

機関番号：63905

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890304

研究課題名（和文）Neurologin 遺伝子改変自閉症モデルマウスのシナプス機能の解析

研究課題名（英文）Analysis of the synapse function in Neurologin knock-in mice generated as models of autism.

研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI KATSUHIKO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号：20546767

研究成果の概要（和文）：自閉症の原因を解明する目的で、自閉症のモデルとして作成した Neurologin-3 の 451 番目のアルギニンがシステインに置換された変異マウスのシナプス機能を解析した。このマウスの海馬のシナプスでは、NMDA 受容体と呼ばれるグルタミン酸受容体を介したシナプス伝達が増強しており、これは NMDA 受容体のシナプス表面での数が増加することに起因していることが判明した。また、このマウスではシナプスの形態学的異常も認められた。これは、今後ヒトの自閉症の原因解明や治療法開発する上で、重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To study the pathogenesis of autism, we analyzed the synaptic function in mouse models harboring Neurologin-3 R451C mutation. We found that the synaptic transmission mediated by NMDA glutamate receptors was enhanced in the hippocampus of these mice and this was due to the increased number of the receptor on the synaptic membrane. In addition, we found morphological abnormalities in the mutant synapses. These findings may provide insight into understanding the pathophysiology and developing treatments of autism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：自閉症、シナプス、モデル動物、Neurologin、Neurexin、電気生理学、SDS-FRL法

1. 研究開始当初の背景

Neurologin は、シナプス後終末に局在する細胞接着因子で、細胞外領域に alpha, beta-hydrolase 様ドメインと、細胞内領域に type I-PDZ ドメイン結合領域を有する 1 回膜貫通型タンパク質である。Neurologin は、シナプス間隙において、カルシウム依存的にシナプス前終末に局在する細胞接着因子 Neurexin と結合し、シナプスの形成および機能的成熟に関与していると考えられている。近年、Neurologin および Neurexin をコードする遺伝子の変異が自閉症患者から発見され、Neurologin/Neurexin の異常によって引き起こされるシナプス機能の改変が、自閉症病理と関連していると考えられるようになった。我々は、これらの変異の中の一つ、Neurologin-3 の、特に保存性の高い 451 番目のアルギニンがシステインに置換された変異を再現したノックインしたマウス (Neurologin-3 R451C) を作成し解析を行ってきた。このマウスは正常に発生、成長し、肉眼的異常は認められないが、電気生理学的にシナプス機能を解析したところ、大脳皮質の体性感覚野において、抑制性シナプスの機能の亢進が認められた。行動学的解析を行った結果、自閉症でみられる社会的相互作用の低下、および空間学習記憶の亢進が認められた。しかし、これを引き起こすメカニズムは今のところ全くわかっていない。私は、neurologin-3 R451C 変異がモデルマウスにおいて自閉症を起こすメカニズムを解明することはヒトの自閉症発症の原因を解明することにつながるのではないかと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

自閉症は 2～3 歳頃に発症する神経発達障害で、患者数は年々増加の一途をたどってい

る。自閉症は統計学的に遺伝学的素因との関連が示唆されているが、その原因はいまだ不明のままである。このため、発症前の診断や根本的治療法は開発されていない。自閉症は一度発症すると生涯治癒しない疾患であり、患者本人のみならず、家族を含めて疾患のために人生を全般に渡って束縛されることになる。このため、自閉症の原因を解明することは急務であり、我々はこの手がかりとして、ヒトの自閉症患者から発見された遺伝子変異を有する **neurologin-3 R451C** ノックインマウスを用いて自閉症の病態の解明を目指す。**Neurologin** はシナプス末端に局在し、シナプスの形成および機能獲得に寄与していることが知られることから、特にシナプス機能に着目して解析を行う。

以前の研究で、**neurologin-3 R451C** ノックインマウスでは、大脳皮質において抑制性シナプス機能の亢進が見られるという結果が得られている。一方、行動学的解析により、このマウスでは社会的相互作用の低下が見られると同時に、空間学習記憶能力の顕著な増強が見られている。このマウスでみられる行動異常とシナプス機能の関係を調べる目的で、空間学習記憶能力との関係が深いとされる海馬のシナプス機能を電気生理学的に解析する。また、このマウスのシナプスの微細形態を、電子顕微鏡を用いて解析する。さらに、シナプス伝達に重要な役割を果たす神経伝達物質受容体のシナプス膜面での動態を、凍結切断レプリカ免疫電顕法 (SDS-FRL 法) を用いて解析する。

本研究は、自閉症モデルとして作成した **neurologin-3 R451C** ノックインマウスのシナプスの異常を解析することにより、自閉症の原因の解明を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的解析

① 細胞外記録による解析

Neurologin-3 R451C ノックインマウスと野生型マウスの海馬の切片を作成し、海馬 CA1 領域の放線層に記録電極を置き、CA3 と CA1 領域の境界領域の放線層を電気刺激し、シナプスの活動を解析した。シナプス前終末の一斉発火を反映した線維斉射に対する fEPSP の傾きを解析した。また、paired-pulse 比、や長期増強(LTP)についても解析した。

② パッチクランプ法による解析

上記切片の海馬の CA1 領域の錐体細胞をパッチクランプし、興奮性および抑制性シナプスの自発的活動や、電気刺激に対する応答、AMPA/NMDA 比を測定した。

(2) 遺伝子発現の解析

成熟マウスの脳から嗅球、大脳皮質前頭前野、線条体、扁桃体、海馬、視床、黒室、小脳の組織を取り分け、RNA を抽出した。これをテンプレートとして、neurologin-1, 2, 3 と、neurexin-alpha-1, 2, 3, beta-1, 2, 3 に特異的な PCR primer を用いて real-time RT-PCR を行い、GAPDH 特異的 primer による real-time PCR を内在コントロールとして、各組織におけるこれら遺伝子の発現レベルを解析した。

(3) 形態学的解析

① 電子顕微鏡によるシナプス微細形態の解析

Neurologin-3 R451C ノックインマウスと野生型マウスの海馬の CA1 領域の放線層の組織を切り出し、固定後、超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡にてシナプスの形態を観察した。これら両マウス系統について、シナ

プス後膜肥厚とアクティブゾーンの形態を指標とし、興奮性及び抑制性シナプスの数を数えると同時に、シナプス後膜肥厚、シナプスボタンの大きさの測定、シナプス小胞の数を数え、結果を比較した。

② 凍結切断レプリカ免疫電顕による解析

これらの組織を凍結割段し、白金カーボン蒸着によりレプリカを作成し、NR1 抗体を用いて免疫染色を行った。金粒子二次抗体を用いて NR1 のシグナルを検出し、透過型電子顕微鏡にてシナプス膜面における NR1 の数を定量した。

③ 樹状突起の分枝および樹状突起棘の解析

海馬の CA1 領域の錐体細胞に色素を注入し、共焦点蛍光顕微鏡にて樹状突起の分枝の状態を測定した。また、樹状突起棘の数を数えた。

4. 研究成果

以前の研究で、自閉症患者から見つかったシナプス接着因子 Neurologin-3 の 1 アミノ酸置換 (R451C) が、これをゲノム上で再現したノックインマウスで自閉症様行動を引き起こすことが示されている。この原因を解明する目的で、本研究においてこのマウスのシナプス機能の解析を行った。このマウスではモリス水迷路試験を用いた行動解析により空間学習記憶能力の増強が見られることから、空間学習記憶の責任領域とされる海馬のシナプス機能を電気生理学的手法を用いて解析したところ、抑制性シナプス機能は正常であったのに対し、興奮性シナプス機能の増強が認められた。この結果は、行動学実験の結果と整合性の取れるものであるが、このマウスの大脳皮質のシナプスで抑制性シナプス機能が増強し、興奮性シナプス機能は正常という以前得られた結果と大きく異なるも

のである。これは、この変異が単にシナプス機能を一律に改変しているのではなく、脳の領域ごとに異なる様式でシナプスの興奮性・抑制性機能のバランス異常を引き起こしているものと考えられる。どうしてこのような領域ごとによるシナプス機能の違いを引き起こしているのかを解明するために、neuroigin 遺伝子群の脳の各部位での発現パターンを real-time PCR 法を用いて定量的に解析した。しかし、neuroigin の主要なアイソフォームについて、脳の領域ごとの際立った違いは認められなかった。次に、Neuroigin のシナプスにおけるリガンドとして知られる Neurexin の主要なアイソフォームについて発現を調べたところ、脳の領域ごとに異なるパターンが認められた。このことから、Neuroigin は脳の各部位において、異なる Neurexin のアイソフォームと結合することにより、シナプス機能の特異性を生み出している可能性が示唆された。

このマウスでみられるシナプス機能異常をさらに詳細に解析する目的で、興奮性シナプス伝達を司るグルタミン酸受容体である NMDA 受容体と AMPA 受容体のシナプス応答の比を解析した。この結果、AMPA 受容体よりも NMDA 受容体の応答が優位に増強していることが判明した。また、形態学的解析により、R451C ノックインマウスでは海馬の錐体神経細胞の樹状突起の分枝が増加していることが判明した。さらに、シナプスの微細形態において、モデルマウスではシナプス小胞の数、シナプス末端の面積、棘突起の面積が減少していることが判明した。凍結割段レプリカ免疫電顕法 (SDS-FRL 法) を用いた解析により、モデルマウスではシナプス後膜面での NMDA 受容体の NR1 サブユニットの密度が増加していることを見出した。

これらのことから、このマウスでは脳の領域によって異なるレベルのシナプスの興奮性・抑制性のバランス異常が認められ、これはシナプスの微細形態や神経伝達物質受容体の局在異常によるものと考えられる。本成果は、ヒトの自閉症患者から発見された変異を導入した動物モデルにおいて、神経機能異常が引き起こされる原因としてのシナプス異常の様態を明らかにした世界で最初の知見である。自閉症は症例ごとに臨床像が大きく異なるが、少なくともあるタイプの自閉症では、本研究で見られたシナプス異常に起因する可能性が考えられ、今後自閉症の臨床病理学的研究を行っていく上で、本研究成果は重要な情報をもたらしたといえる。

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 8 件)

- ① Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, Hammer RE, Südhof TC, Zheng H. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. Proc Natl Acad Sci USA. 査読有, 107(40):17362-7. (2010)
- ② Li H, Wang Z, Wang B, Guo Q, Dolios G, Tabuchi K, Hammer RE, Südhof TC, Wang R, Zheng H. Genetic dissection of the amyloid precursor protein in developmental function and amyloid pathogenesis. J Biol Chem. 査読有, 285(40):30598-605. (2010)
- ③ Fukata Y, Lovero KL, Iwanaga T, Watanabe A, Yokoi N, Tabuchi K, Shigemoto R, Nicoll RA, Fukata M. Disruption of

LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有, 107(8):3799-804. (2010)

④ Blundell J, Blaiss CA, Etherton MR, Espinosa F, Tabuchi K, Walz C, Bolliger MF, Südhof TC, Powell CM. Neuroligin-1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. J Neurosci. 査読有, 30(6):2115-29. (2010)

⑤ Tabuchi K, Chen G, Südhof TC, Shen J. Conditional forebrain inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. J Neurosci. 査読有, 29(22):7290-301. (2009)

⑥ 田淵克彦: シナプス, Neuroligin と自閉症: Cognition and Dementia, 査読無, 8(3), 39-44 (2009)

⑦ 田淵克彦: 素顔のニューロサイエンティスト (Thomas C. Südhof): Clinical Neuroscience, 査読無, 27(8), 944. (2009)

⑧ 田淵克彦: 自閉症とニューロリギン: Clinical Neuroscience, 査読無, 27(10): 2009:1092-1093. (2009)

[学会発表] (計4件)

① 田淵克彦: シナプス機能と自閉症: Neuroligin/Neurexin の役割: 包括能ワークショップ: 2010年7月29日 さっぽろ芸文館 (北海道)

② 田淵克彦: 自閉症患者から見つかった neuroligin 変異がシナプス機能に及ぼす影響: 包括能ワークショップ: 2010年7月28日 さっぽろ芸文館 (北海道)

③ Guiquan Chen, Tabuchi K, Südhof TC, Shen J. Conditional forebrain

inactivation of nicastrin causes progressive memory impairment and age-related neurodegeneration. Society for Neuroscience 2009年10月19日 McCormick Place, Chicago, USA

④ Tabuchi K, Etherton MR, Shigemoto R, Südhof TC. Analysis of neuroligin-3 knock-in mice relevant to autism spectrum disorders. 第32回日本神経科学大会. 2009年9月18日 名古屋国際会議場 (愛知)

[図書] (計1件)

① Tabuchi K. Neuroligins and Neurexins in Autism. American Psychiatric Publishing Inc. Textbook of Autism Spectrum Disorders. pp347-352 (2010)

[その他]

ホームページ等

http://www.nips.ac.jp/dcs/e/abstract/tabuchi_k.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI KATSUHIKO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号: 20546767