

平成22年5月28日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19300133
 研究課題名（和文） 自閉症モデル動物としてのシntaxin1遺伝子ノックアウトマウスの解析
 研究課題名（英文） Analysis of syntaxin 1 gene knockout mice as an animal model for autistic disorder

研究代表者
 赤川 公朗（AKAGAWA KIMIO）
 杏林大学・医学部・教授
 研究者番号：80129303

研究成果の概要（和文）：シナプスの伝達を制御するシntaxin1Aとシntaxin1Bの遺伝子ノックアウトマウスを作製し、両者の神経系における表現系を解析した。その結果、シntaxin1Aはモノアミン性神経伝達を行うシナプスで機能している因子であるのに対して、シntaxin1Bは主としてグルタミン酸性の速い神経伝達をするシナプスで働くことが示唆された。これは両者が同等の機能を有するという従来の常識を覆す新しい知見であった。

研究成果の概要（英文）： It was suggested by studying syntaxin1A(sy1A) or syntaxin1B(sy1B) gene knockout mice that sy1A and sy1B function in monoaminergic and mainly in glutamatergic fast transmission respectively. These findings overturned the usual thought that sy1A and sy1B played similar roles in synaptic function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,700,000	1,410,000	6,500,000
2008年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,690,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：シナプス伝達、シntaxin1A、シntaxin1B、ノックアウトマウス、自閉性障害、疾患モデル動物、シナプス機能分化

1. 研究開始当初の背景

7番染色体の半接合体微小欠損を有するWilliams症候群(WS)では一部の自閉性疾患様の情動行動異常を示し、その欠損領域にsyntaxin1A(sy1A)遺伝子が局在する。当初WSの精神神経症状を再現するモデルマウスと

して syx1A 遺伝子単独ノックアウトマウス(null mutant、以下 K0)を作成したところ、(J.Neurosci., 2006) グルタミン酸性及びGABA性シナプス伝達は正常と考えられた。これは mammal では sy1A と同じ生理機能を持つと信じられているアイソフォームである

syntaxin1B(sy1B)によりシナプス伝達機能が代償されていることを推測させた。情動行動の観点からは null にはヒトの自閉性障害と類似した情動行動の異常反応が出現した。これらの結果を合わせて勘案すると、sy1A 遺伝子欠失が自閉症様異常行動の発現と密接に関連していて、sy1AKO が自閉性障害の動物モデルとして考えられた。そこで syx1A 及びそれと同等の機能を持つと予想されている sy1B との合計遺伝子量の減少が自閉症様の情動行動異常を惹起する可能性が推測され、本研究が着想されるに至った。

2. 研究の目的

既存の sy1AKO の神経機能の詳細な解析を行うと共に新たに sy1B 遺伝子のノックアウトマウスを作製する。次に sy1AKO を利用して、両 mutant 間の交配による syx1A と syx1B 遺伝子について両者の合計遺伝子量が異なるマウス (遺伝子量 0-4 個) を作成する。各々のマウスについて致死性の有無、生育する場合のシナプス機能や神経可塑性、更には個体レベルでの学習行動や情動行動とその異常特性を調べる。その結果に基づいて syx1B が syx1A と同等の機能を有するか、或いはこれらの合計遺伝子量の変化が致死性の有無、シナプス伝達、高次神経機能、行動等に与える影響等を調べる。更には機能性精神疾患である自閉性障害に見られる行動異常との比較を行い、これらのマウスが自閉性障害のモデルマウスとなるか検討する。

3. 研究の方法

(1) syntaxin1B ノックアウトマウスの作成
ノックアウトマウス用のターゲティングベクターを ES 細胞にトランスフェクションし、相同組み換えで syx1B 遺伝子を欠損した細胞を作る。この ES 細胞をマウス胚に注入し、仮親に移植してキメラマウスを作成する。このマウスの交配により heterozygote (hetero) マウスを得る。その交配により syntaxin1B 遺伝子ノックアウトマウス (null mutant、以下 syx1BK0) を得る。その後、sy1A、1B 両 mutant の hetero、null を交配して sy1A、1B 両遺伝子の組み合わせによる両者の合計遺伝子量が異なったマウス (合計遺伝子数 0

-4 個) を得る。これらの遺伝子組み合わせで致死性の有無を検討しておく。生存可能である場合は、これらの合計遺伝子量の異なる各マウスについて以下に記す実験を行う。

(2) 各マウスより得た培養神経細胞におけるシナプス伝達機能の解析

新生仔マウスの脳海馬より得た神経細胞を培養する。近接した 2 つの神経細胞から同時にホールセル記録を行い、一方をシナプス前細胞として電気刺激し、他方から誘発性シナプス後電流を観察する。適当なアンタゴニスト存在下でグルタミン酸 (Glu)、又は GABA 作動性シナプスについての刺激頻度とシナプス応答との相関、paired pulse ratio、自発性微小シナプ後電流、誘発性シナプス後電流の振幅や頻度等の基本的なシナプス伝達の性状を検討する。

(3) 海馬スライスにおける解析

マウス海馬切片を環流下に刺激電極でシャプアー側枝を刺激し、CA1 錐体細胞層のシナプス応答を細胞外誘導により記録する。刺激応答性、高頻度刺激による長期増強の誘導、刺激前後における paired pulse ratio 等の性状を検討する。

(4) 潜在制止試験

これは情動行動試験の 1 つである。恐怖条件付け記憶試験で潜在制止を調べる場合、マウスに対し音の条件刺激 (CS) のみを数日間、前負荷を繰り返した後、CS-無条件刺激 (電気刺激 UCS) の pairing 刺激を与える。正常マウスでは音刺激を予め提示した後 CS-UCS の pairing を行うと、CS 単独による“すくみ反応”が減少することが知られている。CS 前負荷により“すくみ反応”が減少した比率 (潜在制止) を求める。

(5) 脳内微小還流法 (in vivo microdialysis) によるモノアミン分泌の測定

マウス海馬、視床下部、あるいは線条体内にプローブを刺入・固定し、HPLC に接続する。これを介して脳内に試料液を導入・還流する。還流液を HPLC で分離した後、電気化学的検出器 (ECD) により 5HT (セロトニン)、ドーパミン、ノルアドレナリの量を測定する。各モノアミントランスポーターの特異的阻害剤投与、或いは高カリウム刺激を行った際のモノアミン類の分泌量を測定することにより脳内各部

位における分泌障害の有無を確認する。

4. 研究成果

(1) sy1A ノックアウトマウスの高次神経系の詳細な解析

①sy1AKOにおける行動異常と遺伝子欠損

sy1AKO は全く正常に生育し、培養神経細胞を用いた電気生理学的解析からグルタミン酸 (Glu)、GABA 性の速い神経伝達は正常であることが報告されていた。しかもこのマウスには人間の自閉性障害に類似した情動行動の異常が観察されていたが、社会性行動試験、潜在制止試験、新規物体探索試験等の情動行動試験を新たに詳細に行うと hetero、K0 の順に sy1A 遺伝子量の低下に伴って異常行動反応が増強された。それ故、これらの異常行動は sy1A 遺伝子量の低下並びに欠失に起因することが明らかとなった。従って Williams 症候群患者における軽度の自閉性障害様の情動行動異常は sy1A 遺伝子の半接合体欠損によることが強く示唆された。

②モノアミン分泌障害

視床下部、線条体スライスを用いたモノアミン分泌実験や脳内微小還流法等の実験により sy1AKO の中枢神経には 5HT、ドーパミン、ノルアドレナリン等の広範なモノアミン性神経系の分泌障害があることが示された。さらに向精神薬であるセロトニン選択的阻害剤 (SSRI) 及び 5HT 受容体アゴニスト、アンタゴニスト等の投与が上記の異常情動行動発現に及ぼす効果に基づいて、この情動行動異常は主に 5HT 性神経系の分泌障害によることが明らかとなった。またこのマウスでは人間の自閉性障害や WS に見られる症状に類似した痛覚過敏が認められた。視床下部スライスを用いた分泌実験からは CRH 分泌の低下も認められた。これらの結果から sy1A は従来信じられていたように全てのシナプス伝達の必須因子というよりは、主にモノアミン性やペプチド性シナプス等の遅い伝達物質放出過程に働いており、それを介して神経機能を維持・修飾する因子であることが強く示唆された。

(2) Syntaxin1B ノックアウトマウスの神経系における表現系

①sy1BKO の運動障害と致死性

sy1BKO には生下時より明らかに運動障害が認められ、生後一週には立ち直り反射が強く障害されていた。hetero は易痙攣性を有するものの生存可能であったが、K0 は生後二週程で致死となった。この様に本研究で作成された sy1BKO の表現系は予想に反して sy1AKO とは全く異なっていた。これは sy1A と sy1B がシナプスにおいてかなり異なる機能を果たしていることを推測させた。従って当初の実験目的であった「sy1BKO と sy1AKO がほぼ同等の機能を有するという条件の下で、sy1BKO を sy1AKO と同様の自閉性障害の新たなモデルとして考えて、両者の合計遺伝子量による行動異常の解析を行う」ことは適当でないことが明らかとなった。また両遺伝子のダブルノックアウトマウスは胎生期致死であった。

②sy1BKO 中枢神経系の形態的異常と神経細胞の脆弱性

形態学的には生下時の sy1BKO 脳内には神経細胞の脱落と海馬、小脳等の発達障害が見られた。培養神経細胞系では sy1BKO より得た神経細胞の生存には明らかな脆弱性が認められたが、正常マウスより得たグリア細胞のフィーダー上では正常に生存することが確認された。通常 Sy1B は神経細胞に比較して少量ながらグリア細胞にも発現がみられるが、今のところその生理的な意味はわかっていない。しかしこの結果は神経細胞だけでなくグリア細胞でも何らかの神経細胞の維持機能が障害されていて、これが生体内での神経細胞の脱落の原因の 1 つである可能性を推測させた。電子顕微鏡的観察により海馬や小脳内のシナプス内では active zone 近傍の docked vesicle 数が減少していることが認められた。

③電気生理学的解析

培養細胞系での解析により Glu 性シナプスにおける微小興奮性シナプス後電流の頻度が有意に低下していることが明らかとなった。また生後 10 日の海馬スライスを使った解析で CA 1 神経細胞の刺激応答性や paired pulse ratio に異常があった。これらの結果から sy1BKO には Glu 性神経伝達に障害があることが示された。GABA 性シナプスでは微小抑制性シナプス後電流の頻度が低下していたにも拘らず誘発性抑制性シナプス後電流

(Evoked IPSC) は正常であった。上記②の docked vesicle の減少とこれらの電気生理学的な異常の間には密接な関連があると推測されるが、詳細はまだ不明である。またこれらの電気生理学的解析で認められた異常は sy1AKO には全く観察されない所見であった。

④情動行動異常

Hetero の個体には潜在制止試験で行動異常が観察されたが、これと Glu、GABA 性神経伝達の異常との関連は不明である。

(3) HPC-1/syntaxin1A と syntaxin1B の機能分化

現時点で判明した Sy1AKO 及び sy1BKO の神経系に見られる異常の比較結果を表 1 に記した。表から明らかなように sy1A と sy1B のシナプスにおける機能は明らかに異なると考えられ、sy1A が主にモノアミン等の遅い神経伝達を行うシナプスで働くのに対して、sy1B は主に Glu 性、GABA 性の速いシナプス機能に重要であることが示唆された。しかし Sy1BKO については不明の点も多く更に詳細な検討が必要とされた。

表 1 sy1AKO と sy1BKO の神経系に見られる異常の比較

	致死性	中枢神経 形態的異常	情動行動 異常
Sy1AKO	—	—	+
Sy1BKO	+	+	+
	(生後 2 週)		(hetero)
	モノアミン 性伝達異常	Glu 性 伝達異常	GABA 性 伝達異常
Sy1AKO	+	—	—
Sy1BKO	?	+	+(?)

(Hetero:heterozygote mice に見られる結果)

(4) 研究の位置づけと今後の展望

これらの結果は syntaxin1B ノックアウトマ

ウスを新たな自閉症モデルマウスとして考えることはできないことを意味しており、本研究の当初の研究目的とは異なる結論が得られることとなった。しかし従来、sy1A と sy1B が同等の機能を有すると信じられてきた常識を覆す新たな知見を提示することとなり、その意味で本研究はシナプス機能の解析の観点から有意義な進展をもたらしたと考えられる。現時点でこのような sy1A と sy1B の機能の違いが、シナプス小胞の違い、即ち遅い神経伝達を仲介する dense-core vesicle 或いは速い神経伝達で働く plain synaptic vesicle という形態的な違いに対応するか否かについては明らかではない。今後、この疑問に答えるために両者の KO の神経系内で、本研究で検討されたモノアミン性、Glu 性、或いは GABA 性シナプス以外のシナプスの機能がどう変動しているか詳細な検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems.

T. Fujiwara, M. Sanada, T. Kofuji,
T. Yoshikawa & K. Akagawa
Eur. J. Neurosci. (in press) 査読有

② Calcium loading capacity and Ca²⁺ buffering capacity of mitochondria after oxygen-glucose deprivation in hippocampal neurons. 査読有 K. Tanaka, T. Iijima,

T. Mishima & K. Akagawa
Neurochem. Res. Vol. 34 (2009) 221-226

③ The syntaxin 5 isoforms Syx5 and Syx5L have distinct effects on the processing of β-amyloid precursor protein. K. Suga,
A. Saito, T. Tomiyama, H. Mori & K. Akagawa
査読有 J. Biochem. Vol. 146 (2009) 905-915

④ Transient silencing of synaptic transmitter release from specific neuronal types by recombinant tetanus toxin light chain fused to antibody variable region T. Kobayashi, N. Kai,

K. Kobayashi, T. Fujiwara, K. Akagawa,
M. Onda, and K. Kobayashi 査読有
J. Neurosci. Methods vol.175 (2008)
125-132

⑤ Morphological changes in mitochondria
in an ischemic preconditioned model.

T. Iijima, K. Tanaka, S. Matsubara,
T. Mishima & K. Akagawa 査読有
Neurosci. Lett. vol. 448 (2008) 268-272

[学会発表] (計 14 件)

① T. Fujiwara
Genetic analysis of syntaxin 1 function.
36th International Union of Physiological
Science, Kyoto, July 27 2009.

② T. Fujiwara
Phenotype analysis of syntaxin1B
knockout mice. 第 32 回日本神経科学大会
名古屋 平成 21 年 9 月 16 日.

③ 三嶋竜弥
HPC-1/syntaxin1A ノックアウトマウスの LTP
異常における cAMP 情報伝達系の関与.
第 32 回日本神経科学大会、名古屋、平成 21
年 9 月 16 日.

④ 小藤 剛史 HPC-1/syntaxin 1A ノッ
クアウトマウスにおける HPA-axis の障害.
第 51 回日本神経化学学会大会、富山、平成 20
年 9 月 11 日.

⑤ T. Fujiwara
Deletion of HPC-1/syntaxin1A gene causes
autistic behavior in mice.
第 30 回神経科学学会大会 横浜、平成 19 年 9
月 10 日.

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤川 公朗 (AKAGAWA KIMIO)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：80129303

(2) 研究分担者

藤原 智徳 (FUJIWARA TOMONORI)

杏林大学・医学部・講師
研究者番号：90255399

(H19→H20; 連携研究者)

須賀 圭 (SUGA KEI)

杏林大学・医学部・助教
研究者番号：30306675

(H19→H20; 連携研究者)

三島 竜也 (MISHIMA TATSUYA)

杏林大学・医学部・助教

(H19→H20; 連携研究者)

小藤 剛史 (KOFUJI TAKEFUMI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40365200

(H19→H20; 連携研究者)

真田 ますみ (SANADA MASUMI)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：70424108

(H19→H20; 連携研究者)

斎藤 綾子 (SAITOU AYAKO)

杏林大学・医学部・実験助手

研究者番号：80424109

(H19→H20; 連携研究者)

(3) 連携研究者

(上記)