap はがん細胞の浸潤・転移に関与するアダプター蛋白質であるが、ラット臓器における発現プロファイルを解析したところ、脳と精巣に特異的に発現していた。一方、ラット脳での発現は発達依存的に増加し、成獣脳では神経細胞の興奮性シナプスと共局在していた。一方、免疫組織化学的解析で膵臓ランゲルハンス島 β 細胞にも

非常に強い発現が認められた。これらの結果は、p140Capが神経伝達物質とインスリンの分泌に関与し、これらの分泌過程は共通の分子機構によって制御されることを示唆する。そこで、神経伝達物質の放出におけるp140Capの機能を解析するために、膵臓ランゲルハンス島β細胞由来のINS-1細胞によるインスリン分泌をモデル系として立ち上げた。INS-1はグルコース刺激や脱分極刺激によりインスリンを分泌し、前者の刺激による分泌は蛋白質リン酸化阻害剤スタウロスポリンにより完全に阻害された。現在までに、p140CapのshRNA発現ベクターを発現するINS-1細胞株を樹立しており、p140Capがインスリン分泌に果たす機能を分子レベルで解析できる態勢が整いつつある。さらに、p140Capの結合蛋白質vinexin、Abi-1、dysbindin-1およびp130Casの生化学・分子細胞生物学的な性状解析も進め、神経伝達物質の放出に果たす生理的意義を解析する基礎とした。これまでの解析で、p140Capはラット脳内でアダプター蛋白質vinexinと生理的な複合体を形成し得るが、膵臓ランゲルハンス島では相互作用しない可能性が示された。その他のp140Cap結合蛋白質についても同様の解析を進め、神経伝達物質とインスリンの分泌において共通に用いられるメカニズム、および各々に特異的な分子基盤を解明する端緒を得たい。

大脳皮質発生におけるSept14の機能

篠田友靖、須藤香織、伊東秀記、岩本郁子、森下理香、永田浩一

Sept14は神経特異的な発現を示すSeptinファミリー分子のひとつである。発生過程の大脳皮質における発現パターンから、Sept14がこの形成過程において何らかの役割を果たす可能性が考えられた。これを検証する為にRNAi法と子宮内遺伝子導入法を組み合わせ用いて、胎生期マウスの脳室帯細胞でのSept14の発現抑制を行い、皮質錐体神経細胞の分化および遊走過程におけるSept14の機能を検証した。その結果、Sept14発現抑制細胞が局在の異常を示すことが明らかになった。神経幹細胞の分化過程はSept14の発現抑制による影響を受けなかったことから、Sept14は神経細胞の遊走に機能する可能性が示唆された。さらに、この分子メカニズムを解明する目的で相互作用分子のスクリーニングを行い、神経特異的septinファミリー分子のひとつであるSept4を候補として見出した。免疫沈降実験の結果、生理条件下においてSept14とSept4が相互作用すること、およびSept14のC末側に存在するcoiled-coilドメインがSept4との相互作用に必要であることが明らかになった。さらにSept14の発現抑制時と同様に、Sept4発現抑制細胞も、皮質板において局在異常を生じることを見出した。皮質板を移動中の神経細胞の形

態に着目した結果、Sept14およびSept4の発現抑制細胞ではLeading processの長さが短縮していることが明らかになった。海馬培養神経細胞にてSept14およびSept4の発現抑制を行ったところ、軸索および樹状突起の伸張が抑制された。これらの結果から、Sept14およびSept4は神経細胞の突起伸張に関与し、それによって神経細胞の遊走に機能的に関与することが示唆された。

セプチンファミリー分子Sept14の性状解析

須藤香織、篠田友靖、伊東秀記、岩本郁子、森下理香、永田浩一

Septinは酵母から哺乳類まで存在する、高度に保存されたGTP/GDP結合タンパク質である。哺乳類では14個のseptinホモログ(Sept1~Sept14)が存在しており、分子ファミリーを形成することが知られている。一部のseptinファミリー分子は神経組織に特異的に発現することが報告されているが、その生理学的意義もしくは分子メカニズムについては不明な点が多い。我々はこれまで研究が進んでいなかった神経組織に高発現するセプチン、Sept14に着目し、その性状解析を行った。始めにSept14特異的抗体を作成し、これを用いて成獣マウスの各組織におけるSept14の発現を解析した。その結果、Sept14のほぼ神経組織特異的な発現が認められた。次に発生期の大脳におけるSept14の発現をイムノブロットにて検討した結果、胎生14日前後を境に急激な発現上昇が認められた。これは他の神経特異的Septin分子とは明らかに異なる興味深い結果である。さらに免疫組織染色の結果、Sept14は発生期大脳皮質の中間帯上部から皮質板にかけて発現することが明らかになった。培養海馬神経細胞を用いてSept14の細胞内局在を検討した結果、Sept14は軸索先端領域をのぞく細胞質に局在することが認められた。これらの結果から、Sept14が個体レベルおよび細胞レベルで神経発生に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

神経細胞の樹状突起スパイン形成におけるdysbindin-1の役割

伊東秀記、森下理香、篠田友靖、須藤香織、岩本郁子、永田浩一

統合失調症の発症に、遺伝的および環境的要因による神経細胞の発達障害が関与している可能性が注目されている。近年の分子遺伝学的解析により、統合失調症感受性遺伝子がいくつか同定されており、その1つにdysbindin-1がある。dysbindin-1は、神経伝達物質の放出を制御しているとされているが、その生理機能に関しては未解明の

点が多い。私共は、ラット脳組織における dysbindin-1 の性状解析をおこない、結合分子として、神経細胞の樹状突起形態形成との関連が示唆されている WAVE2 および Abi-1 を同定した。免疫沈降法により結合領域を解析したところ、dysbindin-1 の coiled-coil 領域と WAVE2 の WHD 領域および Abi-1 の coiled-coil 領域が結合することが分かった。また、dysbindin-1 は、WAVE2 / Abi-1 複合体の形成を促進することがわかった。RNAi 法により、初代培養海馬神経細胞の dysbindin-1 の発現を低下させると、異常に細長く未成熟な樹状突起スパインの形成が観察された。これらのことから、dysbindin-1 は、WAVE2 / Abi-1 複合体と協調して、神経細胞の樹状突起スパイン形成を制御していると考えられた。

CADPS2 遺伝子の発現と自閉症との関連について

稲熊 裕、吉村育子¹、菱田 学¹、石井 卓¹、吉川 徹¹、吉田 太¹、小森 拓²、武井史郎³、濱武通子⁴、細川昌則⁴、仙波禮治⁵、仙波りつ子⁶、定方哲史⁶、古市貞一⁶

【背景】昨年引き続き自閉症における CADPS2 遺伝子の発現解析を行った。本年度は検体数を増やすことを図った。CADPS2 は、2007 年 Sadakata らによって、自閉症者の一部でエクソン 3 スキップ型のスプライシング・バリエーションが見られることが報告されている。CADPS2 は脳由来神経栄養因子 BDNF の分泌に関与し、神経ネットワークの形成に重要と考えられている。

【目的】CADPS2 の臨床医学的価値の検証を行い、遺伝子異常や発現異常と自閉症との関連を見出し、早期診断法の確立に結びつける。

【対象と方法】中央病院入院患者と外来患者の血中白血球から RNA を抽出し、エクソン 3 でコードされる領域を挟むプライマーで RT-PCR を行った。プライマーは昨年度より狭い領域を増幅するようにデザインした。

【結果】自閉症およびアスペルガー症候群の 86 名において女性 3 名（うち 1 名はアスペルガー症候群）と男性 1 名で CADPS2 転写物のエクソン 3 スキップ型が検出された。健常者 29 名はすべて野生型であった。さらに症例数の蓄積が必要であるが、低年齢層での頻度が高い傾向が見られた。

【考察】エクソン 3 スキップ型 CADPS2 の検査が一部の自閉症の診断に有用である可能性がより高くなった。また、この型の増加現象を示す症例を一群としてクラスタリングできる可能性が考えられた。低年齢層において検出頻度が高い傾向が見られ、今後さらに低年齢層での詳細な検討が必要であることが示唆された。

¹ 中央病院、² こばと学園、³ 病理学部、⁴ 所長研究室、⁵ 総長、

⁶ 理研

研究業績

著書・総説

篠田友靖：DISC1 依存的な神経軸索伸張メカニズム。
Medical Science Digest 34, pp 292-293, 2008.

原著論文

Tanabe K¹, Takai S¹, Matsushima-Nishiwaki R¹, Kato K, Dohi S¹, Kozawa O¹ (1Gifu Univ) : Alpha2 adrenoceptor agonist regulates protein kinase C-induced heat shock protein 27 phosphorylation in C6 glioma cells. *J Neurochem* 106 : 519-528, 2008.

Maimaitiyiming M¹, Kumanogoh H¹, Nakamura S², Nagata K, Suzuki T¹, Maekawa S¹ (1Kobe Univ, 2Natl Inst Neurosci) : Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain. *J Neurochem* 106 : 1175-1183, 2008.

Ito H, Atsuzawa K¹, Sudo K, Di Stefano P², Iwamoto I, Morishita R, Takei S, Semba R, Defilippi P², Asano T, Usuda N¹, Nagata K (1Fujita Health Univ, 2Univ Turin) : Characterization of a multi-domain adaptor protein, p140Cap, as part of a presynaptic complex. *J Neurochem* 107 : 61-72, 2008.

Ito H, Atsuzawa K¹, Morishita R, Usuda N¹, Sudo K, Iwamoto I, Mizutani K², Katoh-Semba R, Nozawa Y³, Asano T, Nagata K (1Fujita Health Univ, 2Gifu Univ, 3Gifu Int Inst Biotech) : Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 to synaptophysin. *J Neurochem* 108 : 867-880, 2008.

Matsushima-Nishiwaki R¹, Takai S¹, Adachi S¹, Minamitani C¹, Yasuda E^{1,2}, Noda T^{1,2}, Kato K, Toyoda H², Kaneoka Y², Yamaguchi A², Kumada T¹, Kozawa O¹ (1Gifu Univ, 2Ogaki Mun Hosp) : Phosphorylated heat shock protein 27 represses growth of hepatocellular carcinoma via inhibition of extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 283 : 18852-18860, 2008.

Hayashi K¹, Takai S¹, Matsushima-Nishiwaki R¹, Hanai Y^{1,2}, Kato K, Tokuda H^{1,2}, Kozawa O¹ (1Gifu Univ, 2Natl Hosp Geriat Med) : (-)-Epigallocatechin gallate reduces transforming growth factor beta-stimulated HSP27 induction through the suppression of stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase in osteoblasts. *Life Sci* 82 : 1012-1017, 2008.

Caron D¹, Winstall E¹, Inaguma Y, Michaud S^{1,2}, Lettre F², Bourassa S¹, Kelly I¹, Poirier GG¹, Faure RL¹, Tanguay RM² (1CHUL Res Ctr, 2Univ Laval) : Proteomic characterization of mouse cytosolic and membrane

prostate fractions: High levels of free SUMO peptides are androgen-regulated. *J Proteome Res* 7 : 4492-4499, 2008.

Nagata K, Ito H, Iwamoto I, Morishita R, Asano T : Interaction of a multi-domain adaptor protein, vinexin, with a Rho-effector, Rhotekin. *Med Mol Morphol* 42 : 9-15, 2009.

その他印刷物

稲熊 裕, 吉村育子¹, 菱田 学¹, 石井 卓¹, 吉川 徹¹, 吉田 太¹, 小森 拓², 武井史郎, 濱武通子, 細川 昌則, 仙波禮治³, 古市貞一⁴ (¹中央病院, ²こぼと学園, ³コロニー総長, ⁴理化学研究所): *CADPS2* 遺伝子のスプライシング異常と自閉症との関連について. 平成 20 年度愛知県心身障害者コロニープロジェクト研究報告書, pp 4-6, 2009.

学会発表

伊東秀記, 武井史郎, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 仙波禮治, 永田浩一 : マルチドメイン・アダプター蛋白質 p140Cap のシナプスにおける性状解析. 日本生化学会中部支部会例会 (岐阜) 2008.5.24.

篠田友靖, 田谷真一郎¹, 貝淵弘三¹ (¹名古屋大院): 統合失調症発症脆弱性因子 DISC1 の機能解析. 日本生化学会中部支部会例会 (岐阜) 2008.5.24.

Maekawa S¹, Maimaitiyiming M¹, Kumanogoh H¹, Nakamura S², Nagata K, Suzuki T¹ (¹神戸大, ²精神神経セ): Biochemical characterization of membrane-associated septin from rat brain. 日本神経科学会 (東京) 2008.7.10.

伊東秀記, 森下理香, 須藤香織, 岩本郁子, 篠田友靖, 岡本賢一, 永田浩一 : Biochemical and histological analysis of MAGI-1 in rat brain. 日本神経化学会 (富山) 2008.9.11.

篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岡本賢一, 岩本郁子, 森下理香, 永田浩一 : Sept14 の皮質神経細胞局在化における機能. 日本神経化学会 (富山) 2008.9.11.

永田浩一, 伊東秀記, 武井史郎, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 仙波禮治 : マルチドメイン・アダプター蛋白質 p140Cap のプレシナプスにおける機能. 日本神経化学会 (富山) 2008.9.12.

伊東秀記, 武井史郎, 須藤香織, 可児利英¹, 岩本郁子, 森下理香, 浅野富子, 仙波禮治, 大塚健三¹, 永田浩一 (¹中部大): マルチドメイン・アダプター蛋白質 p140 Cap のプレシナプスにおける機能解析. 日本臨床分子形態学会 (福岡) 2008.10.4.

稲熊 裕, 熊谷俊幸¹, 鈴木基正¹, 濱武通子 (¹中央病院): Marinesco-Sjögren 症候群原因遺伝子 *SIL1* の新規変異と機能解析. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008.12.9.

伊東秀記, 森下理香, 須藤香織, 岩本郁子, 篠田友靖, 岡本賢一, 永田浩一 : Biochemical and cell biological analysis of dysbindin-1 in rat brain. 日本分子生物学会年会, 日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008.12.10.

篠田友靖, 伊東秀記, 梶田和男¹, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 岡本賢一, 永田浩一 (¹岐阜大): Possible functions of a multi domain adaptor protein, p140Cap in exocytosis. 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008.12.10.

篠田友靖, 伊東秀記, 須藤香織, 岩本郁子, 森下理香, 岡本賢一, 永田浩一 : Sept14 is involved in the proper positioning of cortical pyramidal neuron. 名古屋大学大学院医学系研究科グローバル COE 国際シンポジウム (名古屋) 2009.1.23.

Nagata K, Ito H, Atsuzawa K¹, Morishita R, Usuda N¹, Sudo K, Iwamoto I, Mizutani K², Katoh-Semba R, Nozawa Y³, Asano T (¹藤田保健衛生大, ²岐阜大, ³岐阜国際バイオ研): Sept8 controls the binding of vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) to synaptophysin. 北米神経科学会 (Washington DC, USA) 2008.11.18.

Nagata K, Ito H, Atsuzawa K¹, Sudo K, Di Stefano P², Iwamoto I, Morishita R, Takei S, Semba R, Defilippi P², Asano T, Usuda N¹ (¹藤田保健衛生大, ²チューリン大): Possible role of in neurotransmitter release and signaling of a multi-domain adaptor protein, p140 Cap, in the presynapse. 米国細胞生物学会 (San Francisco, USA) 2008.12.16.

Ito H, Morishita R, Sudo K, Iwamoto I, Shinoda T, Okamoto K, Nagata K: Biochemical and histological analyses of dysbindin-1 in rat brain. 米国細胞生物学会 (San Francisco, USA) 2008.12.16.

鈴木基正¹, 丸山幸一¹, 安藤はるひ¹, 水野誠司¹, 熊谷俊幸², 濱武通子, 稲熊 裕, 柿澤裕子³, 糸見和也³ (¹中央病院, ²こぼと学園, ³あいち小児医療セ): Marinesco-Sjögren 症候群を疑った 8 症例の遺伝子解析. 日本小児神経学会東海地方会 (名古屋) 2009.1.24.

Nagata K, Shinoda T, Ito H : Possible roles of Sept14 and Sept4 in neural cell polarization during brain development. The Spring Janelia Farm Conference "Structure and Function of Septins" (Washington DC, USA) 2009.3.22.

Shinoda T, Ito H, Sudo K, Iwamoto I, Morishita R, Okamoto K, Nagata K : Sept14 is involved in the

proper positioning of cortical pyramidal neurons. The Spring Janelia Farm Conference “Structure and Function of Septins” (Washington DC, USA) 2009.3.22.

講演など

永田浩一, 篠田友靖, 伊東秀記: 神経発達過程におけるセプチンの機能解析. 文部科学省科学研究費補助金特定領域「G蛋白質シグナル」班会議 (越後湯沢) 2008.9.19.

その他の研究活動

海外活動

永田浩一: 北米神経科学会に出席・発表, およびアルバート・アインシュタイン医科大学での講演
2008.11.11. ~ 2008.11.21.
永田浩一: 米国細胞生物学会年会に出席・発表 (アメリカ合衆国) 2008.12.13. ~ 2008.12.19.
伊東秀記: 米国細胞生物学会年会に出席・発表 (アメリカ合衆国) 2008.12.13. ~ 2008.12.18.
永田浩一: ハワード・ヒューズ医学財団ジャネリア・ファーム会議 “セプチンの構造と機能” に出席・発表 (アメリカ合衆国) 2009.3.21. ~ 2009.3.27.

教育活動

永田浩一: 神経生化学 (名古屋大学大学院医学研究科) 2008.4.1. ~ 2009.3.31.
永田浩一: 組織学 (藤田保健衛生大学) 2008.4.1. ~ 2009.3.31.