



Title	Transient expression of Xpn, an XLMR protein related to neurite extension, during brain development and participation in neurite outgrowth
Author(s)	石川, 淑子
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34598
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (石 川 淑 子)

論文題名

Transient expression of Xpn, an XLMR protein related to neurite extension,
during brain development and participation in neurite outgrowth
(X連鎖精神遅滞関連因子KIAA2022(Xpn)の脳発達期における一過性発現と神経突起伸展への関与)

〔 論文内容の要旨 〕

近年の遺伝学的研究により、発達障害を含む広義の精神障害においても発症リスクに関わる脆弱性遺伝子が多数報告されている。これら脆弱性遺伝子の一つKIAA2022はX連鎖精神遅滞(XLMR)患者の遺伝子解析から逆位による遺伝子断絶が明らかなXLMR責任遺伝子である。しかしながら、KIAA2022の機能は不明である。そこで脳におけるKIAA2022の機能解析を行い、XLMR発症メカニズムへの関与を明らかにする目的で本研究を行った。

KIAA2022欠失による神経細胞への影響を検討することにより、突起伸展への関与を検討した結果、Kiaa2022発現抑制によりPC12細胞の突起伸展を阻害することが明らかとなったことから、我々は、KIAA2022を突起伸展関連XLMRタンパク質(XLMR protein related to neurite extension) Xpnと名付けた。次いで神経突起伸展へのXpnの詳細な役割を明らかにするためにXpnの発現時期と脳内局在を検討した結果、マウス脳におけるXpnが胎生後期と周産期において一過的に強く発現することを確認した。また、*In situ* hybridization法によりXpn発現神経細胞は発生学的に3つのタイプに分類できること、更に免疫組織化学的解析により、Xpnが発達段階をとおり脳神経細胞の核と細胞質に局在することを明らかにした。

以上の結果よりXpnは核と細胞質において発達期の脳において神経突起伸展の制御によって神経回路形成に関与することが示され、この神経回路形成の障害が精神遅滞の発症を引き起こすことが示唆された。

〔 目 的 〕

近年の遺伝学的研究により、発達障害を含む広義の精神障害においても発症リスクに関わる脆弱性遺伝子が多数報告され、これまでに20以上の遺伝子がX連鎖精神遅滞(XLMR)責任遺伝子として同定されている(Ropers and Hamel, 2005)。KIAA2022はXLMR患者の遺伝子解析から逆位による遺伝子断絶が明らかなXLMR責任遺伝子である(Cantagrel et al., 2004)。KIAA2022は1516アミノ酸の長大なタンパク質をコードしており、これまでに機能モチーフや、他のタンパク質との明らかな相同性は見つかっていない(Cantagrel et al., 2004, 2009)。Cantagrel et al., 2009はKIAA2022 mRNAが脳において高発現することを見出し、KIAA2022が脳において重要な役割を果たすことを示唆した。しかしながら、KIAA2022の詳細な機能は不明である。そこで脳におけるKIAA2022の機能解析を行い、XLMR発症メカニズムへの関与を明らかにする目的で本研究を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

KIAA2022はPC12細胞における突起伸展に関与する

PC12細胞はnerve growth factor (NGF)誘導性突起形成のモデル細胞として確立されている(Meakin and Shooter, 1992)。PC12細胞にsiRNA処理を行ってKiaa2022の発現を抑制した後にNGFにより突起伸展誘導を行い、その後の形態変化を観察した。その結果、siRNA処理細胞はコントロール細胞(未処理、Scramble siRNA)に比べて突起伸展が抑制された。KIAA2022強制発現ベクターを用いた回復実験を行った結果、KIAA2022 siRNAによる突起伸展の抑制が減少した。PC12細胞の突起伸展にはNGF誘導によるTrkA受容体の活性化が関与することが知られている(Meakin and Shooter, 1992)。そこで、KIAA2022発現抑制によるTrkA経路への影響を検討した。その結果、Kiaa2022発現抑制によるTrkA、及びリン酸化TrkAの発現量に差は見られなかった。また、Kiaa2022発現抑制による細胞死誘導の可能性を検討するためにTUNEL assayを行った。しかしsiRNA処理細胞とコントロール細胞での細胞死誘導に差は見られなかった。以上の結

果から、*Kiaa2022*発現抑制によりPC12細胞の突起伸張が阻害されることが明らかとなり、我々は*KIAA2022*を突起伸張関連XLMRタンパク質(XLMR protein related to neurite extension)Xpnと名付けた。

マウス脳におけるXpnは発達段階によって発現量及び発現局在が変化する

発達段階におけるマウス脳でのXpnの発現時期と脳内局在の検討を行った。リアルタイムPCR解析の結果、胎生10.5日齢ではマウス脳におけるXpnの発現は見られなかったが、発達が進むにつれてXpnの発現が上昇し、生後3日齢においてXpn発現量が最大となることが明らかとなった。その後、発現量は徐々に減少し、成体マウス脳においてXpnは非常に低いレベルでの発現となった。また、*In situ* hybridization法により脳内局在の変化の検討を行った。その結果、Xpn発現神経細胞は3つのタイプに分類できることが明らかとなった。タイプⅠ神経細胞ではXpnは胎生期に一過的に発現する。脳幹や小脳においてタイプⅠ神経細胞が見られる。タイプⅡ神経細胞は胎生後期や周産期にXpn発現量が最大となる。タイプⅡ神経細胞は主に大脳皮質や線条体に存在する。タイプⅢ神経細胞は胎生期から成体期にかけてXpnの発現が持続して見られる。このタイプの神経細胞は海馬のアンモン角や歯状回、嗅球の僧帽細胞である。グリア細胞でのXpn発現は見られなかった。

Xpn細胞内局在は発達段階を通じて核と細胞質である

免疫組織化学的解析により、Xpnの細胞内局在の検討を行った。その結果、PC12細胞と成体マウス脳神経細胞において、Xpnは核と細胞質に局在することが明らかとなった。しかし、軸索や樹状突起には発現が見られなかった。胎生期から成体期におけるマウス脳神経細胞内のXpn発現局在の検討においても、Xpnは主に核と細胞質に局在し、軸索や樹状突起での発現は見られなかった。

[総 括]

Xpn発現抑制によりPC12細胞におけるNGF誘導性突起伸張が抑制されたことから、Xpnの神経突起伸張への関与が示された。マウス脳を用いた検討から、1)Xpnは胎生後期から周産期において高発現すること、2)発達が進むに連れて脳全体における発現量が徐々に減少すること、3)Xpnタンパク質は核と細胞質に局在し、軸索や樹状突起には発現が見られないことが明らかとなった。以上の結果よりXpnは発達期の脳において転写調節や細胞骨格の制御を行うことで神経突起伸張の制御をし、神経回路形成に関与することが考えられる。そしてXpn欠失によりこの神経回路形成が障害され、精神遅滞の発症が引き起こされることが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (石 川 淑 子)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教 授	谷 池 雅 子
	副 査	教 授	松 崎 秀 夫
	副 査	准教授	鈴 木 勝 昭

論文審査の結果の要旨

この研究はX連鎖精神遅滞(XLMR)の責任遺伝子の一つであり、症候性自閉症を引き起こすKIAA2022の機能解析を行い、XLMR 発症メカニズムへの関与を明らかにする目的で行われた。PC12細胞にsiRNA 処理を行ってKiaa2022 の発現を抑制した後にNGF により突起伸展誘導を行った結果、Kiaa2022発現抑制細胞はコントロール細胞に比べてNGF による突起伸展が抑制され、KIAA2022強制発現ベクターを用いるとKIAA2022 siRNA による突起伸展が回復した。そこで著者らは、KIAA2022 を突起伸展関連XLMR タンパク質(XLMR proteinrelated to neurite extension)Xpn と名付け、発達段階におけるマウス脳でのXpn の発現時期と脳内局在の検討を行ったところ、胎生10.5 日齢ではXpn の発現は見られなかったが、発達が進むにつれて発現が上昇し、生後3 日齢において最大となった後、発現量は徐々に減少し、成体マウス脳においてXpn は非常に低いレベルでの発現となった。また、In situ hybridization 法による脳内局在の変化の検討の結果、Xpn 発現神経細胞は脳幹や小脳において胎生期に一過的に発現するタイプと、主として大脳皮質や線条体に存在し胎生後期や周産期にXpn 発現量が最大となるタイプ、海馬のアンモン角や歯状回、嗅球の僧帽細胞に胎生期から成体期にかけて持続して見られるタイプにわかれ、成体マウス脳神経細胞においてはXpn は核と細胞質に局在することが明らかとなった。以上の結果よりXpn は発達期の脳において転写調節や細胞骨格の制御を行うことで神経突起伸展の制御をし、神経回路形成に関与すること、そしてXpn 欠失によりこの神経回路形成が障害され、精神遅滞・自閉症の発症が引き起こされることが示唆された。

石川らの研究は、精神遅滞／自閉症の責任遺伝子であるKIAA2022の機能解析を世界に先駆けて行い、その神経突起伸張制御が正常の神経回路形成に重要であることを示した。従って、当研究科の学位論文にふさわしいと判定された。