

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：23700406
 研究課題名（和文） 小脳発達における新規自閉症感受性遺伝子 AUTS2 の分子機能の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the molecular function of a novel autism susceptibility gene AUTS2 in cerebellar development
 研究代表者
 堀 啓（HORI KEI）
 独立行政法人国立精神・神経医療研究センター神経研究所病態生化学研究部 科研費研究員
 研究者番号：70568790

研究成果の概要（和文）：本研究では、これまで生理機能が全く分かっていなかった自閉症感受性遺伝子 *Auts2* が、Rho ファミリー G 蛋白質 *Rac1* や *Cdc42* シグナル伝達を制御し、アクチン細胞骨格系を再構成することによって、神経発生過程における神経細胞移動や神経突起形成など、神経系発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、*Auts2* ノックアウトマウスを用いた社会的行動測定テストでは、野生型マウスに比べて自閉症様行動を示す傾向にある事も見出した。今後このノックアウトマウスが、新たな診断法や治療法の開発のためのモデルマウスとして貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, It has been revealed that a novel autism susceptibility gene *Auts2*, which functions have been unknown, works as an actin cytoskeleton regulator working as a upstream of Rho family small GTPase *Rac1* and *Cdc42*, and is important factor for regulating multiple events including neuronal migration and neurite formation in CNS development. In the experiments of social behavior test, *Auts2* knockout mice showed the autistic behavior compared with wild type mice, suggesting that the *Auts2* KO mice established in this study would be useful for the development of new diagnosis and therapy on psychiatric disorders such as autism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：発生・発達・再生神経科学

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループは、小脳皮質を完全欠失

 する新規マウス突然変異体 *cerebellless* を単離し、その原因遺伝子である bHLH 型転写因子

Ptf1a が小脳脳室帯で発現し、小脳の全ての抑制性神経細胞の運命決定を司る重要な分子であることを明らかにした。しかしながら、小脳脳室帯から生み出されたそれぞれの抑制性神経細胞が、いかにして正しい経路で移動し、正しい位置へと配置され、そこで複雑かつ精巧な形態の神経突起を伸ばしその固有の形態を獲得するのかについては、未だに全く明らかになっていない。この一つの理由としては、Ptf1a の下流で働き、細胞の移動や突起形態の制御に関わるような遺伝子が未同定であることがあげられる。申請者は、cDNA microarray を用いて Ptf1a ノックアウト (KO) マウスで発現が消失する遺伝子をスクリーニングし、Ptf1a 下流因子候補の1つとして、新規自閉症感受性遺伝子 Autism susceptibility candidate 2 (AUTS2) を見いだした。Aut2 についてはこれまでに自閉症や精神遅滞症状を示す患者で、相互転座などの染色体構造異常による遺伝子欠損が多数報告されており、これら精神疾患の病因遺伝子の有力候補であると考えられている。しかし現在までのところ、AUTS2 についての生化学・分子生物学的なアプローチによる研究例はなく、AUTS2 の生理機能は全く分かっていない。

2. 研究の目的

申請者のこれまでの解析から、AUTS2 を培養細胞に強制発現させると、細胞運動時に形成されるアクチン集積構造である「ラッフル膜」が誘導されることを発見した。また AUTS2 を強制発現させることにより、実際にラッフル膜形成を制御する Rho ファミリー G 蛋白質 Rac が活性化を受けていることを確認している。このことから AUTS2 は神経細胞において、アクチン細胞骨格を介して細胞移動や神経突起など形態形成に関与する可能性が十分考えられた。本研究は、主に細胞生

物学的、生化学・分子生物学的なアプローチにより、AUTS2 がアクチン細胞骨格を制御する分子機構を明らかにする。さらに、初代培養細胞系を用いた *in vitro* の解析と子宮内電気穿孔法による強制発現・ノックダウンや Aut2-KO マウスを用いた個体レベルでの解析を組み合わせ、AUTS2 が神経細胞移動や神経突起形成にいかんして関与しているのかについても明らかにする。また、本研究により自閉症など精神疾患の発生機序解明に対する理解を深め、臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) Aut2 の個体レベルでの機能解析

AUTS2 が中枢神経系発生においてどのような分子生物学的機能を有するかを明らかにするために、本研究では実験系が既に確立されている大脳皮質に焦点を置いて研究を進めた。胎生 14.5 日のマウスの大脳脳室帯に Aut2 の強制発現ベクターおよび shRNA ベクターを、子宮内電気穿孔法を用いて導入し、生み出された神経細胞の移動様式、配置、そして樹上突起の形成に対する影響を共導入した GFP で細胞形態をモニターすることで、様々な発生過程で調べた。また、AUTS2 ノックアウトマウスを作製し、*in vivo* で神経細胞の移動様式や樹上突起の形成様式などについても同方法を用いて解析した。

(2) Aut2 の培養細胞レベルでの機能解析

培養神経細胞や初代培養神経細胞を用いて AUTS2 あるいはその変異体タンパク遺伝子を導入し、ラッフル膜形成、神経突起伸長、樹上突起や軸索など細胞の形態形成などへの影響を解析した。また shRNA ベクターを用いて内在性 AUTS2 の発現を抑制し、同様な解析を行なった。特に、培養細胞を用いた解析では、AUTS2 の上流および下流のシグナル伝達カスケードを調べることによって、具

体的にどのような分子機構によって、AUTS2 が Rac を活性化し、さらには細胞移動や突起形成を制御するのかを明らかにしていく。

(3) AUTS2 結合因子のプロテオミクス解析

Maltose-binding protein (MBP) との融合タンパクとして作成した AUTS2 を bait としたアフィニティークロマトグラフィーと質量分析 (Lc/MS/MS) によるショットガン解析によって、ラットの脳抽出液中から、結合候補分子を同定する。これらの分子のうち、アクチン細胞骨格形成調節因子群 (特にラッフル膜形成に関わる低分子量 G 蛋白質 Rac シグナル関連因子) に焦点を当てて機能解析を行なう。本研究期間内で、*in vitro*・*in vivo* 結合実験によって AUTS2 との結合様式を検討する。さらに脳組織における両者の時間・空間的発現パターンの整合性などを組織免疫染色などによって解析し、さらなる結合候補分子の絞り込みを行なう。絞り込まれた分子群については、過剰発現・shRNA ベクターを作製し、小脳初代培養系および胎児小脳に対する遺伝子導入を行い、その機能について解析する。

4. 研究成果

(1) 培養細胞実験によって AUTS2 が Rho ファミリー G 蛋白質である Rac1 を活性化し、細胞運動時に見られるアクチン集積構造体「Lamellipodia 膜 (葉状仮足)」の形成を促進することを見出した (図 1)。また、これらの細胞に発現する内在性の Rac1 が実際に活性化を受けていることを GTPase pull down ア

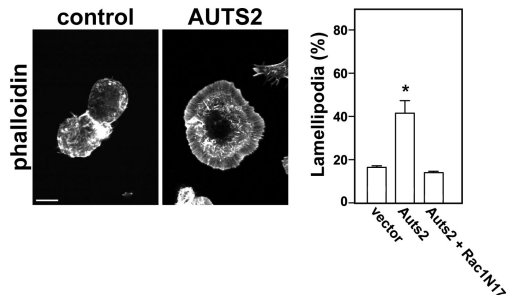
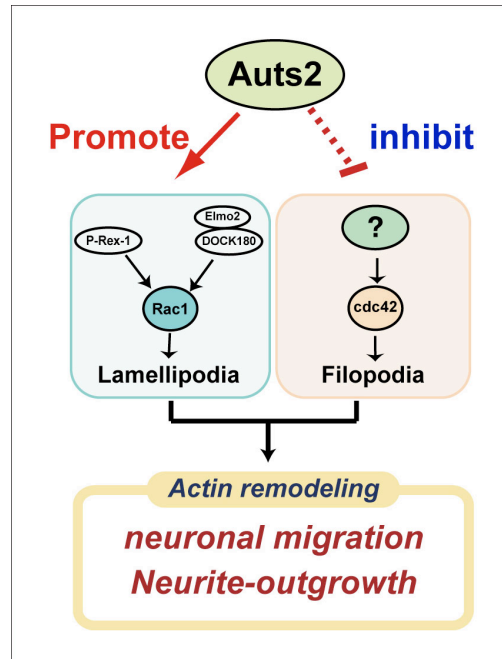


図 1

ッセイによって確認した。AUTS2 から Rac1 活性化に至る伝達経路として考えられる Rac1 活性化因子 (Rac1-GEF) を検索するため、複数の Rac1-GEF に対するドミナントネガティブ変異体を用いて解析を行なった。結果として、P-Rex1 など複数の Rac1-GEF が介在することを見出した。

(2) プロテオミクス技術を用いた AUTS2 の結合分子の探索やその後の *in vitro* 解析によって、AUTS2 が Rac1 活性化因子である P-Rex1 および DOCK180/ELMO2 と結合することで Rac1 を活性化していることがわかった。また、海馬初代培養神経細胞に Aut62 に対するノックダウンベクターを導入したところ、多数の Filopodia (糸状仮足) が形成されることを見出した。つまり、Aut62 は Rho ファミリー G 蛋白質である Cdc42 の活性に対しては抑制的に働き、Filopodia (糸状仮足) 形成を抑制することが考えられる。通常は Rac1 と Cdc42 の活性は同じ方向へ制御されることが多く、それゆえ、AUTS2 はこの両者の Rho ファミリー G 蛋白質カスケードを逆方向へと制御する大変ユニークな分子であると言える。



(3) *Auts2* の海馬初代培養神経細胞での shRNA によるノックダウン実験から、この分子が神経突起伸長に関与していることも明らかにした (図 2A)。さらに、子宮内エレクトロポレーションによる胎児脳へのノックダウンベクターの導入によって、神経細胞移動が著しく阻害されることも見いだされた (図 2B)。また、*Auts2* 遺伝子のノックアウトマウス (*Auts2* KO) においても同様に、大脳皮質神経細胞の移動障害が認められたため、*AUTS2* が神経細胞移動にも関与していることが明らかになった。

(4) 3-chamber 装置を用いた社会的行動測定テストでは、*Auts2* KO マウスが野生型マウスと比べて、自閉症様行動の特徴の一つとして見られる「新規マウスへの関心が低い」傾向にあることが分かった。

このように、*AUTS2* は *Rac1* および *Cdc42* の活性を制御し、アクチン細胞骨格系を精巧かつ複雑に再構成させることによって、神経細胞移動や神経突起伸長など神経系発生に

重要な役割を果たしているということがわかった。また、この遺伝子の変異によって自閉症や精神遅滞症が引き起こされる症例が報告されているということから、この遺伝子の機能異常によって神経細胞移動や神経突起伸長などの神経系形成過程が阻害され、その結果として正常な脳機能を発揮できずにそれらの精神疾患様症状を呈することに繋がったのではないかと示唆される。本研究で作製した *Auts2* ノックアウトマウスは、これまでヒトで報告されている自閉症およびその他、多くの身体的な発達障害の症例と同じ表現型を示しており、これが *Auts2* 遺伝子を失陥することによって引き起こされる自閉症などの精神疾患に対するいいモデルマウスとして確立されたこと考えられる。今後、このマウスを利用した新たな診断法の開発や、薬剤スクリーニングなど治療法の開発に大いに貢献することが寿分期待される。

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 1 件)

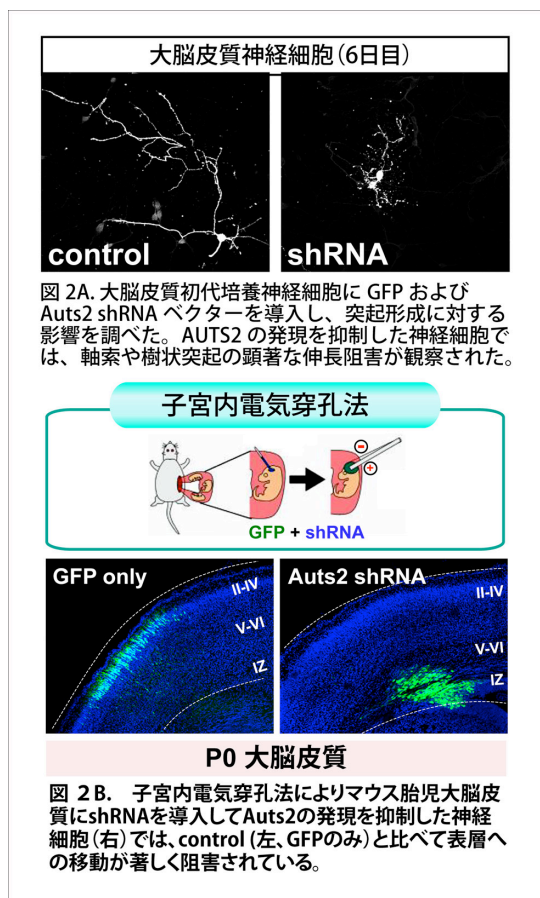
① Hori K and Hoshino M. (2012) GABAergic neuron specification in the spinal cord, the cerebellum and the cochlear nucleus. *Neural Plast* 2012:921732, 11 pages

[学会発表] (計 3 件)

① 堀啓 (代表) 第 35 回日本神経科学大会「Characterization of a novel Autism-related gene in the CNS development」2012 年 9 月 18~21 日 (名古屋国際会議場)

② 堀啓 (代表) 第 35 回日本分子生物学会年会「大脳皮質形成における新規自閉症関連遺伝子の分子機能の解明」2012 年 12 月 11~14 日 (福岡国際会議場マリメッセ)

③ 堀啓 (代表) 第 6 回神経発生討論会「新規自閉症感受性遺伝子 *Auts2* の分子機能の解析」2013 年 3 月 14~15 日 (理化学研究所脳科学総合センター、和光市)



[その他]
ホームページ等
http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 啓 (HORI KEI)

(独) 国立精神神経医療研究センター・神
経研究所・病態生化学研究部・科研費研究
員

研究者番号：70568790