

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 15日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590359

研究課題名（和文） コピー数異常を示す自閉症関連遺伝子CNTN4の変異マウスによる機能解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of the CNTN4 knockout mice

研究代表者

岩城 明子（IWAKI AKIKO）

九州大学・生体防御医学研究所・講師

研究者番号：30253454

研究成果の概要（和文）：

コンタクチン4 (Cntn4)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり軸索伸長やシナプス形成に関与しているものと考えられている。近年複数の研究により自閉症患者で Cntn4 遺伝子 (CNTN4) のコピー数異常が認められた。本研究では個体レベルで Cntn4 の遺伝子量効果を調べるため Cntn4 ノックアウトマウスを作出した。変異型マウスの脳の構造には大きな異常は無いものの、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、変異型と野生型マウスの大脳と嗅球では数百の遺伝子に発現量の違いがあることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Contactin 4 (Cntn4) is a member of the immunoglobulin super family of axon associated adhesion molecule. Recently, copy number variations of CNTN4 have been detected in several studies on autism spectrum disorders. To explore the dosage effect of Cntn4, we generated mice with targeted disruption of Cntn4. The knockout (KO) mice were viable and fertile and developed normally. Microarray analyses of the prefrontal cortex and olfactory bulb of KO mice revealed several hundred genes with altered expression levels in comparison with the wild type mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：遺伝子改変マウス、自閉症、細胞接着因子、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

自閉症は対人関係の障害、コミュニケーションの障害、興味が狭くなり同じ行動を繰り返す（常同行動）を特徴とした精神疾患で3歳までに発症すると言われていた。発症率は1000人に1人とも言われ、完治することが難

しいため家族への負担が大きく社会的にも深刻な問題となっている。自閉症スペクトラム障害に関わる遺伝子は10～100と見積もられているが不明な点が多く、発症要因の解明が急務である。近年、ゲノム中には多数のコピー数多型 (CNV) が存在することが明らか

になり、コピー数の異常が自閉症の原因となりうる事が報告された (Autism Genome Project Consortium, 2007; Marshall, 2007; Morrow, 2008)。ヒト3番染色体短腕遠位部はゲノム構造が不安定で、以前より欠失により成長障害・精神運動発達遅滞・小頭症を呈する3p欠失症候群が知られていた。今回着目した contactin-4 (Cntn4) 遺伝子 (CNTN4) もこの領域内に存在し、自閉症を伴う3p欠失症候を示した患者で本遺伝子の機能欠損を起こすような転座が報告されている (Fernandez, 2004)。さらに本遺伝子の一部欠失や重複のコピー数多型が自閉症スペクトラム障害患者で認められた (Roohi, 2008)。これらの報告により Cntn4 遺伝子の発現異常が高次脳機能に何らかの影響を及ぼす可能性が想定される。

2. 研究の目的

Cntn4 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-アンカーを有する神経系の膜蛋白質である。発達期の神経組織において軸索伸長やシナプス形成に関与しているものと考えられているがその機能は不明な点が多い。本研究では Cntn4 ノックアウトマウスを作出して個体レベルで Cntn4 の遺伝子量効果を解析する。特にノックアウトマウスの脳での発現プロファイリングを明らかにして、この遺伝子の発現低下が及ぼす影響を調べる。また、野生型と変異型マウスを用いてプロテオミクスにより複合体解析を行い、Cntn4 標的結合分子を同定し機能解析の一助とする。

3. 研究の方法

(1) マウス Cntn4 mRNA と蛋白質の発現解析
ノックアウトマウスの解析に先立ち、Cntn4 の発現の時期と場所を確認するために、ノーザンブロットングならびに RT-PCR を行う。また、ウェスタンブロットングを行い発現している細胞種を特定する。

(2) Cntn4 ノックアウトマウスの作出方法と表現型の解析

マウス6番染色体に存在する Cntn4 遺伝子は25個のエクソンから成り、全長は1.02 Mb (105,627,769-106,649,304) に及ぶ。Cntn4 遺伝子の翻訳開始点を含むエクソン4が欠失するようにターゲティングベクターを構築し、ES細胞への導入ならびに相同組換え体の選別を行う。予想通り遺伝子改変できたかどうかザンブロットングならびに PCR で確認する。組換え ES細胞をマウス胚盤胞へ導入し、得られたキメラマウスと近交系マウス (C57BL/6J) との交配を行い、生殖系列移行したヘテロマウスを得る。ヘテロマウス同士を交配させホモ接合変異体を得る。

C57BL/6J への戻し交配を順次行い繁殖する。ホモ接合変異体を用いてウェスタンブロットングにより蛋白質レベルで Cntn4 の消失を確かめる。抗体は抗ヒト CNTN4 抗体を用いる。野生型と変異型マウスの大脳および小脳の組織標本を作製し、HE染色と Klüver-Barrera (KB) 染色により形態学的評価を行う。

(3) Cntn4 結合蛋白質の探索

Cntn4 蛋白質の発現が確認された発達段階の各組織から膜分画を調製する。この際、野生型と変異型マウスからサンプルを調製し後者をネガティブコントロールとして用いる。抗 Cntn4 抗体を使って免疫沈降を行い、内在性複合体を回収する。SDS-PAGE 電気泳動後、目的とするバンドを切り出しマススペクトル (LC-MS/MS) により各蛋白質のアノテーションを行う。分子量、発現様式などのデータを基にターゲットを絞り込む。候補蛋白質の抗体を入手し、免疫組織染色やプルダウンアッセイなどで結合の可能性を調べる。

(4) Cntn4 ノックアウトマウスの発現プロファイリング

野生型および変異型マウス各3匹の前頭前野 (PFC) と嗅球 (ORF) から RNA を調整する。Illumina 社マイクロアレイ (Mouse WG-6 V2) を用いて遺伝子発現データを取得し2群間で比較する。統計解析による発現変動遺伝子 (プローブ) の抽出を行う。2群間 (野生型 vs 変異型) の有意差検定は、マイクロアレイデータにおける2群間検定に用いられる SAM t-test 法により P 値を算出し、更に Rank Product 法を使用し FDR (偽陽性率) を算出する。2群間で発現変動が見られた遺伝子の一部について qRT-PCR により mRNA の発現量を定量し再現性を確認する。さらに発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析を行い、Cntn4 が発現に関与する経路を類推する。自閉症と統合失調症は異なる疾患であるが、一部のパスウェイを共有している可能性が示されている (Burhach and van der Zwaag, 2009)。そこで、我々が既に作製している統合失調症関連遺伝子 (Grm3 と Gria4) の変異マウスで同様なマイクロアレイ解析を行い、その結果と合わせて解析し両者の共通点を探る。

4. 研究成果

(1) Cntn4 の発現解析

マウス Cntn4 遺伝子 (Cntn4) は25個のエクソンから成り、alternative splicing により2種類の転写物があることが知られていたが、RT-PCR 法によりその発現を調べたところ、大脳・小脳・嗅球で両者が発現していることを確認した。また、抗ヒト contactin-4 抗体 (R&D 社) を用いて Western blotting を行い、相当する分子量の蛋白質発現を大脳・小脳・嗅球で検出した。このことから用いた市販のヒ

ト contactin-4 抗体はマウス contactin-4 をも認識することを確認した。さらに免疫組織化学染色にて大脳での細胞レベルでの発現箇所を検討した。

(2) Cntn4 欠失マウスの作出と表現型の解析
Cntn4 遺伝子のエクソン 4 をネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを構築し、常法に従い ES 細胞への導入し、相同組換え体の選別をサザンブロッティングで行った。組換え ES 細胞をマウス胚盤胞へ導入し、得られたキメラマウスと近交系マウス (C57BL/6J) との交配を行った結果、生殖系列への移行が確認できた。さらにヘテロマウス同士を交配させ、ホモ接合変異体を得ることに成功した。C57BL/6J への戻し交配を継続して行い繁殖を行った。ホモ接合変異体マウスの大脳から蛋白質を抽出しウェスタンブロッティングを行い、Cntn4 の消失を蛋白質レベルで確認することができた。ホモ接合変異体は予想された頻度で生まれ、外見上の明らかな異常がなく、繁殖能力にも問題はみられなかった。生存期間も野生型との差は見られなかった。また、野生型と変異型マウスの脳の組織標本を作製し、HE 染色および KB 染色を行った。両者を比較して、大脳皮質の神経細胞の配列や嗅球を含む神経組織の主な構造に大きな異常を認めなかった。

(3) Cntn4 結合蛋白質の検索

野生型と変異型マウスの大脳から膜分画を調整し、抗 Cntn4 抗体を用いて免疫沈降を行った。SDS-PAGE 電気泳動後、銀染色を行い、野生型と変異型マウスで量的差が見られたバンドを各 23 個切り出し、マススペクトル (LC-MS/MS) により各蛋白質のアノテーションを行った。Cntn4 結合候補蛋白質の抗体を入手し、免疫組織染色を行ったが、発現部位が Cntn4 とは一致せず結合分子の同定には至っていない。

(4) 変異型マウスの網羅的遺伝子発現解析

Cntn4 の機能は不明であるが、ヒトでは自閉症スペクトラム障害症例で コピー数多型・転座・欠失などの Cntn4 遺伝子 (CNTN4) の構造異常が報告されており、この遺伝子の何らかの発現異常が高次脳機能に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで Cntn4 欠損により発現が変動する遺伝子群を抽出するためにマイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。まず、野生型および変異型マウス各 3 匹の大脳皮質と嗅球から RNA を調整し、Illumina 社マイクロアレイ (Mouse WG-6 Beadchip) で解析を行った。その結果大脳皮質において 2 群間で統計的に有意な変動が認められたプローブ ($P < 0.05$) のうち 1.5 倍以上発現変化があるプローブは 85 個、1.3 倍以上の発現変化のあるプローブは 223 個見出された。そのうちのいくつかについてマウスの頭数を増やし qRT-PCR による発現定量を行

ったところ再現性が見られたので、Gene Ontology 解析を行った。その結果、転写に関わる遺伝子群が、野生型マウスに比較して変異型マウスで発現が上昇を示す遺伝子に特異的に集積している事がわかった。一方、嗅球では細胞接着、ストレス応答、摂食行動などに関わる遺伝子群が野生型マウスに比較して変異型マウスにおいて有意な発現低下を示す遺伝子として特異的に集積していた。今後は発現変化の見られた分子の挙動が Cntn4 の欠損とどう関わっているのかを検討することで、Cntn4 の機能解析に繋げられるように研究を発展させたい。

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 7 件)

- ① Torisu H, Iwaki A, Takeshita K, Hiwatashi A, Sanefuji M, Fukumaki Y, Hara T: Clinical and genetic characterization of a 2-year-old boy with complete *PLP1* deletion. *Brain Dev* (査読有) in press.
- ② Suzuki SO, Iwaki T, Arakawa K, Furuya H, Fujii N, Iwaki A: An autopsy case of adult-onset hereditary spastic paraplegia type 2 with a novel mutation in exon 7 of the proteolipid protein 1 gene. *Acta Neuropathol* (査読有) 122: 775-781, 2011
- ③ Matsuoka T, Fujii N, Kondo A, Iwaki A, Hokonohara T, Honda H, Sasaki K, Suzuki SO, Iwaki T: An autopsied case of sporadic adult-onset amyotrophic lateral sclerosis with FUS-positive basophilic inclusions. *Neuropathology* (査読有) 31: 71-6, 2011
- ④ Miura S, Shibata H, Kida H, Noda K, Toyama T, Iwasaki N, Iwaki A, Ayabe M, Aizawa H, Taniwaki T, Fukumaki Y: Partial SPAST and DPY30 deletions in a Japanese spastic paraplegia type 4 family. *Neurogenetics* (査読有) 12: 25-31, 2011
- ⑤ Suzuki N, Aoki M, Warita H, Kato M, Mizuno H, Shimakura N, Akiyama T, Furuya H, Hokonohara T, Iwaki A, Togashi S, Konno H, Itoyama Y: FALS with FUS mutation in Japan, with early onset, rapid progress and basophilic inclusion. *J Hum Genet* (査読有) 55: 252-4, 2010
- ⑥ Tateishi T, Hokonohara T, Yamasaki R, Miura S, Kikuchi H, Iwaki A, Tashiro H, Furuya H, Nagara Y, Ohyagi Y, Nukina N,

Iwaki T, Fukumaki Y, Kira JI:
Multiple system degeneration with
basophilic inclusions in Japanese ALS
patients with FUS mutation. Acta
Neuropathol (査読有) 119: 355-364,
2010

- ⑦ Sagata N, Iwaki A, Aramaki T, Takao K,
Kura S, Tsuzuki T, Kawakami R, Ito I,
Kitamura T, Sugiyama H, Miyakawa T,
Fukumaki Y: Comprehensive
behavioural study of GluR4 knockout
mice: implication in cognitive
function. Genes Brain Behav (査読有)
9: 899-909, 2010

[学会発表] (計5件)

- ① Fujioka R, Nii T, Iwaki A, Kitaichi, K,
Ito I, Shibata A, Nomura M, Hattori S,
Takao K, Miyakawa T and Fukumaki Y.
Molecular mechanisms of behavioral
abnormalities of knockout mice of *Grm3*.
The 34th Annual Meeting of the
Molecular Biology Society of Japan,
2011. 12. 14.
- ② Iwaki A, Sagata N, Aramaki T, Takao K,
Miyakawa T, Kawakami R, Ito I, Kitamura
T, Sugiyama H, Kura S, Tsuzuki T,
Fukumaki Y: Generation and
behavioral analysis of GluR4 knockout
mice. The 56th Annual Meeting of Japan
Society of Human Genetics, 2011. 11. 9.
- ③ Nii T, Fujioka R, Iwaki A, Hattori S,
Takao K, Shibata A, Nomura M, Miyakawa
T and Fukumaki Y. Comprehensive
behavioral analysis of mGluR3 knockout
mice. The 33rd Annual Meeting of the
Molecular Biology Society of Japan,
2010. 12. 08.
- ④ Iwaki A, Suzuki SO, Arakawa K, Furuya
H, Fujii N, Fukumaki Y, and Iwaki T.
Adult-onset spastic paraplegia type 2
with a novel mutation in exon 7 of PLP1:
An autopsy case. 59th Annual Meeting of
the American Society of Human Genetics,
2009. 10. 21.
- ⑤ Nii T, Iwaki A, Sasaki T, Shibata A,
Fukuyoshi Y, Sagata N, Nomura M,
Fukumaki Y. Generation and analysis of
schizophrenia susceptibility
candidate gene *Grm3* KO mice. The 32nd
Annual Meeting of the Molecular
Biology Society of Japan, 2009. 12. 12.

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩城 明子 (IWAKI AKIKO)

九州大学・生体防御医学研究所・講師

研究者番号: 30253454