

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500452

研究課題名(和文)新規自閉症発症関連遺伝子の探索と発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of a candidate gene in the etiology of autism spectrum disorder

研究代表者

安田 新(YASUDA, Shin)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：20392368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症発症とTAO2キナーゼをコードする染色体領域(16p11.2領域)の微小欠失との関連が報告されている。そこで、自閉症および正常対照より採取した遺伝子サンプルのTAO2キナーゼに特異的な領域のリシーケンスを行い、複数のrare variantを見出した。これらのTAO2変異体をニューロンに発現するとスパイン形成が抑制された。TAO2bノックアウトマウスを作成し、海馬ニューロンの樹状突起スパインの観察を行ったところ、樹状突起スパインの形態異常がみられた。また、正常ニューロンに比べて抑制性シナプスが増加していた。更に、ノックアウトマウス文脈的恐怖記憶にも異常がみられた。

研究成果の概要(英文)：Dendritic filopodia are most abundant during early phase of synaptogenesis, but the number of filopodia declines thereafter. When filopodia contact presynaptic sites and form synapses, filopodia convert into dendritic spines. Normal dendritic spinogenesis may be related to learning and memory function, and abnormal spine formation may cause the autistic spectrum disorder (ASD). TAO2b is a p38 MAP kinase kinase kinase, which binds to a protocadherin arcadlin at its cytoplasmic region. The gene encoding TAO2b is known to be located on chromosome 16p11.2, a region has been shown to carry substantial susceptibility to ASD. To address if TAO2b variants are associated with ASD, we sequenced TAO2b in patients and unaffected individuals. We identified two rare TAO2b variants in ASD individuals. Overexpression of each variant caused dendritic spine abnormality in cultured hippocampal neurons. We generated TAO2b knock mice. TAO2b knockout induced aberrant spine morphology and ASD-like behavior.

研究分野：神経化学 精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 樹状突起スパイン 16p11.2微小欠失 TAO2キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

自閉症や精神遅滞などの発達障害患者において、スパイン（後シナプス樹状突起棘）の形や密度の異常がみられる（*Brain Res Rev.* 39:29-54, 2002）。自閉症の発症に関連する遺伝子産物（蛋白質）として、neuroligin-3/4 や neurexin-1（神経接着分子とそのリガンド、シナプス形成に関与、*Nat Genet* 34:27-9, 2003; *Am J Hum Genet.* 82:199-207, 2008）、shank3（グルタミン酸受容体のスパインへの局在を制御、*Nat Genet.* 39:25-7, 2007）、FMR1 RNA 結合蛋白質、*Trends Neurosci.* 27:370-7, 2004）、Ube3A（ユビキチン化に関与し、蛋白分解系を制御、*Mol Psychiatry.* 4:64-7, 1999）などのスパイン形成に関わる蛋白質が報告されており、これらの遺伝子の変異によってスパイン形態異常が生じる（*Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5401-4, 1997; *Hum Mol Genet.* 13:1471-7, 2004; *Nat Genet.* 39:25-7, 2007; *Hum Mol Genet.* 17:111-8, 2008）。これらの事実は、スパイン形成に関与する蛋白質の異常が自閉症や精神遅滞などの発症要因となり得ることを示している。Arcadlin は、神経活動依存的にニューロンに発現誘導されるプロトカドヘリンである。スパインに発現することにより、下流に存在する TAO2βキナーゼを介して p38 MAP キナーゼが活性化する。その結果、スパイン膜から N-cadherin を内在化させ、スパインを減らす。TAO2β遺伝子を含む 16p11.2 領域の染色体微小欠失が自閉症発症と関連することが最近になってあきらかとなり、予備実験により、

自閉症患者に見つかった複数の TAO2 変異がスパイン形成不全を引き起こすことを確認した。そこで、TAO2βキナーゼの変異に着目し、自閉症の病態メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

カドヘリンファミリー分子は、細胞間接着に関与する。脳内においては N-cadherin が主に発現しており、シナプス構築維持に必須であることが報告されてきた（*Neuron*, 3;35(1):77-89, 2002）。N-cadherin 以外にも、プロトカドヘリンと呼ばれるカドヘリンが存在する。プロトカドヘリンとシナプス形態制御に関する報告は少ないが、申請者らのグループはてんかん発作などの神経活動によりニューロンに一過性に発現するプロトカドヘリン arcadlin（*J. Biol. Chem.* 274(27):19473-9, 1999）がスパインに発現し、N-cadherin と結合すること。同時に、TAO2-MEK3-p38 MAPK カスケードを活性化すること。更に、p38 MAPK の活性化が、arcadlin と N-cadherin のスパイン膜からの内在化を引き起こし、N-cadherin をシナプス膜から消失させることによって、スパイン密度を減少させることを見出した（*Neuron* 56:456-471, 2007）。また、自閉症患者の遺伝子解析結果から、プロトカドヘリンの異常が自閉症発症に関与することが報告されていることから（*Trends Neurosci.* 32(7) 402-12, 2009）、シナプス形成に関与する arcadlin やその機能を調節する蛋白質は自閉症発症関連遺伝子の候補となりうると考えている。実際に、上述の arcadlin の下流に存在する TAO2 遺伝子の微小欠失と自閉症との関連が報告されている（*N. Engl. J. Med.*, 358(7):667-75, 2008）。そこで、自閉症患者から採取した DNA サンプルを用いて TAO2 遺伝子のリシーケンスを行ったと

ころ、自閉症患者において複数の TAO2 新規変異を見出すことができた。また、これらの変異が arcadlin 内在化障害およびスパイン形態異常を引き起こすことを確認しているため、TAO2 の変異による自閉症発症の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

Thousand and one-amino acid kinase (TAO)2 は、p38 MAP キナーゼの上流に存在する、MEK3/6 をリン酸化するセリンスレオニンキナーゼであり、様々なストレス応答に関与する (*J Biol Chem* 274(40):28803-7, 1999; *J Biol Chem*, 278(25):22278-83, 2003; *Neuron*, 56:456-471, 2007)。N 末端側に kinase domain、C 末端側に regulatory domain と呼ばれる配列を持つ。Regulatory domain の配列が異なる 2 つの splicing variant、TAO2 α (variant 2) と TAO2 β (variant 1) が存在する。TAO2 α と TAO2 β はどちらも arcadlin の細胞内領域と結合する。しかしながら、arcadlin と N-cadherin の内在化は arcadlin の同種結合により活性化した p38 MAP キナーゼによる TAO2 β に特異的なセリン残基のリン酸化によって引き起こされる。そこで、自閉症および正常対照より採取した遺伝子サンプルの TAO2 β キナーゼに特異的な領域のうち (約 900 base pair) に絞ってリシーケンスを行い、rare variant (TAO2[#]) を探索する。

TAO2 をノックダウンした海馬初代培養ニューロンに TAO2 変異体を発現させ、スパインの形態変化を共焦点顕微鏡にて観察する。スパインの長さ、幅および密度について正常対照と比較する。

TAO2 β ノックアウトマウスを作成し、神経系における異常を検討する。まず、マウスを 2% パラフォルムアルデヒドで灌流し、摘出した脳からピプラトームで 200 μ m の切片を作成する。DiI をコートした 1.6 μ m の金粒子を遺伝子銃で脳切

片へ撃ち込むことによって、海馬 CA1 ニューロンを DiI でラベルする。可視化された神経細胞の樹状突起を観察し、樹状突起スパインの三次元定量解析を行う (Diolistic method)。

TAO2 の変異がスパイン密度や形態異常と関連するならば、次にこれらの異常が行動異常を引き起こすかどうかを検討する。ここでは、海馬や扁桃体が関係するとされる文脈的恐怖記憶の差異を正常マウスとノックアウトマウスを用いて比較する。

4. 研究成果

自閉症発症と arcadlin の細胞内領域に結合する TAO2 β キナーゼをコードする染色体領域 (16p11.2 領域) の微小欠失との関連が報告されている。そこで、自閉症および正常対照より採取した遺伝子サンプルの TAO2 β キナーゼに特異的な領域のうち (約 900 base pair) に絞ってリシーケンスを行い、複数の rare variant (TAO2[#]) を見出した。自閉症患者で見つかった TAO2 変異体 (キナーゼドメインの変異 TAO2[#](KD)、調節ドメインの変異 TAO2[#](RD)) をニューロンに発現するとスパイン形成が抑制された。Arcadlin と TAO2 (野生型と変異体) を発現させた HEK293T 細胞に arcadlin 細胞外蛋白質を添加すると、野生型 (wt) では arcadlin が細胞内へ移行するのに対し、TAO2 変異体を発現した細胞では、arcadlin-TAO2 の内在化が抑制された。そこで TAO2 β キナーゼ変異ノックイン・ノックアウトマウスを作成し、Diolistic 法にて標識したニューロンの樹状突起スパインの観察を行ったところ、ノックイン・ノックアウトマウス両方の樹状突起スパインが幼若化していることを確認した。また、ノックアウトマウスにおいて文脈的恐怖記憶に異常が見られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. Sugiura H, Yasuda S, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, Iwasaki K, Ichikawa M, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K Nature communications 6 6842 2015 年 4 月 (査読有) doi:10.1038/ncomms7842
2. Dysfunction of ventrolateral prefrontal cortex underlying social anxiety disorder: A multi-channel NIRS study Yokoyama C, Kaiya H, Kumano H, Kinou M, Umekage T, Yasuda S, Takei K, Nishikawa M, Sasaki T, Nishimura Y, Hara N, Inoue K, Kaneko Y, Suzuki S, Tanii H, Okada M, Okazaki Y NeuroImage: Clinical 8 455-461 2015 年 5 月 (査読有) doi: 10.1016/j.nicl.2015.05.011
3. Anger tendency may be associated with duration of illness in panic disorder. Sugaya N, Yoshida E, Yasuda S, Tochigi M, Takei K, Otowa T, Umekage T, Konishi Y, Sakano Y, Nomura S, Okazaki Y, Kaiya H, Tanii H, Sasaki T BioPsychoSocial medicine 9 6 2015 年 (査読有) DOI: 10.1186/s13030-015-0035-3
4. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K Scientific reports 4 5155 2014 年 6 月 (査読有) doi:10.1038/srep05155
5. Irritable bowel syndrome, its cognition, anxiety sensitivity, and anticipatory anxiety in panic disorder patients. Sugaya N, Yoshida E, Yasuda S, Tochigi M, Takei K, Ohtani T, Otowa T, Minato T, Umekage T, Sakano Y, Chen J, Shimada H, Nomura S, Okazaki Y, Kaiya H, Tanii H, Sasaki T Psychiatry and clinical neurosciences 2013 年 7 月 DOI: 10.1111/pcn.12069
6. Meta-analysis of genome-wide association studies for panic disorder in the Japanese population. Otowa T, Kawamura Y, Nishida N, Sugaya N, Koike A, Yoshida E, Inoue K, Yasuda S, Nishimura Y, Liu X, Konishi Y, Nishimura F, Shimada T, Kuwabara H, Tochigi M, Kakiuchi C, Umekage T, Miyagawa T, Miyashita A, Shimizu E, Akiyoshi J, Someya T, Kato T, Yoshikawa T, Kuwano R, Kasai K, Kato N, Kaiya H, Tokunaga K, Okazaki Y, Tanii H, Sasaki T Translational psychiatry 2 e186 2012 年 11 月 (査読有) doi:10.1038/tp.2012.89
7. Prevalence of bipolar disorder in panic disorder patients in the Japanese population. Sugaya N, Yoshida E, Yasuda S, Tochigi M, Takei K, Otani T, Otowa T, Minato T, Umekage T, Konishi Y, Sakano Y, Chen J, Nomura S, Okazaki Y, Kaiya H, Sasaki T, Tanii H Journal of affective disorders 2012 年 11 月 (査読有) doi:10.1016/j.jad.2012.10.014
8. 神経活動によるスパイン形態制御と脳疾患 山形要人, 杉浦弘子, 安田新 日本薬理学雑誌 142(3) 106-111 (J-STAGE) 2013 年 (査読無) https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/142/3/142_106/_article/-char/ja/
9. 過剰興奮後に生じるスパイン減少のメカニズム 安田新, 杉浦弘子, 山形要人 日本薬理学雑誌 140(3) 141 2012 年 9 月 (査読無) [http://plaza.umin.ac.jp/JPS1927/fpj/issue/TOC12-140\(3\)/12-140-3.htm](http://plaza.umin.ac.jp/JPS1927/fpj/issue/TOC12-140(3)/12-140-3.htm)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, Iwasaki K, Ichikawa M, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K 第 58 回日本神経化学学会大会 2015 年 9 月、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
2. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K 第 36 回日本生物学的精神医学会 第 57 回日本神経化学学会合同年会 2015 年 9 月、奈良県文化会館 (奈良県奈良市)
3. 結節性硬化症におけるスパイン形成の mTOR 非依存的機構 安田新, 杉浦弘子, 桂林秀太郎, 岩崎克典, 小林敏之, 樋野興夫, 山形要人 第 36 回日本神経科学学会第 56 回日本神経化学学会合同大会 (Neuro2013) 2013 年 6 月、京都国際会館 (京都府京都市)

4. A novel mechanism for dendritic spine abnormality in tuberous sclerosis
Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Iwasaki K, Hino O, Yamagata K 第 55 回日本神経化学会第 11 回アジア太平洋神経化学会合同大会 2012 年 9 月、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Mek3, Yasuda S, Sugiura H, Yamagata K
In **Encyclopedia of Signaling Molecules**
Springer New York 2012
ISBN:978-1-4419-0460-7

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/plasticity/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安田 新 (YASUDA, Shin)

公益財団法人 東京都医学総合研究所 脳
発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：20392368

(2)研究分担者

栃木 衛 (TOCHIGI, Mamoru)

帝京大学 医学部・准教授

研究者番号：40456116

(3)連携研究者

なし