

博士論文

統合失調症の病態生理とキネシンスーパーファミリー蛋白  
KIF3 の分子細胞生物学的研究

吉原 壮悟

博士論文

統合失調症の病態生理とキネシンスーパーファミリー蛋白  
KIF3 の分子細胞生物学的研究

所属：東京大学大学院 医学系研究科 分子細胞生物学専攻

指導教員：岡部 繁男教授

申請者名：吉原 壮悟

## 目次

1. 謝辞	7
2. 要旨	10
3. 序論	11
3-1. 統合失調症とカルボニルストレス	11
3-2. 神経細胞と CRMP2	12
3-3. キネシン分子モーター	14
3-4. アクチン細胞骨格	17
4. 結果	20
4-1. <i>Kif3b</i> <sup>+/-</sup> マウスの行動異常に対する高ベタイン餌の効果の行動科学的解析	20
4-2. <i>Kif3b</i> <sup>+/-</sup> 神経細胞の突起過剰形成に対するベタインの効果の形態学的解析	22
4-3. <i>Kif3b</i> <sup>+/-</sup> 神経細胞のラメリポディア動態異常に対するベタインの効果の形態学的解析	24
4-4. <i>Kif3b</i> <sup>+/-</sup> 神経細胞のラメリポディア内アクチン束減少に対するベタインの効果の形態学的解析	25
4-5. KIF3 分子モーターによる CRMP2 輸送の生化学的解析	26

4-6. 神経細胞の突起形成における CRMP2 機能の細胞生物学的解析	28
4-7. マウス脳を用いた CRMP2 カルボニル修飾の生化学的解析	30
4-8. 精製 CRMP2 蛋白質の F-アクチンに対する活性の生化学的解析	32
4-9. 統合失調症患者死後脳における KIF3 モーター蛋白質の発現解析	33
4-10. 研究の分担	35
5. 考察	36
6. 実験材料及び実験方法	42
6-1. 実験モデルと被験者の詳細	42
6-1-1. ヒト死後脳の解析	42
6-1-2. マウス	42
6-1-3. ヒト iPS 細胞	43
6-2. 実験手法	43
6-2-1. ヒト死後脳の解析	43
6-2-2. 血漿ベタイン濃度測定	44
6-2-3 マウス行動解析	44
6-2-4. マウス脳組織観察	45
6-2-5. 細胞培養	46
6-2-6. 抗体及び蛍光ファロイジン	47

6-2-7. 発現ベクター及びノックダウンベクター	48
6-2-8. 海馬神経細胞への遺伝子導入	49
6-3. 顕微鏡観察	50
6-3-1. 免疫蛍光染色法	51
6-3-2. STED 顕微鏡	52
6-3-3. 走査型電子顕微鏡(SEM)	52
6-3-4. 神経細胞ラメリポディアのライブイメージング	53
6-3-5. 近接ライゲーシオンアッセイ	53
6-4. 細胞形態の統計解析	54
6-4-1. 神経突起の分岐度の測定	54
6-4-2. ラメリポディア動態の測定	54
6-4-3. アクチン束密度の測定	54
6-4-4. アクチン動態の形態学的測定	55
6-4-5. EB1 浸潤率の測定	55
6-4-6. ラメリポディア周縁部の CRMP2 強度比較	55
6-5. 生化学的手法	55
6-5-1. 酵母ツーハイブリッド結合実験	55
6-5-2. 免疫沈降法	56

6-5-3. イムノブロットティング	56
6-5-4. HiRes-SEC アッセイ	57
6-6. アクチン結合実験	58
6-6-1. アクチン濁度アッセイ	58
6-6-2. ピレンアクチン重合アッセイ	59
6-6-3. アクチン共沈降アッセイ	59
6-6-4. TIRF 顕微鏡によるアクチンフィラメント束化アッセイ	60
6-7. データの定量と統計解析	61
7. 引用文献	62
8. 発表論文	78
9. 図	79
10. 補足図	106

## 1. 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、多大なるご支援とご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 細胞生物学・解剖学教室 分子構造・動態学寄付講座 廣川信隆特任教授に深く感謝致します。廣川先生の元で研究者としての第一歩を踏み出せたこと、また研究への情熱と喜びをご教授いただいたことは私の今後の人生において大きな財産となりました。ここに深く御礼申し上げます。

本研究を行う過程で多くのご助言を賜りました東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻 細胞構築学分野 田中庸介講師、小川覚之助教ならびに理化学研究所 吉川武男先生に深く感謝致します。研究方針から実験手法にいたるまで詳細にわたってご指導、ご協力いただきました。心より御礼申し上げます。

CRMP2 の初期解析をしてくださった竹田扇教授（帝京大）、野田泰子教授（自治医大）、マウス PPI 試験を行って頂いた森川桃博士、技術的な支援をしてくださった森川真夏博士、福田晴代氏、佐藤ヒロミ氏、尾之内伸久氏、赤松剛氏（東京大学）に深く感謝いたします。

死後脳の解析について多くのご支援を頂きました國井泰人准教授（東北大）、矢部博興教授（福島県立医科大）、柿田明美教授(新潟大学脳研究所)、日野瑞城博士（福島県立医科大）に深く感謝いたします。大場久子博士（理化学研究

所)、渡辺明子博士(理化学研究所)には、マウス行動実験の技術協力をいただきました。深くお礼申し上げます。また、SEM 解析に御協力いただいた小田武秀氏(ZEISS)、4 色免疫蛍光顕微鏡撮影に御協力いただいた林理恵氏(ZEISS)、STED 顕微鏡撮影に御協力いただいた根東寛准教授、浅原益美氏(東京大学、IRCIN)、光学顕微鏡撮影に協力していただいた飯草英明氏(Keyence)に深く感謝いたします。アクチン重合アッセイに御協力いただいた北川宏子氏(日本分光)、ベタインに関して生化学的なご示唆を下さった藤田恭平氏(東京大学)、Lifeact-mRuby マウスを提供してくださった Michael Sixt 博士と Roland Wedlich-Soldner 博士(マックスプランク生化学研究所、ドイツ)、Direct-ELISA に御協力いただいた萩原義明氏と松波一貴氏(免疫生物学研究所)にも深くお礼申し上げます。統計処理についてご助言を賜りました松山裕教授(東京大学)に深く感謝いたします。

本研究は多くの研究助成金により実施されました。ここに記して感謝の意を表します。

① 日本医療研究開発機構(AMED)脳科学研究戦略推進プログラム『臨床と基礎研究の連携強化による精神・神経疾患の克服(融合脳)』の「細胞内分子モーターKIF3, KIF17 の発達障害・統合失調症における役割の解明・新規治療法の開発及びホモシステイン代謝経路に注目した統合失調症の新規治療薬の開発」



(JP20dm0107084；代表者 廣川信隆、田中庸介、JP20dm0107083；代表者 吉川 武 男、JP19dm0107086 及 び JP19dm020707；代 表 者 國 井 泰 人、JP19dm0107107；代表者 矢部博興、JP19dm0107104；代表者 柿田明美)

② 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究（助成番号 JP16H06277；代表者 矢部博興、JP19H05223；代表者 柿田明美）。

③ 日本電子株式会社（JEOL）（代表者 廣川信隆）。

また、東京大学生命科学技術国際卓越大学院プログラムからも支援を賜りました。心より御礼申し上げます。最後に、常に温かく見守り励まして下さった両親に深謝の意を表して謝辞といたします。

## 2. 要旨

統合失調症患者の脳では、神経細胞の形態が大きく変化する傾向が示唆されているが、その分子機序には不明な点が多い。今回、抗カルボニルストレス剤ベタインが、統合失調症様表現型を示すキネシン分子モーター遺伝子を破壊した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおける表現型の一部を回復することを明らかにした。その分子メカニズムとして、CRMP2 の KIF3 モーターによる細胞周縁部への輸送ならびに CRMP2 のベタインによる脱カルボニル化による活性上昇が、主にアクチンの束化を通してラメリポディア動態を維持し、神経細胞突起の過剰形成を抑制していることを解明した。これらの結果は、KIF3-CRMP2 軸の機能低下による統合失調症の新規発症メカニズムならびにそれに対するベタインの作用機序を示唆するものである。

### 3. 序論

#### 3-1. 統合失調症とカルボニルストレス

統合失調症 (SCZ) は、生涯有病率が世界で 0.3~0.7%の主要な精神疾患である (McGrath et al., 2008)。神経発達仮説 (Insel, 2010) において、発達中の神経細胞の障害が統合失調症の発症に中心的な役割を果たしている可能性が提唱されているが (Bellon et al., 2007; Birnbaum and Weinberger, 2017; Stefansson et al., 2009)、その詳細な分子メカニズムには不明な点が多い。

これまでの研究により、酸化ストレスの異常が統合失調症発症の原因の 1 つであることが示唆されている (Schulz et al., 2000; Young et al., 2007)。酸化ストレスは終末糖化産物 (AGEs; advanced glycation end-products) 形成の中心的なメディエーターであり、ビタミン B6 の活性型であるピリドキサミンは、反応性カルボニル化合物 (RCO; reactive carbonyl compounds) を減少させることにより AGEs を除去する (Booth et al., 1996)。生体内において RCO がタンパク質・糖・脂質などを非酵素的に修飾し、AGEs が蓄積した状態をカルボニルストレスと呼称する。AGEs の細胞内除去は、亜鉛金属酵素であるグリオキサラーゼ I (GLO1) の活性に大きく依存しており、カルボニルストレスと GLO1 の機能障害が、統合失調症や自閉症、アルツハイマー病などの精神神経疾患に重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Junaid et al., 2004; LoPachin et al.,

2007)。統合失調症では、患者の約 20%において AGEs の血中濃度が高く、ビタミン B6 の血中濃度が低いこと(Arai et al., 2010) や、患者へのピリドキサミン投与によって、症状が回復する場合があることが報告されている (Itokawa et al., 2018)。

ベタインは抗カルボニルストレス剤であり、その血漿および脳内の発現レベルは統合失調症患者において低下傾向にある (koike et al., 2014; Ohnishi et al., 2019)。また、ベタインの経口投与は幻覚剤投与やベタイン欠乏による統合失調症モデルの行動表現型を回復することが示唆されている (Ohnishi et al., 2019)。しかし、カルボニルストレスの上昇が単独で統合失調症の発症に繋がることは報告されていない (Birnbaum and Weinberger., 2017; Insel., 2010; Stefansson et al., 2009) ため、関連分子の遺伝的またはエピジェネティックな欠陥との相乗効果を解明することが、統合失調症発症の分子メカニズムを解明する鍵となる。

### 3-2. 神経細胞と CRMP2

神経細胞は、情報を処理・保存するための脳の最も基本的な要素である。神経細胞は、タウで特異的に標識される軸索と、MAP2 で特異的に標識される樹状突起を持つ高度に極性化された細胞である。これらは神経突起と呼ばれる幼

若期の神経細胞において観察される構造が成長することにより形成されるが、統合失調症や自閉症スペクトラム障害、パーキンソン病、てんかんなどの脳疾患では、脳回路の異常が検出されており、統合失調症においては神経突起の過剰分枝が、モデルマウスの脳神経細胞で一部検出されている (Duan et al., 2007; Pathania et al., 2014)。これらのことから、神経突起の形態的な発達は、脳の機能を正常に維持するための基本であると考えられている。

CRMP2 (collapsing response mediator protein 2) は、特に中枢神経系で高い発現量を示しており、培養神経細胞や発達期の脳組織において、神経突起の伸長 (Quach et al., 2004)、軸索/樹状突起の決定 (Kawano et al., 2005)、神経細胞の極性 (Arimura et al., 2000; Yoshimura et al., 2005)、シナプスの形成 (Zhang et al., 2016a)、神経伝達物質の放出 (Brittain et al., 2009) など、神経細胞の様々な構造において重要な機能を果たしており、神経発達に不可欠な制御因子と考えられている。遺伝学的研究により、統合失調症が転写レベルにおける CRMP2 の変化と関連していることが明らかにされており、また、CRMP2 の機能的な変異は、統合失調症のリスクを高めることが報告されている (Liu et al., 2015)。

さらに、統合失調症患者の死後脳において、CRMP2 の翻訳レベルでの急激な変化が確認されていることに加え、脳特異的な CRMP2 ノックアウトマウスは、統合失調症様の行動異常や神経細胞の特徴を示すことから、CRMP2 の活性低

下は統合失調症と相関していると考えられている (Nakamura et al., 2016)。

CRMP2 の機能はリン酸化やカルボニル化、O-GlcNAc 化、SUMO 化などの複数の翻訳後修飾によって厳密に制御されている。その中でも、リン酸化は広く研究されているが、他の翻訳後修飾は、CRMP2 の活性を制御する上で重要な役割を果たす可能性があるにもかかわらず、多くが明らかになっていない (Zhang and Koch, 2017)。我々の先行研究では、CRMP2 が、カルボニル化修飾を受けて多量体化 (AGE-CRMP2) し、その機能が失われてしまうことを報告した (Toyoshima et al., 2019)。統合失調症の病因として、酸化ストレスの上昇によるカルボニルストレスの発生が提唱されていることから (Cabungcal et al., 2014; Itokawa et al., 2018; Itokawa et al., 2014; Miyashita et al., 2014; Sawa and Seidman., 2014)、AGE-CRMP2 は統合失調症の発症経路における重要な分子の 1 つである可能性がある。

### 3-3. キネシン分子モーター

微小管細胞骨格は、直径 25 nm のチューブ状に重合したチューブリンポリマーからなり、神経細胞の形態形成や細胞内の輸送に重要である。タウや MAP2 などの微小管関連タンパク質は、微小管を架橋して安定化させ、神経細胞の形態形成に重要な役割を果たしている (Hirokawa, 1994)。また、キネシンやダイ

ニンなどの分子モーターも微小管に結合し、主に ATP を加水分解しながら微小管に沿って運動する性質を持ち、細胞内で必要なタンパク質複合体や細胞小器官などの細胞内物質輸送に重要な働きをしている。キネシンスーパーファミリータンパク質 (KIFs) は、哺乳類脳の cDNA ライブラリーから 45 種類が同定されており、15 種類のサブファミリーに分類されている (Hirokawa, 2009)。

KIFs は、記憶・学習などの脳の高次機能、体の左右軸の決定、腫瘍形成の抑制など重要な生命現象に関与していることが明らかとなっているが、神経細胞の形態形成については不明な点が多い。

KIF3B は、モータードメインを N 末端部に持つキネシン-2 ファミリーの一員であり、微小管のプラス端に向かって移動する。KIF3B は、もう一つのキネシン-2 モーターである KIF3A および関連タンパク質 KAP3 と結合し、KIF3 ヘテロ三量体モーターを構成している (Kondo et al., 1994; Yamazaki et al., 1996)。

KIF3 モーターは、PAR-3 を輸送することで神経細胞の極性を形成したり (Nishimura et al., 2004)、 $\beta$ -catenin や N-cadherin を輸送することで脳腫瘍を予防したり (Teng et al., 2005)、リン酸化依存的に恒常的な神経細胞の可塑性の調節を行ったり (Ichinose et al., 2015) など、生命現象に重要な役割を果たしている。また、KIF3 モーターは、線毛形成、内臓の左右軸決定にも必須の役割を果たしていることも報告されている (Hirokawa et al., 2009; Nonaka et al.,

1999)。 *Kif3b* 遺伝子をヘテロ接合でノックアウトした (*Kif3b*<sup>+/-</sup>)マウスは、社会性の障害や驚愕音への反応を弱めるプレパルス抑制 (PPI) の低下、過活動傾向、記憶・学習能力の低下や記憶の書き換えの柔軟性の低下など、他の統合失調症モデルマウスと共通する行動表現型の変化 (Manago et al., 2016; Savanthrapadian et al., 2013)を示すとともに、シナプス形態とその機能に大きな異常を示すことが明らかになっており、その分子基盤としてスパイン表面に局在して可塑性に重要な役割を担う NMDA 型グルタミン酸受容体のサブユニット NR2A と KIF3B が結合し、樹状突起内を輸送することが同定されている。

また、海馬の単一神経細胞にてパッチクランプ法を用いて AMPA 型グルタミン酸受容体応答と NMDA 型グルタミン酸受容体の応答の比率を計測により、KIF3B の減少によって NMDA 型グルタミン酸受容体の応答が減弱していること、及び海馬急性スライスを用いて可塑性を誘導する刺激により、*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬では野生型に比べてシナプス長期増強が亢進し、シナプス長期抑圧が減弱していることが判明している (Alsabban et al., 2019)。これらの電気生理学的特徴も、統合失調症の表現型としてこれまでに報告されたものと一致し (Savanthrapadian et al, 2013; Bhandari et al, 2016)、また NMDA 型グルタミン酸受容体の機能異常は統合失調症に関与していることが提唱されている (Coyle, 2006)。これらに加え、機能不全を引き起こすヒト KIF3B 変異が、ヒト統合失



調症ゲノムデータベースで同定されている (Purcell et al., 2014; Alsabban et al., 2019)。

### 3-4. アクチン細胞骨格

アクチンはすべての真核生物に最も大量に存在するタンパク質である (Pollard and Cooper, 2009)。単量体のアクチンはその形から球状アクチン (G-アクチン) と呼ばれており、生理的な条件下において 2 本のフィラメントが螺旋状に絡まった線維状アクチン (F-アクチン) を形成する。F-アクチンからなる直径 7-9 nm のアクチンフィラメントは、もう一つの細胞骨格である微小管と共に細胞の形態形成や細胞の運動に深く関与している。神経細胞におけるアクチン細胞骨格は、多数のアクチン調節タンパク質による制御を受け、突起状のフィロポディアや発生初期段階の細胞周縁部に形成されるラメリポディア、神経突起の伸展時に形成される成長円錐、II 型ミオシンと会合したアクトミオシン束からなるストレスファイバー、成熟期に形成されるスパインなど多様なアクチン構造を形成する。アクチン調節タンパク質にはアクチンフィラメントの伸縮を制御するプロフィリンやコフィリン、架橋や束化を制御する  $\alpha$ -アクチニンやファシン、枝分かれを制御する Arp2/3 などが存在している (Blanchoin et al., 2014)。神経発達における神経突起の形成経過は、in vitro で適切な形態

的発達を遂げた初代培養マウス海馬神経細胞で連続的に追いかけることができる (Dotti et al., 1998)。F-アクチンの束によって非常に動的な構造であるラメリポディアは、in vitro の培養 (days in vitro; DIV) 1 日目のステージ 1-2 で形成される (Blanchoin et al., 2014)。中心部の微小管に富んだ (C-) ドメインと、周縁部のアクチンに富んだ (P-) ドメインが動的に共役してラメリポディアの形態と機能を支えており (Cammarata et al., 2016; Coles and Bradke, 2015; Dominguez and Holmes, 2011)、これらは適切な神経細胞の神経突起形成に不可欠である (Burnette et al., 2007; Medeiros et al., 2006; Tanaka and Kirschner, 1991)。従って、ラメリポディアの制御機構を解明することは、神経突起形成異常を伴う疾患に対する治療法の開発に有効であると考えられる。

本研究では、*Kif3b*<sup>+/−</sup>マウスに高ベタイン餌を与え、その効果を探索したところ、この餌が統合失調症様の神経細胞の形態及び行動異常を回復することが判明した。これは、ベタインを初代培養海馬神経細胞の培地に投与した際の結果と一致しており、ベタインはラメリポディアのアクチン束や動態を回復させ、その結果、神経突起の過剰形成を抑制することが判明した。そして、CRMP2 が KIF3 分子モーターの輸送タンパク質であると同時に、カルボニル化高感受性アクチン束形成因子であることを生化学的に確認した。これによって、ベタ

インは CRMP2 の脱カルボニル化を惹起し、その活性を上昇させ、*Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬神経細胞のラメリポディアにおける CRMP2 の欠乏を機能的に補っているのではないか、という仮説を提案する。さらに、統合失調症患者死後脳の前頭前皮質では、KIF3 分子モーターの発現レベルが低下傾向にあることを同定し、KIF3 分子モーターによる CRMP2 輸送の欠陥がヒト統合失調症の病因に関連している可能性を示唆する。これらのデータは、統合失調症の分子メカニズムの一つとして、KIF3 分子モーターの欠陥とカルボニルストレスの相乗効果を提唱するものであり、これらの知見と神経発達仮説を組み合わせることで、統合失調症分子病態の理解と新規治療薬の開発に新たな進展をもたらすことが期待される。

## 4. 結果

### 4-1. *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの行動異常に対する高ベタイン餌の効果の行動科学的解析

抗カルボニルストレス剤であるベタインが *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの統合失調症様表現型を回復できるかを検証するため、通常餌(CE-2)にベタイン (図 1A) を添加して、CE-2 の約 3 倍のベタイン含量を持つ高ベタイン餌 (High Betaine Diet; HBD)を調製した。*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスと *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスに、離乳(4 週齢)後 6~7 週間にわたり、CE-2 または高ベタイン餌を自由摂取させた (図 1B)。両群の体重は同様の増加傾向を示したため (補足図 1A)、餌の摂取量に大きな差はないと考えられた。高ベタイン餌摂食により、*Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスと *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの両群において、血漿ベタイン濃度の上昇が確認され、原因は不明だが *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスで観察された増加は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスよりも大きい傾向があった。

そこで、以下の一連の行動試験を行った (図 2、3、4、および補足図 1、2、3)。*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの CE-2 摂食群はこれまでに報告されている統合失調症様の行動を顕著に再現したため (Alsabban et al., 2019)、高ベタイン餌を与えた効果を調べた。まず、高ベタイン餌は *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの社会性における表現型を回復した。*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおける 3 チャンバー社会性試験においては、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスは対照マウスがいる区画の滞在時間が減少する低社会性を示し、この表現型は高ベタイン餌摂食によって有意に回復した (図 2A および B)。ま

た、reciprocal 社会性試験では、同じ遺伝子型・給餌を受けた、これまでに遭遇経験がないマウスとの社会的相互作用が、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスよりも低い値を示し、この値も高ベタイン餌摂食によって有意に上昇していた（図 3A および 3B）。

次に、プレパルス抑制(PPI)試験を行った（図 4 A、4 B および補足図 1C）。音響驚愕反応（ASR）の程度は変化しなかったが（図 4 A）、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの PPI は著しく低下しており、この低下も高ベタイン餌摂食によって回復傾向にあった（図 4 B および補足図 1C）。

*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスは、オープンフィールド試験や高架式十字迷路試験において、多動性や不安様行動を示す傾向があったが（補足図 2 および 3）、これらの異常は高ベタイン餌摂食によって有意に回復しなかった。また、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの高ベタイン餌摂食群は CE-2 摂食群と比較し、3 チャンバー社会性試験における総歩行距離に明らかな差が生じることなく社会性が回復したことから（補足図 1B）、社会的表現型は運動能力や不安作用とは無関係であると考えられた。しかしながら、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの高ベタイン餌摂食群では、3 チャンバー社会性試験および高架式十字迷路試験において、原因不明のわずかな副作用が見られた（図 2 および補足図 3）。

以上の結果から、高ベタイン餌を摂食することで、少なくとも統合失調症の代表的な行動表現である *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの社会性及び PPI の低下を緩和するこ

とができると考えられる。

#### 4-2. *Kif3b*<sup>+/-</sup>神経細胞の突起過剰形成に対するベタインの効果の形態学的解析

高ベタイン餌摂食による行動回復の細胞生物学的基盤として、in vivo および in vitro における神経細胞の形態を調べた (図 5)。in vivo のマウス大脳皮質においてはゴルジ染色を、in vitro の海馬初代培養神経細胞においては抗 MAP2 抗体を用いた免疫染色を行い、顕微鏡撮影した画像において Sholl 解析 (Sholl, 1953) を施行し、神経突起の分枝点数を定量化した。その結果、11 週齢の *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおける前頭前野の第 4-5 層の錐体細胞 (図 5 A および 5 C) ならびに、初代培養した *Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬錐体細胞の DIV3 のステージ 2-3 (図 5 B および 5 D) および DIV14 のステージ 5 (補足図 4A および 4B) の双方において、分枝点数の有意な増加が確認され、その差は細胞体近位部である 5-20  $\mu\text{m}$  の範囲に多く観察されたため、神経突起の過剰形成が生じていることが示唆された。これらの過剰形成表現型は、一部の統合失調症モデルマウスでも報告されている (Duan et al., 2007; Pathania et al., 2014; Peca et al., 2011)。さらに、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウス神経細胞における過剰形成表現型は、in vivo および in vitro の双方においてベタイン投与により回復し (図 5 および補足図 4)、この効果は行動試験における表現型の回復と関連していた。高ベタイン餌は、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの大脳皮

質錐体細胞の過剰形成を、対照群である CE-2 と比較して著しく減少させた (図 5 A および 5 C)。in vitro の初代培養海馬錐体細胞では、最初の 24 時間の間に培養液に 500  $\mu$ M のベタイン (Ohnishi et al., 2019 ; 補足図 4C) の添加により、大きな副作用を及ぼすことなく、初代培養 *Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬錐体細胞の神経突起形成が有意に減少した (図 5 B および 5 D)。また、この表現型は、抗カルボニルストレス剤として知られている 500  $\mu$ M ピリドキサミン処理 (Itokawa et al., 2018 ; 図 6A および 6 B)、または KIF3B-TagRFP の強制発現のいずれによっても回復された (図 6C および 6 D)。これらのデータから、ベタインはこれまでに提唱されている化学的シャペロン活性や浸透圧バッファー活性などの他の様々な機能よりも抗カルボニルストレス剤としての役割により (Knight et al., 2017; Mittal and Singh, 2015; Ohnishi et al., 2019; Zhang et al., 2016b)、過剰形成表現型の原因である KIF3B タンパク質の欠損を機能的に補っていることが示唆された。

カルボニルストレスと神経突起過剰形成の因果関係を調べる他の細胞モデルとして、カルボニルストレスの減少に必須の役割を果たす *GLO1* 遺伝子欠損ヒト iPS 細胞から誘導した神経細胞の神経突起分枝を調べた (Toyoshima et al., 2011)。 *GLO1*<sup>−/−</sup>神経細胞では、 *GLO1*<sup>+/+</sup>神経細胞と比較し、神経突起の分枝が有意に増加しており (図 7A および 7B)、このことは、過剰なカルボニルスト

レスがヒトの神経細胞においても神経突起の過剰形成を引き起こす可能性を裏付けている。これらのデータを総合すると、KIF3 の欠損とカルボニルストレスの双方が、大脳皮質および海馬神経細胞において神経突起の過剰形成を引き起こす可能性があり、これらの影響は抗カルボニルストレス剤によって回復されることが示唆された。

#### 4-3. *Kif3b*<sup>+/−</sup>神経細胞のラメリポディア動態異常に対するベタインの効果の形態学的解析

神経細胞過剰形成の上流の現象として、DIV1 のステージ 1-2 の初代培養 *Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬神経細胞において、そのラメリポディア動態が著しく低下していることを同定した。カルセイン-AM を用いて細胞膜を標識し、タイムラプスイメージングにより細胞を観察した (図 8A)。その結果、*Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬神経細胞は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞と比較し、ラメリポディア端の動態が小さくなる傾向が観察された (図 8B)。この動態変位の低下は運動の大きさをあらかず統計処理指標の 1 つである平均二乗変位および伸長・退縮双方向の変位量によっても定量化することができた (図 8C および 8D)。この *Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬神経細胞におけるラメリポディア動態異常はベタイン処理によって大きな副作用なく、有意に回復した (図 8C および 8D)。



次にアクチン細胞骨格の変化を探索するため、蛍光ファロイジンで標識した初代培養海馬神経細胞を Airy scan セミ超解像顕微鏡を用いて観察した (図 9 A)。その結果、*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞ではラメリポディア内アクチン束の密度が低下しており、この低下はベタイン投与によって有意に回復したが *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞にもアクチン束密度の上昇を及ぼした (図 9 A、橙矢印および 9 B)。このアクチン束の表現型の異常は、誘導放出抑制顕微鏡 (STED) 顕微鏡 (図 9 C) 及び走査型電子顕微鏡 (SEM) (図 9 D) を用いた観察によっても、共焦点顕微鏡観察と同様の結果が得られた。

#### 4-4. *Kif3b*<sup>+/-</sup>神経細胞のラメリポディア内アクチン束減少に対するベタインの効果の形態学的解析

ラメリポディア内アクチン束の動態を調べるため、Lifeact-mRuby 遺伝子発現細胞におけるライブイメージングによって、ステージ 1-2 の海馬神経細胞の F-アクチンを観察した。まず、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞及び *Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞において、500  $\mu$ M ベタイン処理の条件下で共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察を行った (図 10 A)。*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞では、アクチン束が頻繁に折りたたまれており (図 10 A、白矢印)、この現象はラメリポディア端の局所的な後退とその後の再伸長を伴うものであった。また、*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞の

ラメリポディア内のアクチン束が折りたたまれる頻度は、アクチン束密度の著しい低下のため *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞やベタイン処理した *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞で観察された頻度よりも有意に低下していた (図 1 0 B)。このような KIF3B/ベタイン依存性アクチン束の折り畳みと伸長の繰り返しが、ラメリポディア動態の駆動力となっていると考えられる。

さらに微小管のプラス端を EB1-YFP 遺伝子の発現により標識し、ラメリポディアへの微小管侵入を観察した (図 1 1 A)。タイムラプス画像 (図 1 1 A、白矢印) に示すように、微小管のプラス端は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞では C ドメインの外周を水平方向に移動していく傾向があったが、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞では P ドメインの中へと垂直方向に侵入する傾向があった。これらの傾向は、タイムスタック画像 (図 1 1 B) においてより顕著に表れており、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞の P ドメインには、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞と比較して、微小管のプラス端がより満遍なく侵入していることが判明した (図 1 1 C)。この傾向は、ベタイン処理によって大きな副作用なく回復した (図 1 1 C)。これらの結果から、KIF3 によるアクチン束形成は、ラメリポディア動態を賦活して P ドメインへの微小管侵入を阻害し、神経突起の過剰形成を抑制するために重要な役割を果たしているものと考えられた (図 1 1 D)。

#### 4-5. KIF3 分子モーターによる CRMP2 輸送の生化学的解析

次に、ベタインの投与によりアクチン束形成に関わる KIF3 の欠損が補われることから、この表現型の原因となりうる KIF3 モーターのカーゴについて、ベタインとのかかわりの観点から検索を加えた。まず CRMP2 がヒト統合失調症患者由来の iPS 細胞におけるカルボニルストレスの主要な標的の 1 つであること (Toyoshima et al., 2019)、CRMP2 が細胞骨格を制御する役割を果たしているという知見 (Fukata et al., 2002; Kawano et al., 2005; Niwa et al., 2017)、および未発表データであるが竹田扇教授 (現・帝京大学) が行った抗 KIF3B 抗体を用いた共免疫沈降法による KIF3 結合タンパク質のスクリーニング結果に基づき、KIF3 モーターと CRMP2 の結合を調べた。抗 CRMP2 抗体と抗 KIF3B 抗体を用いたマウス脳ライセートの上清の共免疫沈降実験を行うと、ネガティブコントロールと比較し、KIF3B と CRMP2 の有意な共沈が検出された (図 1 2 A)。また、直接的な結合能を確認するため KIF3A、KIF3B、CRMP2 の各ドメインを用いて、酵母ツーハイブリッド解析を行った (図 1 2 B および 1 2 C)。その結果、KIF3A の尾部ドメイン (aa 600-701) が CRMP2 の尾部ドメイン (aa 312-572 ; 図 1 2 C) と特異的に結合することが判明した。

次に *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞のステージ 1-2 においてセミ超解像顕微鏡による免疫染色観察を行い、KIF3、CRMP2、F-アクチン、微小管の共局在を調べた

ところ（図 1 3 A-1 3 C）、ネガティブコントロール（図 1 3 D）と比較して特異的な共局在シグナルが得られた。KIF3A と CRMP2 は、P ドメインと C ドメインの双方において共局在していたが、細胞骨格との関係はそれぞれ異なっていた。P ドメインでは、これらの共局在部位はアクチン細胞骨格と関連しており、KIF3 がラメリポディア内 CRMP2 の機能に何らかの直接的な役割を果たしていることが示唆された（図 1 3 B、白矢印）。一方、C ドメインの周縁部では、これらの共局在部位は F-アクチンと微小管の双方を含む雲状の集積と関連しており（図 1 3 B、橙矢印）、これは微小管ベースの輸送とアクチンベースの輸送間の乗り継ぎ部位を表していると考えられる。また、C ドメインの中心部と神経突起シャフトでは、微小管ベースの輸送集団を表すと思われる共局在も確認された（図 1 3 C、緑矢印）。さらに KIF3 と CRMP2 の相互作用について、異なるタンパク質が 40 nm 以内に近接している場合に可視化できる技法である近接ライゲーシヨンアッセイによって検証を加えた（Trifilieff et al., 2011）。その結果、ステージ 1-2 において、海馬神経細胞のラメリポディア及び細胞質の双方にシグナルが検出された（図 1 3 E）。これらのデータを総合すると、KIF3 モーターが CRMP2 に有意に結合していることが示唆された。

#### 4-6. 神経細胞の突起形成における CRMP2 機能の細胞生物学的解析

ラメリポディアの CRMP2 レベルを調べるため、ステージ 1-2 において初代培養海馬神経細胞の抗 CRMP2 抗体を用いた免疫染色による顕微鏡観察を行ったところ、CRMP2 は *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞のラメリポディア最周縁部に蓄積する傾向が見られた。しかし、*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞のこの領域における CRMP2 の蛍光強度は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞における蛍光強度よりも著しく低下していた (図 1 4 A および 1 4 B)。そこで、CRMP2 とラメリポディアのアクチン束との相互作用レベルを評価するため、近接ライゲーシオンアッセイを行った。*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞のラメリポディア上において、相互作用を表す点状シグナルの数は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>細胞よりも有意に少なかったため (図 1 4 C および 1 4 D)、KIF3B の欠損によって CRMP2 とアクチンの相互作用が減少することを示唆した。この表現型は、微小管依存的な CRMP2 輸送の低下により説明可能である。

次に CRMP2 が KIF3 による神経突起形成の制御のエフェクターであるかを検証するため、海馬神経細胞を用いて CRMP2 の発現量を双方向的に変化させた (図 1 5 A-1 5 D)。まず、miRNA による CRMP2 のノックダウン (KD) 実験を行った (図 1 5 A、1 5 B、補足図 5 A および 5 B)。興味深いことに、CRMP2 をノックダウンした *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞はスクランブルコントロール (SC) ベクターを導入した場合と比較し、神経突起の形成が著しく増加していた。次に、CRMP2 を *Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞に強制発現すると、コントロール発

現群と比較し、神経細胞の過剰形成が有意に回復した（図 1 5 C、1 5 D、補足図 5 C および 5 D）。これらの結果により、CRMP2 は KIF3B の機能の下流または並行した経路において作用していることが示唆された。*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞で CRMP2 をノックダウンした場合に加え、*Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞で CRMP2 を強制発現した場合においても、細胞体近位部に明らかな変化が生じなかったことから（補足図 5）、神経突起形成に対する KIF3B が介在するプロセスと CRMP2 が介在するプロセスは独立なものではないと考えられた。CRMP2 の強制発現による *Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞の表現型の回復は、軸索が長く伸長しないステージの細胞であるため、強制発現により CRMP2 が細胞周縁に拡散し KIF3 の輸送欠損を十分に補うことができたためと考えられる。以上のように、CRMP2 ノックダウンによっても KIF3 欠損海馬神経細胞と同様の神経突起過剰形成が生じたことに加え、CRMP2 の強制発現が KIF3 欠損の表現型を回復できたことは、CRMP2 が KIF3 モーターのエフェクターとして機能し、神経発生初期段階において、神経突起の過剰形成防止の分子経路に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

#### 4-7. マウス脳を用いた CRMP2 カルボニル修飾の生化学的解析

ベタイン投与によるマウス脳内の CRMP2 タンパク質の生化学的变化につい

て以下のように解析した（図 1 6 A–1 6 E）。まず、カルボニル化促進剤であるグリオキサール（Yang et al., 2011）および抗カルボニルストレス剤であるベタインにより処理した *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスの初代培養大脳皮質神経細胞ライセートを用いて、AGEs のカルボニル化残基の 1 つである CML（N-carboxymethyl lysine）に対するイムノブロッティングによりタンパク質全体のカルボニル化レベルを調べた。その結果、未処理の神経細胞でも一定レベルのタンパク質カルボニル化が内在的に存在していることが明らかになった。このカルボニル化レベルは、グリオキサール処理により有意に上昇したが、ベタイン処理により全分子量の範囲において有意に減少した（図 1 6 A および 1 6 B）。さらに、KIF3 の欠損がタンパク質のカルボニル化に及ぼす影響を調べた。興味深いことに、*Kif3b*<sup>+/+</sup>大脳皮質神経細胞におけるカルボニル化レベルは *Kif3b*<sup>+/+</sup>大脳皮質神経細胞よりも低く、その減少は CRMP2 分子の発現低下に比例していた（図 1 6 C、1 6 D、補足図 6）。この結果は、KIF3B の欠乏がカルボニルストレスの上昇とは別の経路で CRMP2 の機能を低下させていることを示唆している。次に、ベタイン投与による *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウス脳ライセートの上清中の CRMP2 複合体の分子量の変化を調べた。マウス脳ライセートの細胞質画分（画分 S3）を高分解能サイズ排除クロマトグラフィー（HiRes-SEC、図 1 6 Ea）により分子量に応じた分画をし、ドットブロッティングを行った。その結果、高ベタイン餌の摂食により、

脳における CRMP2 複合体の分子量が有意に減少し (図 1 6 Eb)、サイズ分布が右にシフトすることが判明した (図 6Ec)。特に、多量体化した CRMP2 の分画 (図 1 6 Eb および 1 6 Ec、青枠) における CRMP2 レベルが高ベタイン餌摂取群において著しく低下していた。これらの結果は、*Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスの脳ライセートの上清においても再現された (補足図 7)。多量体化の度合いは CRMP2 のカルボニル化のレベルに大きく比例することを既に明らかにしているため (Toyoshima et al., 2019)、これらのデータは、in vivo における高ベタイン餌摂取が、CRMP2 の脱カルボニル化に起因し、CRMP2 の多量体化のレベルを低下させていることを示唆している。

#### 4-8. 精製 CRMP2 蛋白質の F-アクチンに対する活性の生化学的解析

CRMP2 のアクチン細胞骨格に対する活性を生化学的に調べるため、組換え CRMP2 タンパク質 (アミノ酸残基 1-532) を精製し、さらにこのタンパク質をカルボニル化して AGE-CRMP2 を調製した (Toyoshima et al., 2019)。まず、これらのタンパク質を用いてアクチン濁度試験を行った。CRMP2 のモル比がアクチンの 2 倍以上高いとき、CRMP2 による溶液の濁度の上昇が確認できたが (図 1 7 A)、このアクチン溶液濁度の上昇活性は CRMP2 のカルボニル化によって減少した (図 1 7 B)。ピレン標識アクチン重合アッセイの結果、通常の



CRMP2 も AGE-CRMP2 もアクチン重合速度に影響を与えないことが判明した (図 1 7 C)。アクチン共沈降アッセイでは、CRMP2 と F-アクチンの共沈が量依存的に検出されたが、この共沈は CRMP2 の AGE 修飾によって損なわれた (図 1 7 D および補足図 8)。最後に、F-actin と CRMP2 を混合したのち蛍光ファロイジンを用いて標識し、TIRF 顕微鏡を用いて観察を行った (図 17E)。興味深いことに、CRMP2 は F-アクチンの束化を有意に増強することが判明したが、AGE-CRMP2 やネガティブコントロールタンパク質である B S A は増強しなかった (図 1 7 E および図 1 7 F)。これらの結果を総合すると、一定の濃度以上の CRMP2 タンパク質は、F-アクチンに結合してその束化能を有し、この活性は CRMP2 のカルボニル化によって喪失することが示唆された。

#### 4-9. 統合失調症患者死後脳における KIF3 モーター蛋白質の発現解析

ヒト統合失調症の病因における KIF3 分子モーターの意義を評価するため、患者死後脳サンプルにおける KIF3A/B タンパク質レベルを ELISA 法により測定した。統合失調症患者において神経細胞の形態異常が観察される前頭前野 (ブロードマン 10 野) と幻聴や幻覚に重要な部位である後上側頭回 (ブロードマン 22 野; 図 1 8 A) の皮質領域ライセートの上清 (Glantz and Lewis, 2000; Kasai et al., 2003) 及び年齢と性別をマッチさせた対照被験者の同領域の脳ライ

セートの上清における KIF3 レベルを比較した。興味深いことに、GAPDH レベルで正規化した統合失調症患者の 10 野における KIF3A レベルは、対照被験者よりも有意に低く (図 1 8 B)、KIF3B レベルもこの領域において減少する傾向にあった (図 1 8 C)。一方、22 野においてはこれらのタンパク質レベルには明らかな差が見られなかったことから、領域特異的な KIF3 の発現調節機構が存在し、その機構が統合失調症患者において損なわれる傾向があることが示唆された。したがって本研究において *Kif3b*<sup>+/−</sup>マウス脳を用いて解明した分子メカニズムが、ヒト患者の脳においても同様に働いている可能性が示唆された。

これらのデータから、ベタインによる統合失調症の症状回復の分子メカニズムは以下のように推測される (図 1 9)。まず、KIF3 分子モーターの遺伝的またはエピジェネティックな不活性化により、CRMP2 の神経細胞ラメリポディアへの輸送が阻害される。さらに、カルボニルストレスの上昇による CRMP2 のカルボニル化によっても、CRMP2 の活性が低下する。これら 2 つの量的・質的欠損は、相乗的にラメリポディアにおける CRMP2 活性を低下させ、F-アクチンの束化障害、ラメリポディアの異常な安定化、ラメリポディアの P ドメインへの微小管の過剰な侵入、神経突起の過剰形成を引き起こし、脳の神経回路形成やシナプスの興奮・抑制バランスを乱すと考えられる。ベタインを投与すると、CRMP2 の脱カルボニル化により CRMP2 の活性が脱抑制され、これ

らの症状が回復される。このように、CRMP2 のカルボニル化と細胞内物質輸送の欠陥は、相乗的に神経発達を阻害し、統合失調症を発症させる可能性があると考えられる。

## 6-7. 研究の分担

以上の研究は、廣川信隆特任教授、田中庸介講師、吉川武男先生、小川寛之助教のご指導の下、基本的には申請者が全て行った。マウス PPI 試験に関しては森川桃博士、ヒト iPS 細胞実験に関しては豊島学博士、死後脳 ELISA 試験に関しては國井泰人准教授、矢部博興主任教授、柿田明美教授の協力を得た。

## 考察

本研究では、アミノ酸残基のカルボニル化および KIF3 分子モーターによる細胞内輸送という CRMP2 の 2 つの制御メカニズムの破綻が、統合失調症の病因の一つであることを示唆することができた。高濃度ベタインの投与は、分子レベルから個体レベルまで、統合失調症様の *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの表現型を一貫して回復することができ、今後ヒト統合失調症の新規治療法としてさらに追究する可能性を示唆するものである。その分子機序として、CRMP2 が KIF3 のカーゴであることを明らかにした。このカーゴの輸送が欠損すると、神経細胞の正常な形態形成に必要なアクチンを介したラメリポディア動態が阻害される。一方、ベタインによる CRMP2 の脱カルボニル化は、CRMP2 のアクチン束化活性を高めることで、*Kif3b*<sup>+/-</sup>マウス神経細胞の形態異常を回復することを示した。野生型マウスの神経細胞においても CRMP2 のカルボニル化が検出されたため (補足図 7)、CRMP2 の不活性化は常に生じているが多量ではなく、アクチン束化活性を十分に有していることが示唆される。そこに KIF3B ヘテロノックアウトによる輸送の半減も加わることで、アクチン束化活性に必要な CRMP2 量に到達しなくなり、神経細胞の形態に異常が生じていると考えられる。つまり、ベタインは KIF3 に直接作用しておらず、アクチン束化活性を有した CRMP2 の量を増やすことにより、KIF3 による CRMP2 輸送を補っていると考

えられる。そのため、KIF3B ヘテロノックアウトとベタインの効果は相加的なものである。

また、死後脳の解析では、ヒト統合失調症患者の脳において KIF3 分子モーターの発現低下傾向が示唆された (図 1 8)。したがって KIF3 分子モーターを介した CRMP2 輸送の障害は、一部のヒト統合失調症患者の脳でも生じている可能性が高く、これに対してベタイン等の抗カルボニルストレス剤が有効である可能性があると考えられる。

CRMP2 は、それ自体が統合失調症の病態において高い臨床的意義を持っている (Niisato et al., 2013; Zhang et al., 2016a)。今回の研究において、CRMP2 ノックダウン海馬神経細胞 (図 1 5 A および 1 5 B) ならびに過剰にカルボニル化されたヒト iPS 由来神経細胞 (図 7) では一貫して神経突起の過剰形成および分枝が確認され、さらに CRMP2 はカルボニル化の主要標的の 1 つとして同定されている (Toyoshima et al., 2019)。また、CRMP2 をコードする *DPYSL2* 遺伝子は、統合失調症発症に強い関連が知られるヒト染色体 8p21.2 領域内に位置している (Ng et al., 2009)。従って、この CRMP2 の機能障害は、KIF3 の機能不全における統合失調症様表現型の病因を十分に説明可能である。加えて、CRMP2 のカルボニル化感受性アクチン結合活性の解明 (図 1 7) により、さらに詳細な分子メカニズムが明らかとなった。ラメリポディア内への

微小管侵入率の増加は、アクチン束の著しい消失を伴うラメリポディアの過剰な安定化の結果であると考えたが（図8-11）、これは、低濃度のサイトカラシン B 処理によるアクチン束の消失がラメリポディアへの微小管侵入を促進することを示した先行研究の結果によっても裏付けられる（Burnet et al., 2007）。これらのラメリポディア機能不全の表現型は、以前に我々のグループで報告した、*Kif3b*<sup>+/−</sup>海馬初代培養の成熟神経細胞における軸索成長円錐の欠損をも説明することができる（Alsabban et al., 2019）。また、CRMP2 は以前の我々のグループの報告（Toyoshima et al., 2019）により、カルボニル化感受性微小管束化活性も有していることが明らかになっているため、アクチンだけではなく微小管に作用することによりラメリポディアへの微小管侵入や神経突起形成に関与している可能性がある。

*Cytip1*、*DISC1* および *Kif3b* 自体などの統合失調症関連遺伝子を欠損させたマウスモデルは、アクチン動態に依存するマクロ的な樹状突起形態形成ならびにミクロ的なスパイン形成の双方の過程における障害を同時に伴うことが多く（Duan et al., 2007; Pathania et al., 2014; Alsabban et al., 2019）、またアクチン細胞骨格の機能異常はこれまでも統合失調症の病態への関連性が示唆されている（Bellon, 2007; Birnbaum and Weinberger, 2017; Insel, 2010; Stefansson et al., 2009）。今後、成熟した神経細胞へのベタイン添加により、スパインの形成及

び形態へのベタインの作用を検証する必要がある。今回の研究データはこれらに関連して、微小管分子モーターの機能不全ならびにカルボニルストレスの上昇によるアクチン細胞骨格の機能異常を通した統合失調症の新しい分子メカニズムを示唆するものである。本研究ではカルボニル化による CRMP2 のアクチン束化能の喪失を、グリオキサールにより過剰に多量体化させた CRMP2 非修飾の CRMP2 を等しいモル濃度でアクチンと混合することにより示した。しかし、多量体化により CRMP2 の分子量が減少し、アクチン束化能を喪失させている可能性がある。そのため、過剰量の多量体化 CRMP2 の添加や低グリオキサール処理による低多量体化 CRMP2 を用いた、分子量を非修飾の CRMP2 と可能な限り揃える、もしくは過剰量にすることで今後検証する必要がある。また、様々なドメインを欠失させた変異体 CRMP2 を用いたアクチン束化ドメインの決定も今後の課題である。

ベタインによる CRMP2 の脱カルボニル化を通じて神経細胞の形態を正常化することを示したが、その作用機序には未だ不明な点が多い。ベタインは、コリンがコリンデヒドロゲナーゼによってベタインアルデヒドに酸化され、さらにアルデヒドデヒドロゲナーゼによって酸化されることで合成される。合成されたベタインは、ホモシステインをメチオニンに変換することで、メチオニン代謝経路を回転させる。統合失調症の原因の一つに、エピジェネティックな制

御の異常が関与していることが示唆されており (Kular and Kular, 2018; Nishioka et al, 2012; Roth et al, 2009)、DNA メチル化は、その主要な制御機構である。これはメチオニン代謝経路の産物である S-アデノシルメチオニンからシトシンにメチル基が付加されることにより起こり、S-アデノシルメチオニンはその後、ホモシステインに代謝される。統合失調症患者群では、健常者群と比較し、グローバル DNA メチル化レベルが低下しており、血漿ベタイン濃度と正に相関すること (Murata et al., 2020)に加え、ホモシステインとメチオニンが統合失調症と関連している報告 (Moustafa et al., 2014; Brown and Susser, 2005) は、統合失調症の病態生理がエピジェネティック調節の障害と関連している可能性を補強するものであり、ベタインの摂取はメチオニン代謝経路を正常にすることにより、DNA メチル化レベルも正常にしている可能性がある。

ベタインは、ホモシスチン尿症の治療薬(レクメド)として使用されているため、統合失調症患者へのドラッグ・リポジショニングは比較的容易であると予想される。in vivo の血漿ベタイン投与量が in vitro の条件で使用されたものよりも著しく少ない量で効果を発揮できた理由として、ベタインの補給が代謝経路のドラスティックな変化を通じてカルボニルストレスの全身的な減少を誘発したのではないかということが示唆されるが、その中間物質の同定に関しては今後メタボローム研究によりさらに解明を進める予定である。さらに、ベタインま



たはピリドキサミンによる統合失調症様症状の回復効果は、KIF3 または CRMP タンパク質の発現を薬理的に増強することでさらに補うことができる可能性があり、将来的にはこれらも新規統合失調症治療薬スクリーニングのターゲットとして検討されうるものである。

## 6. 実験材料及び実験方法

### 6-1. 実験モデルと被験者の詳細

#### 6-1-1. ヒト死後脳

死後脳試料の分析は、東京大学（#G10017）、福島県立医科大学（#1685 および 2381）、理化学研究所（#wako3 2019-2）、新潟大学（G2015-0827）、免疫生物学研究所の倫理委員会の承認のもとに行われた。統合失調症患者および年齢と性別をマッチさせた対照被験者のブロードマン 10 野ならびに 22 野の死後脳組織を、既報に従い(Ohnishi et al., 2019)、福島精神疾患死後脳バンクおよび新潟大学脳研究所から入手した（n=30 の対照被験者サンプルおよび n=24 の統合失調症サンプル）。統合失調症の各患者は、「精神障害の診断・統計マニュアル（DSM-IV）」によって診断されており、他の神経疾患や物質乱用の既往歴はなかった。また、対照被験者においても、精神神経疾患や物質乱用の既往歴はなかった。

#### 6-1-2. マウス

すべての動物実験は東京大学動物実験実施規則に基づき、東京大学大学院医学系研究科（#M-P15-118）および理化学研究所（#H29-2-204）の動物実験委員会の承認を得て、雄マウスを用いて行われた。*Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスは、C57BL6/J バックグラウンド（日本 CLEA）に導入し、SPF 環境下で、14/10 時間明暗サ

イクルで飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした (Nonaka et al., 1998)。  
Lifeact-mRuby マウス(Riedl et al., 2010)は、Michael Sixt 博士および Roland Wedlich-Soldner 博士(Max Planck Institute for Biochemistry、ドイツ)により分与いただき、*Kif3b*<sup>+/−</sup>系統と交配させた。高ベタイン餌に関しては、0.2% (w/w) のベタイン (トリメチルグリシン：富士フィルム和光純薬) を添加した CE-2 ペレット (高ベタイン含有餌) を調製し (日本 CLEA)、4 週齢の離乳後にマウスに自由摂取させた (図 1)。

### 6-1-3. ヒト iPS 細胞

*GLO1*<sup>+/+</sup>および *GLO1*<sup>−/−</sup>ヒト iPS 細胞は、既報の細胞(Toyoshima et al., 2019)を、理化学研究所の倫理委員会の承認 (#Wako-daisan25-14) のもと、解析に使用した。

## 6-2. 実験手法

### 6-2-1. ヒト死後脳の解析

ヒト死後脳の定量用サンプルの調製にあたっては、前頭前野 (ブロードマン 10 野) および上側頭回 (ブロードマン 22 野) の脳ライセートの上清を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Calbiochem) および PhosSTOP ホスファターゼ阻害剤カクテル (Roche) を添加した N-PER (#87792、Thermo Fisher) を用い

てホモジナイズした後、 $40,000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、30 分間遠心分離した上清を使用した (Nagaoka et al., 2020)。KIF3A および KIF3B タンパク質レベルは、既報に従い Direct-ELISA によって定量した (Crowther, 2001)。GAPDH タンパク質レベルは、キットのプロトコルに従って、抗 GAPDH モノクローナル抗体 (Abnova) および抗 GAPDH モノクローナル抗体-HRP-DirecT (MBL)を用いたサンドイッチ ELISA の結果によって定量化し、正規化対照群として用いた。

#### 6-2-2. 血漿ベタイン濃度分析

血漿中ベタイン濃度の測定については、午前 8-10 時にマウスを深麻酔し、ヘパリンを注射後、全血を採取し、 $1.0 \text{ mg/ml}$  EDTA-2Na 存在下で遠心分離 ( $1,000 \times g$ 、20 分、 $4^{\circ}\text{C}$ ) して血漿を分離し、得られた血漿サンプルを既報に従い LC/MS 測定により定量した (Ohnishi et al., 2019)。

#### 6-2-3. マウス行動解析

行動解析については、10 週齢の雄マウスを、既報に従い以下の行動試験に使用した (Alsabban et al., 2019; Morikawa et al., 2018)。オープンフィールド試験では、マウスを新規の直方体の箱 (底面  $52 \times 39 \text{ cm}$ ) の中央に置き、その軌跡を 10 分間ビデオ撮影し、EthoVision XT 11.0 ソフトウェア (Noldus Information Technology) を用いて定量化した。高架式十字迷路試験では、中央の台 (底面  $6 \times 6 \text{ cm}$ ) から伸ばされた 2 本ずつの壁のない走行路 (オープンア

ーム)と壁で囲まれている走行路(底面 27×6 cm)を備えた新規の十字形の箱の中央にマウスを置き、5 分間ビデオ撮影した。録画した映像を解析して、壁のない走行路と壁で囲まれている走行路のそれぞれの滞在時間を調べた。

reciprocal 社会性試験では、測定マウス 2 匹を新規の長方形の箱(底面 30×16.5 cm)の中央に配置し、その軌跡を 10 分間ビデオ撮影し、Icy ソフトウェア(de Chaumont et al., 2012)を用いて鼻と鼻の接触時間を定量化した。3 チャンバー社会性試験では、長方形の箱を空区画、中央区画、対照マウスがいる区画(各底面 18×39 cm)に分け、測定マウスを中央区画に配置し、EthoVision XT 11.0 ソフトウェアを用いて、10 分間のうち各区画における滞在時間と総歩行距離を定量した。対照マウスには 10 週齢の C57B6/J 雄マウスを用いた。音響驚愕反応(ASR)およびプレパルス抑制(PPI)試験では、プレパルス音響刺激に用いられる標準的なプロトコルをマウスに適用し、驚愕反応の振幅を既報に従い測定した(Maekawa et al., 2010)。PPI の割合は、 $[(\text{パルス振幅}-\text{プレパルス振幅})/\text{パルス振幅}] \times 100$  として算出した。平均値 $\pm 2 \times$ 標準誤差を超える振幅は、統計から除外した。

#### 6-2-4. マウス脳組織観察

Golgi-Cox 染色のためには、10–11 週齢のマウスを深麻酔し、Rat Ringer's solution [156 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 5 mM HEPES, 10 mM glucose, 4 mM

EGTA, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>]を用いて灌流した。脳を摘出し、SuperGolgi Kit (Bioenno Lifesciences) を用いてキットのプロトコルに従って染色を行った。その後、DTK-1000 マイクロスライサー (Dosaka-EM) を用いて、前頭前野においてブレグマの吻側から 1.10 mm と 1.30 mm の間で 100 μm の厚さで脳を冠状に切片化し、DM 3000 顕微鏡 (Leica) において 40×/0.75 Plan Apochromat (Leica) の対物レンズを用いて撮影するとともに、BZ-X700 顕微鏡 (Keyence) において 20×/0.75 Plan Apochromat (Keyence) の対物レンズを用いて撮影した。

#### 6-2-5. 細胞培養

初代培養海馬神経細胞の培養液は、既報に従い調製した (Ichinose et al., 2015; Kaech and Banker, 2006)。胎生 17.5 日において解離した海馬神経細胞を乖離し、ポリエチレンイミンとポリ-L-リジンでプレコーティングした 8 ウェルチャンバーカバーガラス (Nunc) 上に、10%ウマ血清、1 mM ピルビン酸、0.6%グルコース、2 mM GlutaMAX (Gibco) を添加した 0.3 ml の MEM (Gibco) を用いて、 $1.5 \times 10^4$  細胞/ウェルの密度で蒔いた。5% CO<sub>2</sub> 下で 3–4 時間培養した後、培養液を 1 mM ピルビン酸、0.6%グルコース、2 mM GlutaMAX、2% B27 (Gibco) を添加した MEM で置換した。細胞の形態および抗 Prox1 免疫染色が陰性であることを用いて錐体細胞を選択し、解析に用い

た。

大脳皮質神経細胞の初代培養は、既報に従い行った (Ichinose et al., 2019)。  
薬理学的処理として、500  $\mu$ M ベタイン (富士フィルム和光純薬)、500  $\mu$ M ピ  
リドキサミン (Sigma-Aldrich)、200  $\mu$ M グリオキサール (富士フィルム和光純  
薬) を、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

#### 6-2-6. 抗体及び蛍光ファロイジン

ウサギ抗 KIF3B ポリクローナル抗体は、既報にて作成されたものを用いた  
(1:500, Yamazaki et al., 1995, RRID:AB\_2715472)。マウス抗 KIF3A モノク  
ローナル抗体 (1 : 500, BD Transduction Laboratories, #611508, RRID:  
AB\_398968)、ウサギ抗 MAP2 ポリクローナル抗体 (1 : 200, Abcam, ab5392,  
RRID: AB\_2138153)、マウス抗 Prox1 モノクローナル抗体 (1: 2,000, Millipore,  
MAB5654, RRID: AB\_2170714)、ウサギ抗 CRMP2 モノクローナル抗体  
(1:50,000, Abcam, ab129082, RRID: AB\_11154701)、マウス抗  $\beta$ -アクチンモ  
ノクローナル抗体 (1:2,500, Sigma-Aldrich, AC15-A5441, RRID: AB\_476744)、  
マウス抗 CML モノクローナル抗体 (1: 200, Trans Genic, KH001, RRID:  
AB\_1964188)、イムノブロッティング用マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体  
(1:2,500-10,000, 富士フィルム和光純薬, 5A12, RRID: AB\_2814991)、Alexa  
Fluor 488 標識マウス抗チューブリンモノクローナル抗体 (1: 1,000, Abcam,

ab195887, RRID: AB\_2241126)、ELISA 用マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体 (Abnova, H00002597-AP51, RRID: AB\_10549815)、マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体-HRP-DirecT (MBL, M171-7, RRID: AB\_10699462)、コントロール用ウサギ IgG 抗体 (Cappel/ICN/MP, #55944, RRID: AB\_2334717)、コントロール用マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, #02-6502, RRID: AB\_2532951)、Alexa Fluor 405-, 568-, 647-conjugated ヤギ 抗-マウス、ウサギ及びチキン IgG 抗体 (1:1,000, Thermo Fisher, A-31553, RRID: AB\_221604; A-11004, RRID: AB\_2534072; A-11036, RRID: AB\_10563566; A-11039, RRID: AB\_2534096; A-21245, RRID: AB\_2535813)、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウスおよびウサギ IgG 抗体 (1:10,000, GE ヘルスケア、#NA931V, RRID: AB\_772210; #NA934V, RRID: AB\_772206)、抗ウサギおよびマウス IgG (H+L) ヤギ Fab'-HRP (125 ng/ml, IBL, #17502, RRID: AB\_494707; #17508, RRID: AB\_494709)、Alexa Fluor 488-, 568-結合 ファロイジン (1:200-1,000, Thermo Fisher, A12379, A12380)はそれぞれの製造元から入手した。

#### 6-2-7. 発現ベクター及びノックダウンベクター

CRMP2-ECFP および KIF3B-TagRFP の真核生物発現ベクタープラスミドを得るため、それぞれの完全長マウス cDNA を *pECFP-C1* (Clontech) および



*pTagRFP-N1* (Evrogen) ベクターにライゲーションし、エンドトキシンフリーのプラスミド DNA 精製キット (MACHERY-NAGEL) を用いて調製した。大腸菌で組換え CRMP2 タンパク質を発現させるために、*pCRMP2-PET-21b* ベクターを既報に従い構築した (Toyoshima et al., 2019)。BLOCK-iT RNAi Designer ツール (Thermo Fisher Scientific) と、BLOCK-iT Pol II miR RNAi Expression Vector Kit (Thermo Fisher) の *pcDNA6.2-GW/miR* ベクターを用いて、標的配列 5'-CATGATCATTGACCATGTTGT-3' を有するマウス CRMP2 ノックダウンベクターを設計し、調製した。ノックダウンの効率は、蛍光抗体法を用いて確認した。

酵母ツーハイブリッドアッセイにおいては、マウス *Kif3a* (369–701 aa, 600–701 aa) および *Kif3b* (470–747 aa, 592–747 aa) 遺伝子の cDNA 断片を PCR で増幅し、*pGBKT7* ベクター (タカラバイオ) にライゲーションして bait 遺伝子とした。*CRMP2* (1–249 aa, 312–572 aa) の cDNA 断片を PCR で増幅し、*pGADT7* ベクター (タカラバイオ) とライゲーションして prey 遺伝子とした。

#### 6-2-8. 海馬神経細胞への遺伝子導入

ノックダウンおよび強制発現実験のため、DIV0 において初代培養海馬神経細胞を既報に従ったアデノウイルスを用いたトランスフェクション (Tanaka et al., 2016)、または Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific) によ

るキットのプロトコルに従った電気穿孔法、または DIV12 において Calcium Phosphate Transfection Kit (Takara) によるリン酸カルシウム法のいずれかを使用して発現ベクターを遺伝子導入し、DIV3 または DIV14 のステージで表現型を分析した。電気穿孔法においては、1  $\mu\text{g}$  の真核細胞発現ベクタープラスミドと  $1.0 \times 10^5$  個のニューロンを Neon 緩衝液 [25 mM HEPES (pH7.4), 2 mM EGTA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 250 mM トレハロース, 2 mM グルタチオン, 5 mM リン酸カリウム, 2 mM ATP, 1% DMSO] 中にて混合し、この混合物を 10  $\mu\text{l}$  の Neon Tip に装填した。その後、1,400V で 1 パルス、20 ms のパルス幅でエレクトロポレーションを行った。リン酸カルシウム法の遺伝子導入では、まず培養液を 1 mM ピルビン酸、0.6% グルコース、2 mM GlutaMAX、2% B27 (Gibco) を添加した MEM に交換した。1  $\mu\text{g}$  の *pEGFP-N3* プラスミド (Clontech)、3.1 ml の 2 M  $\text{CaCl}_2$ 、25 ml の Hank's 平衡塩溶液の混合液を、室温で 15 分間インキュベートした。その後、細胞にこの混合液を添加し 37°C の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内で 1 時間インキュベートした。インキュベーション後、この培地を、10%  $\text{CO}_2$  下で予め平衡化した培地と交換し、5%  $\text{CO}_2$  下で 15 分間インキュベートした後、培地を完全培地に再度交換した。

### 6-3. 顕微鏡観察

### 6-3-1. 免疫蛍光染色法

蛍光顕微鏡観察は基本的に既報に従い施行した (Ichinose et al., 2015)。

MAP2 染色のためには、DIV3 および DIV14 の初代培養海馬神経細胞を、4% パラホルムアルデヒド (PFA) /リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて室温で 20 分間固定し、0.1% Triton X-100 で 2 分間透過処理させ、4% スキムミルク / PBS を用いて室温で 30 分間のブロッキングを行った。その後、神経細胞を抗 MAP2 抗体 (1:200) /ブロッキングバッファーを用いて室温で 1 時間インキュベートし、PBS を用いて 5 分間の洗浄を 3 回行った後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ニワトリ IgG 抗体 (1:1,000) /ブロッキングバッファーを用いて室温で 1 時間インキュベートした。

アクチン、CRMP2 及び KIF3A・CRMP2・アクチン・微小管の 4 重染色は、DIV1-3 の初代培養海馬神経細胞を 4% PFA/PBS を用いて室温で 20 分間固定し、0.1% Triton X-100 を用いて 3 分間の透過処理をした後、1% ウシ血清アルブミン (BSA; Roche)/PBS を用いて室温で 30 分間のブロッキングを行った。その後、Can Get Signal Solution 1 液 (TOYOBO) で希釈した一次抗体を添加して 4°C で一夜インキュベートし、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO) で希釈した二次抗体および/または蛍光ファロイジンを室温で 1 時間インキュベートした。4 重染色では、PBS に溶解した Alexa

Fluor 488 結合抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Abcam) をさらに室温で 1 時間インキュベートした。Airyscan 検出器と 40 $\times$ /1.3 または 63 $\times$ /1.4 Plan Apochromat 対物レンズ (ZEISS) を備えた LSM780 または LSM880 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いてサンプルを解析した。

### 6-3-2. STED 顕微鏡

DIV1 の初代培養海馬神経細胞をハーフカルノフスキー固定液により室温で 20 分間固定し、0.1% Triton X-100/PBS を用いて、室温で 3 分間透過処理し、1% BSA/PBS を用いて室温で 30 分間のブロッキングをし、Can Get Signal Solution 2 に溶解した Alexa Fluor 488 結合ファロイジン (1:200) を用いて染色し、東京大学 IRCN の STED 顕微鏡 (Leica, FALCON) を用いて解析した。

### 6-3-3. 走査型電子顕微鏡(SEM)

SEM サンプル作成は、基本的には既報に従って行った (He et al., 2015)。DIV1 の海馬神経細胞を、膜抽出緩衝液 [80 mM PIPES (pH 7.9)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM EGTA、4% ポリエチレングリコール (35 kDa)、1  $\mu$ M ファロイジン、1% Triton X-100] を用いて 45 秒間室温で処理したあと、ハーフカルノフスキー固定液を用いて室温で 20 分間固定した。その後、2% タンニン酸/0.15 M カコジル酸緩衝液にて室温で 20 分間処理し、1% OsO<sub>4</sub>/0.15 M カコジル酸緩衝液を用いて室温で 1 時間後固定した。エタノール系列による脱水及び臨界点乾燥を行

い、イオンスパッタリングにより白金を 3-7 nm 厚でコーティングをし、GeminiSEM300 顕微鏡 (ZEISS) による観察を行った。

#### 6-3-4. 神経細胞ラメリポディアのライブイメージング

細胞膜のライブイメージングのためには、海馬神経細胞の培地に 50 nM のカルセイン-AM (同仁堂) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 分間培養した後、培養液で 2 回洗浄し、10 秒間隔で 10 分間撮影を行った。細胞骨格タンパク質のライブイメージングのためには、Lifeact-mRuby トランスジェニックマウス由来の初代培養海馬神経細胞、またはその細胞に EB1-YFP 発現アデノウイルスベクター (Nakata and Hirokawa, 2003) を導入した生細胞を、10 秒間隔で 10 分間撮影を行った。画像は Airyscan 検出器と 63×/1.4 Plan Apochromat 対物レンズ (ZEISS) を備えた LSM780 共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて取得した。

#### 6-3-5. 近接ライゲーションアッセイ

近接ライゲーションアッセイのためには、DIV1 の海馬神経細胞をパラホルムアルデヒド (PFA) / リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて室温で 20 分間固定し、マウス及びウサギの一次抗体を用いて 4°C で一夜インキュベートした。その後、Duolink in situ PLA キット (Sigma) を用いてキットのプロトコルに従って処理し、Alexa Fluor 488 標識ファロイジン (1:1,000) とインキュベート

した。サンプルは、Airyscan 検出器と 63×/1.4 Plan Apochromat 対物レンズ (ZEISS) を備えた LSM780 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて観察した。

#### 6-4. 細胞形態の定量

##### 6-4-1. 神経突起の分岐度の測定

錐体細胞の分岐度の測定のため、Computational Neurobiology and Imaging Center (CNIC), Mount Sinai School of Medicine (<http://research.mssm.edu/cnic/tools-ns.html>) からダウンロードした NeuronStudio ソフトウェア (Wearne et al., 2005) を用いて Sholl 解析を行った。各ヒト iPS 由来の神経細胞の分岐点の数は手動で測定を行った。結果は、Two-way ANOVA および Welch' t-test により統計処理した。データは平均±標準誤差を用いてプロットした。

##### 6-4-2. ラメリポディア動態の測定

ラメリポディアの 1 部位における垂直方向の変位を 10 秒ごとに 10 分間手動で測定し、その典型的な結果を 3 つの連続したフレームでグラフ化した。また、動きの度合いを平均二乗変位により求め、10 秒間の平均変位量を各方向で算出した。

##### 6-4-3. アクチン束密度の測定

ラメリポディアの幅 1  $\mu\text{m}$  あたりのアクチン束の数を手動で測定した。

#### 6-4-4. アクチン動態の形態学的測定

ラメリポディアの幅 1  $\mu\text{m}$  あたりのアクチン束の折りたたみ運動回数を、10 秒ごとに 10 分間撮影した画像を用いて、手動で測定した。

#### 6-4-5. EB1 浸潤率の測定

Lifeact-mRuby および EB1-YFP を発現させた海馬神経細胞のライブイメージングは、10 秒ごとに 10 分間行った。すべての撮影像を一枚にスタックし、ImageJ ソフトウェア (NIH) を用いて、ラメリポディア端から周縁 3  $\mu\text{m}$  幅の領域に対する EB1 占有面積を計算した。

#### 6-4-6. ラメリポディア周縁部の CRMP2 強度比較

DIV1 の海馬神経細胞を抗 CRMP2 抗体で染色し、ImageJ ソフトウェアを用いて、ラメリポディア端から 1  $\mu\text{m}$  幅の領域の CRMP2 のシグナル強度を測定し、野生型における平均強度を用いて正規化した。平均値  $\pm 2 \times$  標準誤差を超えるサンプルは、統計から除外した。

### 6-5. 生化学的手法

#### 6-5-1. 酵母ツーハイブリッド結合実験

Gal4 Two-Hybrid system 3 (Takara Bio)を用いて酵母ツーハイブリッド結合

実験を行った (Takeda et al., 2000)。Y187 株に両ベクターをトランスフェクションした後、細胞をカラーセレクションプレート上で培養した。

#### 6-5-2. 免疫沈降法 (IP)

免疫沈降法は、おおむね既報に従い施行した (Ichinose et al., 2019)。まずマウスの全脳を IP 緩衝液 [50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.1% Triton-X 100] に complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) および PhosSTOP phosphatase inhibitor cocktail (Roche) を添加した溶液を用いてポッター・ホモジナイザーによりホモジナイズし、 $1,000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間— $10,000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 15 分— $100,000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、30 分の遠心分離を段階的に行い、最終的な上清である S3 画分を使用した。S3 画分を  $5 \mu\text{g}$  の抗体と混合し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベートした後、プロテイン A セファロースビーズ (GE ヘルスケア) に  $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間タンパク質を捕捉させた。その後、ビーズを 2 回洗浄し、2×サンプルバッファーを用いて  $98^{\circ}\text{C}$  で 5 分間溶出し、イムノブロッティングに使用した。

#### 6-5-3. イムノブロッティング

培養神経細胞のライセートを調製するためには、DIV1 の初代培養大脳皮質神経細胞から 10% TCA 処理によりタンパク質を沈降させ、 $15,000 \text{ rpm}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間遠心分離した。その後、サンプルバッファーで溶出させ、 $98^{\circ}\text{C}$  で 5 分間煮沸した。SDS-PAGE は、10%または 7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて、20



mA の定電流で行った。泳動したゲルをセミドライブロッキング装置により Immobilon-P メンブレン (Merck Millipore) へ 200 mA の定電流で 30 分間転写した。膜を TBS-T 中の 1% BSA でブロッキングし、Can Get Signal Solution 1 で希釈したそれぞれの一次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートし、3 回洗浄し、Can Get Signal Solution 2 で希釈したそれぞれの二次抗体を用いて室温で 1 時間インキュベートし、再度洗浄した。プロトコルに従って、Enhanced ECL Prime kit (GE Healthcare) と ImageQuant LAS4000 Mini image analyzer (GE Healthcare) を用い、ケミルミネッセンスによりシグナルを可視化した。

#### 6-5-4. HiRes-SEC アッセイ

HiRes-SEC アッセイは、ÄKTA ピュアシステム (GE Healthcare) 上の twin Superdex 200 Increase 10/300 カラム (GE Healthcare) をタンデムに接続したカラムを用いて、既報に従い行った (Ogawa and Hirokawa, 2018; Ogawa et al., 2017)。マウス脳ライセートの上清の S3 画分およびタンパク質標準物質 (フェリチン、440 kD ; アルドラーゼ、158 kD ; オバルブミン、44 kD ; リボヌクレアーゼ A、13.7 kD) を、Assay Buffer [20 mM PIPES pH 6.5、200 mM KCl、1 mM MgCl<sub>2</sub>] を含むカラムにアプライし、溶出した各画分を以下のドットブロット法にて定量した。まず画分を Immobilon-P メンブレンに滴下し、室温で乾燥させた。その後、膜を TBS-T 中の 4% スキムミルクを用いて室温で 30 分間ブロッキングし、

4%スキムミルク/TBS-T の抗 CRMP2 抗体と一夜 4°Cでインキュベートした。その後、膜を 3 回洗浄し、4%スキムミルク/TBS-T 中の適切な二次抗体と室温で 1 時間インキュベートし、再度洗浄した。製造元のプロトコルに従って、Enhanced ECL Prime キットと ImageQuant LAS4000 Mini イメージアナライザーを用いてケミルミネッセンスによりシグナルを可視化した。各ドットシグナルの強度は ImageJ ソフトウェアを用いて定量した。

## 6-6. アクチン結合アッセイ

### 6-6-1. アクチン濁度アッセイ

アクチンは、ブタ心筋のアセトン粉末から抽出し、既報に従い精製し (Pardee and Spudich, 1982)、ÅKTA pure system を用いて脱塩した。

未修飾 CRMP2 および AGE 修飾 CRMP2 タンパク質は、既報に従い調製した (Toyoshima et al., 2019)。G-buffer [2 mM Tris-HCl pH 8.0、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、0.2 mM ATP、および 1 mM DTT] 中の G-actin (20 μM) を、0、10、20、または 40 μM の CRMP2 または AGE-CRMP2 と混合した。その後、1/10 量の F-バッファー [20 mM MgCl<sub>2</sub>、1 M KCl] を加え、混合物 200 μl を分光蛍光光度計 FP-777Win (日本分光) を用いて、37°Cで 140 秒ごとに 12,000 秒間、波長 350 nm (A350) の吸光度を測定した。

### 6-6-2. ピレンアクチン重合アッセイ

ピレンアクチン重合アッセイは、基本的に既報に従い行った (Cooper et al., 1983)。5  $\mu$ M の 10%ピレン標識 G-アクチンを、20  $\mu$ M の未修飾 CRMP2 または AGE-CRMP2 の存在下または非存在下で、1/10 量の F-バッファーを添加した G-バッファー中で重合させた。ピレン蛍光の増加は、FP-8600 spectrofluorometer (JASCO; 励起波長 365 nm, 放出波長 407 nm) を用いて、室温で 30 秒ごとに 2,000 秒間、測定した。

### 6-6-3. アクチン共沈降アッセイ

アクチン-CRMP2 共沈アッセイは、基本的には既報に従い行った (Mische et al., 1987)。G-アクチンに 2 mM ATP および 1 mM DTT を含む 1/10 量の F-バッファーを添加し、1.5 時間、37°C で重合させた。20 mM HEPES pH 7.25, 110 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM イミダゾール pH 7.0 からなるバッファー中で、F-アクチン (5  $\mu$ M) を一連の濃度の未修飾 CRMP2 または AGE-CRMP2 タンパク質とともに 27°C で 30 分間インキュベートした。濃度ごとに 3 回の独立したアッセイを行い、反応後のサンプルを 100,000  $\times$  g で 30 分間遠心分離した後、SDS-PAGE により分析した。上清およびペレット中のタンパク質濃度は、ImageJ ソフトウェアを用いて CBB 染色ゲルのデンストメトリー分析により定量した。結合したタンパク質の量を、結合していないタンパク質量の関数としてプロットし、Prism8

ソフトウェア (GraphPad Software) を用いた One Site binding model によりグラフを作成した。

#### 6-6-4. TIRF 顕微鏡によるアクチンフィラメント束化アッセイ

サンプルの調製は、基本的には既報に従い行った (Harris et al., 2006)。G-actin (4  $\mu$ M) を重合バッファー [2 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.2 mM ATP、1 mM DTT、100 mM KCl、1 mM EGTA、10 mM イミダゾール] 中において室温で 1 時間重合させた。16  $\mu$ M の未修飾 CRMP2、AGE-CRMP2、または BSA コントロールの 10  $\mu$ l を、穏やかに振盪しながら 10  $\mu$ l のアクチンフィラメントと混合した。Alexa Fluor 488 標識ファロイジン (最終 1  $\mu$ M) を含む重合バッファー 20  $\mu$ l を加えた後、直ちに蛍光バッファー (4 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM DTT, 25 mM KCl, 1 mM EGTA、25 mM イミダゾール、0.5%メチルセルロース、15 mM グルコース、100 mg/ml グルコースオキシダーゼ、20 mg/ml カタラーゼ) を用いて 1 ml になるよう希釈して観察チャンバーに入れ、ELYRA P.1 システムの TIRF モード (ZEISS) で観察した。アクチンフィラメントは一定範囲 (1  $\mu$ m  $\times$  2.5  $\mu$ m) 内でランダムに観察し、ImageJ ソフトウェアを用いて長さと平均強度を測定した。統計解析は、Prism 8 ソフトウェア (GraphPad Software) を用いた。

## 6-7. データの定量化と統計解析

図中の数値は、平均±標準誤差を表している。すべてのサンプルサイズと統計的有意水準は、それぞれの図の凡例に記載されており、データはウェルチのt検定の片側検定、二元配置分散分析(Two-way ANOVA)、事後比較にはボンフェローニの検定(Bonferroni's post hoc comparisons)を用いて統計的に分析した。

統計解析には GraphPad Prism 8 ソフトウェアを用いた。

## 引用文献

Alsabban, A.H., Morikawa, M., Tanaka, Y., Takei, Y., and Hirokawa, N. Kinesin Kif3b mutation reduces NMDAR subunit NR2A trafficking and causes schizophrenia-like phenotypes in mice. *The EMBO Journal* 39, e10109, 2019

Arai M, Yuzawa H, Nohara I, Ohnishi T, Obata N, Iwayama Y, Haga S, Toyota T, Ujike H, Arai M. Enhanced carbonyl stress in a subpopulation of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67: 589–597, 2010.

Arimura, N., Inagaki, N., Chihara, K., Ménager, C., Nakamura, N., Amano, M., ... & Kaibuchi, K. Phosphorylation of collapsin response mediator protein-2 by Rho-kinase. Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. *J Biol Chem* 275, 23973-23980, 2000.

Bellon, A. New genes associated with schizophrenia in neurite formation: a review of cell culture experiments. *Molecular Psychiatry* 12, 620-629, 2007.

Bhandari, A., Voineskos, D., Daskalakis, Z. J., Rajji, T. K., & Blumberger, D. M. A review of impaired neuroplasticity in schizophrenia investigated with non-invasive brain stimulation. *Frontiers in psychiatry*, 7, 45, 2016.

Birnbaum, R., and Weinberger, D.R., Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience* 18, 727-740, 2017

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews* 94, 235-263, 2014.

Booth, A. A., Khalifah, R. G., & Hudson, B. G.. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end-products: comparison with aminoguanidine. *Biochemical and biophysical research communications*, 220(1), 113-119, 1996.

Brown, A. S., & Susser, E. S. Homocysteine and schizophrenia: from prenatal to adult life. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 29(7), 1175-1180, 2005.

Brittain, J. M., Piekarz, A. D., Wang, Y., Kondo, T., Cummins, T. R., & Khanna, R. An atypical role for collapsin response mediator protein 2 (CRMP-2) in neurotransmitter release via interaction with presynaptic voltage-gated calcium channels. *J Biol Chem* 284, 31375-31390, 2009.

Burnette, D.T., Schaefer, A.W., Ji, L., Danuser, G., and Forscher, P. Filopodial actin bundles are not necessary for microtubule advance into the peripheral domain of Aplysia neuronal growth cones. *Nature Cell Biology* 9, 1360-1369, 2007

Cabungcal, J.H., Counotte, D.S., Lewis, E.M., Tejeda, H.A., Piantadosi, P., Pollock, C., Calhoon, G.G., Sullivan, E.M., Presgraves, E., Kil, J., et al. Juvenile antioxidant treatment

prevents adult deficits in a developmental model of schizophrenia. *Neuron* 83, 1073-1084, 2014.

Cammarata, G.M., Bearce, E.A., and Lowery, L.A. Cytoskeletal social networking in the growth cone: how plus TIPs mediate microtubule-actin cross-linking to drive axon outgrowth and guidance. *Cytoskeleton* 73, 461-476, 2016.

Coles, C.H., and Bradke, F. Coordinating neuronal actin-microtubule dynamics. *Current Biology* 25, R677-R691, 2015.

Cooper, J.A., Walker, S.B., and Pollard, T.D. Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 4, 253-262, 1983.

Coyle, J. T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cellular and molecular neurobiology*, 26(4), 363-382, 2006.

Crowther, J.R. *The ELISA guidebook*, Springer Science & Business Media, 2001.

de Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Herve, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Le Montagner, Y., et al. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature Methods* 9, 690-696, 2012.

Dotti, C.G., Sullivan, C.A., and Banker, G.A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience* 8, 1454-1468, 1988.



Duan, X., Chang, J.H., Ge, S., Faulkner, R.L., Kim, J.Y., Kitabatake, Y., Liu, X.B., Yang, C.H., Jordan, J.D., Ma, D.K., et al. Disrupted-in-schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130, 1146-1158, 2007.

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Menager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., et al. CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature Cell Biology* 4, 583-591, 2002.

Glantz, L.A., and Lewis, D.A. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* 57, 65-73, 2000.

Harris, E.S., Rouiller, I., Hanein, D., and Higgs, H.N. Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14383-14392, 2006.

He, Y.P., Ren, Y., Wu, B.B., Decourt, B., Lee, A.C., Taylor, A., and Suter, D.M. Src and cortactin promote lamellipodia protrusion and filopodia formation and stability in growth cones. *Molecular Biology of the Cell* 26, 3229-3244, 2015.

Hirokawa, N. Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Current opinion in cell biology*, 6(1), 74-81, 1994.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 682-696, 2009.

Ichinose, S., Ogawa, T., and Hirokawa, N. Mechanism of activity-dependent cargo loading via the phosphorylation of KIF3A by PKA and CaMKIIa. *Neuron* 87, 1022-1035, 2015.

Ichinose, S., Ogawa, T., Jiang, X.G., and Hirokawa, N. The spatiotemporal construction of the axon initial segment via KIF3/KAP3/TRIM46 transport under MARK2 signaling. *Cell Reports* 28, 2413-2426, 2019.

Insel, T.R. Rethinking schizophrenia. *Nature* 468, 187-193, 2010.

Itokawa, M., Miyashita, M., Arai, M., Dan, T., Takahashi, K., Tokunaga, T., Ishimoto, K., Toriumi, K., Ichikawa, T., Horiuchi, Y., et al. Pyridoxamine: a novel treatment for schizophrenia with enhanced carbonyl stress. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 72, 35-44, 2018.

Itokawa, M., Miyashita, M., Arai, M., and Miyata, T. Carbonyl stress in schizophrenia. *Biochemical Society Transactions* 42, 468-472, 2014.

Junaid MA, Kowal D, Barua M, Pullarkat PS, Sklower Brooks S, Pullarkat RK. Proteomic studies identified a single nucleotide polymorphism in glyoxalase I as autism susceptibility factor. *Am J Med Genet A* 131, 11-17, 2004.

Kaech, S., and Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols* 1, 2406-2415, 2006.

Kasai, K., Shenton, M.E., Salisbury, D.F., Hirayasu, Y., Lee, C.U., Ciszewski, A.A., Yurgelun-Todd, D., Kikinis, R., Jolesz, F.A., and McCarley, R.W. Progressive decrease of left superior temporal gyrus gray matter volume in patients with first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 160, 156-164, 2003.

Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T., and Kaibuchi, K. CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation. *Molecular and Cellular Biology* 25, 9920-9935, 2005.

Knight, L.S., Piibe, Q., Lambie, I., Perkins, C., and Yancey, P.H. Betaine in the brain: characterization of betaine uptake, its influence on other Osmolytes and its potential role in neuroprotection from osmotic stress. *Neurochemical Research* 42, 3490-3503, 2017.

Koike S, Bundo M, Iwamoto K, Suga M, Kuwabara H , Ohashi Y , Shinoda K , Takano Y, Iwashiro N, Satomura Y, Nagai T, Natsubori T, Tada M, Yamasue H, Kasai K. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. *Translational Psychiatry* 4, e379, 2014.

Kondo, S., Satoyoshitake, R., Noda, Y., Aizawa, H., Nakata, T., Matsuura, Y., and Hirokawa, N. KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *Journal of Cell Biology* 125, 1095-1107, 1994.

Kular, L. and Kular, S. Epigenetics applied to psychiatry: clinical opportunities and future challenges. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 72 (4) , 2018.

Liu, Y., Pham, X., Zhang, L., Chen, P. L., Burzynski, G., McGaughey, D. M., ... & Valle, D. Functional Variants in DPYSL2 Sequence Increase Risk of Schizophrenia and Suggest a Link to mTOR Signaling. *G3-Genes Genom Genet* 5, 61-72, 2015.

LoPachin RM, Barber DS, Gavin T. Molecular mechanisms of the conjugated  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl derivatives: Relevance to neurotoxicity and neurodegenerative diseases. *Toxicol Sci* 104: 235–249, 2007.

Maekawa, M., Ohnishi, T., Hashimoto, K., Watanabe, A., Iwayama, Y., Ohba, H., Hattori, E., Yamada, K., and Yoshikawa, T. Analysis of strain-dependent prepulse inhibition points to a role for Shmt1 (SHMT1) in mice and in schizophrenia. *Journal of Neurochemistry* 115, 1374-1385, 2010.

Manago F, Mereu M, Mastwal S, Mastrogiacomo R, Scheggia D, Emanuele M, De Luca MA, Weinberger DR, Wang KH, Papaleo F. Genetic disruption of Arc/Arg3.1 in mice causes alterations in dopamine and neurobehavioral phenotypes related to schizophrenia. *Cell Rep* 16, 2116–2128, 2016.

McGrath, J., Saha, S., Chant, D., & Welham, J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiologic reviews*, 30(1), 67-76, 2008.

Medeiros, N.A., Burnette, D.T., and Forscher, P. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature Cell Biology* 8, 215-226, 2006.

Mische, S.M., Mooseker, M.S., and Morrow, J.S. Erythrocyte adducin: a calmodulin-regulated actin-bundling protein that stimulates spectrin-actin binding. *Journal of Cell Biology* 105, 2837-2845, 1987.

Mittal., S., and Singh, L. Macromolecular Crowding Enhances the Efficiency of the Chemical Chaperone, Betaine in Inhibiting Protein Aggregation. *The FASEB Journal* 29, 2015.

Miyashita, M., Arai, M., Kobori, A., Ichikawa, T., Toriumi, K., Niizato, K., Oshima, K., Okazaki, Y., Yoshikawa, T., Amano, N., et al. Clinical features of schizophrenia with enhanced carbonyl stress. *Schizophrenia Bulletin* 40, 1040-1046, 2014.

Morikawa, M., Tanaka, Y., Cho, H.S., Yoshihara, M., and Hirokawa, N. The molecular motor KIF21B mediates synaptic plasticity and fear extinction by terminating Rac1 activation. *Cell Reports* 23, 3864-3877, 2018.

Moustafa, A. A., Hewedi, D. H., Eissa, A. M., Frydecka, D., & Misiak, B. Homocysteine levels in schizophrenia and affective disorders—focus on cognition. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 343, 2014.

Murata, Y., Ikegame, T., Koike, S., Saito, T., Ikeda, M., Sasaki, T., ... & Iwamoto, K. Global DNA hypomethylation and its correlation to the betaine level in peripheral blood of patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 99, 109855, 2020.

Nagaoka, A., Kunii, Y., Hino, M., Izumi, R., Nagashima, C., Takeshima, A., Sainouchi, M., Nawa, H., Kakita, A., and Yabe, H. ALDH4A1 expression levels are elevated in postmortem brains of patients with schizophrenia and are associated with genetic variants in enzymes related to proline metabolism. *Journal of Psychiatric Research* 123, 119-127, 2020.

Nakamura, H., Yamashita, N., Kimura, A., Kimura, Y., Hirano, H., Makihara, H., Goshima, Y. Comprehensive behavioral study and proteomic analyses of CRMP2-deficient mice. *Genes to cells* 21(10), 1059-1079, 2016.

Nakata, T., and Hirokawa, N. Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *Journal of Cell Biology* 162, 1045-1055, 2003.

Ng, M.Y.M., Levinson, D.F., Faraone, S.V., Suarez, B.K., DeLisi, L.E., Arinami, T., Riley, B., Paunio, T., Pulver, A.E., Irmansyah, et al. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 14, 774-785, 2009.

Niisato, E., Nagai, J., Yamashita, N., Nakamura, F., Goshima, Y., and Ohshima, T. Phosphorylation of CRMP2 is involved in proper bifurcation of the apical dendrite of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Developmental Neurobiology* 73, 142-151, 2013.

Nishioka, M., Bundo, M., Kasai, K., & Iwamoto, K. DNA methylation in schizophrenia: progress and challenges of epigenetic studies. *Genome medicine*, 4(12), 1-13, 2012.

Niwa, S., Nakamura, F., Tomabechi, Y., Aoki, M., Shigematsu, H., Matsumoto, T., Yamagata, A., Fukai, S., Hirokawa, N., Goshima, Y., et al. Structural basis for CRMP2-induced axonal microtubule formation. *Scientific Reports* 7, 10681, 2017.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N. Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829-837, 1998.

Ogawa, T., and Hirokawa, N. Multiple analyses of protein dynamics in solution. *Biophysical Reviews* 10, 299-30, 2018.

Ogawa, T., Saijo, S., Shimizu, N., Jiang, X.G., and Hirokawa, N. Mechanism of catalytic microtubule depolymerization via KIF2-tubulin transitional conformation. *Cell Reports* 20, 2626-2638, 2017.

Ohnishi, T., Balan, S., Toyoshima, M., Maekawa, M., Ohba, H., Watanabe, A., Iwayama, Y., Fujita, Y., Tan, Y.F., Hisano, Y., et al. Investigation of betaine as a novel psychotherapeutic for schizophrenia. *EBioMedicine* 45, 432-446, 2019.

Pardee, J.D., and Spudich, J.A. Purification of muscle actin. *Methods in Cell Biology* 24, 271-289, 1982.

Pathania, M., Davenport, E.C., Muir, J., Sheehan, D.F., Lopez-Domenech, G., and Kittler, J.T. The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. *Translational Psychiatry* 4, e374, 2014.

Peca, J., Feliciano, C., Ting, J.T., Wang, W.T., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z.Y., and Feng, G.P. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472, 437-442, 2011.

Pollard, T. D., & Cooper, J. A. Actin, a central player in cell shape and movement. *science*, 326(5957), 1208-1212, 2009.

Purcell, S. M., Moran, J. L., Fromer, M., Ruderfer, D., Solovieff, N., Roussos, P., ... & Sklar, P. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. *Nature*, 506(7487), 185-190, 2014.



Quach, T. T., Duchemin, A. M., Rogemond, V., Aguera, M., Honnorat, J., Belin, M. F., & Kolattukudy, P. E. Involvement of collapsin response mediator proteins in the neurite extension induced by neurotrophins in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci* 25, 433-443, 2004.

Riedl, J., Flynn, K.C., Raducanu, A., Gartner, F., Beck, G., Bosl, M., Bradke, F., Massberg, S., Aszodi, A., Sixt, M., et al. Lifeact mice for studying F-actin dynamics. *Nature Methods* 7, 168-169, 2010.

Dominguez, R., & Holmes, K. C. Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40, 169-186, 2011.

Roth, T. L., Lubin, F. D., Sodhi, M., & Kleinman, J. E. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(9), 869-877, 2009.

Savanthrapadian S, Wolff AR, Logan BJ, Eckert MJ, Bilkey DK, Abraham WC. Enhanced hippocampal neuronal excitability and LTP persistence associated with reduced behavioral flexibility in the maternal immune activation model of schizophrenia. *Hippocampus* 23, 1395–1409, 2013.

Sawa, A., and Seidman, L.J. Is prophylactic psychiatry around the corner? Combating adolescent oxidative stress for adult psychosis and schizophrenia. *Neuron* 83, 991-993, 2014.

Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267, 4904–4911, 2000.

Sholl, D.A. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *Journal of Anatomy* 87, 387-406, 1953.

Stefansson, H., Ophoff, R.A., Steinberg, S., Andreassen, O.A., Cichon, S., Rujescu, D., Werge, T., Pietilainen, O.P.H., Mors, O., Mortensen, P.B., et al. Common variants conferring risk of schizophrenia. *Nature* 460, 744-747, 2009.

Takeda, S., Yamazaki, H., Seog, D.H., Kanai, Y., Terada, S., and Hirokawa, N. Kinesin superfamily protein 3 (KIF3) motor transports fodrin-associating vesicles important for neurite building. *Journal of Cell Biology* 148, 1255-1265, 2000.

Tanaka, E.M., and Kirschner, M.W. Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *Journal of Cell Biology* 115, 345-363, 1991.

Tanaka, Y., Niwa, S., Dong, M., Farkhondeh, A., Wang, L., Zhou, R.Y., and Hirokawa, N. The molecular Motor KIF1A transports the TrkA neurotrophin receptor and is essential for sensory neuron survival and function. *Neuron* 90, 1215-1229, 2016.

Teng, J., Rai, T., Tanaka, Y., Takei, Y., Nakata, T., Hirasawa, M., ... & Hirokawa, N. The KIF3 motor transports N-cadherin and organizes the developing neuroepithelium. *Nature cell biology*, 7(5), 474-482, 2005.

Toyoshima, M., Jiang, X., Ogawa, T., Ohnishi, T., Yoshihara, S., Balan, S., Yoshikawa, T., and Hirokawa, N. Enhanced carbonyl stress induces irreversible multimerization of CRMP2 in schizophrenia pathogenesis. *Life Science Alliance* 2, e201900478, 2019.

Toyoshima, M., Maekawa, M., Toyota, T., Iwayama, Y., Arai, M., Ichikawa, T., Miyashita, M., Arinami, T., Itokawa, M., and Yoshikawa, T. Schizophrenia with the 22q11.2 deletion and additional genetic defects: case history. *British Journal of Psychiatry* 199, 245-246, 2011.

Trifilieff, P., Rives, M.L., Urizar, E., Piskorowski, R.A., Vishwasrao, H.D., Castrillon, J., Schmauss, C., Slattman, M., Gullberg, M., and Javitch, J.A. Detection of antigen interactions ex vivo by proximity ligation assay: endogenous dopamine D2-adenosine A2A receptor complexes in the striatum. *Biotechniques* 51, 111-118, 2011.

Wearne, S.L., Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Rocher, A.B., Henderson, S.C., and Hof, P.R. New techniques for imaging, digitization and analysis of three-dimensional neural morphology on multiple scales. *Neuroscience* 136, 661-680, 2005.

Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., and Hirokawa, N. KIF3A / B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *Journal of Cell Biology* 130, 1387-1399, 1995.

Yamazaki, H., Nakata, T., Okada, Y., and Hirokawa, N. Cloning and characterization of KAP3: a novel kinesin superfamily-associated protein of KIF3A/3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8443-8448, 1996.

Yang, K., Qiang, D., Delaney, S., Mehta, R., Bruce, W.R., and O'Brien, P.J. Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 191, 322-329, 2011.

Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. GSK-3 $\beta$  regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120, 137-149, 2005.

Young J, McKinney S, Ross B, Wahle K, Boyle S. Biomarkers of oxidative stress in schizophrenic and control subjects. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 76, 73–85, 2007.

Zhang, H.S., Kang, E.C., Wang, Y.Q., Yang, C.J., Yu, H., Wang, Q., Chen, Z., Zhang, C.Y., Christian, K.M., Song, H.J., et al. Brain-specific Crmp2 deletion leads to neuronal development deficits and behavioural impairments in mice. *Nature Communications* 7, 11773, 2016a.

Zhang, M.M., Zhang, H., Li, H.X., Lai, F.R., Li, X.F., Tang, Y.G., Min, T., and Wu, H. Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64, 7921-7930, 2016b.

Zhang, J. C. Koch. Collapsin response mediator protein-2 plays a major protective role in acute axonal degeneration. *Neural Regen Res* 12, 692-695, 2017.

## 発表論文

尚、本論文に記載する研究内容は以下の文献に公表済みである。

雑誌名「Cell Reports」(電子版 35 巻 2 号、2021 年 4 月 13 日)

論文タイトル

Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating for KIF3-based CRMP2 transport

著者

Shogo Yoshihara, Xuguang Jiang, Momo Morikawa, Tadayuki Ogawa, Sotaro Ichinose, Hirooki Yabe, Akiyoshi Kakita, Manabu Toyoshima, Yasuto Kunii, Takeo Yoshikawa, Yosuke Tanaka, and Nobutaka Hirokawa

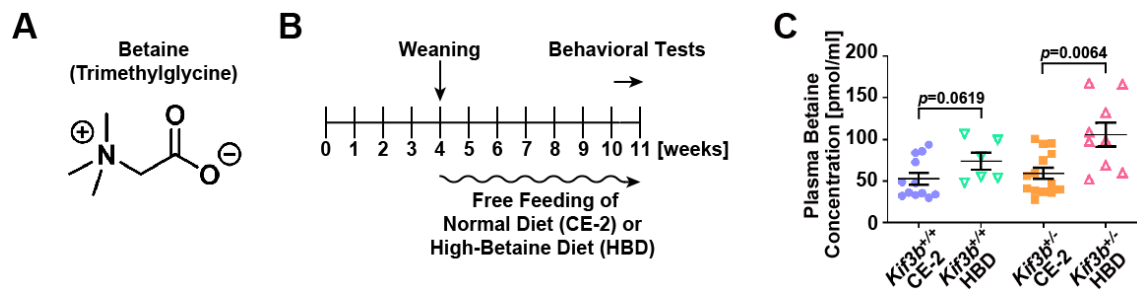


図 1. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおける血漿ベタイン濃度の上昇

(A) ベタインの構造式。(B) マウスへの高ベタイン餌 (High Betaine Diet (HBD)) 投与と行動実験のスケジュール。(C) マウスの血漿ベタイン濃度の比較。データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 37) = 3.837$ ,  $p = 0.0577$ , 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 37) = 11.88$ ,  $p = 0.0014$ , KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 37) = 1.674$ ,  $p = 0.2037$ , Two-way ANOVA ; 及び *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/+</sup> HBD,  $p = 0.0619$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,  $p = 0.0064$ , ウェルチの t 検定 (n = 6–14) による。

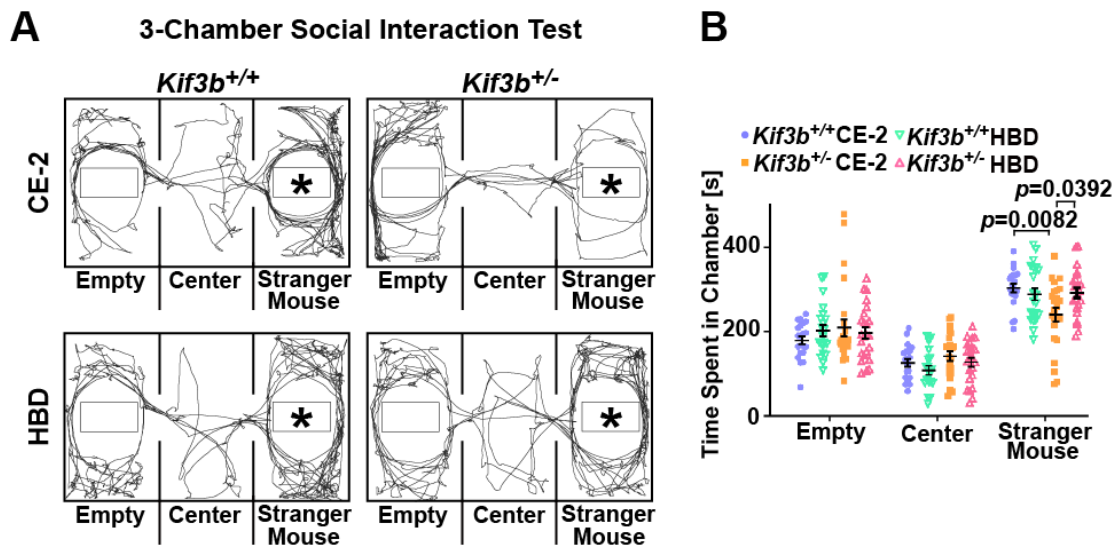


図 2. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの 3-chamber 社会性試験における社会性の低下の回復

(A and B) 3-chamber 社会性試験 (A) における代表的な軌跡図及び統計 (B)。

データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 85) =$

4.814,  $p = 0.0310$ , 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 85) = 1.864$ ,  $p = 0.1758$ ,

KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 85) = 6.082$ ,  $p =$

0.0157, *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2,  $p = 0.0082$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,

$p = 0.0392$ , Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons (n = 21–

24)による。



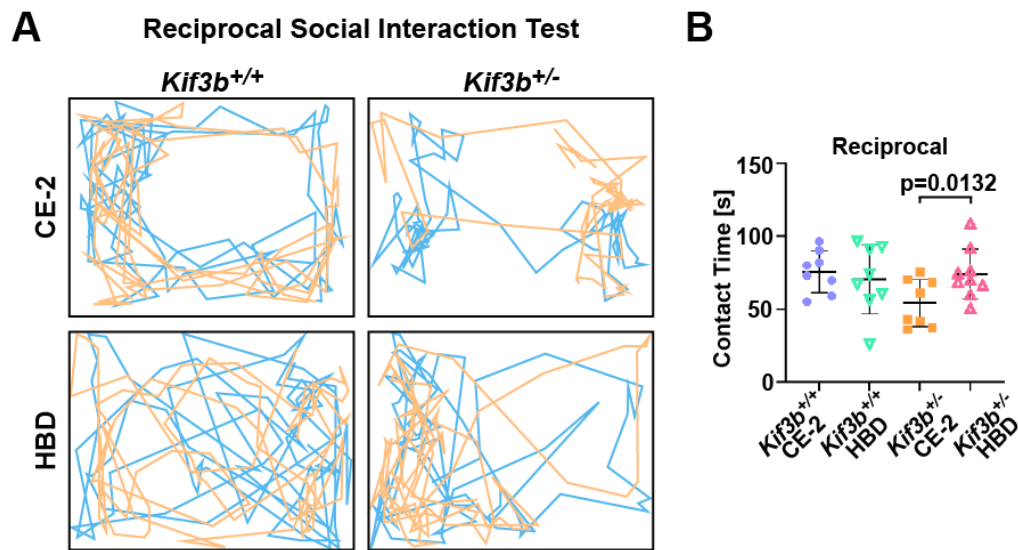


図 3. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの reciprocal 社会性試験における社会性の低下の回復

(A and B) reciprocal 社会性試験 (A) における代表的な軌跡図及び統計 (B)。

データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 29) = 1.968$ ,  $p = 0.1713$ , 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 29) = 1.372$ ,  $p = 0.2510$ , KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 29) = 3.952$ ,  $p = 0.0563$ , Two-way ANOVA ; 及び *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,  $p = 0.0132$ , ウェルチの t 検定 ( $n = 8-9$ ) による。

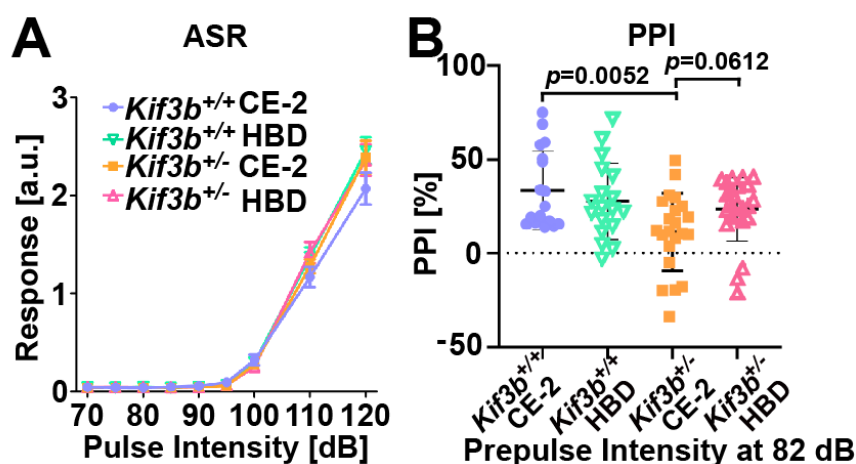


図 4. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおけるプレパルス抑制の低下の回復

(A and B) 音響驚愕反応 (ASR) の測定およびプレパルス抑制 (PPI) 試験を行い、驚愕反応の統計解析 (A) と 82dB における PPI の度合い (B) を表した。

データは平均±標準誤差で表した。各グループの主効果,  $F(3, 747) = 1.337, p = 0.2613$ , pulse 強度の主効果,  $F(8, 747) = 651.6, p < 0.0001$ , 各グループの主効果 × pulse 強度の交互作用  $F(24, 747) = 1.042, p = 0.4077$  (A), KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 77) = 8.777, p = 0.0041$ , 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 77) = 0.5592, p = 0.4568$ , KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 77) = 4.037, p = 0.0480$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2,  $p = 0.0052$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,  $p = 0.0612$ , Two-way ANOVA もしくは Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons (n = 20–25)による。補足図 1C 参照。

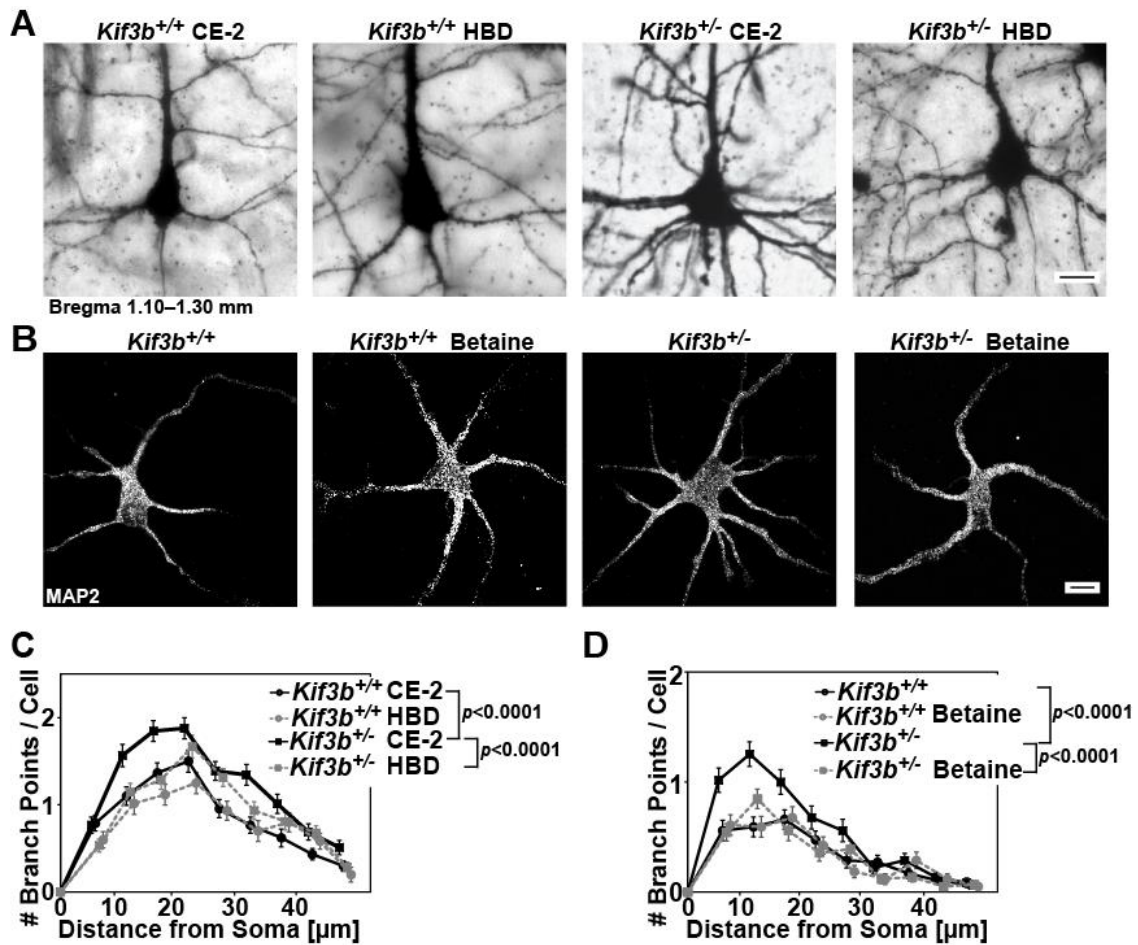


図 5. ベタインを投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞における過剰形成表現型の回復

(A-D) 11 週齢マウスの前頭前野を Golgi-Cox 染色した錐体細胞 (A)および抗 MAP2 抗体を用いて標識した DIV3 初代培養海馬神経細胞 (B) の Sholl 解析による細胞形態学的解析を行った (C and D)。スケールバー、10  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準誤差で表した。各グループ間の主効果,  $F(3, 3260) = 26.04$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 3260) = 93.07$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(27, 3260) = 1.769$ ,  $p = 0.0085$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2,  $p < 0.0001$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>

HBD,  $p < 0.0001$  (C), 各グループ間の主効果,  $F(3, 2360) = 22.74$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 2360) = 70.44$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(27, 2360) = 2.971$ ,  $p < 0.0001$ ,  $Kif3b^{+/+}$  vs  $Kif3b^{+/-}$ ,  $p < 0.0001$ ,  $Kif3b^{+/-}$  2 vs  $Kif3b^{+/-}$  Betaine,  $p < 0.0001$  (D), Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 3$  匹のマウスから計 90 細胞 (C)、 $n = 60$  (D))による。初代培養海馬神経細胞には 500  $\mu$ M ベタインを、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

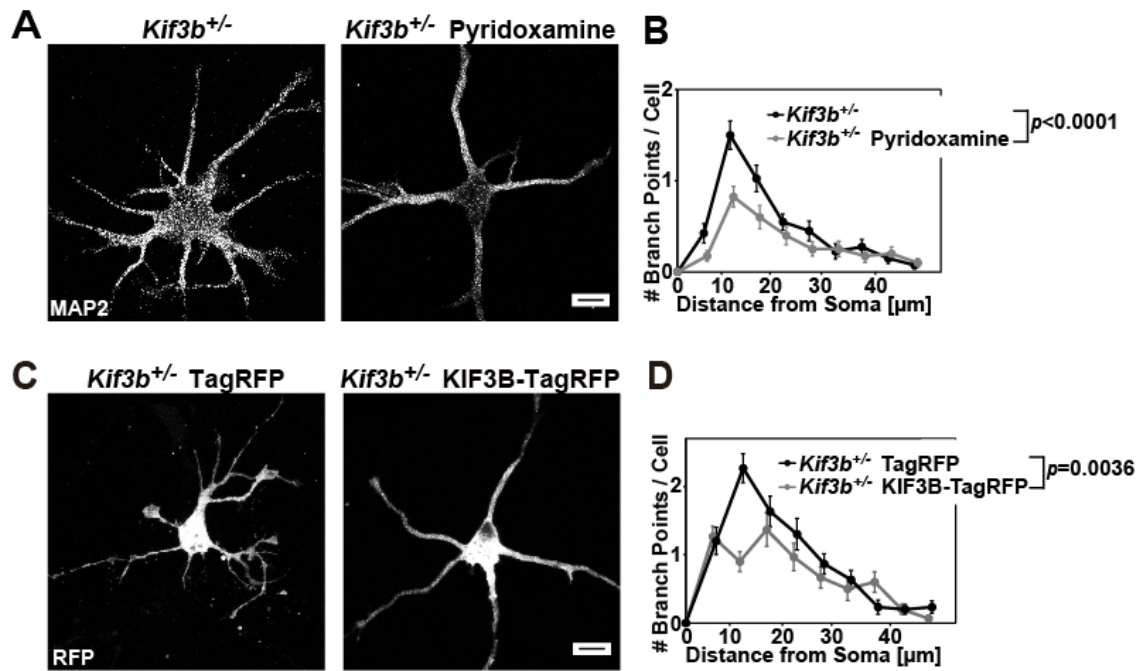


図 6. 抗カルボニルストレス剤であるピリドキサミンの投与及び KIF3B の過剰発現による *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞の過剰形成表現型の回復

(A–D) ピリドキサミン処理 (A) 及び KIF3B-RFP を強制発現した (C) DIV3 初代培養海馬神経細胞について、Sholl 解析による細胞形態学的解析を行った (B and D)。スケールバー、10  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準誤差で表した。ピリドキサミン投与の主効果,  $F(1, 780) = 17.68$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 780) = 30.78$ ,  $p < 0.0001$ , ピリドキサミン投与  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 780) = 3.305$ ,  $p = 0.0006$  (B), KIF3B 過剰発現の主効果,  $F(1, 580) = 8.555$ ,  $p = 0.0036$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 580) = 27.66$ ,  $p < 0.0001$ , KIF3B 過剰発現  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 580) = 4.279$ ,  $p < 0.0001$  (D), Two-way ANOVA, ( $n = 40$

(B)、 $n = 30$  (D))による。500  $\mu\text{M}$  ピリドキサミンを、細胞を蒔いた直後から24時間培養液に添加した。

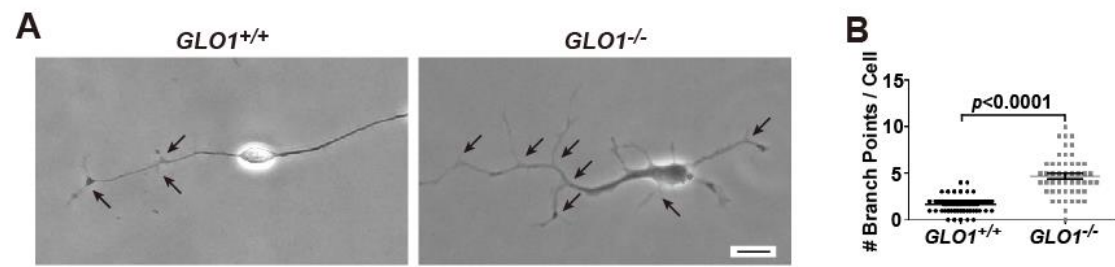


図 7.カルボニルストレス除去機構に関わる *GLO1* 遺伝子を破壊したヒト iPS 細胞

から作成した神経細胞における形成点数の増加

(A and B) *GLO1*<sup>+/+</sup>および *GLO1*<sup>-/-</sup>ヒト iPS 細胞から作成された神経細胞の位

相差画像 (A) 並びに分枝点数の統計解析 (B)。スケールバー、10  $\mu$ m。デー

タは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。 $p < 0.0001$ 、 ウェルチの t 検定 ( $n = 50$ )による。

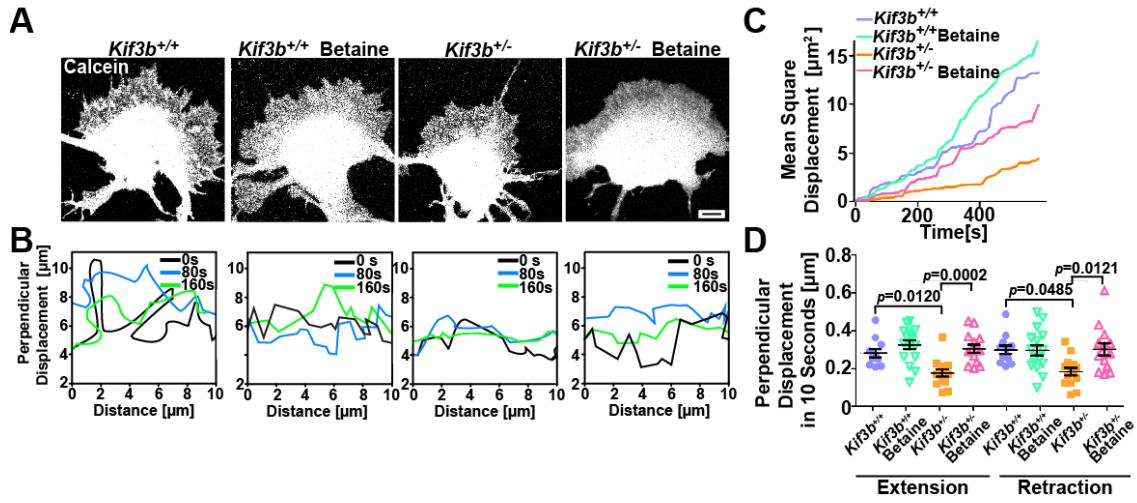


図 8. ベタインを投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞におけるラメリポディア動態の低下の回復

(A-D) カルセイン-AM で標識した各遺伝子型の 500  $\mu$ M ベタイン処理または未処理 DIV1 初代培養海馬神経細胞をライブセルイメージングし (A)、その結果の 3 時点でのラメリポディア端 (B)、ラメリポディア動態の代表的な平均二乗変位 (C)、各方向の変位の統計解析 (D) を示した。スケールバー、5  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 56) = 6.721$ ,  $p = 0.0121$ , ベタイン投与の主効果,  $F(1, 56) = 15.43$ ,  $p = 0.0002$ , KIF3B ノックアウト  $\times$  ベタイン投与の交互作用,  $F(1, 56) = 4.918$ ,  $p = 0.0307$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>,  $p = 0.0120$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> Betaine,  $p = 0.0002$  (Extension), KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 56) = 3.265$ ,  $p = 0.0761$ , ベタイン投与の主効果,  $F(1, 56) = 4.941$ ,  $p = 0.0303$ , KIF3B ノックアウト  $\times$  ベタイン投与の交互作用,



$F(1, 56) = 4.841$ ,  $p = 0.0319$ ,  $Kif3b^{+/+}$  vs  $Kif3b^{+/-}$ ,  $p = 0.0485$ ,  $Kif3b^{+/-}$  vs  $Kif3b^{+/-}$

Betaine,  $p = 0.0121$  (Retraction), Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc

comparisons ( $n = 6-9$  細胞から 12-18 箇所測定)による。500  $\mu$ M ベタインを、

細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

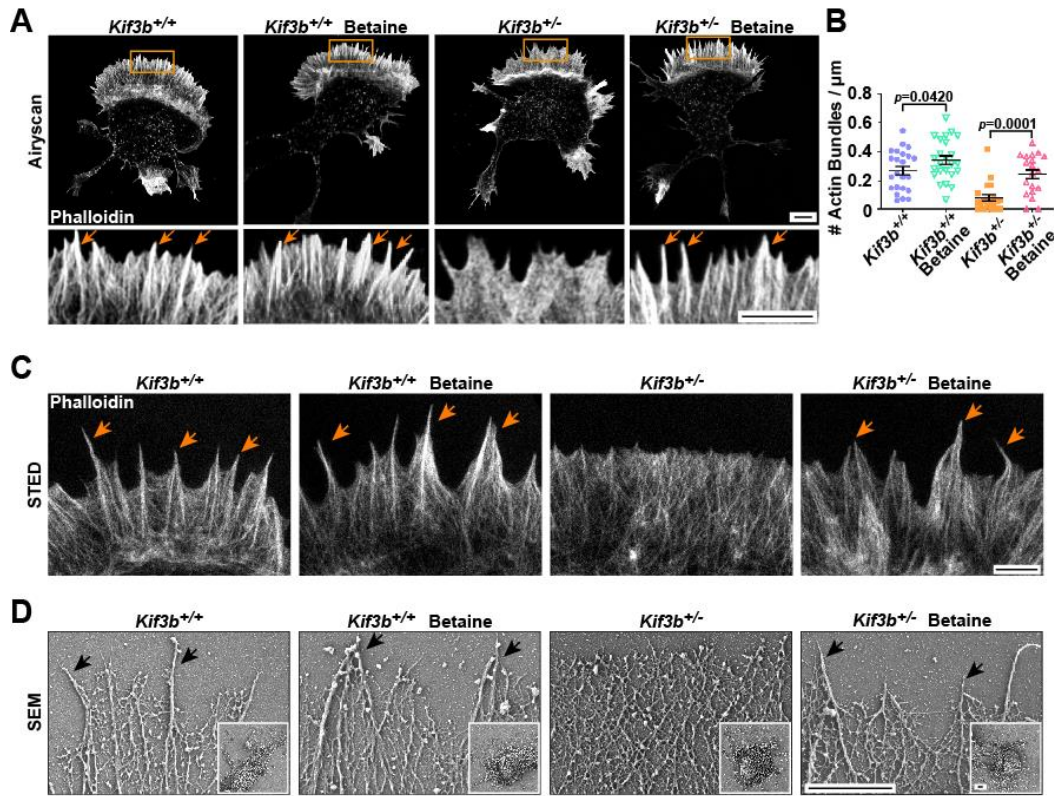


図 9. ベタインを投与した *Kif3b*<sup>+/+</sup> 神経細胞におけるラメリポディア内アクチン束形成の回復

(A–D) DIV1 初代培養海馬神経細胞のラメリポディアにおけるアクチン細胞骨格のイメージング。蛍光ファロイジンを用いた共焦点顕微鏡像(A)、STED 顕微鏡像 (C)、および走査型電子顕微鏡像 (D)。スケールバー、5  $\mu$ m (B) および 2  $\mu$ m (C および D)。データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 82) = 27.00$ ,  $p < 0.0001$ , ベタイン投与の主効果,  $F(1, 82) = 16.36$ ,  $p < 0.0001$ , KIF3B ノックアウト × ベタイン投与の交互作用,  $F(1, 82) = 2.175$ ,  $p = 0.1441$ , Two-way ANOVA ; 及び *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/+</sup> Betaine,  $p =$

0.0420, *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> Betaine,  $p = 0.0001$ , ウェルチの t 検定 (n = 19-24) に

よる。500  $\mu$ M ベタインを、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

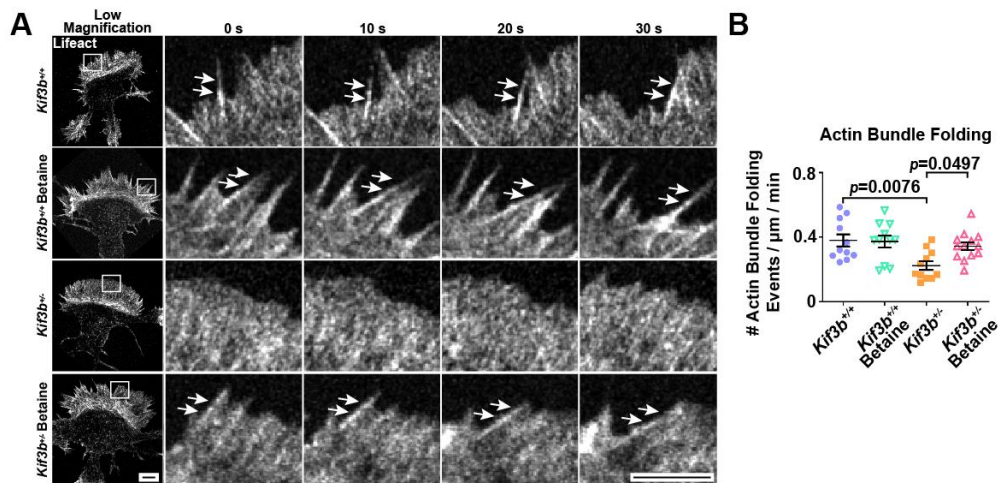


図 10. ベタインを投与した *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞におけるアクチン束形成不全によるラメリポディア動態の減少の回復

(A and B) Lifeact-mRuby 導入 DIV1 海馬神経細胞のラメリポディアにおける F-アクチン動態を低倍率図の四角で囲んだ領域においてタイムラプス撮影し (A)、アクチン束の折りたたみ頻度を定量した (B)。白矢印は、ベタイン非投与の *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞ではほとんど見られなかったアクチン束の折りたたみ運動を示す。スケールバー、5  $\mu\text{m}$ 。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 42) = 8.679$ ,  $p = 0.0052$ , ベタイン投与の主効果,  $F(1, 42) = 3.250$ ,  $p = 0.0786$ , KIF3B ノックアウト  $\times$  ベタイン投与の交互作用,  $F(1, 42) = 4.151$ ,  $p = 0.0479$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>,  $p = 0.0076$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> Betaine,  $p = 0.0497$ , Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 11-13$ ) による。500  $\mu\text{M}$  ベタインを、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

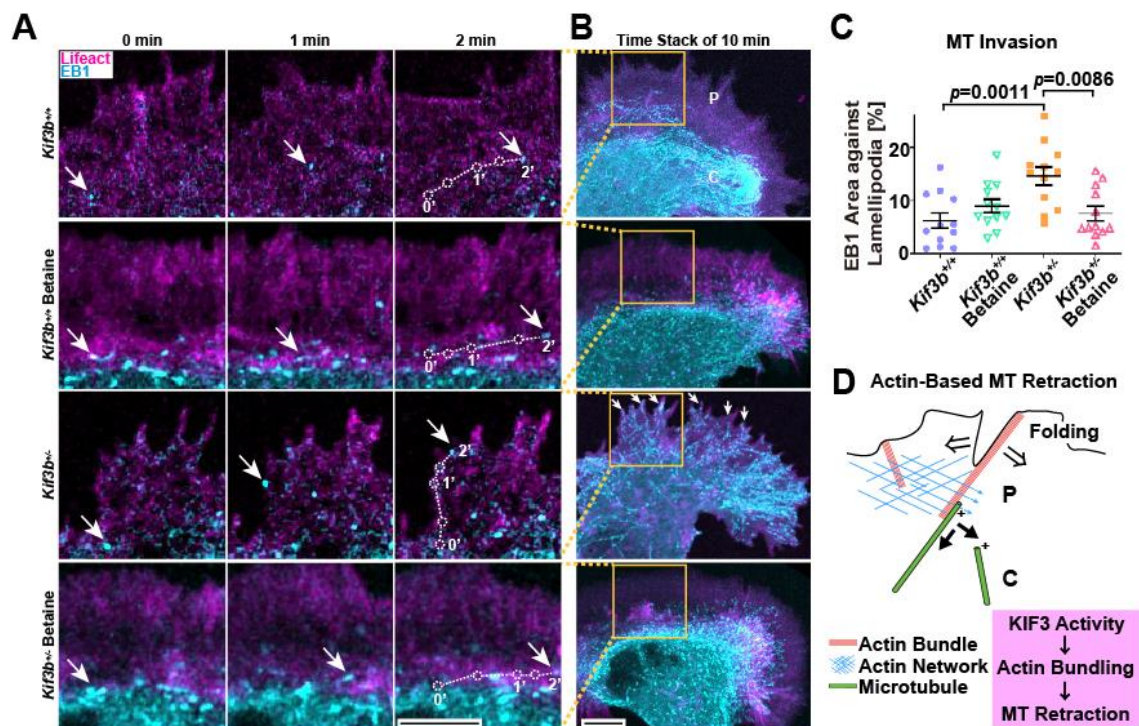


図 11. *Kif3b*<sup>+/-</sup> 神経細胞におけるラメリポディアダイナミクスの低下を原因とした微小管の末梢への過剰侵入

(A–C) EB1-YFP (微小管プラス端、シアン) 及び Lifeact-mRuby (F-アクチン、マゼンタ) を発現させた海馬神経細胞におけるラメリポディア P ドメインへの微小管の侵入を 2 色のタイムラプス解析を用いて各遺伝子型について 500  $\mu$ M ベタイン投与有無の条件下で記録した。タイムラプス連続画像 (A)、10 分間のタイムスタック画像 (B)、タイムスタック画像における EB1-YFP 占有領域の統計解析 (C) を示す。(A) の点線は、EB1-YFP の典型的な輝点の軌跡を示す。(B) の四角は、(A) のタイムラプス連続画像の領域を示す。(B) の矢印は、P ド

メインに侵入した過剰な微小管を示す。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$  である。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 44) = 5.731$ ,  $p = 0.0210$ , ベタイン投与の主効果,  $F(1, 44) = 2.089$ ,  $p = 0.1554$ , KIF3B ノックアウト  $\times$  ベタイン投与の交互作用,  $F(1, 44) = 11.33$ ,  $p = 0.0016$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>,  $p = 0.0011$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> Betaine,  $p = 0.0086$ , Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 12$ )による。500  $\mu\text{M}$  ベタインを、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。

(D) アクチン束が存在する状態におけるラメリポディア内微小管+末端伸長の模式図。微小管+末端は C ドメインを中心に、アクチン束の折り畳みによって水平方向に移動する。ベタイン処理していない *Kif3b*<sup>+/-</sup>神経細胞ではアクチン束の消失によって、微小管+末端の水平方向の移動が損なわれていた。

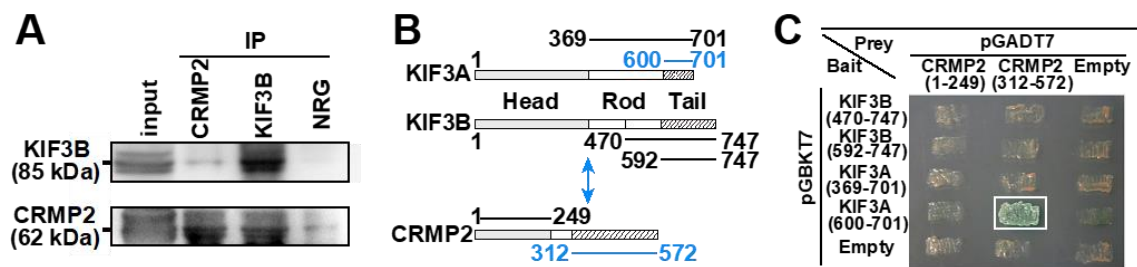


図 12. CRMP2 と KIF3 モーターの結合の生化学的解析

(A) 抗 KIF3B 抗体および抗 CRMP2 抗体、コントロールとして正常ウサギ IgG

(NRG) を用いたマウス脳ライセートの上清の免疫沈降 (IP)。CRMP2 は多くの修飾を受けているため、イムノブロッティングでは複数の CRMP2 バンドが生じる。

(B and C) 欠失変異体間の酵母ツーハイブリッド結合アッセイ (B) 及び酵母コロニー画像 (C)。KIF3A の尾部ドメイン (600-701) が CRMP2 の C 末端ドメイン (312-572) と直接的に相互作用している。



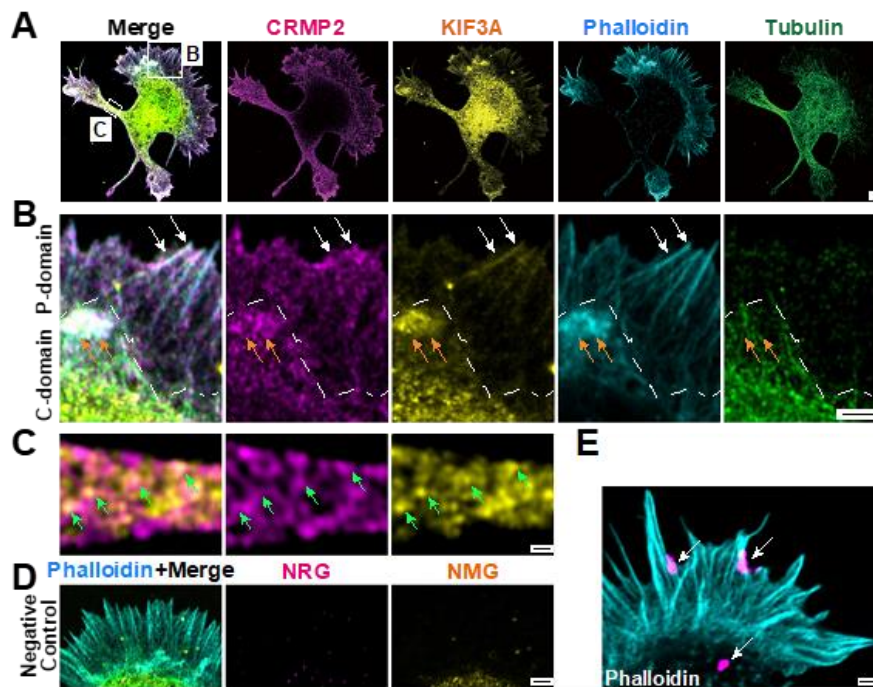


図 13. 免疫染色による CRMP2 と KIF3A の共局在

(A–D) 抗 CRMP2 抗体 (A–C、マゼンタ) または正常ウサギ IgG (D、マゼンタ)、抗 KIF3A 抗体 (A–C、黄) または正常マウス IgG (D、黄)、蛍光ファロイジン (A, B and D、シアン)、および抗 $\alpha$ -tubulin 抗体 (A and B、緑) を用いて標識した DIV1 における初代培養 *Kif3b*<sup>+/+</sup> 海馬神経細胞の免疫蛍光顕微鏡像、低倍率を (A)、中倍率を (B)、高倍率を (C) に示した。(A) のオープンボックスが (B) および (C) で示している領域である。(B) の矢印は、P ドメインのアクチン束 (白) と C ドメイン外周部 (橙) における CRMP2 と KIF3A の共局在を示す。(C) の緑矢印は、神経突起シャフトにおける CRMP2 と KIF3A の共局在を示す。スケールバー、2  $\mu$ m。



(E) DIV1 初代培養 *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞における抗 CRMP2 抗体及び抗 KIF3A 抗体を用いた近接ライゲーションアッセイ（マゼンタ）を行い、蛍光ファロイジン（シアン）により対比染色した蛍光顕微鏡写真。スケールバー、2  $\mu\text{m}$ 。

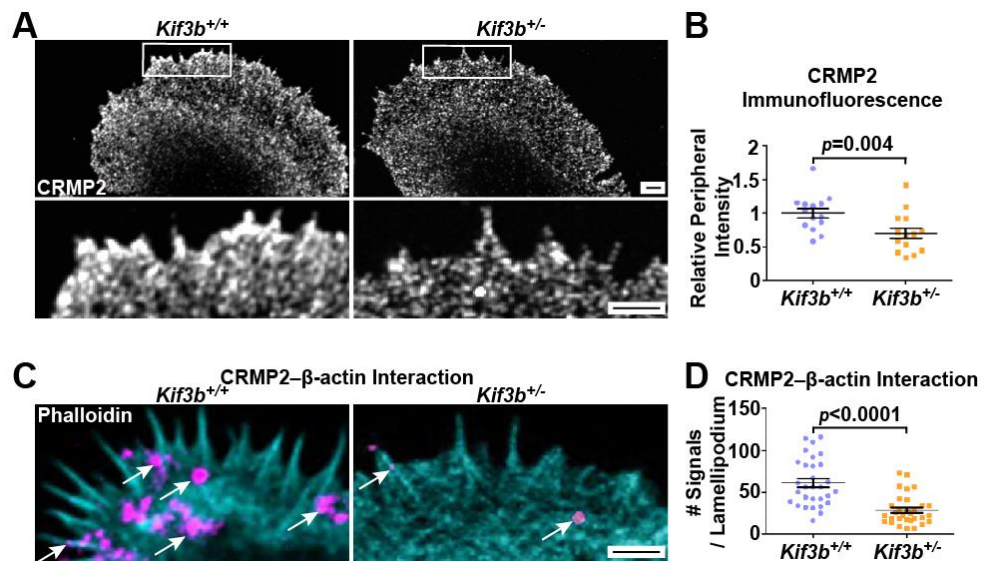


図 14. ラメリポディア周縁部における CRMP2 とアクチンの結合

(A and B) 抗 CRMP2 抗体で標識した DIV1 における各遺伝子型のマウス初代培養海馬神経細胞ラメリポディアの低倍率 (A、上列) 並びに高倍率 (A、下列) の免疫蛍光顕微鏡像、および野生型における蛍光強度により正規化した周縁部 CRMP2 蛍光強度の統計解析 (B) を示す。スケールバー、2  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準誤差で表した。  $p = 0.004$ 、ウェルチの  $t$  検定 ( $n = 14-15$ ) による。

(C and D) 各遺伝子型の初代培養海馬神経細胞ラメリポディアにおける抗 CRMP2 抗体及び抗 G-アクチン抗体を用いた近接ライゲーションアッセイ (C、マゼンタ) を行い、蛍光ファロイジン (C、シアン) により対比染色した蛍光顕微鏡写真、および統計解析を示す (D)。スケールバー、2  $\mu$ m。データは平均  $\pm$  標準誤差で表した。  $p < 0.0001$ 、ウェルチの  $t$  検定 ( $n = 30-31$ ) による。

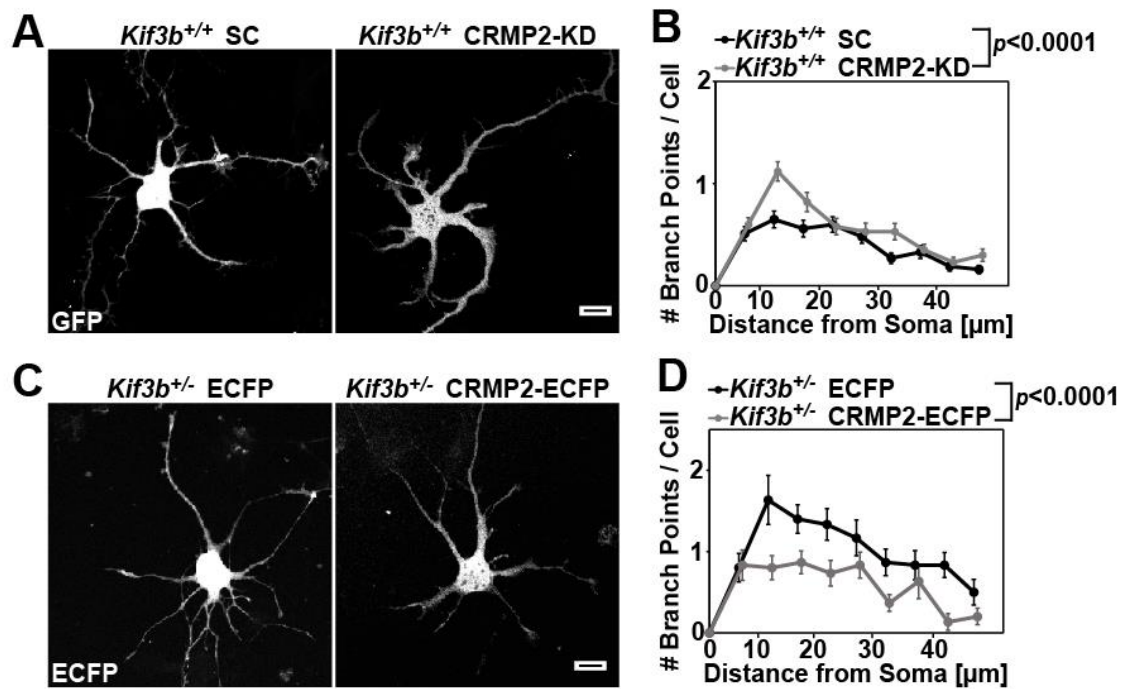


図 15. CRMP2 の発現レベル変化による樹状突起形成の制御

(A–D) スランブルコントロール(SC)または CRMP2-KD を導入した *Kif3b*<sup>+/+</sup> 初代培養海馬神経細胞(A)と、ECFP コントロールまたは CRMP2-ECFP を導入した *Kif3b*<sup>+/-</sup> 初代培養海馬神経細胞 (C)の DIV3 における Sholl 解析による細胞形態の統計解析を示す(B and D)。スケールバーは 10  $\mu$ m。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。CRMP2 ノックダウンの主効果,  $F(1, 1980) = 19.08$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 1980) = 29.76$ ,  $p < 0.0001$ , CRMP2 ノックダウン  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 1980) = 2.680$ ,  $p = 0.0043$  (B), CRMP2 過剰発現の主効果,  $F(1, 580) = 28.65$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 580) = 10.70$ ,  $p < 0.0001$ , CRMP2 過剰発

現 × 細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 580) = 1.513$ ,  $p = 0.1397$  (D),

Two-way ANOVA ( $n = 100$  (B) および  $n = 30$  (D)) による。

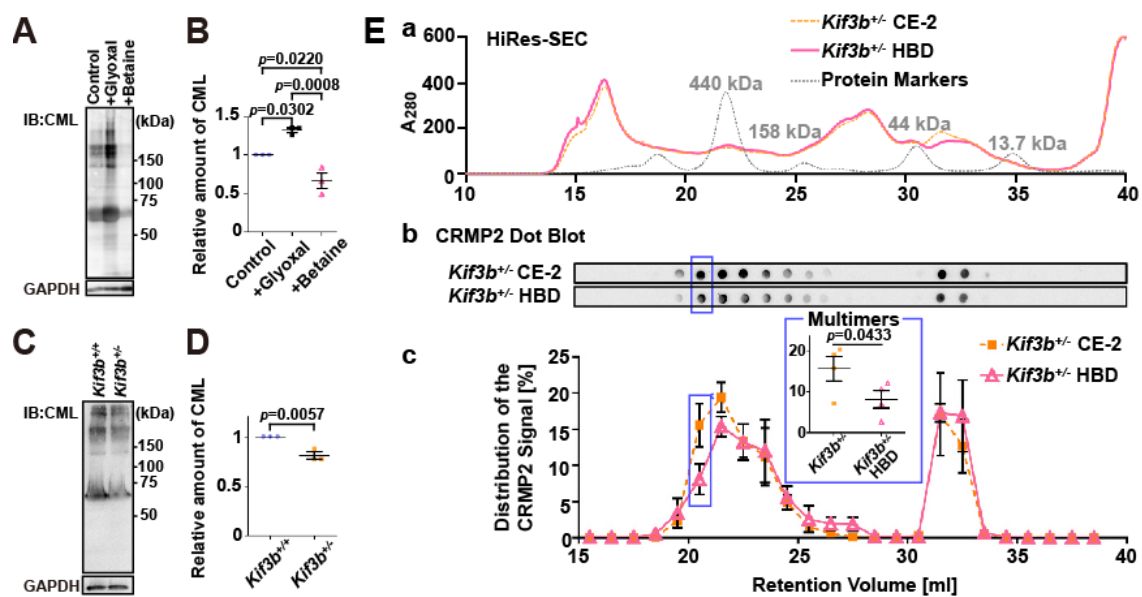


図 16. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスにおける CRMP2 の多量体化の抑制

(A–D) *Kif3b*<sup>+/+</sup> (A and C) 及び *Kif3b*<sup>+/-</sup> (C) の初代培養大脳皮質神経細胞において、200  $\mu$ M グリオキサールまたは 500  $\mu$ M のベタインを用いて、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加したサンプルを抗 CML 抗体を用いてイムノブロッティング (A) を行い、統計解析を行った (B and D)。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。コントロール群 vs グリオキサール添加群,  $p = 0.0302$ , コントロール群 vs ベタイン添加群,  $p = 0.0220$ , グリオキサール添加群 vs ベタイン添加群,  $p = 0.0008$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>,  $p = 0.0057$ , one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparison (B) もしくはウェルチの t 検定 (D) (それぞれ  $n = 3$ ) による。

(E) CE-2 (橙破線) または高ベタイン餌 (ピンク実線) を摂食した *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスの脳細胞質画分における CRMP2 サイズ分布の統計解析。(a) 高分解能サイズ排除クロマトグラフィー (HiRes-SEC) による溶出画分の A280 クロマトグラム。灰色の点線はタンパク質の分子量標準を示す。(b) 各画分の CRMP2 ドットブロット。(c) CRMP2 シグナルの相対的なドットブロット強度の統計解析。挿入図は、20–21 ml における高カルボニル化画分の統計解析 (青枠)。データは平均±標準誤差で表した。 $p = 0.0433$ , ウェルチの  $t$  検定( $n = 4$ )による。

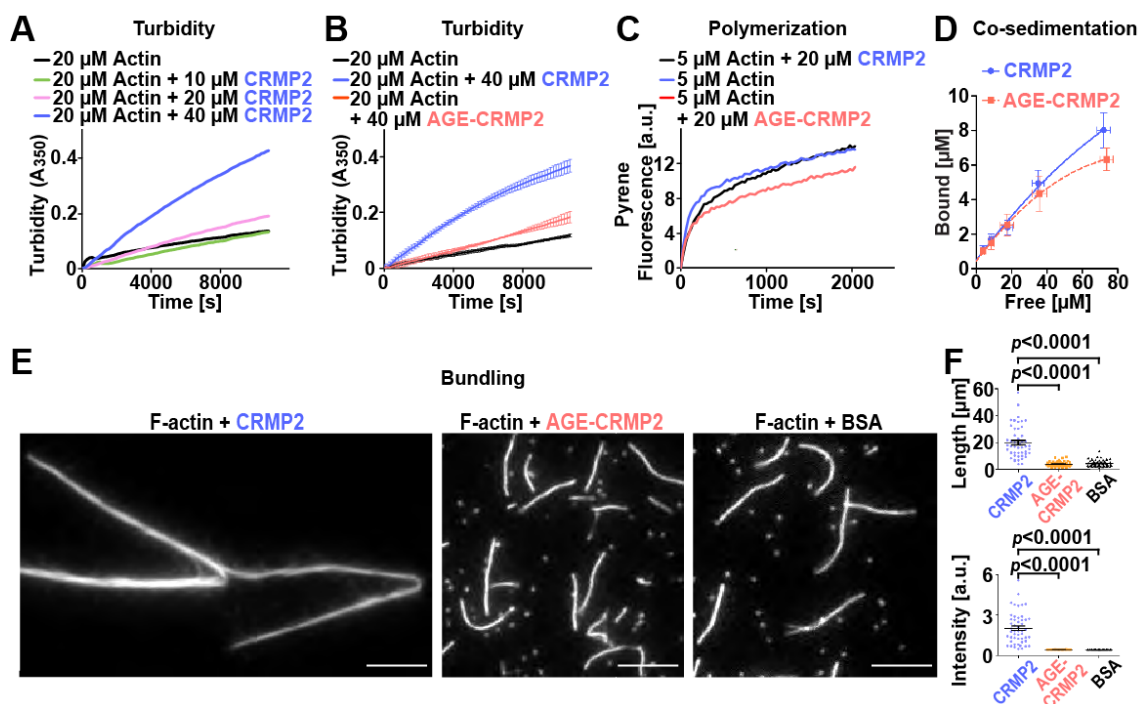


図 17. CRMP2 のアクチン束化能のカルボニル化修飾による喪失

(A–F) アクチンに対する CRMP2 の活性を生化学的に評価した。(A and B) CRMP2 (A) または AGE-CRMP2 を添加したアクチンの濁度の時間経過。(C) ピレン-アクチン重合アッセイにおけるタイムコース。(D) 上清とペレット中のタンパク質濃度に応じた F-アクチン共沈降アッセイの Free-bound plot を One Site binding model を用いてフィッティングした。データは平均±標準偏差で表した。補足図 7 参照。(E and F) TIRF 顕微鏡によるアクチン束化アッセイ (F) 及びその統計解析。スケールバー、5  $\mu\text{m}$ 。データは平均±標準誤差で表し、CRMP2 vs AGE-CRMP2,  $p < 0.0001$ , CRMP2 vs BSA,  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 3$  (B and F)、 $n = 50$  (F)) による。

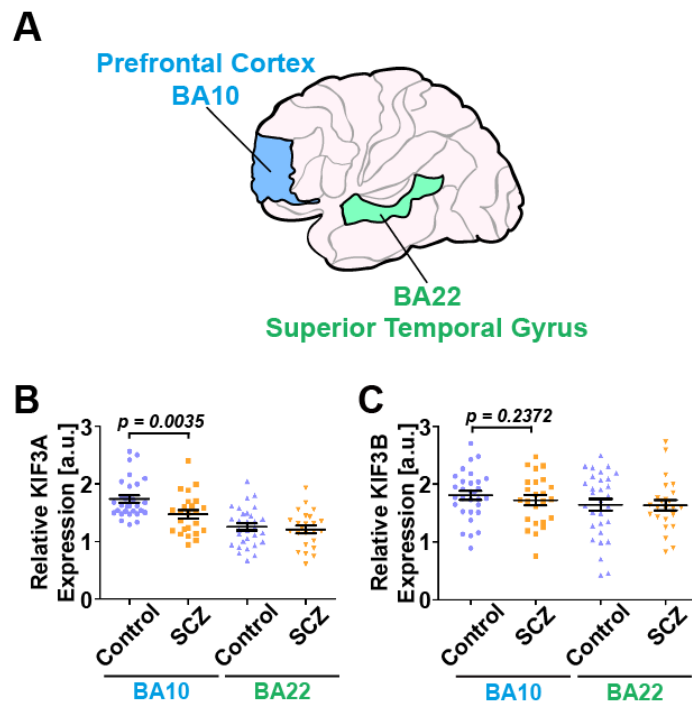


図 18. 統合失調症患者死後脳における KIF3 レベルの低下傾向

(A–C) ブロードマン 10 野 (A、青) および 22 野 (A、緑) 領域のヒト死後脳ライセートの上清の KIF3A (B) および KIF3B (C) に対する ELISA 試験。データは GAPDH レベルで正規化し、平均±標準誤差で表した。BA10 領域におけるコントロール群 vs 統合失調症患者群,  $p = 0.0035$  (B), BA10 領域におけるコントロール群 vs 統合失調症患者群,  $p = 0.2372$  (C), ウェルチの t 検定 (n = 24–30) による。



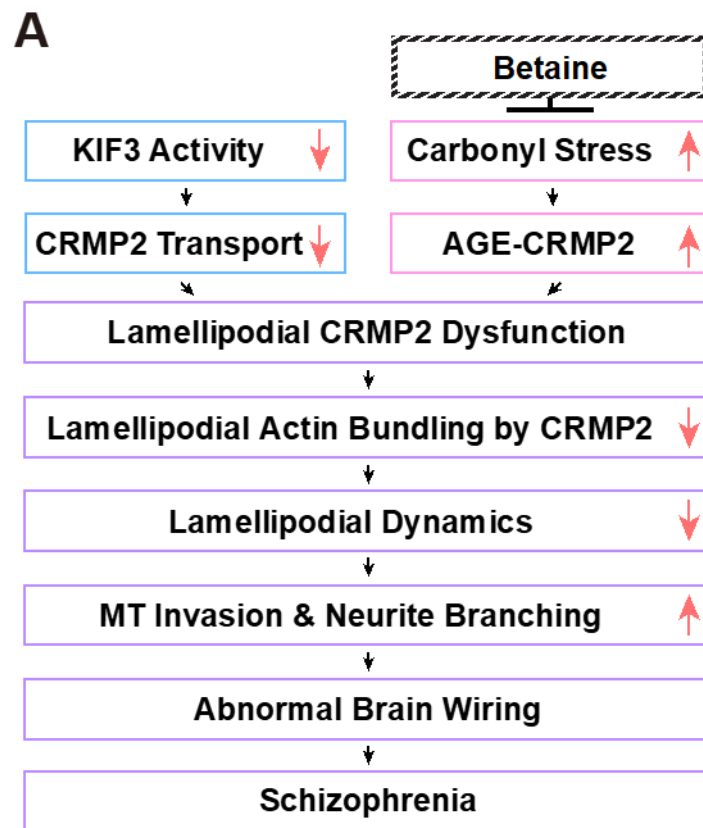
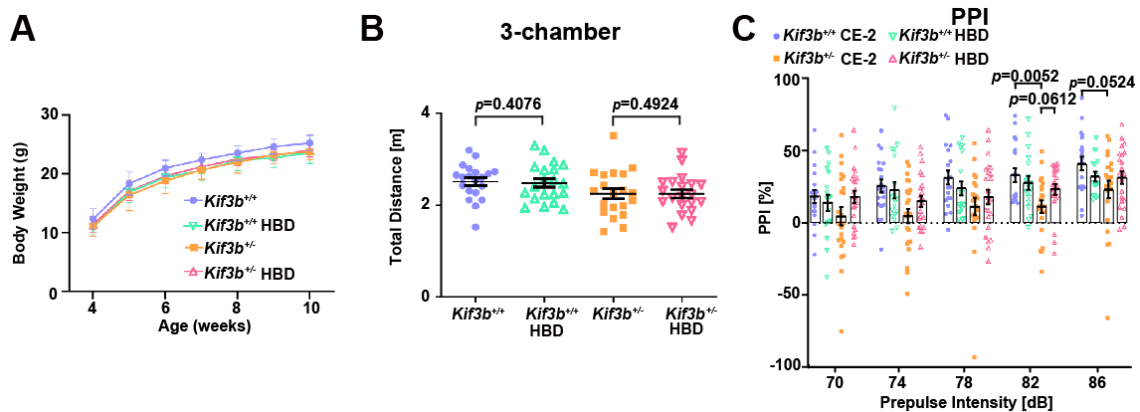


図 19. 統合失調症病態における KIF3/CRMP2 を介した神経突起過剰形成の分

#### 子メカニズムの作業仮説

(A)発達中の神経細胞のラメリポディアにおける CRMP2 のアクチン束化活性の障害は、KIF3 の機能低下とカルボニルストレスの相乗効果によって誘発され、ベタインによる CRMP2 タンパク質の脱カルボニル化によって回復することができる。本文参照。

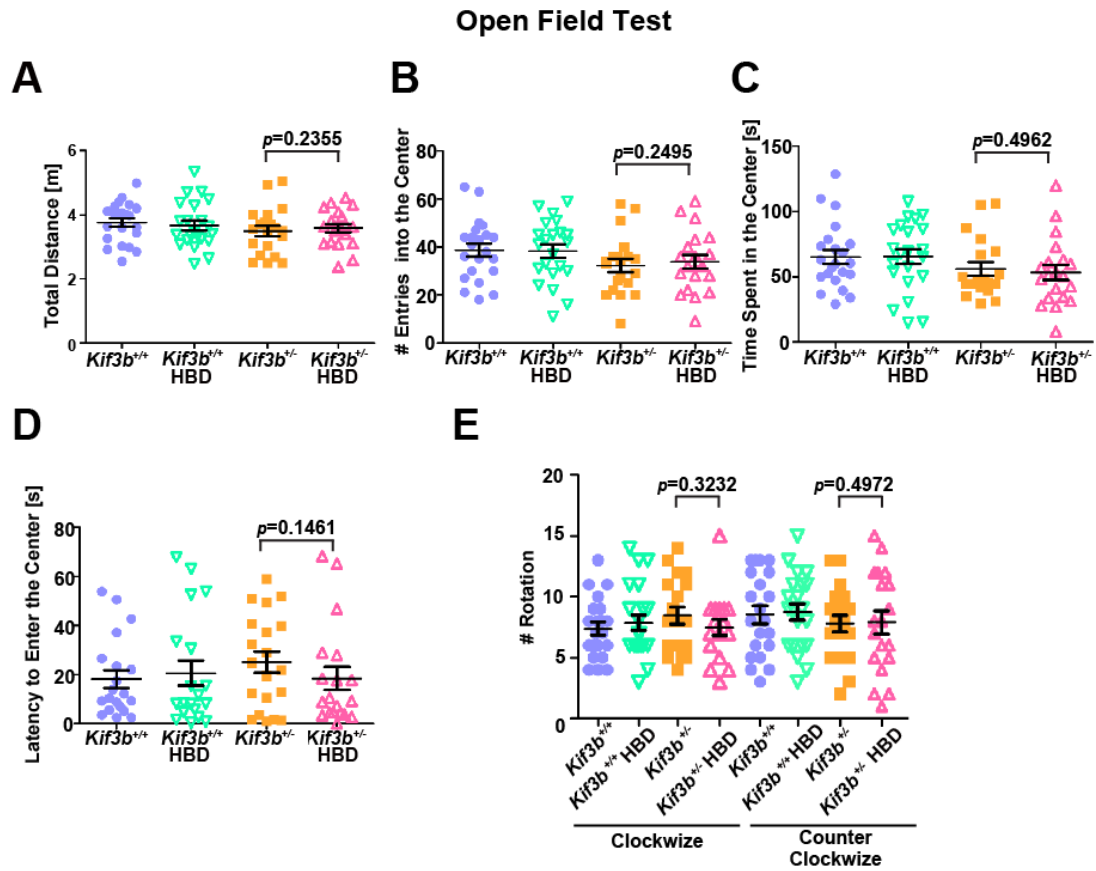


補足図 1. 高ベタイン餌の効果測定する行動学的試験

(A) CE-2 または高ベタイン餌を摂食した各遺伝子系におけるマウスの体重曲線。データは平均±標準誤差で表した。各グループ間の主効果,  $F(3, 196) = 14.31$ ,  $p < 0.0001$ , 週齢の主効果,  $F(6, 196) = 253.6$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間 × 週齢の交互作用,  $F(18, 196) = 0.1395$ ,  $p > 0.9999$ , Two-way ANOVA ( $n = 7-9$ ) による。

(B) CE-2 または高ベタイン餌を摂食した  $Kif3b^{+/+}$  または  $Kif3b^{+/-}$  マウスにおける 3 チャンバー社会性試験におけるマウスの総移動距離 (図 2 に関連)。データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 76) = 6.734$ ,  $p = 0.0113$ , 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 76) = 0.0287$ ,  $p = 0.8659$ , KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 76) = 0.0198$ ,  $p = 0.8885$ , Two-way ANOVA ; 及び  $Kif3b^{+/+}$  vs  $Kif3b^{+/+}$  HBD,  $p = 0.4076$ ,  $Kif3b^{+/-}$  vs  $Kif3b^{+/-}$  HBD,  $p = 0.4924$ , ウェルチの t 検定 ( $n = 21-24$ ) による。

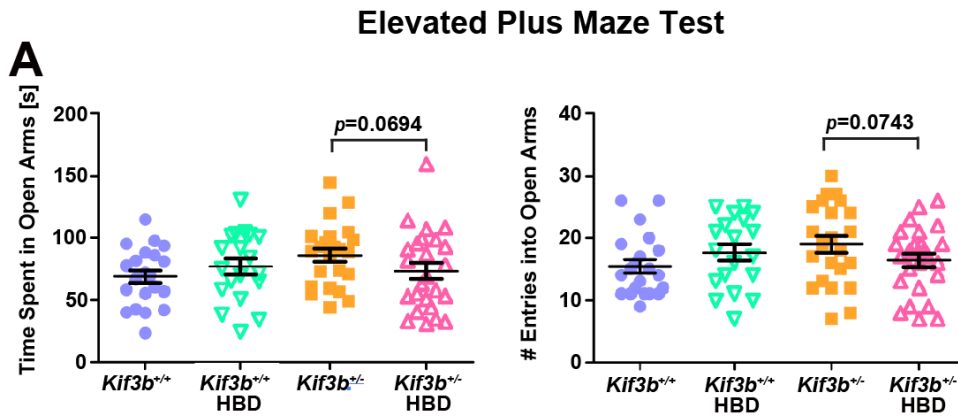
(C) CE-2 または高ベタイン餌を摂食した *Kif3b*<sup>+/+</sup>または *Kif3b*<sup>+/-</sup>マウスにおける異なるプレパルスの強度における PPI 試験 (図 4 に関連)。データは平均 ± 標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 88) = 1.872, p = 0.1747$  (70 dB),  $F(1, 85) = 8.624, p = 0.0043$  (74 dB),  $F(1, 86) = 6.819, p = 0.0106$  (78 dB),  $F(1, 77) = 8.777, p = 0.0041$  (82 dB),  $F(1, 84) = 3.000, p = 0.0869$  (86 dB), 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 88) = 2.138, p = 0.1473$  (70 dB),  $F(1, 85) = 0.2280, p = 0.6343$  (74 dB),  $F(1, 86) = 0.00043, p = 0.9835$  (78 dB),  $F(1, 77) = 0.5592, p = 0.4568$  (82 dB),  $F(1, 84) = 0.1166, p = 0.7336$  (86 dB), KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 88) = 1.769, p = 0.1870$  (70 dB),  $F(1, 85) = 1.721, p = 0.1930$  (74 dB),  $F(1, 86) = 1.821, p = 0.1808$  (78 dB),  $F(1, 77) = 4.037, p = 0.0480$  (82 dB),  $F(1, 84) = 4.461, p = 0.0376$  (86 dB), *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2,  $p = 0.0052$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,  $p = 0.0612$  (82 dB), *Kif3b*<sup>+/+</sup> CE-2 vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> CE-2,  $p = 0.0524$  (86 dB), Two-way ANOVA もしくは Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons (n = 20–25) による。



## 補足図 2. オープンフィールドテストにおけるベタインの作用探索

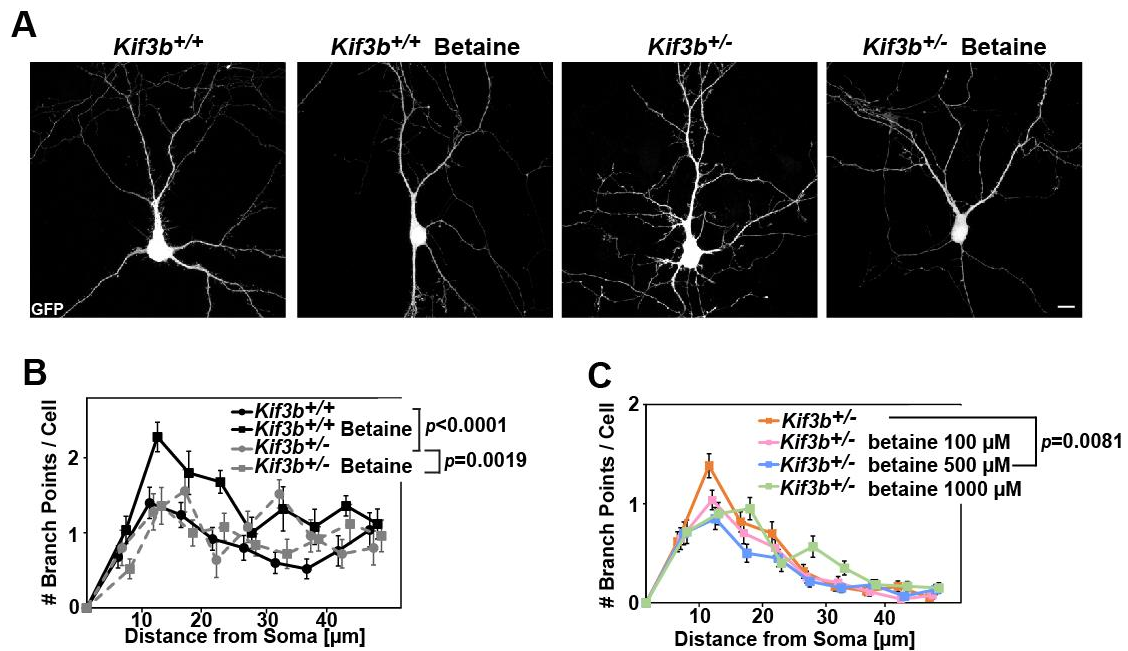
(A-E) 各遺伝子系におけるオープンフィールドテスト。結果は、総距離 (A)、中心部への進入回数 (B)、中心部の滞在時間 (C)、中心部に進入するまでの待ち時間 (D)、時計回りと反時計回りの回転数 (E) で表した。データは平均±標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 86) = 1.244$ ,  $p = 0.2678$  (A),  $F(1, 86) = 3.440$ ,  $p = 0.0671$  (B),  $F(1, 86) = 4.209$ ,  $p = 0.0432$  (C),  $F(1, 78) = 0.1422$ ,  $p = 0.7071$  (D),  $F(1, 83) = 1.992$ ,  $p = 0.1618$  (E(clockwise)),  $F(1, 83) = 1.186$ ,  $p = 0.2792$  (E(counter clockwise)), 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 86)$

$= 0.02879, p = 0.8657$  (A),  $F(1, 86) = 0.1701, p = 0.6811$  (B),  $F(1, 86) = 0.00047,$   
 $p = 0.9827$  (C),  $F(1, 78) = 0.1979, p = 0.6577$  (D),  $F(1, 83) = 0.4901, p =$   
 $0.4858$ (E(clockwise)),  $F(1, 83) = 0.02333, p = 0.8790$  (E(counter clockwise)),  
 KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 86) = 0.6776, p =$   
 $0.4127$  (A),  $F(1, 86) = 0.2825, p = 0.5965$  (B),  $F(1, 86) = 0.00122, p = 0.9722$   
 (C),  $F(1, 78) = 1.054, p = 0.3079$  (D),  $F(1, 83) = 0.0049, p = 0.9439$   
 (E(clockwise)),  $F(1, 83) = 0.02664, p = 0.8707$  (E(counter clockwise)), Two-  
 way ANOVA ; 及び  $Kif3b^{+/-}$  vs  $Kif3b^{+/-}$  HBD,  $p = 0.2355$  (A) ,  $p = 0.2495$  (B),  $p$   
 $= 0.4962$  (C),  $p = 0.1461$  (D),  $p = 0.3232$  (E(clockwise)),  $p = 0.4972$  (E(counter  
 clockwise)), ウェルチの t 検定 (n = 19–23) による。



補足図 3. 高架式十字迷路試験におけるベタイン作用の解析

(A and B) 各遺伝子系における高架式十字迷路試験。結果は、オープンアームにいた時間 (A) とオープンアームに入った回数 (B) で表した。データは平均 ± 標準誤差で表した。KIF3B ノックアウトの主効果,  $F(1, 84) = 1.225$ ,  $p = 0.2715$  (A),  $F(1, 84) = 0.8836$ ,  $p = 0.3499$  (B), 高ベタイン含有餌の主効果,  $F(1, 84) = 0.1164$ ,  $p = 0.7399$  (A),  $F(1, 84) = 0.02094$ ,  $p = 0.8853$  (B), KIF3B ノックアウト × 高ベタイン含有餌の交互作用,  $F(1, 84) = 3.173$ ,  $p = 0.0785$  (A),  $F(1, 84) = 3.796$ ,  $p = 0.0547$  (B), Two-way ANOVA ; 及び *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> HBD,  $p = 0.0694$  (A) ,  $p = 0.0743$  (B), ウェルチの t 検定 ( $n = 19-25$ ) による。



補足図 4. 成熟神経細胞におけるベタイン処理及び至適ベタイン濃度の探索

(図 5 に関連して)

(A および B) 各遺伝子型の DIV14 における GFP を遺伝子導入した初代培養海

馬神経細胞の 500  $\mu$ M のベタイン投与の有無による細胞形態学的解析 (A) 及び

その統計解析(B)。スケールバー、10  $\mu$ m。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。

各グループ間の主効果,  $F(3, 760) = 7.904$ ,  $p < 0.0001$ , 細胞体からの距離の分岐

点数の主効果,  $F(9, 760) = 15.40$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体からの距

離の分岐点数の交互作用,  $F(27, 760) = 1.534$ ,  $p = 0.0414$ , *Kif3b*<sup>+/+</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup>,  $p$

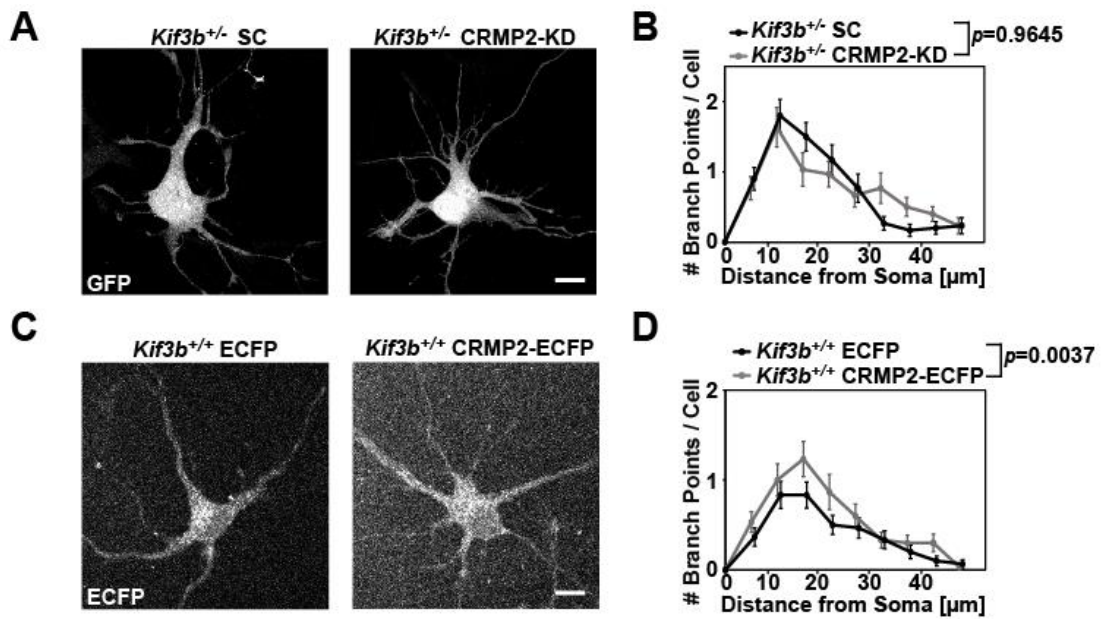
$< 0.0001$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> Betaine,  $p = 0.0019$ , Two-way ANOVA with

Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 25$ )による。500  $\mu$ M ベタインを、細胞

を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。(C) DIV3 における *Kif3b*<sup>+/-</sup>初代

培養海馬神経細胞にベタインを投与したときの用量反応曲線。0、100、500、1000  $\mu\text{M}$  のベタインを投与した。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。各グループ間の主効果,  $F(3, 2360) = 5.308, p = 0.0012$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 2360) = 80.71, p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(27, 2360) = 2.399, p < 0.0001$ , *Kif3b*<sup>+/-</sup> vs *Kif3b*<sup>+/-</sup> 500  $\mu\text{M}$  Betaine,  $p = 0.0081$ , Two-way ANOVA with Bonferroni's post hoc comparisons ( $n = 60$ )による。各濃度のベタインは、細胞を蒔いた直後から 24 時間培養液に添加した。



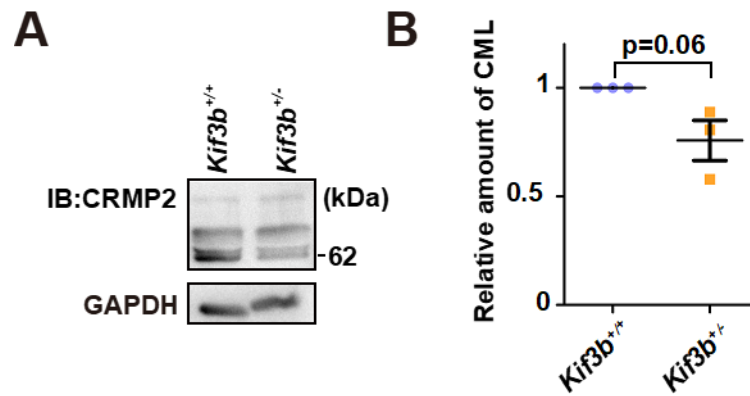


補足図 5. 海馬神経細胞における CRMP2 の発現レベル変化による樹状突起形成の制御 (図 1 5 に関連して)

(A-D) スクランブルコントロール (SC) または CRMP2 ノックダウンを導入した *Kif3b*<sup>+/-</sup>海馬神経細胞 (A) 及び ECFP のみ、または CRMP2-ECFP を導入した *Kif3b*<sup>+/+</sup>海馬神経細胞(C)の DIV3 における細胞形態学的分析。結果は Sholl 解析で定量した (B and D)。スケールバー、10  $\mu$ m。データは平均 $\pm$ 標準誤差で表した。CRMP2 ノックダウンの主効果,  $F(1, 580) = 0.0019$ ,  $p = 0.9645$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 580) = 20.19$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体からの距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 580) = 1.418$ ,  $p = 0.1768$ , CRMP2 過剰発現の主効果,  $F(1, 580) = 8.510$ ,  $p = 0.0037$ , 細胞体からの距離の分岐点数の主効果,  $F(9, 580) = 18.45$ ,  $p < 0.0001$ , 各グループ間  $\times$  細胞体から

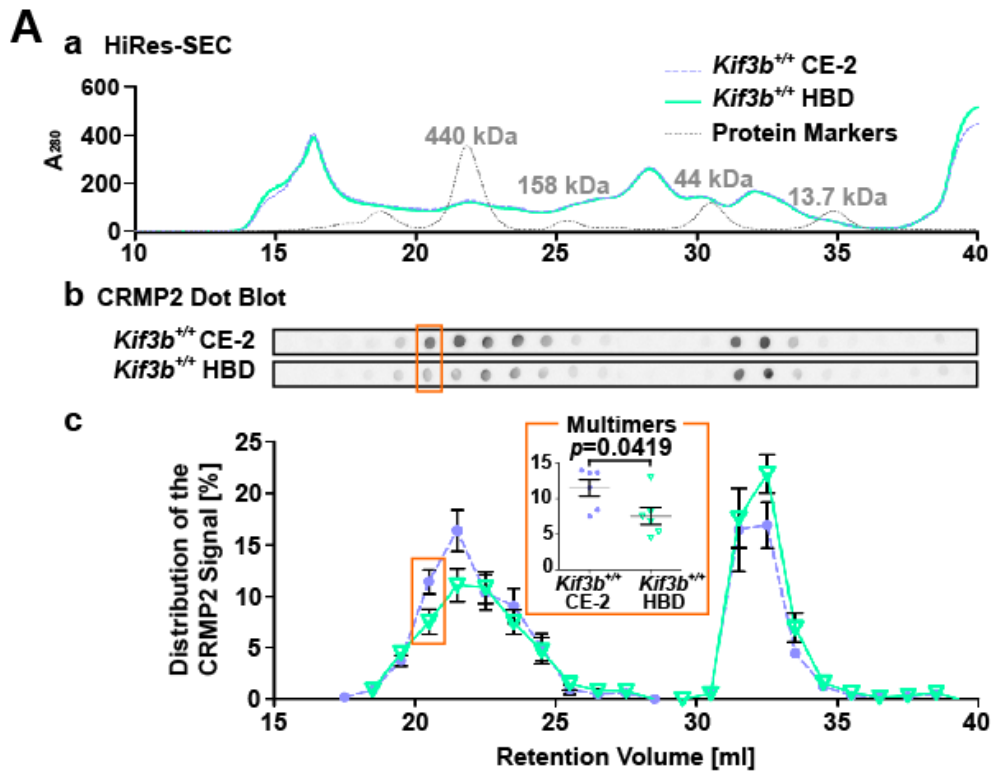
の距離の分岐点数の交互作用,  $F(9, 580) = 0.8148, p = 0.6027$ , Two-way ANOVA

( $n = 30$ )による。



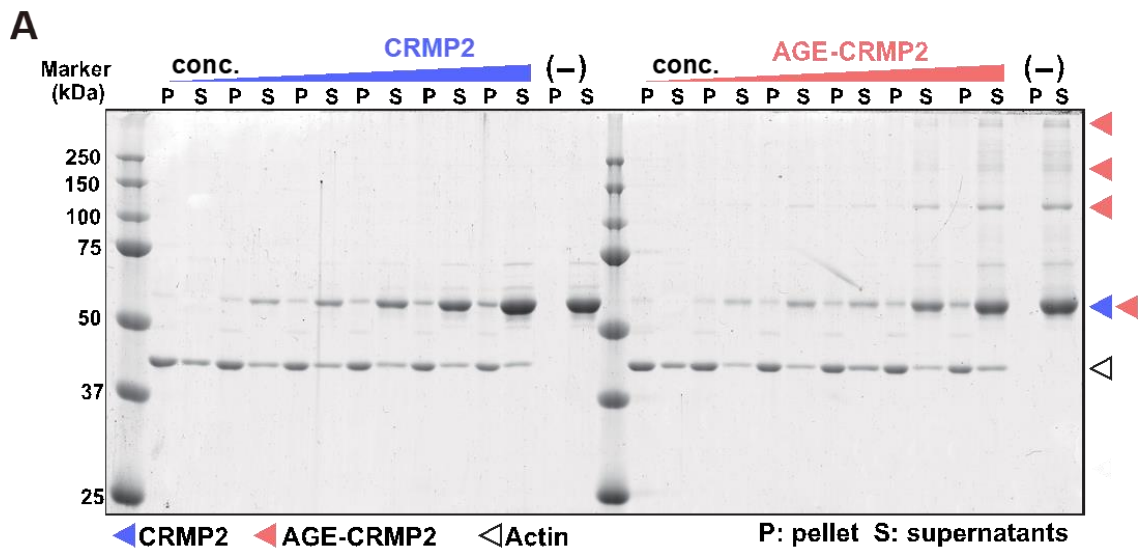
# 補足図 6. CRMP2 の生化学的解析 (図 16 に関連して)

(A-B) 各遺伝子型における DIV1 初代培養大脳皮質神経細胞の上清を用いた抗 CRMP2 抗体免疫ブロッティング(A)および統計解析 (B)。データは平均±標準誤差で表した。 $p = 0.06$ , ウェルチの t 検定 ( $n = 3$ )による。



補足図 7. 高ベタイン餌を投与した *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスにおける CRMP2 の多量体  
化の抑制

(A) CE-2 (青破線) または高ベタイン餌 (緑実線) を摂食した *Kif3b*<sup>+/+</sup>マウスの脳細胞質画分における CRMP2 サイズ分布の統計解析。(a) 高分解能サイズ排除クロマトグラフィー (HiRes-SEC) による溶出画分の A280 クロマトグラム。灰色の点線はタンパク質の分子量標準を示す。(b) 各画分の CRMP2 ドットプロット。(c) CRMP2 シグナルの相対的なドットプロット強度の統計解析。挿入図は、20-21ml における高カルボニル化画分の統計解析 (橙枠)。データは平均±標準誤差で表した。 $p = 0.0419$ 、ウェルチの t 検定( $n = 6$ )による。



補足図 8. アクチン共沈降アッセイ（図 17D に関連して）

(A) CRMP2 および AGE-CRMP2 の F-actin 共沈アッセイ。結果は SDS-PAGE のゲルの CBB 染色で表した。サンプルは  $100,000 \times g$ 、室温で 30 分間の超遠心分離を行い、分離した。