

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07590

研究課題名(和文) 自閉症リスク遺伝子ニューロリジン3のリン酸化部位の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the phosphorylation site of the autism-risk gene neuroligin 3

研究代表者

江川 純 (Egawa, Jun)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：80648527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：初代培養神経細胞を培養48時間後に固定し、特にNLGN3のS745リン酸化抗体で染色した神経細胞で軸索先端が強く染まっていた。培養神経細胞にKinase inhibitor (TAOK2i, TNiKi, CDKL5i, LRRKi, GAKi, AKTi, R048)添加したプレートにおいてDMSOのみ添加のコントロールに比して神経突起長、シナプス数が有意に減少していることを確認した。そのうちSGC-GAK-1は近年確立された非常に選択性の高い阻害剤であり、そのリン酸化阻害作用が特に神経発達に負の影響を与えるという結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、NLGN3の重要なリン酸化部位のS745におけるリン酸化シグナルが軸索先端が強いことおよび精神神経疾患に関連するKinase inhibitor添加プレートにおいて神経突起長、シナプス数が有意に減少していることを自動細胞イメージアナライザーを用いて確認した。本研究によりシナプス数を指標としたHCSが可能であることを示唆できたため、このパラメータを形態マルチパラメータ(神経細胞数、神経突起数・長・分岐数、シナプス数)に加えたうえで、ASDリスク遺伝子群の操作(過剰発現もしくは発現抑制)を加えた培養神経細胞の神経発達を計測することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Primary cultured neurons were fixed 48 hours after culture, and the axon tips were particularly strongly stained with NLGN3 S745 phosphorylated antibodies. In cultured neuron plates with Kinase inhibitors (TAOK2i, TNiKi, CDKL5i, LRRKi, GAKi, AKTi, R048), neurite length compared to the control with DMSO alone. Among them, SGC-GAK-1 is a highly selective inhibitor established in recent years, and the results show that its phosphorylation inhibitory action has a particularly negative effect on neurodevelopment.

研究分野：発達精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 初代培養神経細胞 High content screening NLGN3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Neurologin (NLGN) はシナプス後終末に局在し、シナプスの形成および機能獲得に関与すると考えられている。細胞外領域でシナプス前終末蛋白質の Neurexin と結合し、細胞内では足場蛋白質である PSD-95 と結合する。Neurexin はシナプス前終末の成熟やシナプス伝達物質の放出に作用し、PSD-95 は、Shank などと複合体を形成してシナプス後終末における神経伝達物質受容体の局在や機能調節に作用している。

ヒトでは 5 種類の NLGN のアイソフォームが存在し (NLGN1, 2, 3, 4X, 4Y) するが、NLGN3 および NLGN4X の 1 塩基変異がスウェーデンの X 伴性の自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorders; ASD) 家系から発見された (Jamain et al., 2003 Nat Genet)。また、この家系から発見された NLGN3 の 1 塩基変異 (Arg451Cys) ノックインマウス的大脑皮質では抑制性シナプス機能の亢進と同時に、行動学的に社会的相互作用の低下および空間学習記憶能力の増強が認められ、ASD に認められる機能喪失のみではなくサヴァン症候群のような機能獲得の表現型も認められる唯一の ASD モデルマウスとなっている (Tabuchi et al., 2007 Science)。また、NLGN3 遺伝子の異常を有する患者の多くは非症候群性であり、自閉症の主症状である社会的コミュニケーションの障害と限局された興味および行動以外の身体的異常を伴わず、NLGN3 モデルマウスも、シナプス機能以外に顕著な異常をきたさないことから、シナプス異常が ASD の病態の必要最低条件であり、シナプスにおける代表的なプレイヤーである NLGN3 はシナプス機能発達および ASD の病態解明の鍵として注目されている。

NLGN3 はポストシナプスにおける役割が強調され、機能解析が進められているが「未だにポストシナプスにおける細胞内シグナル伝達経路については不明な点が多い」。さらに連携研究者の五十嵐 (新潟大学分子細胞機能学教授) が行った「ラットの成長円錐 (軸索が伸長するときその先端に生じる構造物) のリン酸化プロテオミクスにおいて重要なリン酸化部位として NLGN3 の 745 番目のアミノ酸 Serine (S745) が同定され、このアミノ酸配列はヒトにも存在することから、軸索先端やプレシナプスにおいても役割を果たしている可能性が示唆された」。

2. 研究の目的

ポストシナプスにおける役割が強調されてきた従来の NLGN3 機能の理解を、ポストシナプスの細胞内シグナル伝達において最も重要な機構であるタンパクリン酸化に注目して機能解析することにより深め、成長円錐に同定された S745 リン酸化 NLGN3 の解析によりポストのみではなくプレシナプスや軸索での機能を明らかにすることにより広げ、ことが目的である。

本研究期間中は NLGN3 遺伝子の S745A の変異を加えた培養神経細胞のシナプス数の変化を確認しようと考えたが、これまでに High Content Screening (HCS) によるシナプス数カウントの実験系が確立していないため、その実験系の確立を試みた。

3. 研究の方法

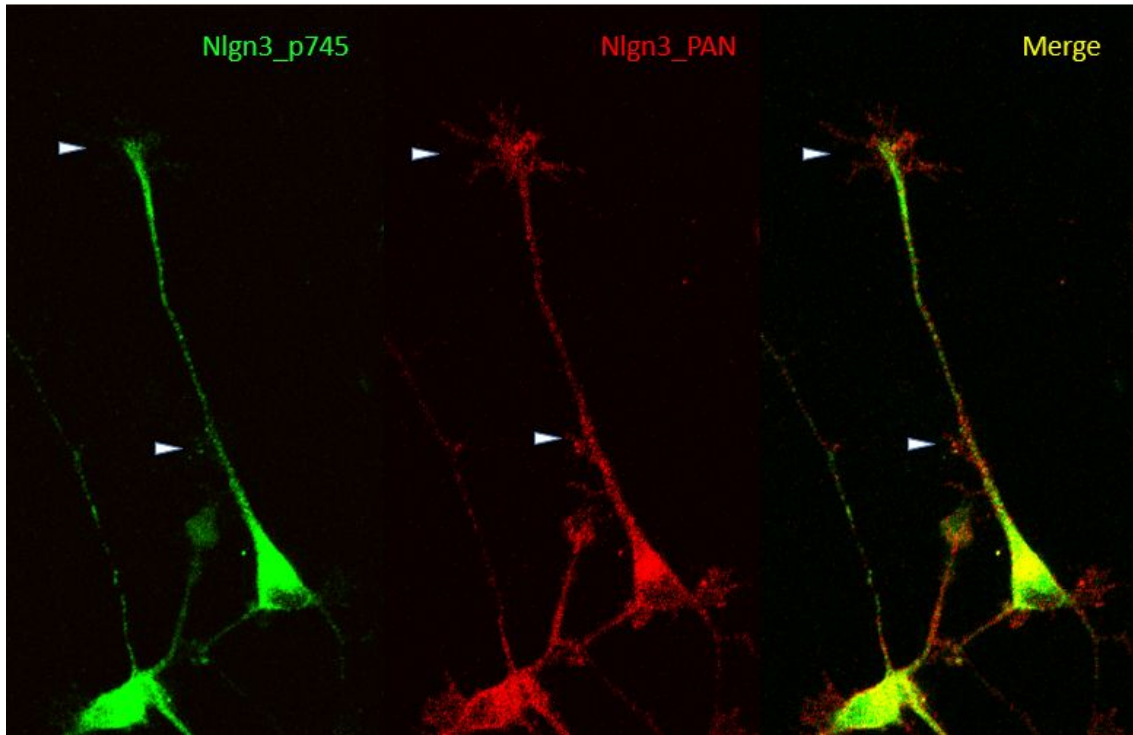
本研究に必要な NLGN3_S745 リン酸化部位特異抗体を作成し、抗原ペプチドによる抗体吸収試験によりその特異性を確認した。さらにラットの初代培養神経細胞を培養 48 時間後に固定し、NLGN3 抗体および NLGN3_S745 リン酸化抗体でそれぞれ免疫染色を行った。

NLGN3 遺伝子の S745A の変異を加えた培養神経細胞のシナプス数の変化を確認するために、High Content Screening を用いてシナプス数を自動的にカウントする実験系の確立を行った。シナプス発達および精神神経疾患に関連が報告されている Kinase (AKT, TNIK, DYRK1A, TAOK2, GAK) に注目し (Crino, 2015; Duchon and Herault, 2016; Baltussen et al., 2018)、計 5 種類の Kinase inhibitor (CP43, AKTi-1/2, Harmine, PF0626033, LRRK2IN-1, JH-II-127, MLi-2, GSK2578215A, SGC-GAK-1) をそれぞれ添加した。

NLGN3 遺伝子の S745A 変異導入したプラスミドベクターの作成を行い、培養神経細胞への導入を試みている。妊娠 18 週のラットの胎仔より海馬を摘出して、96 ウェルプレート上 (9,000cell/well) で培養した。1 週間培養後、シナプス発達および精神神経疾患に関連が報告されている Kinase (TAOK2i, TNIKi, CDKL5i, LRRKi, GAKi, AKTi, RO48) に注目し (Crino, 2015; Duchon and Herault, 2016; Baltussen et al., 2018)、それらの同一の Kinase に複数の inhibitor 候補がある LRRK2i (LRRK2-IN-1, JH-II-127, MLi-2, GSK2578215A の 4 種類) はそれらも添加した (表 1)。それらの化合物は 40, 20, 5, 1.25, 0.3125mM を添加後にさらに 1 週間培養し固定した。その後、プレシナプスマーカーに抗 Synaptophysin1 抗体、ポストシナプスマーカーに抗 SHANK2 抗体を用いてシナプスを染色した。HCS 機器 (ThermoFisher Cellomics ArrayScan VTI) を用いてプレシナプスとポストシナプスのシグナルが重なり合った点の数をカウントして、それを神経細胞数 (DAPI で染色カウント) で割った値をシナプス数の指標とした。

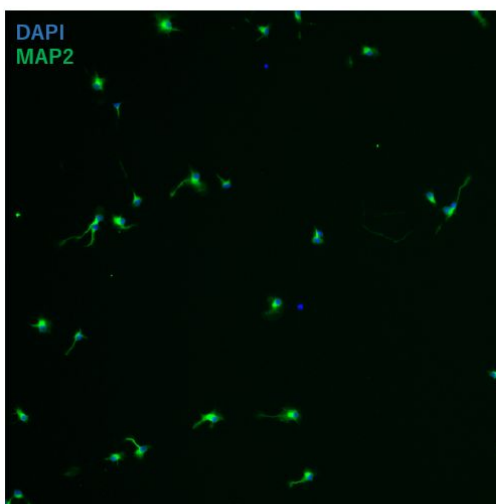
4. 研究成果

ラットの初代培養神経細胞を培養 48 時間後に固定し、特に S745 リン酸化抗体で染色した神経細胞で軸索先端が強く染まっていた(下図)。

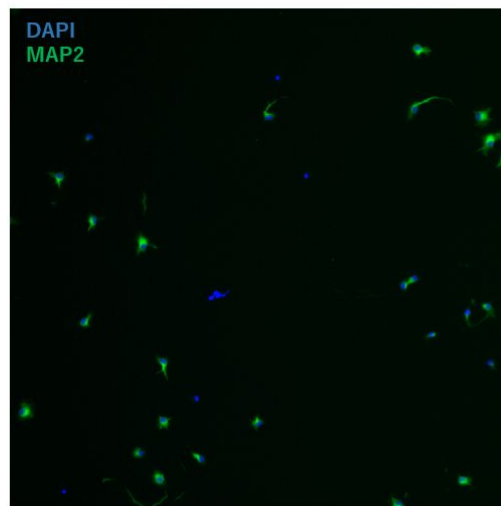


全ての Kinase inhibitor (TAOK2i, TNKi, CDKL5i, LRRKi, GAKi, AKTi, RO48)添加プレートにおいて(それぞれ n=6) DMSO のみ添加のコントロール(n=6)に比して神経突起長、シナプス数が有意に減少していることを確認した ($p < 0.05/8$, Bonferroni の補正)。そのうち SGC-GAK-1 は近年確立された非常に選択性の高い阻害剤であり(Asquith et al., 2019)、そのリン酸化阻害作用が特に神経発達に負の影響(神経突起長およびシナプス数の減少)を与えるという結果を得た。本結果は、NEURO2022(2022年7月)に演題採択され発表予定であるとともに論文投稿されている(Egawa et al., submitted)。本研究によりシナプス数を指標とした HCS が可能であることを示唆できたため、このパラメータを形態マルチパラメータ(神経細胞数、神経突起数・長・分岐数、シナプス数)に加えたうえで、ASD リスク遺伝子群の操作(過剰発現もしくは発現抑制)を加えた培養神経細胞の神経発達を計測することが可能である。

Analysis of neurite length of SGC-GAK-1 treated neurons

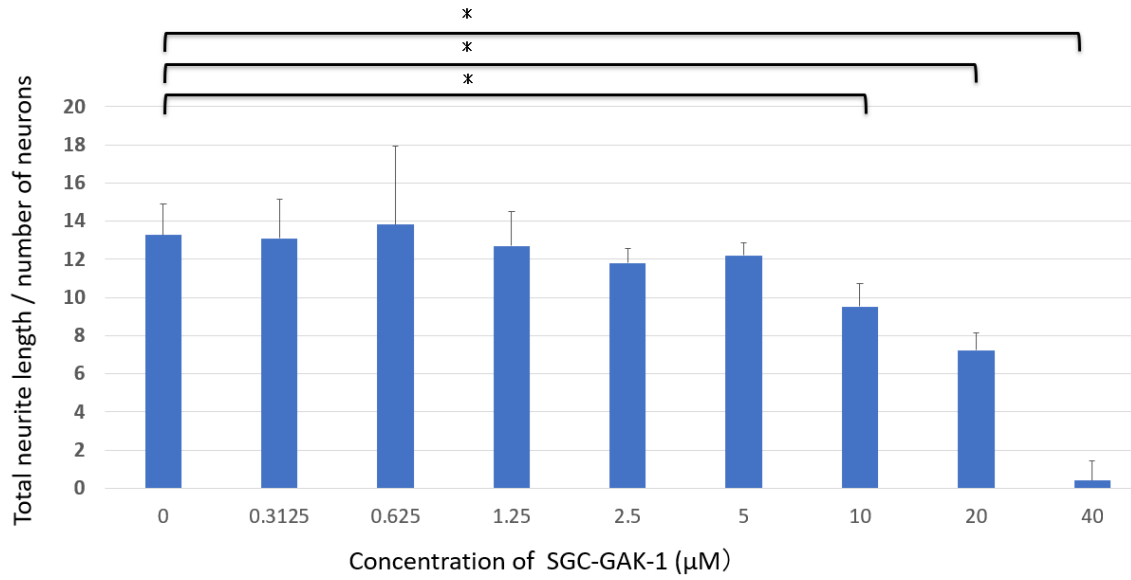


Control (DMSO only)

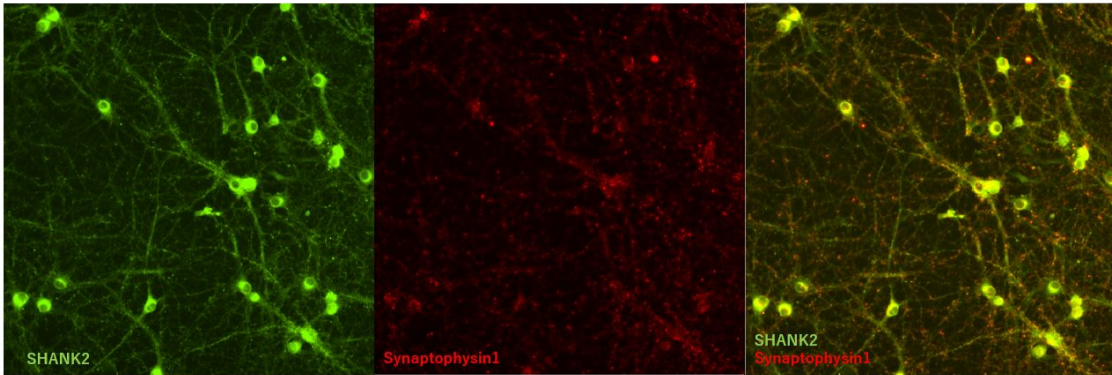


Treated with 10 μ M SGC-GAK-1

Analysis of neurite length of SGC-GAK-1 treated neurons

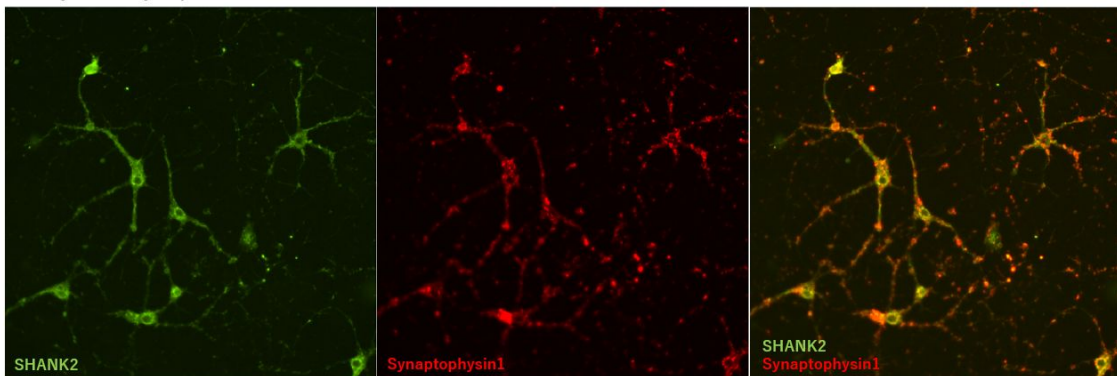


Analysis of synapse number of SGC-GAK-1 treated neurons



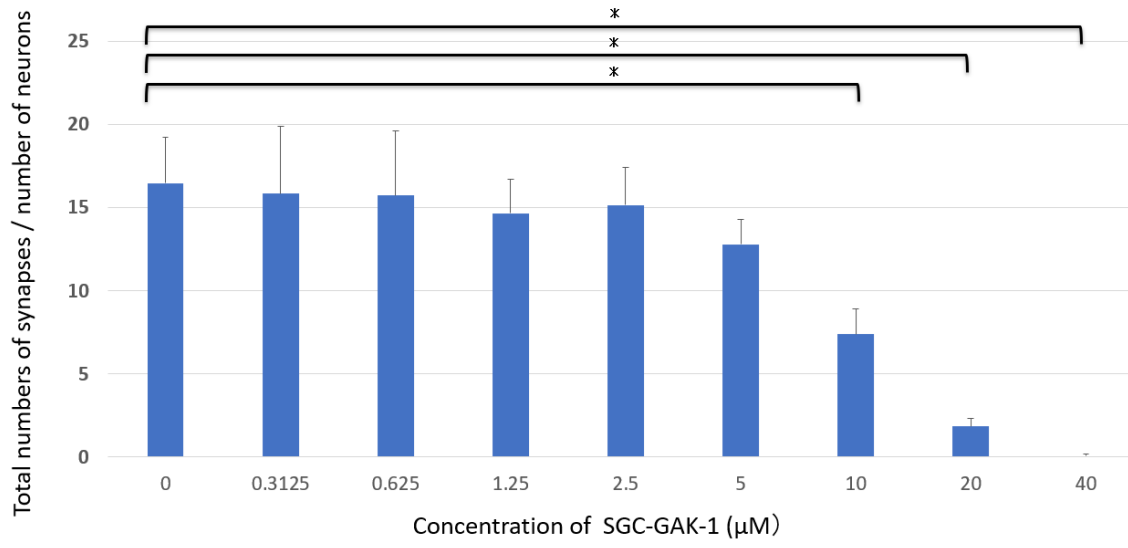
Control (DMSO only)

Analysis of synapse number of SGC-GAK-1 treated neurons



Treated with 10 μM SGC-GAK-1

Analysis of synapse number of SGC-GAK-1 treated neurons



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fukui Naoki, Motegi Takaharu, Watanabe Yuichiro, Hashijiri Koyo, Tsuboya Ryusuke, Ogawa Maki, Sugai Takuro, Egawa Jun, Enomoto Takayuki, Someya Toshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Exclusive Breastfeeding Is Not Associated with Maternal Infant Bonding in Early Postpartum, Considering Depression, Anxiety, and Parity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13041184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motegi Takaharu, Watanabe Yuichiro, Fukui Naoki, Ogawa Maki, Hashijiri Koyo, Tsuboya Ryusuke, Sugai Takuro, Egawa Jun, Araki Rie, Haino Kazufumi, Yamaguchi Masayuki, Nishijima Koji, Enomoto Takayuki, Someya Toshiyuki	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 <p>Depression, Anxiety and Primiparity are Negatively Associated with Mother?Infant Bonding in Japanese Mothers</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropsychiatric Disease and Treatment	6. 最初と最後の頁 3117 ~ 3122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S287036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa Maki, Watanabe Yuichiro, Motegi Takaharu, Fukui Naoki, Hashijiri Koyo, Tsuboya Ryusuke, Sugai Takuro, Egawa Jun, Araki Rie, Haino Kazufumi, Yamaguchi Masayuki, Nishijima Koji, Enomoto Takayuki, Someya Toshiyuki	4. 巻 Volume 17
2. 論文標題 Factor Structure and Measurement Invariance of the Hospital Anxiety and Depression Scale Across the Peripartum Period Among Pregnant Japanese Women	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuropsychiatric Disease and Treatment	6. 最初と最後の頁 221 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S294918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nawa Yoshihiro, Kimura Hiroki, Mori Daisuke, Kato Hidekazu, Toyama Miho, Furuta Sho, Yu Yanjie, Ishizuka Kanako, Kushima Itaru, Aleksic Branko, Arioka Yuko, Morikawa Mako, Okada Takashi, Inada Toshiya, Kaibuchi Kozo, Ikeda Masashi, Iwata Nakao, Suzuki Michio, Okahisa Yuko, Egawa Jun et al	4. 巻 7
2. 論文標題 Rare single-nucleotide DAB1 variants and their contribution to Schizophrenia and autism spectrum disorder susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-020-00125-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Hidekazu, Kushima Itaru, Mori Daisuke, Yoshimi Akira, Aleksic Branko, Nawa Yoshihiro, Toyama Miho, Furuta Sho, Yu Yanjie, Ishizuka Kanako, Kimura Hiroki, Arioka Yuko, Tsujimura Keita, Morikawa Mako, Okada Takashi, Inada Toshiya, Nakatochi Masahiro, Shinjo Keiko, Kondo Yutaka, Kaibuchi Kozo, Egawa Jun et al	4. 巻 10
2. 論文標題 Rare genetic variants in the gene encoding histone lysine demethylase 4C (KDM4C) and their contributions to susceptibility to schizophrenia and autism spectrum disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-01107-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishizuka Kanako, Yoshida Tomoyuki, Kawabata Takeshi, Imai Ayako, Mori Hisashi, Kimura Hiroki, Inada Toshiya, Okahisa Yuko, Egawa Jun, Usami Masahide, Kushima Itaru, Morikawa Mako, Okada Takashi, Ikeda Masashi, Branko Aleksic, Mori Daisuke, Someya Toshiyuki, Iwata Nakao, Ozaki Norio	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional characterization of rare NRXN1 variants identified in autism spectrum disorders and schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurodevelopmental Disorders	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s11689-020-09325-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Taketsugu, Akikawa Ryota, Kawasaki Keisuke, Egawa Jun, Minamimoto Takafumi, Kobayashi Kazuto, Kato Shigeki, Hori Yukiko, Nagai Yuji, Iijima Atsuhiko, Someya Toshiyuki, Hasegawa Isao	4. 巻 30
2. 論文標題 Macaques Exhibit Implicit Gaze Bias Anticipating Others' False-Belief-Driven Actions via Medial Prefrontal Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 4433 ~ 4444. e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igeta Hirofumi, Watanabe Yuichiro, Morikawa Ryo, Ikeda Masashi, Otsuka Ikuo, Hoya Satoshi, Koizumi Masataka, Egawa Jun, Hishimoto Akitoyo, Iwata Nakao, Someya Toshiyuki	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 <p>Rare compound heterozygous missense SPATA7 variations and risk of schizophrenia; whole-exome sequencing in a consanguineous family with affected siblings, follow-up sequencing and a case-control study</p>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychiatric Disease and Treatment	6. 最初と最後の頁 2353 ~ 2363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/NDT.S218773	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Motegi Takaharu, Fukui Naoki, Hashijiri Koyo, Tsuboya Ryusuke, Sugai Takuro, Egawa Jun, Mitome Setsuko, Araki Rie, Haino Kazufumi, Yamaguchi Masayuki, Takakuwa Koichi, Enomoto Takayuki, Someya Toshiyuki	4. 巻 73
2. 論文標題 Identifying the factor structure of the Mother to Infant Bonding Scale for post partum women and examining its consistency during pregnancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 661 ~ 662
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12920	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kushima I, Egawa J et al	4. 巻 24
2. 論文標題 Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2838 ~ 2856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.08.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yu Y, Egawa J et al	4. 巻 8
2. 論文標題 Rare loss of function mutations in N-methyl-d-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-017-0061-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kushima I, Egawa J et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Cross-Disorder Analysis of Genic and Regulatory Copy Number Variations in Bipolar Disorder, Schizophrenia, and Autism Spectrum Disorder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological Psychiatry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopsych.2022.04.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morikawa Ryo, Watanabe Yuichiro, Igeta Hirofumi, Arta Reza K., Ikeda Masashi, Okazaki Satoshi, Hoya Satoshi, Saito Takeo, Otsuka Ikuo, Egawa Jun, Tanifuji Takaki, Iwata Nakao, Someya Toshiyuki	4. 巻 310
2. 論文標題 Novel missense SETD1A variants in Japanese patients with schizophrenia: Resequencing and association analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Psychiatry Research	6. 最初と最後の頁 114481 ~ 114481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.psychres.2022.114481	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa Jun, Kawasaki Keisuke, Hayashi Taketsugu, Akikawa Ryota, Someya Toshiyuki, Hasegawa Isao	4. 巻 -
2. 論文標題 Theory of mind tested by implicit false belief: a simple and full fledged mental state attribution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16322	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 江川純, 五十嵐道弘, 染矢俊幸
2. 発表標題 自閉症リスク遺伝子NeuroLigin3の機能的リン酸化部位の機能解析.
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川純, 杉本篤言, 吉永清宏, 林剛丞, 染矢俊幸
2. 発表標題 拡散テンソル画像を用いた脳機能結合と自閉スペクトラム症との関連解析.
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川純, 五十嵐道弘, 染矢俊幸
2. 発表標題 : 自閉症リスク遺伝子NeuroLigin3の機能的リン酸化部位の機能解析
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川純, 杉本篤言, 吉永清宏, 林剛丞, 染矢俊幸
2. 発表標題 拡散テンソル画像を用いた脳機能結合と自閉スペクトラム症との関連解析
3. 学会等名 第115回日本精神神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sugimoto A, Suzuki Y, Yoshinaga K, Orime N, Hayashi T, Egawa J, Ono S, Sugai T, Someya T
2. 発表標題 Relationship between prefrontal cortex activity during task execution and ADHD symptoms of adult patients, and their changes by atomoxetine.
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hoya S, Igeta H, Watanabe Y, Nunokawa A, Inoue E, Shibuya M, Egawa J, Someya T:
2. 発表標題 Resequencing of the SETD1A gene in Japanese patients with schizophrenia
3. 学会等名 WFSBP Asia Pacific Regional Congress of Biological Psychiatry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Egawa J, Arta R, Igarashi M, Lemmon V, Bixby J, Barrero M, Shi Y, Someya T
2. 発表標題 Effects of GAK inhibition on Neurite Outgrowth and Synapse Formation
3. 学会等名 Neuro2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

LEMBIX LAB https://www.lembixlab.net/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	五十嵐 道弘 (Igarashi Michihiro) (50193173)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------