

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830030

研究課題名(和文) 自閉症発症機序の解明に向けた新規自閉症感受性遺伝子Aut2の分子機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of autism susceptibility candidate gene Aut2 in brain 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 代謝研究部・室長

研究者番号：70568790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症感受性遺伝子AUTS2は、自閉症や統合失調症などの精神発達障害との関連性が示唆されるが、中枢神経系でのAut2の生理的役割については全く分かっていない。本研究では、神経細胞においてAUTS2が成長円錐に集積し、RhoファミリーG蛋白質Rac1の活性化を介して、神経突起伸長を促進することを見出した。逆にAut2 KOマウスを用いた解析では、神経突起伸長や神経細胞移動に著しい障害が認められた。また行動解析では、野生型マウスに比べて不安様行動の低下、記憶障害などが認められた。以上のことから、Aut2は大脳皮質の発生および高次精神機能の獲得に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have demonstrated that the mutations in AUTS2 have been associated in multiple psychiatric disorders such as autism, intellectual disability and schizophrenia. In the CNS, Aut2 is highly expressed at several brain regions responsible for the higher brain functions such as frontal cortex, hippocampus and cerebellum. The physiological roles of AUTS2 in CNS development, however, remain unknown. Here we reveal the functions of AUTS2 in regulating cytoskeleton and neural development. In neurons, AUTS2 accumulates at the growth-cones, and activates Rac1 to promote the neurite-outgrowth. Loss-of-function experiments showed that AUTS2 participates in the neuronal migration and neuritogenesis in the cerebral cortex. Moreover, Aut2 KO mice displayed behavioral abnormalities including anxiety-related emotion and memory formation. Thus, our findings indicate that AUTS2 contributes to cortical development and is critical for the acquisition of neurocognitive function.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 神経細胞移動 神経突起伸長 大脳皮質 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

脳の正常な機能は、胎生期に生み出された神経細胞が正しく移動し、複雑かつ精巧な突起を伸ばし、固有の形態を獲得して正常な脳組織が構築されること、また生後には、適切な数のシナプスが形成され、機能的な神経回路網が構築されることによって初めて獲得される。しかしながら、これら発生プログラムに関わる遺伝子に変異が生じると正常な脳発生は破綻し、自閉症や知的障害、統合失調症など様々な精神疾患が発症する。新規自閉症感受性遺伝子 Autism susceptibility candidate 2 (Autis2) はこれまでに、主に転座や逆位などの染色体構造異常による当遺伝子の欠損と、自閉症や知的障害、ADHD、あるいはてんかんなど、広範囲な精神・神経発達障害との関連性について示唆されており、また、大脳皮質や小脳、海馬など高次精神機能を司る脳領域で強く発現することから、神経系の発達に広く重要な役割を果たしていると考えられてきた (Trens Genet, 2013)。しかしながら現在までのところ、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、中枢神経系における AUTS2 の生理機能は全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、未だ明らかとなっていない AUTS2 の細胞内分子機能を、培養細胞や生化学的解析を用いた in vitro 解析系によって明らかにし、また *Autis2* ノックアウト (KO) マウスなどを用いた個体レベルでの発生学・解剖学的解析により、主に大脳皮質発生過程における AUTS2 の生理的役割を明らかにすること、さらに *Autis2* KO マウスを用いた一連の行動解析により、*Autis2* 遺伝子の異常によってもたらされるヒト疾患の病理について理解を深めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞レベルでの分子機能解析

培養細胞株 N1E-115 や大脳皮質または海馬由来の初代培養神経細胞を用いて、AUTS2 強制発現による細胞形態や神経突起伸長への影響を調べ、またその分子機構をプロテオミクス解析 (下記参照) により得られた AUTS2 結合候補分子を中心に細胞生物学・生化学的手法を用いて調べた。具体的には、Rac1 や Cdc42 などの Rho ファミリー G タンパクシグナル関連分子を中心に、各種ドミナントネガティブ変異体と AUTS2 を培養細胞に共発現し、細胞形態や神経突起伸長の制御に AUTS2 が関わるシグナル伝達経路を明らかにした。また、AUTS2 に対する shRNA 発現ベクターを用いた解析により、*Autis2* 発現抑制が細胞形態・神経突起伸長などに与える影響についても同様に解析した。

(2) AUTS2 結合因子のプロテオミクス解析

リコンビナント AUTS2 タンパク質カラムを作成し、ラット脳抽出液から AUTS2 に結合するタンパクの精製を行った。得られたタンパク群は、液体 chromatography と質量分析 (Lc/MS/MS) を組み合わせたショットガン解析によって AUTS2 結合候補分子を網羅的にスクリーニングした。同定された結合因子候補の 2 次スクリーニングとして、データベースや過去の文献を利用して情報を収集し、AUTS2 と時間・空間的に発現が適合する分子を選別した。また、in vitro 結合実験によって AUTS2 との結合を生化学的に検証した。特に lamellipodia 膜 (Rac シグナル) や filopodia (Cdc42 シグナル) などアクチン細胞骨格制御関わるシグナル因子群に注目して解析し、機能的な AUTS2 結合因子を決定した。

(3) 子宮内電気穿孔法による個体レベルでの解析

野生型マウス胎仔に対して shRNA および

GFP 発現ベクターを大脳脳室帯上皮に導入し、GFP 蛍光を指標に神経細胞の移動位置や距離などを GFP 遺伝子のみを導入したコントロールと比較定量した。さらに、GFP 蛍光によって可視化させた神経細胞の樹上突起や軸索の形態（突起伸長や分岐構造、配向性など）も比較検証した。また、遺伝子導入後に分散培養へと展開して細胞レベルで突起伸長や形態形成への影響を *in vitro* レベルでも解析した。さらに、後述する *Auts2* KO マウスを用いても同様の解析を行なった。また、遺伝子導入された細胞の細胞骨格系タンパクや重合調節因子（アクチン重合調節因子 Rac 下流因子 JNK など）の活性化状態を、リン酸化抗体を用いた免疫染色を行い、*Auts2* 発現抑制による細胞骨格系制御への影響について検証した。

(4) *Auts2* KO マウスの作成および解析

Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配させて、任意に時期や部位を限定して遺伝子欠損できる「*Auts2*-floxed」を作製し、本研究では主に全身性に Cre を発現する CAG-Cre マウスと掛け合わせて、恒常型 *Auts2* KO マウスを作成して解析に用いた。作製した *Auts2* KO マウスは、標識核酸 BrdU の取り込みや子宮内電気穿孔法を用いた GFP 蛍光標識により、異なる時期に生み出された神経細胞を特異的にラベルして、個々の神経細胞の動向を追跡し移動度を定量的に比較解析した。さらに、大脳皮質の層特異的抗体を用いた組織免疫染色を組み合わせ、*Auts2* 遺伝子欠損が大脳皮質層形成に与える影響を検証した。さらに、子宮内電気穿孔法を用いて GFP ラベルした神経細胞の軸索伸長についても野生型および *Auts2* KO マウス間での比較検討を行なった。

(5) *Auts2* KO マウス個体を用いた行動解析

Auts2 KO マウスを用いて、以下に挙げる行

動解析を行い、*Auts2* 遺伝子欠損が脳高次機能に与える影響を調べた。(a) Locomotor activity test (自発性行動量)、(b) オープンフィールドテスト (不安行動)、(b) 高架式十字迷路 (不安行動)、(c) 新奇物体認識テスト (記憶・学習)、(d) ロータロッドテスト (運動学習など)、(e) Fear-conditioning テスト (記憶・学習)、プレパルスインビジョンテスト (驚愕反応)。

4. 研究成果

神経様細胞株 N1E-115 に AUTS2 を強制発現させることで Rho-family G タンパクの一つ、Rac1 を活性化しアクチン集積構造体「Lamellipodia 膜」の形成を促進することを見出した。さらに、プロテオミクス解析による AUTS2 結合分子の探索や *in vitro* 解析により、AUTS2 が Rac1 活性化因子である P-Rex1 および Elmo2/Dock180 複合体を介して Rac1 を活性化することも明らかにした。一方で、もう一つの Rho-family G タンパクである Cdc42 に対しては、その上流因子 Intersectin1 (ITSN1) を介して抑制的に働き、フィロポディア形成を抑制することも分かった。通常、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-family G タンパク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 (図 1)。

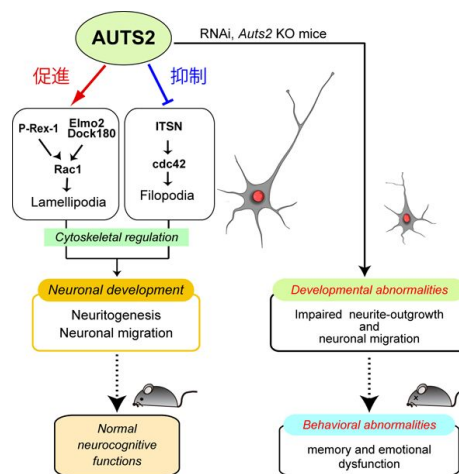


図 1

また、海馬初代培養神経細胞での強制発現および shRNA によるノックダウン実験から、この分子が Elmo2/Dock180 を介し Rac1 活性化依存的に神経突起伸長を促進することも見出した(図1)

さらに、*Auts2* KO マウスを用いた解析や、子宮内電気穿孔法による shRNA ベクターの導入実験によって、大脳皮質の神経細胞移動や、その後の軸索伸長が大きく阻害されることも明らかにした(図2)。このように、AUTS2 はアクチン細胞骨格系制御に関与し、神経細胞移動や神経突起伸長など大脳皮質の正常な組織構築に重要な役割を果たしていることが明らかとなった(Hori et al. *Cell Reports*, 2014)。さらに、恒常型 *Auts2* KO マウスのヘテロ接合体を用いた行動解析で、*Auts2* KO マウスは記憶障害や、探索行動および不安行動の顕著な低下を示し、脳の高次精神機能形成に関わる重要な遺伝子であることが示され

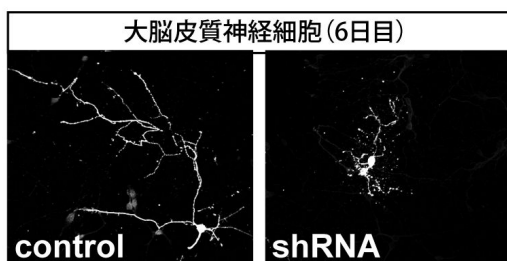


図 2A. 大脳皮質初代培養神経細胞に GFP および *Auts2* shRNA ベクターを導入し、突起形成に対する影響を調べた。*AUTS2* の発現を抑制した神経細胞では、軸索や樹状突起の顕著な伸長阻害が観察された。

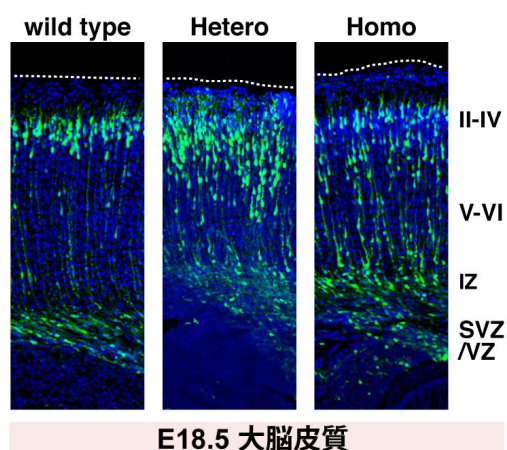


図 2B. 子宮内電気穿孔法により E14.5 における野生型および *Auts2* KO マウス(ヘテロ・ホモ接合体)の胎児大脳皮質神経細胞を GFP でラベルして E18.5 で解析したところ、*Auts2* KO マウスでは野生型と比べて、神経細胞の表層への移動に著しい障害が観察された。

た。興味深いことに、ヒト *AUTS2* 遺伝子変異によって引き起こされる精神疾患の報告例がいずれもヘテロ変異体であり、また、この *Auts2* KO マウスの行動学的な異常がヒト精神疾患様症状の一部を反映していることから、この KO マウスが新たなヒト精神疾患のモデルマウスとして確立されることが十分に期待された。

引用文献

Oksenberg N and Ahituv N (2013) The role of *AUTS2* in neurodevelopment and human evolution. *10*, p600-8.

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)

Kei Hori, Taku Nagai, Wei Shan, Asami Sakamoto, Shinichiro Taya, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Keiko Nakao, Tomoki Nishioka, Kenji Sakimura, Kiyofumi Yamada, Kozo Kaibuchi and Mikio Hoshino. (2014) Cytoskeletal regulation by *AUTS2* in Neuronal migration and neuritogenesis. *Cell Rep.* 9, 2166-2179. doi:10.1016/j.celrep.2014.11.045

(査読有り)

[学会発表](計 3 件)

(1) Mikio Hoshino, Kei Hori. 「Analysis of the function of a psychiatric disorder-related gene during development」 国立精神・神経医療研究センター・マックスプランク研究所合同シンポジウム 招待講演、2014 年 11 月 5~7 日、ザ・プリンス箱根 国際会議場

(2) Kei Hori et al. (他 12 名) 「大脳皮質発生における新規自閉症感受性遺伝子の生理機能の解明」第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25~27 日、パシフィコ横浜 展示ホー

ル1階、ポスター発表

(3) Kei Hori et al. (他8名) 「Analysis of the roles for the autism susceptibility candidate gene Auts2 in cerebellar development」第8回神経発生討論会、2015年3月19~20日、九州大学病院キャンパス内コラボステーションI

〔その他〕

ホームページ等

研究部ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/
所属研究機関による研究成果のプレスリリース

http://www.ncnp.go.jp/press/press_release141219.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 啓 (KEI HORI)

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・代謝研究部・室長

研究者番号：70568790