

### 3. 発生障害学部

#### 研究の概況

中山 敦雄

発生（胎児形成）は、一つの受精卵から人の体が形成されるという極めて神秘的に満ちた生命現象であり、細胞の増殖・移動・分化が遺伝情報に規定されて極めて複雑に進行する。発生障害、すなわち発生過程の破綻や変調は先天奇形の原因になるのみでなく、出生後に顕かになってくる発達障害にも直接的、間接的に影響を与えている。発生障害学部はこういった疾病や障害の基盤となる発生過程の破綻や変調の詳細を明らかにし、その知見を臨床に還元することを目的として研究を行っている。

具体的なテーマとしては自閉症感受性遺伝子ニューロリギン4Xとその産物に焦点を当てた研究、非ヒストン脱アセチル化酵素の脳機能・神経発達における役割の解明を目指した研究、その異常が発達障害の大きな要因の一つと考えられるに至っているエピジェネティックな遺伝子発現制御に関しての基盤的研究を進めている。

自閉症に関しては、社会性やコミュニケーションといった複雑な高次神経機能の障害であることから、その生物学的な病態の理解はまだまだ先のことと考えられる。一方で臨床遺伝学的解析から自閉症の原因遺伝子や感受性遺伝子の候補が多数報告されており、原因に関する情報は増加の一途をたどっている。当部門で進めている自閉症感受性遺伝子ニューロリギン4Xの遺伝子発現制御の解析と遺伝子産物の生理機能もなかなか目覚ましい進展には至っていないのが現状であるが、個別研究に報告されているように、少しずつ分子間ネットワークの理解に向かって進んでいる。この研究には中山、正木、鈴木、青木（研究企画調整科）が主に携わっている。

翻訳後修飾の中で近年注目を集めているのがタンパクのアセチル化修飾で、リン酸化修飾による様々な生理機能の制御に比べると已然未知の部分が多い。ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）6はその命名とは異なり非ヒストン蛋白のアセチル化制御が主要な機能と考えられ、特に神経系で重要な役割を担うことが示唆されている。川口、深田、花井（研究企画調整科）が解析を進めているHDAC6ノックアウトマウスの行動解析から、HDAC6欠損は動物に抗うつ状態を招くことが判り、HDAC6特異的阻害剤の投与でも同様の行動変化が観察された。論文の公表に先立ち、HDAC6阻害剤を新たな機序の抗うつ剤候補として特許の共同出願を行った。

自閉症を主に多くの発達障害の発症には、複数遺伝子の発現変調を引き起こすエピジェネティック制御の破綻が大きな要因の一つと考えられる様になって来た。エピジェネティック制御の本態の一つ、DNAメチル化の新た

な役割を明らかにするために、ジーンボディメチル化に関する基盤的研究も進めている。これは「さきがけ」研究課題として主に鈴木が従事している。

以上の詳細については個別研究の項目を参照されたい。

本年度の人事異動として年度末に正木が定年退職を迎えた。

本年度も実験遂行にあたっては竹島京子さん、小原円さん、吉成晶子さんに実験補助業務をしていただいた。

今年度の研究資金として日本学術振興会科学研究費補助金として若手研究（B）1件、基盤研究（C）2件、スタートアップ研究1件、科学技術振興機構から「さきがけ」研究1件の研究助成を受けて研究を進めた。

#### 自閉症原因遺伝子ニューロリギン4 遺伝子発現制御因子の解析

中山敦雄、青木英子

これまでにヒトニューロリギン（NLGN）4X遺伝子には複数のプロモーターが存在する事を明らかにしてきたが、本年度はこれらのプロモーターで転写される5'側の異なるmRNA種のうち、どれが主要な転写産物であるかをreal time PCRにより検討した。その結果5種類存在するエクソン1のうち最も5'側に位置するエクソン1Aを含むmRNA種がヒト胎児脳でもNLGN4X発現神経芽細胞腫でも最も多い事が明らかになった。これはconventional PCRで得ていた予備結果と一致するものであった。このためエクソン1A上流のプロモーター活性を最小領域まで絞り込んだところ、重複したCCAAT/Enhancer Binding Protein（C/EBP）の結合コンセンサスを含む28塩基対領域で十分な活性を認めた。C/EBP結合コンセンサスに変異を導入するとプロモーター活性は減弱した。この最小プロモーターに対する各種C/EBPタンパクの過剰発現の影響を検討すると、C/EBP $\delta$ の過剰発現で有意な活性の上昇が見られた。以上からNLGN4X発現制御に於けるC/EBPの役割が強く示唆され、特に転写活性化にはC/EBP $\delta$ が重要であることが示唆された。

#### 自閉症因子ニューロリギン4とアダプタータンパク質複合体AP-4 $\mu$ サブユニット間の相互作用解析

正木茂夫、青木英子、中山敦雄

自閉症患者に変異が観察されるさまざまな遺伝子の解析が行われているが、原因に明確に結びつくような遺伝子は現在まで明らかになっていない。弱いながら関連を見せる遺伝子にはシナプス形成とシグナル伝達に関係するものが多くみられ、シナプスの機能障害が自閉症と関



わることを示唆している。われわれはこれらのうち NLGN4X に注目しその産物ニューロリギン4に選択的に結合するタンパク質の検索を行ってきた。ヒト脳より得たクローンのうち特に AP4M1 に注目している。AP4M1 はアダプタータンパク質複合体4型 (AP-4;  $\epsilon$ - $\beta$ - $\mu$ - $\delta$  各1) の  $\mu$  サブユニットをコードし、遺伝子座は AUTS1 (7q22.1, 自閉症感受性遺伝子領域1) に位置する。AP-4 はニューロン AMPA 受容体のトランスゴルジ網からシナプス後膜への移送に関与し、脳性マヒ患者の一部での重篤な神経機能障害は AP-4  $\epsilon$  および  $\mu$  サブユニットの変異によることが知られている。また最近アルツハイマー病アミロイド前駆タンパク質が AP-4 によって移送されることが発見され、他にも未知のニューロンタンパク質が移送される可能性が示された。われわれの研究結果からニューロリギン4も同様に AP-4 による移送タンパク質である可能性が高い。AP-4 の未知の変異 (SNPs など) や取り巻く環境によってニューロリギン4の発現量や存在量が変動するなど、自閉症の発症への関与も想像される。今後 AP4M1 を新たな自閉症感受性遺伝子として報告出来るような研究の進展を期待している。

## メチル化 DNA 結合タンパク質による遺伝子発現調節機構の解明

鈴木美穂、吉成晶子、小原 円、中山敦雄

メチル化 DNA に特異的に結合するメチル化 CpG 結合タンパク質 (MBD) は、他のクロマチン修飾因子をリクルートすることによって転写抑制を行うと考えられている。ヒト MBD family の一つ MeCP2 の遺伝子変異は進行性神経疾患 Rett 症候群の原因であることが知られているが、MeCP2 を含め哺乳類の MBD が実際にターゲットとしている遺伝子や、その制御機構、疾患にどのように影響を及ぼしているのかはよくわかっていない。DNA メチル化修飾は遺伝子プロモーターに限らず遺伝子内部 (gene body 領域) にも存在し、神経細胞では遺伝子内部の DNA メチル化が遺伝子発現を大きく制御していることがわかっている。私たちは、MBD が gene body 領域の DNA メチル化を読み取り、遺伝子発現に影響を与えている可能性に着目し、gene body 領域のみに DNA メチル化を持つ無脊椎動物の細胞をモデルに研究を進めている。本年度は、バンドシフトアッセイにより MBD がメチル化 DNA に特異的に結合することを示した。また、GFP を融合させた MBD は核に局在することを示した。次に MBD の機能を調べるためにモルフォリノオリゴを用いたノックダウン実験を行ったところ、細胞分裂が異常となって停止するシビアな表現型が観察され、gene body 領域への MBD の局在は正常な細胞分裂に必須であることが示された。ま

た、MBD に対する抗体を作製しクロマチン免疫沈降実験を行ったところ、遺伝子のメチル化領域への特異的な結合が示された。今後は MBD と共局在する因子を同定することで、MBD がどの遺伝子にどのようなエピジェネティック因子をリクルートしているのかを明らかにし、MBD が遺伝子発現制御に関わるメカニズムを解明したい。

## タンパク質の可逆的アセチル化制御から見た情動障害の分子基盤研究

川口禎晴、深田斉秀、竹島京子、花井敦子

HDAC6 は細胞質で働く脱アセチル化酵素であり、細胞において様々な機能を有する。この分子は脳に多く発現していることが判っているがその役割は不明である。我々は HDAC6 遺伝子欠損マウスに抗うつ様の行動異常を見出したことから、HDAC6 は情動を司る脳の機能に重要であると考えている。その機能を分子レベルで明らかにするために、我々は脳神経系細胞における HDAC6 標的分子の探索を実施し、これまで HDAC6 遺伝子欠損マウスの脳から候補分子として CaMK2beta とピルビン酸脱水素酵素複合体 E2 サブユニットを見出した。加えて本年度は HDAC6 阻害剤を投与したマウスや HDAC6 ノックダウン PC12 細胞を用いアセチル化が亢進している分子を広く探索した結果、新たにピルビン酸脱水素酵素複合体 E1 サブユニットを見出した。CaMK2beta とピルビン酸脱水素酵素複合体 E2 サブユニットは今回の探索においても検出されたが、野生型のマウスや正常細胞においてもアセチル化分子として検出されたため、これら2分子はアセチル化分子ではあるものの HDAC6 による脱アセチル化調節は受けていないと判断された。従って今後はピルビン酸脱水素酵素複合体 E1 サブユニットに焦点を当て HDAC6 による脱アセチル化の検証を実施し、脱アセチル化による分子の機能調節の解明やこの分子の機能異常がもたらす表現系の変化を HDAC6 遺伝子欠損マウスにより解析する。

## HDAC6阻害剤は抗うつ薬様作用を示す

深田斉秀、花井敦子、竹島京子、川口禎晴

私たちは昨年度、HDAC6 遺伝子欠損マウスが、尾懸垂試験においてあたかも抗うつ薬を投与されたかのような行動を示すことを見出した。HDAC6 は細胞質性脱アセチル化酵素で、特に脳で強い発現が観察されるものの、脳機能における役割は不明であった。本年度は HDAC6 遺伝子欠損マウスが示す抗うつ様行動の成因を明らかにするための解析を行った。



名古屋市立大学との共同研究により、HDAC 6 選択的阻害剤の薬理作用を検討したところ、HDAC 6 阻害剤がマウスに対して抗うつ薬様の効果を示すことが判明した。また HDAC6 阻害剤を投与したマウスの脳において、HDAC6 遺伝子欠損マウスと同様にチューブリンのアセチル化亢進が観察された。これらのことから、HDAC6 遺伝子欠損マウスの抗うつ様行動は、成体マウス脳における脱アセチル化活性の欠損に起因するものであること、神経回路網の形成不全等の先天的な要因によるものではないことが判明した。現在 HDAC6 阻害剤が作用する脳領域、抗うつ作用と関連する細胞内プロセスの同定を進めている。本研究は、高次脳機能と「非ヒストンタンパク質のアセチル化」の関連を初めて示すものであり、今後うつ病の病態に関して新たな知見が見出されることが期待できる。

## 研 究 業 績

### 学 会 発 表

- 正木茂夫, 青木英子, 竹島京子, 中山敦雄: ニューロリギン 4 と AP-4  $\mu$  サブユニットの結合の特異性の解析. 日本神経科学大会・日本神経化学学会大会・日本神経回路学会大会合同大会 (名古屋) 2010.9.2.
- 深田斉秀, 花井敦子, 竹島京子, 中山敦雄, 川口禎晴: Hdac6 脱アセチル化活性抑制は、マウスの抗うつ様行動を誘発する. 日本薬理学会年会 (横浜) 2011.3.24.

### 教 育 活 動

- 川口禎晴: 理学同窓会寄付講座 (静岡大学)  
2010.6.3.
- 川口禎晴: 遺伝子操作論 (中部大学)  
2010.7.12.
- 中山敦雄: 神経生化学 (名古屋大学大学院医学研究科)  
2010.4.1. ~ 2011.3.31.
- 中山敦雄: 病理学 (名古屋大学医学部)  
2010.4.13. ~ 2010.9.30.

### その他の研究活動

#### 特 許 出 願

- 抗うつ薬及びその用途. 特願 2010-196993, 発明者 (川口禎晴・深田斉秀・鈴木孝禎・宮田直樹)