

5. 神経制御学部

研究の概況

永田 浩一

神経制御学部は、神経擬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龍の改善や、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、須藤香織リサーチレジデントが任期満了により退職した。一方、岐阜大学医学部から村瀬香奈大学院生を研修生として迎えた。

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。臨床薬理学研究室では、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、神経細胞における細胞骨格関連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例も多数報告されている。そこで、知的障害の病因解明と治療法開発に貢献すべく、神経における細胞骨格関連分子（セプチン）と極性関連分子（アダプター蛋白質 *vinexin*, *ArgBP2*, *p140Cap* など）の機能解析を進めた。本年度も、上記の分子群に関する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認されているアダプター蛋白質 *dysbin - din-1* の機能解析に取り組んだ。

セプチンは神経組織に大量に存在し、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。ダウン症や統合失調症、パーキンソン病、家族性神経痛性筋萎縮症の病態との関連性が報告されるなど、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うと共に、*Sept8* のノックアウトマウスの作成に着手した。一方、子宮内胎仔脳遺伝子発現法を用いて、発達期における神経組織構築における *Sept1* と *Sept14* の機能を、マウス個体および分子レベルで解析した。

アダプター蛋白質 (*vinexin*, *ArgBP2*, *p140Cap*, *Abi-1* など) 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* 細胞をモデル系として細胞生物学的解析を遂行した。さらに、神経細胞や種々の培養細胞を用いて *p140Cap* の結合蛋白質 *Abi-1* および *dysbindin-1* の性状解析をすすめた。

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* が後シナプスに存在し、アクチン細胞骨格制御因子 *WAVE2* やアダプター蛋白質 *Abi-1* と相互作用することで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、シナプスにおける神経伝達物質放出異常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。現在、*dysbindin-1* の分子レベルでの機能解明を目指し種々の培養細胞を用いた解析を遂行中である。

神経変性予防研究室では、ミオパチーを中核症候とし、常染色体劣性遺伝で、小脳萎縮、精神運動発達遅滞、幼児期発症の両側性白内障を特徴とする疾患であるマリネスコ・シェーグレン症候群 (*MSS*) の遺伝子解析を中心とした研究を進めた。近年、*MSS* の原因として *HSPA5* (*BiP/HSP70*) の co-chaperone である *SIL1* の変異が明らかとなった。*SIL1* は小胞体に局在する糖タンパク質で *HSPA5* の ATPase ドメインに結合し nucleotide exchange factor として働き、蛋白質の折りたたみに関与する。*SIL1* の遺伝子変異は日本人を含む多様な人種において複数種類の変異が報告されているが、これまでに我々が調べた *MSS* の徴候を示す 8 名の独立した患者のうち 4 名において 4 種瀬の変異が見つかり、このうち 1 種類は新規の変異であった。現在、細胞生物学的解析を進めている。

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 B2 件)、日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 B1 件、若手スタートアップ研究 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 の機能解析

永田浩一、岩本郁子、伊東秀記、須藤香織、篠田友靖、森下理香

これまでに私共は、アダプター蛋白質 *p140Cap* が、1) ラット脳において発達依存的に蛋白質発現が増加すること、2) 成獣脳では神経細胞の興奮性シナプスと共局在すること、3) 細胞レベルで SNARE 蛋白質 *Syntaxin-1A* やシナプス小胞膜蛋白質 *Synaptophysin* と相互作用すること、を報告している。これらの結果は、*p140Cap* が神経伝達物質の放出に関与することを示唆する。一方、*p140Cap* は、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。神経伝達物質とインスリンの分泌過程は共通の分子構造によって制御されると考えられる。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、ラット 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。*p140Cap* の shRNA 発現ベクターを構成的に発現する *INS-1* 細胞株を樹立してグルコース依存的なインスリン分泌を検討したところ、*p140Cap* はインスリン分泌を負に制御していると考えられた。現在までに、*p140Cap* の全長、あるいは各種ドメインを構成的に過剰発現した *INS-1* 細胞の樹立を終えており、

p140Cap が分泌過程で果たす役割を細胞レベルで解析する準備が整いつつある。さらに、神経細胞極性や神経伝達物質放出への関与が示されている p140Cap 結合蛋白質である Abi-1 と dysbindin-1 に着目した解析も始めている。本年度は、Abi-1 と dysbindin-1 の RNAi ベクターを作成し、p140Cap の作用メカニズムを分子レベルで解析する準備を整えた。今後の解析により、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と考えている。

神経細胞極性の獲得・維持における dysbindin-1 複合体の性状解析

永田浩一、伊東秀記、森下理香、岩本郁子、篠田友靖、須藤香織

統合失調症の発症に、遺伝的要因や胎生期または周産期の環境的要因による神経細胞の発達障害が関与しているという神経発達障害仮説が提唱されている。最近の遺伝学的研究により、*dysbindin-1* 遺伝子上の変異と統合失調症発症との相関が見いだされ、病態との関連が注目されている。私共はこれまでに、*dysbindin-1* が樹状突起スパインの形態を制御することを見出した。さらに、*dysbindin-1* は、アクチン重合を制御する WAVE2 と Abi-1 複合体形成を介して、神経細胞のスパイン形成を制御している可能性を提示した。一方、*dysbindin-1*、WAVE2、Abi-1 はいずれも全身の組織に広く分布することが知られている。そこで私共は、末梢組織を用いた、*dysbindin-1* の機能異常を原因とする若年性統合失調症や発達障害の簡便な診断法や予後判定法の開発のための基礎実験として本研究を遂行した。本年度は、上皮細胞を用いて *dysbindin-1*、WAVE2、Abi-1 複合体の性状解析を遂行した。上皮細胞において、これらの 3 蛋白質はすべて細胞の辺縁部で皮相下アクチンと共局在した。この結果は、これらの 3 蛋白質が神経細胞における細胞辺縁部にあたるスパインに共局在することと符合する。また、*dysbindin-1* と Abi-1 は分裂期細胞の紡錘体に局在した。この結果は、末梢組織を用いての若年性統合失調症や発達障害における *dysbindin-1* の病態学的位置付けに新たな視点を提供する可能性を示唆する。

大脳皮質発生における Septin 分子群の機能解析

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、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 の発現抑制時と同時に、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。Sept14 の knockdown and rescue 実験を全長および C 末欠損型 Sept14 で行った結果、Sept14 は Sept4 との相互作用を通して神経細胞移動に関与することが強く示唆された。皮質板を移動中の神経細胞の形態に着目したところ、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。現在までに細胞骨格系タンパクの制御分子の機能抑制が leading process 形成に関与するという報告がされており、Sept14 および Sept4 と細胞骨格制御の間をつなぐ分子機構を探索中である。

脳神経組織における MAGI-1 の性状機能解析

伊東秀記、森下理香、篠田友靖、須藤香織、岩本郁子、永田浩一

MAGI ファミリー蛋白質は、分子内に 6 つの PDZ ドメインと 2 つの WW ドメインをもつ分子量 110~160kDa の分子であり、哺乳動物において 3 種類の分子 (MAGI-1、MAGI-2/S-SCAM、MAGI-3) が知られている。MAGI-2/S-SCAM は、神経特異的 MAGI 分子とされており、神経組織における機能解析が国内外の研究グループによって進められているが、MAGI-1 に関しては、神経組織における機能はよくわかっていない。そこで、脳神経組織における MAGI-1 の性状機能解析を行った。MAGI-1 を選択的に認識する抗体を作製し、ラット全身臓器における局在をウェスタンブロット法により解析したところ、脳組織で高発現していることがわかった。脳における発現をさらに詳細に解析したところ、嗅球での著明な発現が見られた。胎生期から生後発達期のラット脳における発現変化を同様に解析したところ、胎生期には低分子量のアイソフォームが多く、発達に伴い高分子量のアイソフォームが増加することがわかった。ラットの脳神経組織における局在を免疫組織染色法により検討したところ、海馬の錐体細胞層、小脳のプルキンエ細胞層および嗅球の

糸球体層などでの局在が認められた。現在、MAGI-1 の神経組織における機能を明らかにすることを目指し、結合分子の探索を行っている。

統合失調症脆弱性因子 dysbindin-1 と結合する分子の探索

伊東秀記、森下理香、篠田友靖、須藤香織、岩本郁子、永田浩一

Dysbindin-1 は筋ジストロフィーの病態と関連するジストロフィン蛋白質複合体に含まれる dystrobrevin と結合する分子として同定された分子であり、また、統合失調症発症との関連についても注目されている。昨年度までに、私共は、dysbindin-1 は、WAVE2 および Abi-1 と複合体を形成し、神経細胞の樹状突起スパイン形態を制御していることを明らかにした。今年度は、dysbindin-1 の新規機能を明らかにすることを目指し、結合分子の探索を行った。複数の蛋白質相互作用データベースを用いて、dysbindin-1 に結合する分子を検索したところ、低分子量 GTP 結合タンパク質と結合することが知られている arfaptin2 が結合分子の一つとして同定されていた。Arfaptin2 は、分子内に生体膜との相互作用が知られている BAR ドメインを有し、構造的に類似する分子に arfaptin1 および PICK1 が知られている。免疫沈降により、これらの分子と dysbindin-1 との結合を検討したところ、arfaptin2 および PICK1 との結合が確認でき、特に、PICK1 と強く結合することがわかった。PICK1 は、分子内の PDZ ドメインを介して様々なシナプス関連分子と結合することが知られており、現在 dysbindin-1 と PICK1 の結合の生理的意義について検討を進めている。

Marinesco-Sjogren 症候群原因遺伝子 SIL1 の解析

稲熊 裕、濱武通子¹、細川昌則¹、鈴木基正²、熊谷俊幸³

Marinesco-Sjogren 症候群は、ミオパチーを中核症候とし、常染色体劣性で、精神運動発達遅滞、幼児期発症の白内障、小脳萎縮を三徴とする疾患である。病理学的には rimmed vacuole を伴う筋原性変化を認める。近年、Marinesco-Sjogren 症候群の原因として HSPA5 の co-chaperone である SIL1 の変異が明らかとなった。SIL1 は小胞体に局在する糖タンパク質で HSPA5 の ATPase ドメインに結合し nucleotide exchange factor として働き、タンパク質の折りたたみに関与すると考えられている。

今回、我々は Marinesco-Sjogren 症候群と診断若しくは強く疑われた患者 8 例について *SIL1* 遺伝子の解析を行ったところ、3 例に既知の変異を認めた。1 例は日本人に多いとされる *SIL1* 遺伝子エクソン 9 をコードする領域での 1 塩基挿入 (936dupG) のホモ接合型変異であり、別の 1 例はこれと同じ変異とエクソン 9 内の 5 アミノ酸をコードする塩基の欠失を伴うヘテロ接合型変異であった。さらに、別の 1 例はイントロン 9 内のスプライシング・アクセプターサイトの変異が推測された。これらの変異は、エクソン 10 によってコードされるカルボキシ末端の ER retention signal の機能に影響したり、エクソン 6-9-10 によって構成される HSPA5 の ATPase ドメインとの相互作用に影響すると考えられた。

¹ 所長研究室、² 中央病院、³ こばと学園