

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25282242

研究課題名(和文) Neurexinの結合特異性を操作したマウスを用いた自閉症の分子経路の解明

研究課題名(英文) Analysis of Neurexin mutant mice in which binding specificity of Neurexins to the ligands are manipulated to elucidate the molecular pathway responsible for autism.

研究代表者

田淵 克彦 (TABUCHI, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20546767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症関連細胞接着因子Neurexinについて、リガンドであるNeuroiginとの結合の特異性を操作した遺伝子改変マウスを解析することで、Neurexin-Neuroiginの結合を介した自閉症の分子メカニズムの解明を試みた。Neuroiginとの結合が阻害されるNeurexin-3 ss4+型マウスでは、シナプス後膜表面でのAMPA受容体の局在が低下していることを見出した。これは自閉症モデルマウスであるNeuroigin-3 R704Cマウスの表現型と一致することから、NeurexinがNeuroiginとの結合を介した自閉症関連の分子メカニズムであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurexins are pre-synaptic cell adhesion molecules that bind post-synaptic Neuroigin to induce synapse formation and maturation. Both Neurexins and Neuroigin are implicated in autism. We hypothesized that the synaptic defects caused by disruption of Neurexins-Neuroigin interaction may be involved in the molecular pathophysiology of autism. To test this hypothesis, we generated mutant mice of Neurexins that have deficit of Neurexin-Neuroigin binding and analyzed the effect on synapse functions. Neurexin-3 ss4+ knockin mice of which Neurexin-3 lacks binding affinity to Neuroigin decreased the AMPA receptor-mediated synaptic transmission in the hippocampal neurons due to the hyper-internalization of AMPA receptor from the post-synaptic membrane. This phenotype is consistent with that in Neuroigin-3 R704C autism model mice, suggesting that this may be the mechanism caused by impaired Neurexin-Neuroigin interaction associated with autism pathophysiology.

研究分野：神経生理学

キーワード：Neurexin 自閉症 シナプス Neuroigin

## 1. 研究開始当初の背景

Neurexin は、Neurexin-1, -2, -3 の 3 つの遺伝子からなる細胞接着因子で、それぞれの遺伝子は、2 つの独立したプロモーターにより、alpha および beta という 2 つのアイソフォームを産生する。これら Neurexin のタンパク質は、シナプス前終末に局在し、シナプス後終末に局在する別の接着因子 Neuroligin と結合することにより、シナプスの形成および成熟に寄与していることが知られている。近年、Neurexin および Neuroligin の遺伝子異常が、自閉症をはじめとする精神疾患の原因と関係することが知られるようになってきた。我々は、これまでの研究において、自閉症患者から見つかった Neuroligin の遺伝子変異を導入したマウスがシナプス機能の異常をきたすと同時に自閉症症状を再現することを見出した (Tabuchi et al., Science 2007)。我々は現在、Neurexin も Neuroligin 同様、マウスモデルにおいて自閉症を再現するのかどうかを確かめる目的で、遺伝学的に自閉症との関連が指摘されている Neurexin-3 のノックアウトマウスを作成し解析を行っている。Neurexin の第 4 選択的スプライス部位 (ss4) の挿入の有無は、Neuroligin や LRRTM といったシナプス後終末リガンドとの結合特異性を制御することが知られている。ss4 の挿入のあるもの (ss4+) は、Neuroligin や LRRTM との結合親和性が低く、挿入の無いもの (ss4-) は、これらと結合できる。我々は、Neurexin-3 の第 4 選択的スプライス部位のスプライスアクセプター配列に変異を加え、このエクソンが常に Neurexin-3 に挿入されたマウスと、さらにこのエクソンの両端を loxP で挟んで Cre で除去し、常にこのエクソンが挿入されないマウスを作製している。このマウスの ss4+型と ss4-型のシナプス機能を比較して解析することで、Neurexin-3 が Neuroligin や LRRTM など、ss4 の挿入の有無

によって結合が制御されるシナプス後終末リガンドとの結合を介した自閉症の分子経路の解明につながると期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では、Neurexin-3 ss4+および ss4-マウスを用いて、Neurexin と Neuroligin や LRRTM などの結合がシナプス機能に及ぼす影響を解析し、この結合を介した自閉症発症の共通の分子経路を解明することを目的とする。具体的には、下記の項目について研究を行う。

#1: Neurexin-3 ss4(+)および ss4(-)マウスの急性海馬スライスによるパッチクランプ解析 Neurexin-3 ss4(+)および ss4(-)マウスの急性海馬スライスを作成し、パッチクランプ法により Neuroligin などとの結合能の有無が、AMPA 受容体機能に影響を与える効果を明らかにする。

#2: Neurexin-3 ss4(+)および ss4(-)マウスの AMPA 受容体の動態の解析 我々は、これまでに Neuroligin R704C 自閉症モデルマウスにおいて、AMPA 受容体の主要サブユニットである GluR1 の膜表面への移行が障害されていることを見出している。本研究で、Neurexin-3 ss4(+), ss4(-)マウスから分散神経培養を作成し、GluR1 の膜表面・細胞質内移行を免疫組織学的、生化学的に解析して、R704C モデルで見られる GluR1 の異常が、Neurexin との結合を介しているか否かを明らかにする。

上記は当初の目的であるが、これらの研究が予想以上に順調に進んだことから、Neurexin-3 ss4+および ss4-マウスに加えて、かねてより並行して作成していた beta-Neurexin-1, 2, 3 トリプルノックアウトマウス、Neurexin-3 のコンディショナルノックアウトマウス、alpha および beta-Neurexin-1, 2, 3 トリプルノックアウト

トマウスについても解析を行い、研究目的に含めて、より発展した成果を目指すことにした。

### 3. 研究の方法

Neurexin-3 ss4 ノックイン/ノックアウトマウスの作成： Neurexin-3 の第4選択的スプライスエクソンのスプライスアクセプター配列に変異を加え、典型的なスプライスアクセプター配列にして、このスプライスエクソン (ss4) が常に neurexin-3 の mRNA に挿入されるようにし、同時にこのエクソンの前後に loxP 配列を挿入し、Cre 組換え酵素依存的にこのエクソンが除去されるようにしたマウスを作成した。

beta-Neurexin トリプルノックアウトマウスの作成： Neurexin-1, -2, -3 について、beta 特異的エクソンの両端に loxP を挿入したマウスを作成した。

Neurexin-3 alpha/beta コンディショナルノックアウトマウスの作成： Neurexin-3 の alpha と beta の共通の第一エクソンの両端に loxP を挿入したマウスを作成した。

alpha/beta-Neurexin-1, 2, 3 トリプルノックアウトマウスの作成： Neurexin-1, -2, -3 の最終エクソンは、それぞれ alpha および beta-Neurexin 共通で、膜貫通領域からストップコドンにコードする領域と、3' UTR を含んでいる。このエクソンの直前のイントロンと、3' UTR に loxP を挿入したマウスを作成した。

これらの flox マウスの大脳皮質及び海馬から初代培養ニューロンを作成し、レンチウイルスによって Cre 組換え酵素を導入し、ノックアウトニューロンを作成した。また、この状態でレンチウイルスにより、各種 Neurexin のアイソフォームを導入し、レスキューニューロンを作成した。パッチクランプ法により、これらのニューロンから興奮性および抑制

性シナプス後微小電流 (mEPSC および mIPSC)、電気刺激によるシナプス応答 (eEPSC および eIPSC) を記録し、シナプス機能を評価した。また、膜透過性および非透過性状態での AMPA 受容体の蛍光免疫染色により、AMPA 受容体の膜移行性を評価した。更に、これらのマウスから急性脳切片を作成し、パッチクランプ法によりシナプス微小電流や電気刺激による応答を記録し、シナプス機能を評価した。

### 4. 研究成果

Neurexin-3 ss4 ノックイン/ノックアウトマウスの解析：シナプス前終末に局在する自閉症関連シナプス接着因子 Neurexin-3 について、この分子のシナプス間複合体の形成に重要であることが知られている第4選択的スプライス部位 (ss4) の挿入の有無を操作した遺伝子改変マウスを用いて、このシナプス間複合体形成がシナプス機能に及ぼす役割について解析を行った。ss4 の挿入は、Neurexin-3 と、シナプス後部に局在する Neuroligin や LRRTM との結合を阻害するが、ss4 の挿入のある Neurexin-3 のみを発現するマウスの海馬のシナプスでは、電気生理学的に AMPA 受容体機能の低下が認められ、抗体染色により AMPA 受容体の主要なサブユニットである GluR1 のシナプス表面への移行の低下が認められた。また、Neuroligin や LRRTM との結合能を有する、ss4 の挿入がない Neurexin-3 のみを発現するマウスではこの現象がみられなかったことから、シナプス前終末に局在する Neurexin-3 が、シナプス間複合体を介して経シナプス的にシナプス後部の AMPA 受容体機能を制御していることが示唆された (Aoto et al Cell 2013)。さらに、自閉症患者から見つかったアミノ酸変異をノックインした Neuroligin-3 R704C モデルマウスでも同様の異常がみられたことから、この複合体が自閉症の分子病理パスウェイと関係していることも示唆された。

beta-Neurexin トリプルノックアウトマウスの解析: beta-Neurexin のトリプルノックアウトマウスは、マウスの生存への影響はさほどないが、野生型に比較して小さく、繁殖性が低下するため、作成時に挿入した loxP を利用して、大脳皮質神経培養にレンチウイルスで Cre 組み換え酵素を導入することにより、トリプルノックアウトのニューロンを作成した。beta-Neurexin トリプルノックアウトのニューロンは、シナプスの数に異常は見られなかったが、パッチクランプによる電気生理学的解析により、興奮性シナプス微小電流 (mEPSC) の頻度の低下が見られた。抑制性シナプス微小電流 (mIPSC) については変化が見られなかった。電気刺激による応答に関して、トリプルノックアウトでは AMPA 受容体性と NMDA 受容体性の応答に低下が見られたが、GABA 受容体性の応答の低下は見られなかった。内在性カンナビノイド受容体 (CB1R) の遮断薬を培養液に投与すると、トリプルノックアウトの mEPSC の頻度の上昇が見られた。これは野生型コントロールでは見られない現象であり、beta-Neurexin が存在することにより内在性カンナビノイド受容体を介したシグナルが抑えられていることを示唆するものである。また、内在性カンナビノイド受容体のアゴニストである 2-AG を投与すると、トリプルノックアウトでも mEPSC の頻度が低下したことから、beta-Neurexin は、2-AG の産生を阻害することにより内在性カンナビノイドシグナルを抑えていることが示唆された (Anderson et al. Cell 2015)。

Neurexin-3 alpha/beta コンディショナルノックアウトマウスの解析: Neurexin-3 遺伝子全体 (alpha および beta) をノックアウトしたマウスは、殆どのものが生後すぐに致死となるため、作成時に挿入した loxP を利

用して、Neurexin-3 の flox マウスの海馬から神経培養を作成し、レンチウイルスにより Cre 組み換え酵素を導入して Neurexin-3 のノックアウトニューロンを作成し、パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析を行った。Neurexin-3 ノックアウトニューロンの微小電流の頻度は野生型と比較して変化がなかったが、興奮性微小電流 (mEPSC) の振幅が Neurexin-3 ノックアウトにおいて低下が見られた。電気刺激による応答を解析したところ、Neurexin-3 ノックアウトニューロンでは AMPA 受容体性応答の低下が見られたが、NMDA 受容体性応答や GABA 受容体性応答に変化は見られなかった。Neurexin-3 ノックアウトニューロンに第 4 選択的スプライスエクソンを含む Neurexin-3 (ss4+) と含まない Neurexin-3 (ss4-) をレンチウイルスにより導入したところ、Neurexin-3 ss4- のみで AMPA 受容体性応答の低下がレスキューされた。細胞内領域を除去した Neurexin-3 ss4- でも AMPA 受容体性応答がレスキューされたことから、シナプス前終末に局在する Neurexin-3 が、シナプス後部に局在するリガンドとの結合を介して AMPA 受容体機能を制御していることが示唆された (Aoto et al., Nat Neurosci 2015)。

alpha/beta-Neurexin-1, 2, 3 トリプルノックアウトマウスの解析: 小脳顆粒細胞特異的に Cre を発現するマウスと alpha/beta-Neurexin-1, -2, -3 のトリプル flox マウスを掛け合わせると、マウスの成熟に伴って顆粒細胞が細胞死を起し、小脳の萎縮がみられた。顆粒細胞死は、Neurexin トリプル flox マウスの顆粒細胞の培養系にレンチウイルスで Cre を導入しても認められ、これは Neurexin-1 の過剰発現によりレスキューされた。また、この細胞死は BDNF の投与により改善された。BDNF の放出に関わる大型有芯小胞に蛍光ラベルして大型有芯小胞

の放出をモニターしたところ、Neurexin のトリプルノックアウトではこれが低下していたことから、Neurexin のトリプルノックアウトでは BDNF の放出が低下することにより神経細胞死を引き起こしていることが示唆された。

## 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 13 件)

Cao, X. and Tabuchi, K. Functions of synapse adhesion molecules neurexin/neuroligins and neurodevelopmental disorders. **Neurosci Res.** 116:3-9. (2017)

10.1016/j.neures.2016.09.005 (査読有)

Baig, D. N., Yanagawa, T. and Tabuchi, K. Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. **Brain Res Bull.** 129:82-90. (2017)

10.1016/j.brainresbull.2016.10.006 (査読有)

Um, J. W., Choi, G., Park, D., Kim, D., Jeon, S., Kang, H., Mori, T., Papadopoulos, T., Yoo, T., Lee, Y., Kim, E., Tabuchi, K. and Ko, J. IQ Motif and SEC7 Domain-containing Protein 3 (IQSEC3) Interacts with Gephyrin to Promote Inhibitory Synapse Formation. **J Biol Chem.** 291(19):10119-30. (2016)

10.1074/jbc.M115.712893 (査読有)

Uemura, T., Mori, T., Kurihara, T., Kawase, S., Koike, R., Satoga, M., Cao, X., Li, X., Yanagawa, T., Sakurai, T., Shindo, T. and Tabuchi, K. Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain

neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques. **Scientific Reports.** 6:35861. (2016)

10.1038/srep35861 (査読有)

Anderson, G. R., Aoto, J., Tabuchi, K., Foldy, C., Covy, J., Yee, A. X., Wu, D., Lee, S. J., Chen, L., Malenka, R. C. and Sudhof, T. C. beta-Neurexins Control Neural Circuits by Regulating Synaptic Endocannabinoid Signaling. **Cell.** 162(3):593-606. (2015)

10.1016/j.cell.2015.06.056 (査読有)

Aoto, J., Foldy, C., Ilcus, S. M., Tabuchi, K. and Sudhof, T. C. Distinct circuit-dependent functions of presynaptic neurexin-3 at GABAergic and glutamatergic synapses. **Nat Neurosci.** 18(7):997-1007. (2015)

10.1038/nn.4037 (査読有)

Ko, J. S., Pramanik, G., Um, J. W., Shim, J. S., Lee, D., Kim, K. H., Chung, G. Y., Condomitti, G., Kim, H. M., Kim, H., de Wit, J., Park, K. S., Tabuchi, K. and Ko, J. PTPsigma functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4 complex and is essential for excitatory synaptic transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 112(6):1874-9. (2015)

10.1073/pnas.1410138112 (査読有)

Nagaoka, T., Tabuchi, K. and Kishi, M. PDZ interaction of Vangl2 links PSD-95 and Prickle2 but plays only a limited role in the synaptic localisation of Vangl2. **Sci Rep.** 5:12916. (2015)

10.1038/srep12916 (査読有)

Um, J. W., Pramanik, G., Ko, J. S., Song, M. Y., Lee, D., Kim, H., Park, K. S., Sudhof, T. C., Tabuchi, K. and Ko, J. Calsynenins function as synaptogenic

adhesion molecules in concert with neurexins. *Cell Rep.* 6(6):1096-109.

(2014)

10.1016/j.celrep.2014.02.010 (査読有)

Isshiki, M., Tanaka, S., Kuriu, T., Tabuchi, K., Takumi, T. and Okabe, S. Enhanced synapse remodelling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nat Commun.* 5:4742. (2014)

10.1038/ncomms5742 (査読有)

田淵克彦, 張文欣, Asgar, N. F. M. and Pramanik, G. モデルマウスに見るシナプス成熟障害と自閉症との関係. **日本神経精神薬理学雑誌 (Jpn. J. Neuropsychopharmacol.)**. 34:1-4. (2014)

(査読無)

田淵克彦. シナプスと自閉症. **生体の科学**. 65(1):3-6. (2014) (査読無)

Aoto, J., Martinelli, D. C., Malenka, R. C., Tabuchi, K. and Sudhof, T. C. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell*. 154(1):75-88. (2013)

10.1016/j.cell.2013.05.060 (査読有)

[学会発表](計7件)

Katsuhiko Tabuchi: Distortion of the synaptic functions in the microcircuit of the brain in model mice for neurodevelopmental disorders. The 47<sup>th</sup> NIPS International Symposium "Decoding Synapses", 2016年10月26日~2016年10月28日 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

Katsuhiko Tabuchi: Modification of genes associated with synaptic functions in the subpopulation of neurons in mouse brains and the effects on pathophysiology of autism. 第39回日本神経科学大会,

2016年7月22日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

田淵克彦: 微小神経回路におけるシナプス機能の異常と自閉症の病態生理. 3 プロジェクト合同終了シンポジウム「次ステージ機能生命科学の展望」, 2016年3月10日, 岡崎コンフェレンスセンター(愛知県岡崎市)

田淵克彦: Neuroligin自閉症モデルのシナプス機能の解析. 第2回生物学的自閉症研究, 2015年7月10日, 東京大学(東京都文京区)

田淵克彦: Neuroligin-3変異マウスを用いた非症候群性自閉症におけるシナプス異常の研究. 第92回日本生理学会, 2015年3月23日, 神戸国際会議業(兵庫県神戸市)

Katsuhiko Tabuchi: Impairment in Synapse Maturation as a Cause of Autism. International Conference on Emerging Trends in Life Sciences for Sustainable Development, 2014年10月9日, Forman Christian College, Lahore, Pakistan

田淵克彦: Neuroliginモデルマウスに見るシナプス成熟障害と自閉症との関係. 第55回脳の医学生物学研究会, 2013年8月10日, 名古屋大学医学部(愛知県名古屋市)

[その他]

ホームページ等

信州大学分子細胞生理学講座研究内容

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-2seiri/ja/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田淵 克彦(TABUCHI, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号: 20546767