

20030755

厚生科学研究費補助金  
こころの科学研究事業

遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析とその治療への応用

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 塩見 春彦

平成16(2004)年 4月

## 目次

I. 総括研究報告		
遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析と その治療への応用	-----	1
塩見春彦 (資料) 倫理審査申請書及び審査結果通知書		
II. 分担研究報告		
1. シナプスにおける翻訳調節機構の解析	-----	14
武井延之		
2. 脆弱X症候群の遺伝子診断とゲノム多型解析 に基づくCGGリピート伸長機構の解析	-----	20
難波栄二 (図1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)		
3. 知的障害児の医学的診断と脆弱X症候群の 神経生理学的解析	-----	32
加我牧子		
I. 脆弱X症候群の神経心理学的研究 自閉性障害との比較を通して (表1, 2, 3, 4, 5: 図1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)		
II. 難聴モデルマウスにおける認知機能および行動異常に関する研究 (表1, 2: 図1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	56
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	59

遺伝性精神遅滞症脆弱X症候群の分子機構解析とその治療への応用

主任研究者 塩見春彦 徳島大学ゲノム機能研究センター・教授

研究要旨: 脆弱X症候群は最も頻度の高い遺伝性精神遅滞症であり、その原因はFMR1遺伝子内に存在するCGGリピートの伸長によるFMR1遺伝子産物の発現抑制(loss-of-function)である。患者の多くが自閉症類似の行動異常を示すことから、自閉症のメカニズムを理解する上でも極めて重要な疾患である。病理学的には神経シナプス形成の場である樹状突起上スパインの形態異常を示す。今までの実験結果から、FMR1蛋白質は、ある種のmRNAの翻訳調節に関与するRNA結合蛋白質であると考えられている。

本研究では:(1)FMR1蛋白質の標的mRNAを同定し、FMR1蛋白質による翻訳調節機構の理解とそのスパイン形態形成への関与の解析、(2)FMR1発現異常の影響を個体レベルで解析できるモデル動物の作成とその解析、(3)患者及び健常人サンプルを用いたFMR1遺伝子CGGリピート伸長機構の理解、(4)患者の行動、神経心理、生理学的特性を明らかにし療育法への提言、を行うことにより脆弱X症候群発症の分子機序の理解に迫り、療育法及び治療戦略に関する研究基盤を確立することを目的としている。過去3年間の研究から、脆弱X病態モデル動物としてのマウスとショウジョウバエの有用性を示す結果を蓄積しており、また、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理面での整備も行った。さらに、アンケート調査等をとおして、日本における脆弱X症候群の実態の把握を進めた。

分担研究者

武井延之 新潟大学脳研究所分子神経生物分野・助教授

難波栄二 鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

加我牧子 国立精神・神経センター精神保健研究所知的障害部部長

A. 研究目的

トリプレットリピート病の代表例の一つである脆弱X症候群の患者は頻繁に自閉症様症状を呈するため、これら二つの病気に至る分子病理学的経路に共通部分があると考えられる。脆弱X症候群と自閉症はいずれも小児精神神経疾患の中で極めて重要な位置を占めるものであり、少子化社会を迎える我が国の医療問題の大きな比重をしめることが予想され、原因の究明と有効な医薬の開発を必要とする重要な疾患である。FMR1蛋白質がmRNAの翻訳調節を介して、どのような遺伝情報発現調節機構に関与しているかを解析することで、脆弱X症候群の分子機序の

理解のみならず、自閉症の分子病理機構を理解する手がかりを得ることが期待できる。日本における脆弱X症候群の発症頻度を明らかにし、患者の行動、神経心理、生理学的特性を明らかにすることで行政施策の基礎資料とし、乳児から成人に至る福祉政策に反映させることができる。さらに、これらの研究をとおして得られる知見は、脆弱X症候群や自閉症の治療戦略を具体的に進めていくための実用的かつ有効なアッセイシステムの開発につながることを期待される。

本疾患は遺伝子診断のシステムは確立しているが、その本質的な治療法は世界的にも確立していない。本研究は、FMR1

遺伝子の機能研究では実績があり独自の研究を推進している主任研究者を中心に、機能解析にはなくてはならない神経シナプス機能の研究者、また臨床面では遺伝子診断での実績を持つ研究者と臨床心理学的・生理学的解析に経験豊富な研究者が共同研究を行うことにより、研究成果を患者に還元し、福祉政策に反映させることを目指している。多くの精神遅滞を伴う遺伝性疾患の本質的な治療法は、未だに開発されていない。本研究による成果は自閉症等の精神神経疾患の治療戦略に結びつく可能性もある。また、遺伝性精神遅滞の分子機序を遺伝子改変動物モデル（知的障害モデル動物）の作成とその遺伝学的、生化学的、そして行動学的解析をとおして、多動、記憶障害、認知障害等における遺伝子による影響を明らかにすることで理解していくというアプローチは、それ自体学問的独創性を有する。本グループでは、FMR1 KO マウスとショウジョウバエの FMR1 変異体をモデル動物として行動及び分子レベルで解析しており、また、これらモデル動物を用いて病態により動態変化が見られる蛋白質のプロテオーム解析による同定を開始し、初期データを獲得している点でも先駆性を有する。

## B. 研究方法

脆弱 X 症候群の発症機序及び病態を解明するための平成 15 年度の研究の骨子は以下にまとめられる。

### 1. FMR1 機能解析及び脆弱 X 病態解析のためのモデル動物の作成とその解析：シ

ョウジョウバエ dFMR1 変異体は、概日リズムの異常のみならず、記憶障害を示した。これは、臭いと電気ショックによる条件付け試験により判明した。この解析から、dFMR1 変異体ハエは、学習はできるが記憶過程（形成または記憶を引き出すところ）に問題があることがわかった。また、RNAi 因子である AGO2 変異体を作成し、dFMR1 と AGO2 の間には遺伝学的な相互作用（行動及び形態）が見られることを見出した。

一方、Fmr1KO マウス脳神経シナプスでは、恒常的な翻訳の活性化が occurring ことを発見した。さらに、行動レベルでは、Fmr1KO マウスの睡眠が質的に野生型と異なることも発見した（REM 睡眠の率が高い）。さらに、脆弱 X 症候群と一部類似した症状を示す Bronx waltzer マウスの行動特性と認知機能を解析した結果、本マウスが遺伝性精神遅滞の分子機序解析に極めて有用である結果を得た。

### 2. 正常日本人における FMR1 CGG リピート配列の頻度検定：日本人における脆弱 X 症候群の頻度は、未だ判明していない。

そこで、正常人での CGG リピート配列の頻度を検討し、保因者になりうるアレル (permutation CGG repeat #: 50-200) の有無を調べた。現在までに男性 469 名、女性 292 名の DNA を調べ、60 リピートをもつ permutation アレルが男性 1 名に検出された。今後も合計 3000 人以上この検査を行い、統計学的に有意な結果を導くことを目指す。

### 3. FMR1 標的分子の同定：アフィニティ

一精製法を用いて、dFMR1 が形成する複合体の精製を継続し、新たに2つの蛋白質を同定した。このうちの一つは、UBA(ubiquitin associated)ドメインを有し、もう一つは PNPase と強い相同性をしめした。これらのことから、dFMR1 は ubiquitin 経路と RNA 分解経路に関与することが示唆された。

4. 脆弱 X 症候群の心理学的研究：類似した心理状態を示す自閉性障害の神経心理学的検査について、発達的变化と検査成績間の関連を検討し、脆弱 X 症候群の対象者と比較した。脆弱 X 症候群においては、自閉性障害に比べて言語機能が保たれているようであった。また、視覚認知機能、特定のモダリティによる記憶機能には異常を認めず、本症候群児・者の療育や訓練に活用できる認知機能上の特徴であると考えられた。これらの成果をふまえ、療育法への提言を行い、乳幼児から成人に至る福祉政策に反映させる。また、患者家族の疾患への理解と研究への協力を獲得し、研究成果を速やかに患者に還元するための体制を整えることを目指す。さらにこのような研究を進め、『FMR1 機能を代替する化合物』のスクリーニングを可能にするアッセイ系の確立を目指す。

#### 倫理面への配慮

本申請における遺伝子解析は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成13年3月29日：文部科学省、厚生労働省、経済産業省)に従って行う。

既に徳島大学(参考資料添付)と鳥取大学において、倫理委員会に実施計画を申請し、承認された。また、実施にあたっては書面で患者家族からインフォームドコンセントをとって患者から検体を採取する。本研究に関する遺伝相談に関しては、日本人類遺伝学会「臨床遺伝学認定医・指導医」である研究分担者難波が対応可能である。

#### C. 研究結果

主任研究者らの研究により、その原因は翻訳過程に関与する RNA 結合蛋白質をコードする FMR1 遺伝子の機能喪失であることが判明している (Cell 74:291-298, Cell 76:33-39, MCB 16:3825-3832)。主任研究者らは、ショウジョウバエ FMR1 遺伝子 (dfmr1) 変異体が概日リズムの異常を示すことを明らかにした (Current Biology 12:1331-1335, 2002)。脆弱 X 症候群患者には頻りに睡眠障害が見られ、これは概日リズムの異常によると考えられている。主任研究者らは、さらに生化学的解析により dfmr1 蛋白質が RNAi (RNA 干渉) 分子装置に組み込まれた因子であることを明らかにした (Genes & Development 16: 2497-2508, 2002)。これは Science 誌の Editors' Choice や Nature Medicine 誌の News and Views 等にも取り上げられ、「RNAi 分子装置の異常による疾患」というヒト分子遺伝学の全く新しい領域を開くさきがけとして注目されている。患者では脳の高次機能(特に可塑性)に直接関与することが確実に視されている樹状突起上スパインの形態異常が見られるが、これらの結果はスパ

インの形態と機能に FMR1 蛋白質を含む RNAi 分子装置の関与の可能性を示唆する。主任研究者は、病態モデル動物としてショウジョウバエの FMR1 相同遺伝子 (dFMR1) の解析を進め、dFMR1 変異体ハエが概日リズムの異常と記憶障害を示すことを発見した。脆弱 X 患者は精神遅滞のみならず、頻繁に睡眠障害を示し、これは概日リズムの異常によると考えられている。ヒトとショウジョウバエの間では、学習・記憶、概日リズムといった複雑な行動を制御する遺伝子の機能が驚くほどよく保存されていることから、この変異体の詳細な解析から得られる知見は、脆弱 X 症候群原因遺伝子 FMR1 の機能の理解を深めるだけでなく、治療法開発の基盤となることが期待される。また、生化学的機能解析により dFMR1 蛋白質が RNAi (RNA 干渉) 分子経路に関わる因子であることを発見したが、本年度、各種変異体ハエを交配し、それらの表現型を解析することで、dFMR1 が遺伝学的にも RNAi 分子経路に関与していることを突き止めた。この発見により「RNAi 分子経路の異常による疾患」というヒト分子遺伝学におけるまったく新しい領域を開いた。

分担研究者武井は、FMR1 KO マウスの脳では、制御されない蛋白質合成の亢進と翻訳の活性化が起こっているが、刺激応答性は見られないことを見出した。

分担研究者難波は、これまでに正常日本人 761 名の FMR1 遺伝子 CGG リピート配列 (1053 アリル) を検討し、60 リピートの premutation サイズをもつアリルを一つ同定した。

分担研究者加我は、脆弱 X 症候群と類似性が指摘されている自閉症を比較し、脆弱 X 症候群においては自閉性障害を比し言語機能が保たれていること、また、視覚認知機能や特定のモダリティーによる記憶機能には異常はなく、脆弱 X 児の療育や訓練に活用できる認知機能上の特徴であることを発見した。

#### D. 考察

主任研究者らが作成したショウジョウバエ dFMR1 変異体は、本疾患発症の分子機構を理解する上で重要なモデルである。dFMR1 蛋白質が概日リズムや記憶に関与し、しかも RNAi 分子経路に関わる因子であるという発見は、従来とは異なった側面から病因遺伝子が複雑な行動に関与する分子機構を理解することにつながる可能性を示す。一方、もう一つのモデル動物として FMR1 KO マウスを用い、神経シナプスにおいて FMR1 蛋白質が翻訳調節系に関与することを見出した。この知見は、翻訳調節系と RNAi 分子経路がどのような関係にあるのかを理解し、さらに、FMR1 が仲介する神経シナプスにおける蛋白質合成のアッセイ系確立に寄与する。これは、さらにそこに介入する薬剤のスクリーニングを可能にするであろう。日本人における脆弱 X 症候群の実態調査、発症頻度の検定、精神心理学的研究等とおして得られた結果は、行政施策の基礎資料となるだけでなく、知的障害に関わる多くの専門家の関心を高め、疫学資料、福祉施策資料として役立たせることができる。

## E. 結論

(1) ショウジョウバエ脆弱X遺伝子がRNAi (RNA 干渉) 関連因子と遺伝学的にも相互作用することを明らかにした。

(2) Fmr1KO マウス脳神経シナプスでは、恒常的な翻訳の活性化がおこっていることを発見した。

(3) 日本人における脆弱 X 症候群の頻度は、未だ判明していない。そこで、正常人での CGG リピート配列の頻度を検討し、保因者になりうるアレル (permutation CGG repeat #: 50-200) の有無を調べた。

(5) 神経心理学的検査をおこない、脆弱 X 症候群と自閉性障害の相違を明らかにした。

以上の結果は学会発表を行い、その多くを論文としても報告した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表 (主任研究者分のみ)

総説

1. Siomi, H., Ishizuka, A., and Siomi, MC. 2004. RNA Interference: A New Mechanism by Which FMRP Acts in the Normal Brain? - What can *Drosophila* teach us? - 2003. *MRDDR Review* 10: 68-74.

和文総説

1. 塩見美喜子、塩見春彦. 2003 RNA 結合蛋白質の発現異常による疾患「脆弱 X 症候群」蛋白質核酸酵素 増刊号「RNA の細胞生物学」48: 480-486

2. 岡村勝友、塩見春彦. 2003 RNAi とその生理学的意義 *Bio Clinica* 18: 89-91

3. 岡村勝友、塩見春彦、塩見美喜子. 2003 RNAi 経路と疾患 *実験医学* 21: 1662-1666

4. 石塚明、塩見美喜子、塩見春彦. 2003 RNAi-小分子 RNA による遺伝子発現制御- *遺伝子医学* 3: 21-25

### 2. 学会発表

国際シンポジウム等

1. 塩見春彦. SFB Symposium 'Molecular Mechanisms of Neurodegeneration', Wildbad Kreuth, Germany, 2003年7月

2. 塩見春彦. International Symposium "RNAS2003Kyoto", Kyoto, 2003年11月

3. 塩見春彦. 6<sup>th</sup> Annual Symposium Japanese-American Frontiers of Science, Shonan Village, Kanagawa, Japan, 2003年12月

4. 塩見春彦. International Symposium on Molecular Clock Tokyo 2004, 東京、2004年2月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし  
3. その他  
なし



審 査 結 果 通 知 書

平成15年11月14日

申請者

徳島大学ゲノム機能研究センター教授  
塩 見 春 彦 殿

徳島大学医学部ヒトゲノム・遺伝子  
解析研究倫理審査委員会

委 員 長 大 森 哲 郎



受付番号 44

研究計画名 精神遅滞の原因と頻度に関する遺伝子の研究（研究分担者及び解析サンプル追加に関する件）

研究責任者名 徳島大学ゲノム機能解析センター教授 塩 見 春 彦

上記研究計画を、提出された研究計画書に基づき審査し、平成15年11月6日の委員会で下記のとおり判定したので通知します。

記

判 定	承 認	条件付承認	不承認
	変更の勧告	中止の勧告	非該当
意          見	( 承認の条件・不承認の理由・勧告の内容と理由・非該当の理由 等)		

# 審査結果通知書

平成15年 9月24日

申請者（主任研究者）  
脳神経小児科部門 教授  
大野 耕 策 殿

鳥取大学医学部長  
井 藤 久 女



課 題 名 「「精神遅滞の原因と頻度に関する遺伝子の研究」への分担研究者の追加ならびにサンプルの追加」

研究者名 大野 耕 策 脳神経小児科部門 教授

さきに申請のあった上記課題に係る実施計画を、下記のとおり判定したので、通知します。

## 記

判 定	<input checked="" type="checkbox"/> 承認 <input type="checkbox"/> 条件付承認 <input type="checkbox"/> 変更勧告 <input type="checkbox"/> 不承認 <input type="checkbox"/> 非該当
理 由 又 は 勧 告	

# 研究計画書

## 研究課題名

精神遅滞の原因と頻度に関する遺伝子の研究(平成14年2月26日承認、受付番号G5)への分担研究者の追加ならびにサンプルの追加

### 1. 研究の意義と目的

精神遅滞の原因の多くは未だ解明されていない。この原因の中には、様々な遺伝子異常が含まれていると考えられている。また、比較的研究が進んでいる脆弱X症候群のような病気でも、遺伝子診断が可能になってきたが、治療法は未だ開発されていない。この疾患では、原因の遺伝子(FMR-1遺伝子)が他の様々な遺伝子に影響を与え、そのために精神遅滞が引き起こされることが明らかになってきており、現在、精神遅滞を直接引き起こす遺伝子を明らかにする研究が重要になっている。これらの研究から明らかにされた遺伝子は、脆弱X症候群以外の精神遅滞の直接の原因になっている可能性もあり、精神遅滞全体の研究に発展する。

そのために、この研究では、まず精神遅滞の患者さんやその家族の方々を対象に、FMR-1遺伝子の解析や精神遅滞に関係する可能性のある新規遺伝子の探索を行い、脆弱X症候群のように原因が分かった場合には、さらに詳しくメカニズムに関係した遺伝子解析を進める。

さらに、精神遅滞のない人の遺伝子を解析し患者さんの遺伝子の特徴を明らかにするとともに、遺伝子異常が起きる頻度などを検討する。

この研究により、患者の診断が可能になるばかりではなく、遺伝子異常の患者さんがどの程度発生するかも予想できる。その結果、疾患の予防や病態解明にも重要な意味をもつと考えられる。

本研究は平成14年2月26日に承認を受けているが、その研究への研究分担者追加と解析サンプル追加を今回申請する。

### 2. サンプルの追加に関して

ヒューマンサイエンス研究資源バンクの細胞株(PSC)由来のゲノムDNA、約1000サンプルを追加し解析する。本サンプルは連結不可能匿名化が行われており、遺伝子解析研究用に同意を得て集められ提供されているために、提供者等には危険や不利益が及ぶ可能性はまったくない。

### 3. 研究の方法・場所と協力者の危険性について

遺伝子の解析は、鳥取大学医学部附属脳幹性疾患研究施設、鳥取大学遺伝子実験施設、ならびに徳島大学ゲノム解析センターで行う予定である。この施設以外の協力が必要な場合には倫理審査委員会に追加申請する。

### 4. 研究期間

承認の翌日から平成16年3月31日の予定。

### 5. 参考資料

PSC細胞株・DNAの分譲について

# PSC細胞株・DNAの分譲について

## 1. PSC 細胞株 について

本細胞株はPSC（ファルマ スニップ コンソーシアム、平成12年に日本製薬工業協会加盟の43社が設立した団体）からJCRB・HSRRBバンクに寄託されました。本細胞株は、PSCの共同研究者である鎌谷直之教授（東京女子医科大学・膠原病リウマチ痛風センター所長）により、日本人ボランティア約1,000人の血液（白血球）にEpstein-Barr virusを感染させ、不死化された白血球（B細胞）株です。PSC細胞株は連結不可能匿名化が行われております。PSCの概略については、ホームページ（<http://www.psc.gr.jp/>）をご覧ください。

## 2. PSC 細胞株・ DNAの分 譲

PSC細胞株について、凍結細胞または精製DNAのいずれかで分譲可能です。現時点で分譲可能な資源数（ドナーの年齢、性別で区分）は"分譲可能なPSC細胞株"（別図）をご参照ください。分譲については"PSC細胞株・DNA分譲依頼書・同意書（様式A-2）"にて申し込みください。なお、年齢、性別以外の情報に基づいて細胞株、DNAの選択を希望される場合はHSRRBにご相談ください。

## 3. 分譲 サンプル ルの性 状

細胞は約 $10^6$ 個以上/本の凍結細胞をドライアイス詰め宅配便にて送付いたします。Epstein-Barr virusなどのウイルス産生の恐れもありますので、取扱い（バイオハザード対策）にご留意ください。DNAはフェノール・クロロホルム抽出法にて精製しており、 $OD_{260nm}/OD_{280nm}$ 値は1.8~2.0となっております。1本

あたりの DNA 量は 10 $\mu$ g で、100 $\mu$ L の TE バッファーに溶解し、凍結 (-80 $^{\circ}$ C 保管) 状態で、ドライアイス詰め宅配便にて送付いたします。

#### 4. 分譲手数料

・凍結細胞で分譲の場合 (1本あたり・税込み・国内は送料込み)

大学・国公立研究機関・独立行政法人・ 賛助会員・PSC 会員	24,000 円
一般	29,000 円
海外 (送料は別途請求)	26,000 円

・DNA 凍結サンプルで分譲、(10 $\mu$ g/本、税込み・国内は送料込み)

大学・国公立研究機関・独立行政法人・ 賛助会員・PSC 会員	7,000 円
一般	8,500 円
海外 (送料は別途請求)	7,500 円

・大量に購入する場合の割引 (細胞・DNA)

30~99 サンプル	20%割引
100~499 サンプル	35%割引
500~999 サンプル	60%割引
1,000 サンプル以上	70%割引

#### 5. 支払い方法

請求書を送付しますので、下記指定銀行口座にお振込み下さい。

なお、振込手数料はご負担下さい。また、現金等でのご送金は受けられませんのでご注意下さい。

特別の様式の請求書、納品書、領収書を必要とされる場合は、申込みの際に必ず当該書類を添えて上記ヒューマンサイエンス研究資源バンクへお申込み下さい。

指定銀行口座：

東京三菱銀行 本店（普）7651406

名義：

（財）ヒューマンサイエンス振興財団

PSC 細胞株・DNA 分譲依頼書・同意書 (様式A-2)

財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンク 御中

1. 下記細胞株・DNAを分譲願います。

申込日: 15年 2月 10日	受付日: 年 月 日	受付番号:
依頼者氏名 <u>板倉 光夫</u> フリガナ(ローマ字) <u>Itakura Mitsuo</u> 職名 <u>教授</u> 郵便番号 〒 <u>770-8503</u> 機関住所 <u>徳島大学蔵本町3-18-15</u> 機関名及び研究室名 <u>徳島大学ゲノム情報研究センター遺伝情報分析</u> 責任者名 <u>板倉 光夫</u> 電話 <u>088-633-9454</u> FAX: <u>088-633-9455</u>		
(請求書の送付先が上記機関と異なる場合は、下記にご記入下さい。) 機関住所 〒 <u>770-8503</u> 機関名 <u>徳島大学ゲノム情報研究センター 遺伝情報分析</u> 氏名 <u>板倉 光夫</u> 電話 <u>088-633-9454</u> FAX: <u>088-633-9455</u>		
分譲を希望する細胞株・DNA (本数) <p style="text-align: center;"><u>PSCの全細胞株 (1000株以上)</u></p>		
研究目的 <p style="text-align: center;"><u>「アルツハイマー病」の発症関連性遺伝子同定のための 健康対照者と2用いるため</u></p>		

2. ヒューマンサイエンス研究資源バンク (以下HSRRBと略す) より細胞株の分譲を受けるにあたり、下記の事項について同意します。

- 1) 「HSRRB 運営規程」を遵守する。
- 2) 分譲された細胞株・DNAの利用に当たっては、当研究機関の倫理審査委員会において承認が得られており、また、人の尊厳を尊重し、ヒトクローン作製の研究や人体に直接投与するなど倫理に反する取り扱いはない。
- 3) 当該細胞株・DNAに関する樹立者の優先権を全面的に尊重し、樹立者からの使用上の制限等がある場合は、これを遵守する。
- 4) 分譲された細胞株・DNAは上記記載目的の研究、試験、教育等のためにのみ使用し、直接的な営利活動や軍事目的に使用しない。
- 5) 分譲された細胞株・DNAを第三者に分与しない。
- 6) 分譲された細胞株・DNAの使用により事故、損害等が生じても、HSRRBの責任を一切問わない。
- 7) 分譲された細胞株・DNAを使用した研究を発表する場合は、資源番号・資源名ならびに樹立者名あるいは文献名を記載し、HSRRBを通じて入手したことを明記する。

分譲依頼者署名 Mitsuo Itakura

送付先 (FAXまたは郵送): 〒590-0536 大阪府泉南市りんくう南浜2-11

ヒューマンサイエンス研究資源バンク

TEL: 0724-80-1670 FAX: 0724-80-1656

E-mail: hsrrb@osa.jhsf.or.jp URL: http://www.jhsf.or.jp/index\_b.html

厚生労働科学研究費補助金 (こころの研究科学研究事業)  
分担研究報告書

遺伝性精神遅滞症脆弱 X 症候群の分子機構解析とその治療への応用

分担研究者 武井延之 新潟大学脳研究所分子神経生物分野・助教授

精神遅滞症脆弱 X 症候群はダウン症候群とならび遺伝性精神遅滞の代表的疾患である。本疾患の原因遺伝子は FMR1 であり、X 染色体上の 5' 非翻訳領域にある (CGG)<sub>n</sub> リピートの伸展により、遺伝子産物 FMRP の発現が消失、もしくは著しい低下をきたす loss-of-function による疾患と考えられている。現状では本疾患の分子機構は明らかでなく、治療法も無い。FMRP は mRNA 結合蛋白であることから、脳神経系の発達や機能に重要な標的遺伝子を翻訳段階で抑制していることが示唆されている。また FMRP がシナプス部に輸送されることから、シナプス部へ特定の mRNA を運び、局所的な翻訳調節に関与していることも考えられる。近年シナプス部における蛋白合成と翻訳調節が脳機能に重要であるとの仮説が提唱されており、本分担研究者自身の報告も含め知見が集積しつつある。本研究ではシナプス部における翻訳調節機構を明らかにすることによって、FMRP の持つ生理機能を、培養神経細胞や FMRP ノックアウトマウス脳を用いて明らかにしてゆく。

A. 研究目的

本研究では精神遅滞症脆弱 X 症候群の分子機構解析と治療法の確立を最終目標においている。そのためには脆弱 X 症候群の責任遺伝子 FMR1 の産物 FMRP の生理機能を知ることが必須である。

FMRP は RNA 結合蛋白であり、ある種の mRNA の翻訳を調節していることが本研究主任研究者塩見らによって明らかにされている。さらに FMRP は神経細胞のシナプス部に存在し、そこでの mRNA の局在と翻訳調節に関与している可能性が示唆されてきている。

一方、神経機能 (あるいは脳高次機能) の調節には、シナプス部に局在する mRNA を用いた新規の蛋白質合成が重要な役割を担っていることが、本分担研究者らの報告も含め次第に明らかになってきた。そこで本研究では FMRP の神経細胞、とくにシナプス部における役割について翻訳調節の観点から検討し、FMRP の脳機能への関与を明らかにすること、

さらには FMRP の機能代替の方策を見出し治療への応用をおこなうことを目的としている。

前年度までの成果を踏まえて、本年度の目標としては以下のものをあげた。

# シナプス部における翻訳調節のシグナル伝達系の詳細な解析。

# シナプス部において新規に合成される蛋白の探索とそのメカニズムの解明。

# シナプス部での翻訳過程における FMRP の役割と刺激に応答した FMRP の動態の検索。

B. 研究方法

# シナプス部における翻訳調節のシグナル伝達系の詳細な解析。

前年度までの成果として、BDNF (brain-derived neurotrophic factor) の刺激により培養神経細胞のシナプス部、および脳シナプトニューロゾーム画分において mTOR (mammalian target of rapamycin)



及びその下流の翻訳調節シグナルが活性化することを報告している。これを踏まえさらに詳細な mTOR シグナルの活性化について、抗リン酸化抗体を用いた免疫細胞化学やウエスタンブロット、アイソトープを用いた GDP/GTP 変換や蛋白合成を培養系やシナプス画分で行い、mTOR の上流シグナルの活性化を調べた。

#シナプス部において新規に合成される蛋白の探索とそのメカニズムの解明。  
シナプトニューロゾーム画分を <sup>35</sup>S メチオニンで代謝ラベルし、BDNF の刺激によって合成が誘起あるいは促進される蛋白質の同定と、薬理的アプローチによるシグナル経路の解明を試みた。

#シナプス部での翻訳過程における FMRP の役割と刺激に応答した FMRP の動態の検索。

前年度に引き続き、精神遅滞症脆弱 X 症候群のモデル動物である、FMR1 ノックアウトマウス及び野生型マウスの脳よりシナプス画分を調整し、アイソトープラベルしたアミノ酸の取り込みにより、蛋白合成能を比較した。同時に両者のサンプルにおいて刺激応答性の翻訳因子のリン酸化の変化などを通じて翻訳活性化に差があるかをしらべた。また FMR1-EGFP 融合蛋白をコードするコンストラクトを含む発現ベクター (Prof. Eero Castren, Helsinki University より供与) を培養神経細胞に遺伝子導入し、FMRP の局在および神経栄養因子、神経伝達物質の刺激による動態を調べた。

### C. 研究結果

#シナプス部における翻訳調節のシグナル伝達系の詳細な解析。

シナプス部において mTOR シグナルの活性化が、局所での翻訳活性化と蛋白合成に必要であることを見出したが、本年はさらに BDNF から mTOR にいたるシグナル系を明かにすることができた。BDNF の刺激によって、PI3K, Akt が活性化することが知られていたが、本研究ではさらに TSC 2 (tuberous sclerosis complex) のリン酸化から、Rheb の活性化 (GDP 結合型から GTP 結合型への変換) が mTOR の活性化の上流にあることがわかった。

#シナプス部において新規に合成される蛋白の探索とそのメカニズムの解明。

脳シナプトニューロゾーム画分を <sup>35</sup>S メチオニンで代謝ラベルし、BDNF の短時間 (30分) 処理により翻訳の誘起/促進される蛋白を調べたところ、神経可塑性関連分子である CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) と Arc のレベルが顕著に上昇していた。これらの mRNA は樹状突起に存在することが知られており、調節的かつ局所的な蛋白合成がおこっていることを強く示唆している。また BDNF による Arc の翻訳促進は mTOR の阻害剤であるラパマイシンによって完全に抑制されたが、CaMKII の上昇は部分的にしか阻害されず、複数の経路の関与を示唆していた。

#FMR1 ノックアウト脳シナプス部位における蛋白合成と翻訳調節。

前年度までの予備的な結果と合わせ、FMR1 ノックアウトマウスではシナプス部位における蛋白合成能と一部の翻訳因子の活性化が亢進していることがわかった。一方、BDNF による蛋白合成の増強と翻訳因子の活性化はあまり見られなかった。このことは FMR1 ノックアウトマウス脳では翻訳調節における生理的な抑制機構に破綻をきたしている可能性を示唆している。

また FMRP-EGFP の強制発現の実験から、FMRP 分子の存在を示す EGFP シグナルは樹状突起に局在していた。この結果を踏まえ、刺激に応答した FMRP-EGFP の動きをイメージングするセットアップをはじめている。

#### D. 考察

本研究から中枢の神経細胞ではシナプス領域に翻訳機構が存在し、脳の主要な神経栄養因子であり情報伝達分子である BDNF に応答して調節的に蛋白合成が行われていることが明らかとなった。この調節には翻訳因子やその上流のシグナル分子の活性化が必要であり、BDNF-TrkB-PI3K-Akt-TSC1/2-Rheb-mTOR-4EBP1 および mTOR-p70S6K-S6 の系が関与していることを見出した。BDNF は神経可塑性に関与することが明らかとなっており、BDNF の刺激によって実際に合成が増加している蛋白として CaMKII と Arc という神経可塑性関連分子が同定できたことから、神経可塑性への翻訳調節の系の重要性が示唆された。FMR1 ノックアウトで mTOR 下流の翻訳機構の活性化と蛋白合成が亢進しており、刺激に応答した増強が

見られなかったことは、調節的な翻訳の破綻を意味している可能性もあり、病因解明の手がかりとなるかもしれない。空間学習後の脳の海馬で BDNF シグナルの活性化と翻訳調節因子の活性化がおり、mTOR の阻害剤であるラパマイシンの脳内投与で空間学習の獲得が障害されることも翻訳機構の調節不良は精神遅滞などの高次機能の障害をもたらす可能性を示唆しているといえよう。

自閉症は脆弱 X 症候群との類似性が指摘されているが、この自閉症と TSC が責任遺伝子である結節硬化症 (tuberous sclerosis) との関連も報告されてきており、TSC1/2 を介した翻訳調節の異常と脆弱 X 症候群の病態との関連も今後研究課題としてゆきたい。

#### E. 結論

- 1) BDNF によるシナプス部での翻訳活性化では PI3K-Akt-TSC1/2-Rheb-mTOR-4EBP1 および mTOR-p70S6K-S6 の経路が重要である
- 2) BDNF 刺激によりシナプス部での神経可塑性関連蛋白の合成が増加した。
- 3) FMR1 ノックアウトマウス脳では制御されない蛋白合成の亢進と翻訳の活性化が起っている。が、刺激応答性はみられなかった。
- 4) 培養神経細胞に導入した FMRP-EGFP は樹状突起に存在していた。

以上の結果は学会発表し、論文発表、または論文投稿中である。

#### F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. Yuhara, A., Ishii, K., Nishio, C., Abiru, Y., Yamada, M., Nawa, H., Hatanaka, H. and **Takei, N.** (2003) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and nerve growth factor cooperatively enhance choline acetyltransferase activity in postnatal basal forebrain neurons by complementary induction of different species of its mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 344-349
2. Mizuno, M., Yamada, K., **Takei, N.**, Tran, M.H., He, J., Nakajima, A., Nawa, H. and Nabeshima, T. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. *Mol. Psychiatry.* 8, 217-224
3. Inamura, N., Hoshino, S., Uchiyama, T., Nawa, H. and **Takei, N.** (2003) Differential Distributions of Translation Initiation, Elongation and Release Factors in Rat Hippocampus. *Mol. Brain Res.* 111, 165-174
4. Amada, N., Tezuka, T., Mayeda, A., Araki, K., **Takei, N.**, Todokoro, K. and Nawa, H. (2003) Novel Mammalian Orthologue and Homologue for *Drosophila crooked neck Gene* in Neuroblasts / Neural Stem Cells. *J. Biochem.* 133, 615-623
5. Seki, M., Nawa, H., Fukuchi, T., Abe, H. and **Takei, N.** (2003) BDNF is Up-regulated by Postnatal Development and Visual Experience: Quantitative and Immunohistochemical Analyses of Neurotrophins in the Rat Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3211-3218
6. Inamura, N., Nawa, H. and **Takei, N.** (2003) Developmental changes of eukaryotic initiation factor 2B subunits in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 346, 117-119
7. Nagano T, Yanagawa Y, Obata K, Narisawa-Saito M, Namba H, Otsu Y, **Takei N**, Nawa H. (2003) Brain-derived neurotrophic factor upregulates and maintains AMPA receptor currents in neocortical GABAergic neurons. *Mol Cell Neurosci.* 24, 340-356
8. Jourdi H, Iwakura Y, Narisawa-Saito M, Ibaraki K, Xiong H, Watanabe M, Hayashi Y, **Takei N**, Nawa H. (2003) Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons. *Dev.*

9. Namba, H., **Takei, N.** and Nawa, H. (2003) Transforming growth factor- $\alpha$  changes firing properties of developing neocortical GABAergic neurons by down-regulation of voltage-gated potassium currents. *Neuroscience* 122, 637-646.
10. Seki, M., Fukuchi, T, Nawa, H., **Takei, N.** and Abe, H. (2004) Quantitative analyses of mRNA and protein levels of NT-3 in the rat retina during postnatal development and aging. *Jpn. J. Ophthalmol.* in press

総説

- (1) 武井延之 (2003) 神経栄養因子による神経伝達調節 脳の科学 25、89-94
- (2) 武井延之 (2004) 神経栄養因子による蛋白合成促進と翻訳活性化 CLINICAL NEUROSCIENCE 22 268-270
- (3) 武井延之、那波宏之 (2004) ニューロトロフィンによる脳機能の調節-細胞応答から行動変容まで- 生化学 76 111-123
2. 学会発表  
シンポジウム等
- 1) Takei, N., Inamura, N., Namba, H.

and Nawa, H. Brain-derived neurotrophic factor and neural activity mediated regulation of translational control in neurons: a possible link between novel protein synthesis and neural plasticity. 北陸神経科学ワークショップ

- 2) 武井延之、稲村直子、那波宏之 (2003) 神経栄養因子によるニューロンの樹状突起における翻訳調節と蛋白合成 第108回解剖学会シンポジウム「神経栄養因子研究の新展開」 福岡 4月3日 (座長)
- 3) 武井延之、稲村直子、那波宏之 (2003) BDNFによる樹状突起における翻訳調節と蛋白合成 平成15年度生理研研究会「神経可塑性の分子基盤」 岡崎 5月29日
- 4) 武井延之、稲村直子、那波宏之 (2003) BDNF induces mTOR-dependent translational activation in neurons 生化学会シンポジウム「分子から精神機能へ-神経栄養因子研究の新展開-」 (オーガナイザー)
- 5) 武井延之、稲村直子、那波宏之 (2003) 神経栄養因子によるニューロンの局所的翻訳調節機構 大阪大学蛋白質研究所セミナー「活動依存的な細胞内情報伝達のダイナミクスと脳・神経機能発現」 10月30日 (座長)

口演/ポスター

- 1) Inamura, N., Nawa, H., Takei, N. (2003) BDNF activates translation elongation in cultured cortex neurons. 33th Annual Meeting of