

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21700377

研究課題名（和文）Foxp2 が制御するマウス超音波音声機能および行動機能に関する研究

研究課題名（英文）The regulation of mouse ultrasonic vocalization and behavior by Foxp2.

研究代表者

神保 恵理子 (ERIKO JIMBO)

自治医科大学 医学部・講師

研究者番号：20291651

研究成果の概要（和文）：ヒト言語障害変異に対応する変異 Foxp2 (R552H)-ノックイン(KI)ホモマウスはプルキンエ細胞の発達異常とシナプス形成不全に関連する運動性障害を有する。本研究は Foxp2 (R552H)-KI を用いて、USV(言語)障害の原因を探索する。また、小脳プルキンエ細胞に特異的に MycTag をつけた正常 Foxp2 [Foxp2-トランスジェニック (Tg) マウス] を Foxp2 (R552H)-KI ホモマウスのプルキンエ細胞に発現させ、言語障害、発育障害、運動障害、致死の回復を調べることで、小脳機能および機能相互間の関係を明らかにする。Foxp2 (R552H)-KI マウスと Foxp2-Tg マウスと交配させたハイブリッドマウス、正常マウス、Foxp2 (R552H)-KI マウスについてハイブリッドマウスの USV、行動機能、致死の回避などを解析した。その結果、ホモマウスは、親マウスから乳をもらえないことによる餓死を防ぐことはできなかったものの、USV 障害についてはヘテロマウスおよびホモマウスで USV の回復が認められた。

研究成果の概要（英文）：The R553H mutation has been found in the FOXP2 gene of patients with speech-language disorder. Foxp2(R552H) knock-in (KI) mice exhibit impaired ultrasonic vocalization (USV), which is related to human speech and language, and abnormal Purkinje cell development. To clarify the relationship between Foxp2 function in Purkinje cells and USV, we prepared transgenic (Tg) mice that express Foxp2-myc in Purkinje cells. Foxp2 expression in the cerebellum of heterozygous Foxp2 (R552H)-KI {Foxp2 (R552H)-KI-Pcp2-FOXP2-myc-Tg} mice improved USVs and increased whistle-like sounds. Foxp2 expression promoted dendrite formation in Purkinje cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1300000	390000	1690000
2010 年度	1100000	330000	1430000
2011 年度	900000	270000	1170000
年度			
年度			
総計	3300000	990000	4290000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) Foxp2 (2)超音波音声 (3)マウス (4)脳 (5)言語障害

1. 研究開始当初の背景

言語障害家系 KE ファミリーの患者は

FOXP2(R553H)の変異をもち、会話以外にも、語彙の記憶、言語の理解、文法の理解に障害がある(Lai CS et al., Nature, 2001)、また別の家系でも FOXP2(R327X)の変異が観察されたことや、進化過程でFOXP2は保存されていることから、言語獲得とFOXP2との関係が注目されている(Enard W et al., Nature, 2002)。また、ヒト言語の獲得訓練中、季節ごとの求愛行動を示すカナリア、フィンチでは線条体に対応する領域でFoxp2の発現パターンが変動する(Haesler S et al., J. Neurosci., 2004)。Foxp2機能を介するヒト言語機能の一部は動物種で共有されていることが示唆されている。仔マウスは超音波領域(Ultrasonic Vocalization; USV)で母親とコミュニケーションをとる(Branchi I et al., Behav. Brain Res., 2001)。マウスFoxp2は、ヒトFoxp2との相違が少なく、ポリグルタミンのグルタミン残基が1つ少ない他、アミノ酸置換が2箇所存在する。ヒト言語障害変異に対応する変異Foxp2(R552H)ノックイン(KI)マウスは小脳発達障害を示し、生後1週間以内は異常を示さないが、その後USV障害と行動障害を示し、母親の育児放棄により授乳されず、生後3-4週間で餓死する(Fujita E et al., PNAS, 2008)。このようにFoxp2のフォークヘッド領域が持つ転写制御機構はヒト言語とマウスUSVに関与しており、脳における共通の分子機構の基盤を形成している。

ヒト自閉性障害は言語障害を伴う social communication 異常を呈する。自閉性障害患者の3%がシナプス接着タンパク Neuroigin-3, -4の変異を持つ。また申請者が、自閉性患者(米国自閉症協会)の中に発見したシナプス接着タンパク RA175/SynCAM1(CADM1)遺伝子のH246N、Y251Sの変異が発見され、家族にも同様な変異が確認された(Zhiling Y, Fujita E (First authors) et al., 2008)。自閉症の原因遺伝子である Neuroigin-4 欠損マウス(Jamain S et al. PNAS, 2008)はFoxp2(R552H)KIマウス(Fujita E et al., PNAS, 2008)と同様とUSV Social Communicationの異常を示した。このことから、自閉性障害にみられるシナプス機能障害を原因とする言語障害とFoxp2変異(R552H)がもたらすUSV障害は密接な関連が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

ヒトの言語能力獲得に必要な脳域としてBroca領域(言語領域)特定されている。しかし、ヒト言語獲得の分子機構は不明である。

その解明には、非侵襲的な方法による解析とともに分子生物学、生理学アプローチを基礎とした神経回路の解析および言語障害の病因の解析を基盤とした分子機構の解析が必要であり、ヒト以外の動物実験系が必須である。

言語障害症(Speech-language disorder)は転写因子FOXP2の変異を原因としている。これまで申請者はヒト言語障害の変異遺伝子FOXP2(R553H)に対応したマウスFoxp2(R552H)を導入したマウスモデル[Foxp2(R552H)-ノックイン(KI)マウス]を作成した。動物はヒトと同様な言語を持たないものの、マウスは言語に類似したUSVでのコミュニケーション能力を有している。これまでFoxp2(R552H)-KIマウスの解析を通して、マウスUSVとヒト言語が脳で共通の分子機構をもつことを明らかにしてきた(Fujita E et al., PNAS, 2008)。しかし、ホモFoxp2(R552H)-KI仔マウスはUSV障害による母仔コミュニケーション障害とともに、小脳発達障害による行動障害をとらない、生後約3週で死に至る。ヒト言語障害患者は全てヘテロであり、ホモが致死に至ることはいまままで不明であった。

本研究はヒト言語障害遺伝子変異を導入したFoxp2(R552H)-KIマウスの機能障害の解析を基盤として、USV(言語)能力獲得に必要な分子機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

129/sv系統のWild-type、Foxp2(R552H)-KIマウスを使用した。マウスの解析には全てオスを使用した。

### (2) 細胞

培養細胞はCOS細胞を使用した。COS細胞は培養液[10%牛胎児血清を含んだ $\alpha$ -MEM培養液(Minimum Essential Medium)]を4mlを加え5.0%CO<sub>2</sub>、37°Cの条件下で培養した。

### (3) 小脳抽出液の調整

マウス発達過程の小脳を用いて、核分画と細胞質分画を調整した。組織(5検体)をその質量の3倍量の細胞質抽出バッファー[10 mM HEPES (pH 7.6), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL CA630, protease inhibitors]でシリンジを用いてホモジナイズし、氷上に30分間置いた後、遠心(12000rpm, 30分間)し、その上清を細胞質分画とした。ペレットは細胞質抽出バッファーと等量の核抽出バッファー[20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol,

protease inhibitors]で再度懸たくし、氷上に30分間放置後、遠心(12,000rpm, 4°C, 30分間)し、その上清を核分画とした。得られた抽出物はタンパク定量後 SDS-PAGE 電気泳動により分離した。

#### (4) イムノブロット

10%アクリルアミドゲルにて電気泳動(SDS-PAGE)を行った後、ニトロセルロースフィルターに転写した。フィルターは、ブロッキング緩衝液(0.1% TritonX-100, 0.5% スキムミルクを含むPBS溶液)によりブロッキングし、同溶液で希釈した1次抗体溶液と反応(4°C)させた。3回洗浄後、2次抗体反応を行った後、0.1% TritonX-100を含むPBS溶液で3回洗浄した。バンドの検出はアルカリホスファターゼ反応により行った。フィルターと発色液[100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 10 ml に対し発色基質 50 μg/ml NBT), 50 μg/ml BCIP を各 8 μl 加えた溶液]を反応させ、発色が見られた後、蒸留水により洗浄し、反応を停止させた。

#### 2-5. RT-PCR

##### (5) mRNA の調整

マウス(P10)の小脳から Qiagen RNeasy Mini kit を用いて Total RNA を抽出した。Agilent 社製 60 mer カタログオリゴ DNA マイクロアレイ Whole Mouse Genome 4x44K v2 を用いたマイクロアレイを行った。

##### (6) 細胞、組織染色法

COS 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定した。マウス発達過程 (E17, P0, P1, P2, P4, P10, P22) を 4% パラホルムアルデヒド/PBS により灌流固定を行った。その後脳を摘出し、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS に浸した後、30%スクロースを含む PBS に置換した。組織を凍結組織包埋剤である OCT コンパウンドに包埋した。さらに包埋したブロックをクリオスタット (CM3000, Leica) により厚さ 10 μm で薄切しスライドガラスに貼りつけ、免疫染色に使用した。

固定細胞および凍結薄切片を PBS に浸し OCT コンパウンドを洗い流した後、ブロッキング緩衝液に 30 分間反応させ、1 次抗体を反応(4°C、一晚)させた。1 次抗体はヤギ anti-Foxp2N (Santa Cruz)、ウサギ anti-Foxp2C (Abcam)、ウサギ anti-CNTNAP2 (Abcam)、マウス anti-calbindin (Sigma)、ヤギ anti-CTBP (Santa Cruz) を使用した。マウス、ウサギおよびヤギに対する二次抗体として Alexa488, 596 イムノグロブリン抗体を用い、核染色には Hoechst33346 を用いた。観察は蛍光顕微鏡 (AF6000, Leica) で行った。

#### (7) Foxp2 に結合する蛋白の解析法

Foxp2-MycTag (cerebellumTg) マウス小脳で Foxp2-Myc と結合している内在性タンパクを固定化した myc 抗体のカラムを用いて分離した。

#### (8) USV 測定法

生後 10 日目の仔マウスを授乳している母マウスから離し、UltraSound Gate 116 detector set (Avisoft Bioacoustic) を用いて、40-100 kHz の音域を測定した。仔マウスをチャンバーに入れ、1 分後、3 分間の音を測定した。

#### (9) マウスの行動解析および生理学的解析

Foxp2 (R552H)-KI マウスを 129SV 系統から C57BL/6J 系統に 10 代継代した。このマウスを用いて、行動解析および生理学的解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) Foxp2 (R552H)-KI マウスおよび正常マウス脳で発現する遺伝子について解析し、Foxp2 が制御する USV(言語)関連遺伝子の候補を 5 つ見出し、関連遺伝子の確認に免疫染色、プルダウン解析、免疫沈降などの生化学的、細胞分子生物学的手法を用いて行なった。そして、候補遺伝子の 1 つである CNTNAP2 の mRNA が Foxp2 (R552H)-KI マウスで増加していることが明らかとなった(図)。Foxp2 は Foxp family 以外にも、CtBP などの Co-repressor と複合体を形成している。小脳プルキンエ細胞の CTBP に関与していることが示唆された。

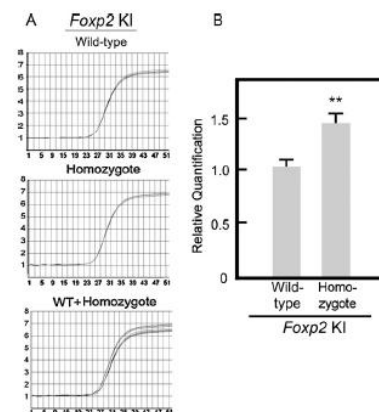


図. リアルタイム PCR 法による Foxp2 (R552H)-KI マウスにおける CNTNAP2 の発現の変化

(2) 小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させる Pcp/L7 プロモーターを用い MycTag を付加した正常 Foxp2 を発現させたトランスジェニックマウス (Tg) マウスを用いて、小脳プルキンエ細胞で Foxp2 により制御する遺伝子の解析を行ない、数種の候補遺伝子を得た。

(3) C57BL/6J への 10 世代までバッククロス

行なった Foxp2 (R552H)-KI マウスと Foxp2-Tg マウスと交配させたハイブリッドマウス、正常マウス、Foxp2 (R552H)-KI マウスについてハイブリッドマウスの USV、行動機能、致死の回避などを解析した。その結果、ホモ仔マウスは、親マウスから乳をもらえないことによる餓死を防ぐことはできなかったものの、USV 障害についてはヘテロマウスおよびホモマウスで USV の回復が認められた。さらに小脳プルキンエ細胞の発達とデンドライト形成について、カルビンジエン、シナプトフィシン、受容体の抗体を用いて、免疫染色解析を行ったところ、小脳発達不全についても回復傾向を示した。

(4) Foxp2 (R552H) KI マウス脳における神経細胞での Foxp2 (R552H) の局在を調べたところ、正常マウスで Foxp2 は核に存在し、変異マウスでは一部以外の細胞質にも存在した。

Foxp2-cerebellum-Tg (Myc タグ付加) マウス小脳で Foxp2 と結合している内在性タンパクを固定化した myc 抗体のカラムを利用して分離した。現在 N 末端解析、TOFF-MS 解析により小脳プルキンエ細胞内で Foxp2 に結合しているタンパク質の同定を試みている。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)  
〔雑誌論文〕 (計 3 件) 査読あり。

1. Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, M. Y., and Momoi, T. Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2 (R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. *Neurosci Lett.* 506:277~280. 2012
2. Tanabe, Y., Fujita, E., and Momoi, T. FOXP2 promotes the nuclear translocation of POT1, but FOXP2 (R553H), mutation related to speech-language disorder, partially prevents it. *Biochem Biophys Res Commun.* 410;593~596, 2011
3. Momoi, T., Fujita, E., Senoo, H., and Momoi, M.: Genetic factors and epigenetic factors for autism: endoplasmic reticulum stress and impaired synaptic function. *Cell Biol. Int.* 34 ; 13~19, 2009.

〔学会発表〕 (計 4 件)

1. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子 ; Catnap2 expression in the cerebellum of the Foxp2 (R552H) mice, with mutation related to the speech-language disorder, 第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011

年 12 月 14 日

2. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子 ; 自閉性障害候補遺伝子 CADM1 ノックアウトマウスにおける超音波音声、第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011 年 9 月 15 日
3. 田辺裕子、藤原裕士、松崎鮎美、笠原忠、湯浅茂樹、桃井隆、藤田恵理子 ; 小脳発達過程におけるフォークヘッドドメインを欠いた新規 Foxp2 アイソフォームの発現の解析、第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会合同学術集会抄録集、神戸、2010 年 9 月 4 日
4. Fujita E., Tababe Y, Fujiwara Y, Mariko Momoi, Takashi Momoi ; Ultrasonic vocalization of the knock-in mice with mutated Foxp2 related to speech-language disorder and normal Foxp2 expressed in Purkinje cells. *Neuroscience*2009、名古屋、2009 年 9 月 18 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神保 恵理子 (ERIKO JIMBO)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 20291651

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし