

公益財団法人富山第一銀行奨学財団
理事長 野村 充 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名　： 富山大学		助成金額　　： 800 千円	
研究代表者　： 藤井拓人	所属　　： 学術研究部 薬学・和漢系		職位　　： 講師
研究題目　　： 新規 Na ⁺ ポンプによる神経軸索伸長機構とその破綻が関与する発達障害発症機構の解明			

研究概要

脳の発達期において神経細胞は、細長い突起（軸索）の先端部をアメーバ状に動かしながら、正しい方向に移動し、標的となる神経細胞の樹状突起に到達してシナプスを形成する。この軸索伸長の異常は自閉症や統合失調症などの神経発達障害につながる。本研究では、自閉症や統合失調症患者において複数の変異が報告されている「BR-ATPase（論文投稿前のため、本報告書では仮称を用いる）」に着目する。最近、我々は BR-ATPase が「ナトリウムイオン（Na⁺）を輸送する Na⁺ポンプ（Na⁺-ATPase）」として機能することを発見した。また、BR-ATPase は、軸索の先端部に集積しており、発現を減少させることで軸索伸長が著しく阻害された。これまで、軸索の伸長には神経細胞内のカルシウムイオン（Ca²⁺）動態が重要な役割を担うと考えられているが、Na⁺動態について詳細に検討した研究報告は無い。そこで本研究では、「新規 Na⁺ポンプ BR-ATPase が司令塔として軸索内 Na⁺動態を制御し、軸索伸長を導く」という新たな軸索伸長メカニズムの解明を目的とした。本助成期間中には、発現系を用いた BR-ATPase の詳細なイオン輸送機能およびポリアミン輸送機能の検討、ならびにラット神経細胞において BR-ATPase と機能的に連関し、軸索伸長に関与する分子の探索を行った。

成果要約

本研究では、まず BR-ATPase の詳細なイオン輸送機能を明らかにするため、BR-ATPase を強制発現させた HEK293 細胞を用いて Na⁺輸送活性を検討した。BR-ATPase の ATPase 活性が Na⁺濃度依存性を示すことから、²²Na⁺を用いて Na⁺輸送活性を解析した。一般に、ほぼすべての細胞の原形質膜には Na⁺,K⁺-ATPase が発現し、細胞内外の Na⁺濃度勾配の形成を担っている。BR-ATPase を過剰発現させていないコントロール細胞において、Na⁺,K⁺-ATPase 阻害剤 ouabain を添加したところ、細胞内 ²²Na⁺量は有意に上昇した。一方、BR-ATPase 発現細胞では、ouabain 添加による細胞内 ²²Na⁺量の上昇は認められなかった。以上の結果から、BR-ATPase は Na⁺を細胞外へ排出する ATPase として機能し、内因性 Na⁺,K⁺-ATPase の阻害に伴う細胞内 Na⁺上昇を抑制する可能性が示唆された。

次に、BR-ATPase の基質特性をさらに検討するため、ポリアミンの 1 つである spermidine に着目した。近年、一部の ATPase がポリアミン輸送に関与することが報告されていることに加え、ポリアミンは神経細胞の分化や軸索伸長に関与することが知られている。そこで、BR-ATPase が Na⁺輸送に加えてポリアミン輸送にも関与しうる可能性を検討した。BR-ATPase 強制発現 HEK293 細胞の膜画分を用いて ATPase 活性を測定したところ、Na⁺存在下で BR-ATPase 野生型 (WT) 発現細胞ではコントロール (未発現) 細胞に比べて有意な活性上昇が認められた。一方、D487N 変異体発現細胞では活性上昇は認められなかった。D487N 変異体は、ATPase 反応に必須なリン酸化ドメインの Asp 残基を置換した変異体であり、BR-ATPase の ATPase 機能に重要な変異体である。さらに、spermidine を添加すると WT 発現細胞では ATPase 活性が有意に上昇し、その活性は 1~30 mM の範囲で濃度依存的に増加した。また、spermidine 存在下で Na⁺濃度を低下させると ATPase 活性は著しく低下した。これらの結果から、BR-ATPase の ATPase 活性は Na⁺および

spermidine 依存性を示すことが明らかとなった。さらに、 $[^3\text{H}]$ -spermidine を用いて BR-ATPase 発現 HEK293 細胞における spermidine 取込み活性を検討したところ、WT 発現細胞ではコントロール細胞と比較して有意に高い取込み活性が認められ、これは時間依存的に増加した。また、この取込み活性は反応温度を 4°C に低下させることで有意に抑制された。一方、D487N 変異体発現細胞では有意な取込み活性の上昇は認められなかった。以上の結果から、BR-ATPase は Na^{+} 輸送活性に加えて、spermidine の細胞内取込みにも関与する可能性が示唆された。

続いて、BR-ATPase が神経細胞の軸索伸長に関与する分子機構を明らかにするため、ラット初代培養神経細胞において BR-ATPase ノックダウンにより変動する分子の探索を行った。BR-ATPase が Na^{+} -ATPase として機能することから、まず軸索伸長に関与する Na^{+} 輸送体群の発現変化に着目した。BR-ATPase siRNA 導入により BR-ATPase mRNA 発現の低下を確認したサンプルについて、NHE1、NCX1、NKCC1、Nav1.7 および Nav1.9 の mRNA 発現を解析したところ、NHE1 mRNA 発現量のみが減少していた。この結果は real-time PCR 解析でも確認された。さらに、抗 BR-ATPase 抗体および抗 NHE1 抗体を用いた免疫共染色により、BR-ATPase と NHE1 が成長円錐において共局在することを明らかにした。

また、軸索内輸送との関連を検討するため、キネシン関連分子の発現変動についても解析した。ラット初代培養神経細胞において BR-ATPase ノックダウンの影響を検討したところ、Kifc1 mRNA 発現が低下することを見出した。

以上の結果から、BR-ATPase は神経細胞の軸索小胞および成長円錐に局在し、 Na^{+} を細胞外に、spermidine を細胞内に交換輸送する Na^{+} /spermidine ATPase として機能することが示唆された。さらに、神経軸索において、BR-ATPase は、 $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ 交換輸送体 NHE1 やキネシン関連分子 Kifc1 と機能的に連関することで、軸索伸長を制御する可能性が示された。本成果は、BR-ATPase を中心とした新たな軸索伸長制御機構の一端を明らかにするものであり、自閉症や統合失調症などの神経発達障害の病態理解と新規治療標的の探索につながることが期待される。

研究成果発表状況	雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況		
	本助成により得られた成果を中心に、現在、学術論文として取りまとめを進めており、今後、学会等においても順次発表する予定である。		
経費の執行状況	区 分	執行額(円)	備 考
	試薬類	431,023 円	抗体、蛍光指示薬、siRNA、阻害剤など
	細胞培養関連試薬	55,154 円	メディウム、抗生物質、遺伝子導入試薬など
	消耗品	313,823 円	ディッシュ、ピペット、プレート、計数版など