

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21046

研究課題名(和文) シナプスシグナリングの網羅的・定量的解析による自閉症の病態解明

研究課題名(英文) Elucidating of pathogenesis of autism by comprehensive and quantitative analysis of synaptic signaling

研究代表者

江川 純 (Egawa, Jun)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：80648527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：成長円錐のリン酸化プロテオミクスにより同定された神経発達に重要なリン酸化部位が存在する遺伝子のうち、自閉スペクトラム症(Autism Spectrum Disorder; ASD)のリスク遺伝子であるNLGN3を選定し機能解析を行った。NLGN3のリン酸化部位(S745)の分布についてシナプトソームを用いたイムノブロットイングと初代培養神経細胞を用いた免疫組織学的観察を行った結果、このリン酸化が軸索先端およびシナプスの両方で機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ASDの妥当性の高いリスク遺伝子は全エクソーム解析などの網羅的な解析法によって同定された。本研究ではタンパクレベルの網羅的解析であるリン酸化プロテオミクスで同定された神経発達に重要と考えられるリン酸化部位のうちASDのリスク遺伝子に存在するものを選定してそれらの機能についての知見を得ることができた。タンパクレベルの妥当性の高い知見を蓄積することにより、さらに高次レベルの知見を得るための確かな土台となる。このように各レベルで妥当性の高い土台を重ねていくことにより、ASDの病態解明および治療法開発に結び付くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We selected NLGN3, which are risk genes for autism spectrum disorder (ASD), among genes whose phosphorylation sites are important for neurodevelopment identified by phosphoproteomics of growth cones, and performed functional analysis. The distribution of the phosphorylation site (S745) of NLGN3 was subjected to immunoblotting using synaptosomes, and immunohistological observation using primary culture neurons. These findings suggest that phosphorylation may be functional at both the axonal tip and the synapse.

研究分野：発達精神医学

キーワード：自閉スペクトラム症 NLGN3 機能解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder: ASD)は遺伝的要因が発症に強く影響する神経発達障害と考えられている。また、共に一般人口における頻度は約 1%と高く、社会性の障害を伴い社会機能を大きく損なうため、不登校、ひきこもり、ニートなどの社会問題の背景因子となり、放置した場合の社会的損失は甚大である。世界的に ASD の原因遺伝子の網羅的探索が行われ、それぞれ 1000 近いリスク遺伝子が報告されている。しかし、特に分子・細胞レベルの変化を網羅的かつ定量的に解析し、比較する方法がこれまではなかったため、リスク変異による遺伝子の変化が各層レベルの変化を経て認知・行動の変化へつながる過程はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

細胞内シグナル伝達経路のうち最も重要な機構であるタンパクリン酸化に注目した手法であるリン酸化プロテオミクスの分子レベルの網羅的データを利用し、そのリン酸化部位のうち ASD のリスク遺伝子上にある部位を選定した。その部位が存在するリスク遺伝子の機能解析をすることによりそれぞれの疾患に特異的な異常経路を同定し、生物学的治療法の分子ターゲットを明らかにすることが本研究の目的である。

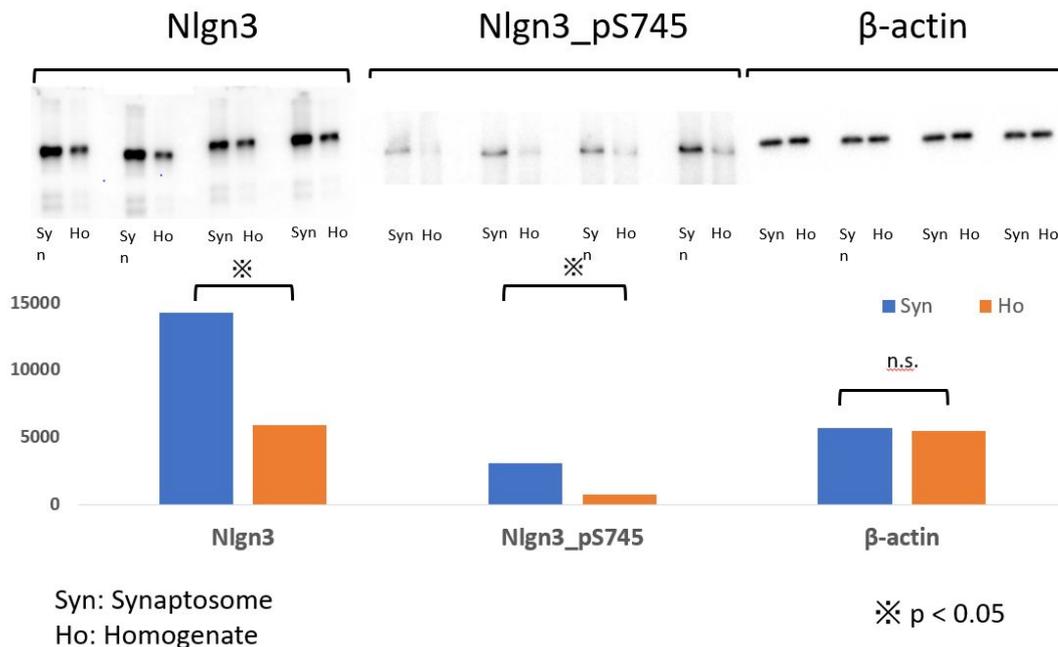
3. 研究の方法

成長円錐のリン酸化プロテオミクスにより同定された神経発達に重要なタンパクリン酸化部位のうち、ASD のリスク遺伝子である NLGN3 遺伝子を選定して機能解析を行った。成体マウス 4 体からそれぞれ別に全脳ホモジネートとシナプトソームを作成し、NLGN3 遺伝子のリン酸化部位の抗体 (pS745 抗体) でイムノプロットングを行った。さらにマウスの初代培養神経細胞を培養 2 日 (軸索および成長円錐を観察するため) および 21 日目 (成熟シナプスを観察するため) で固定して抗 NLGN3 抗体および pS745 抗体で免疫染色を行った。

4. 研究成果

成体マウス 4 体からそれぞれ別に全脳ホモジネートとシナプトソームを作成し、NLGN3 遺伝子のリン酸化部位の抗体 (pS745 抗体) でイムノプロットングを行ったところ、ホモジネートと比較してシナプトソームに強い集積が確認された (図 1)。

図1. Nlgn3リン酸化抗体によるイムノプロットング



マウスの初代培養神経細胞を培養 2 日目で固定した神経細胞において、抗 NLGN3 抗体に比し pS745 抗体で軸索先端は強く染色されていた (図 2)。培養 21 日目で固定した神経細胞は、抗 NLGN3 抗体と pS745 抗体でシナプスが同様に染まっていた。(図 3)

図2. マウス初代培養神経細胞（培養2日目に固定）

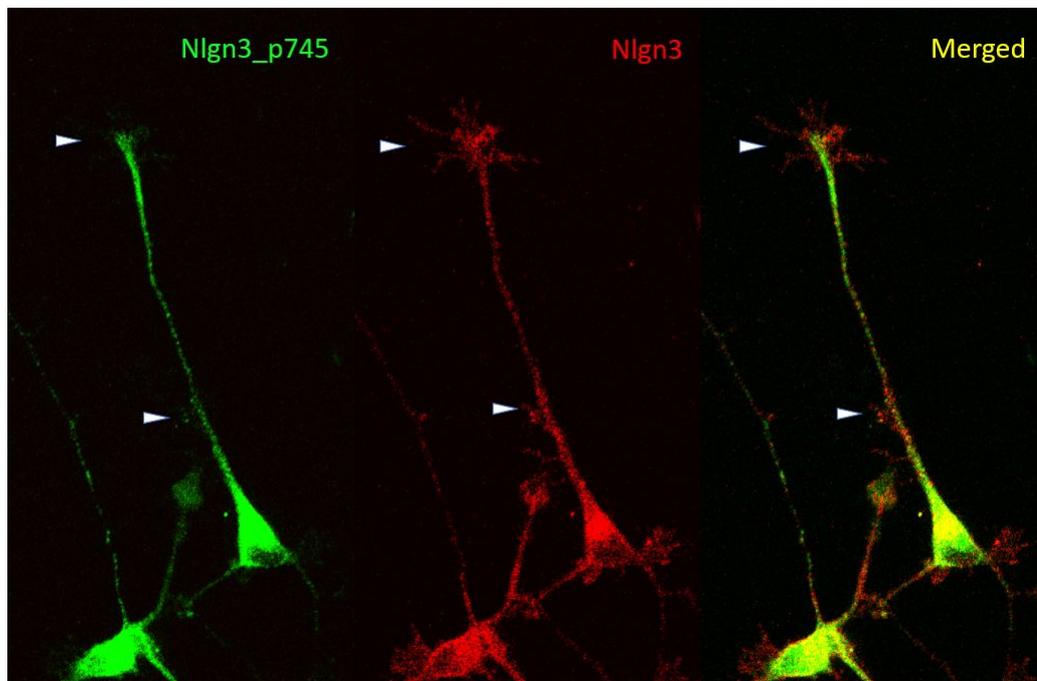
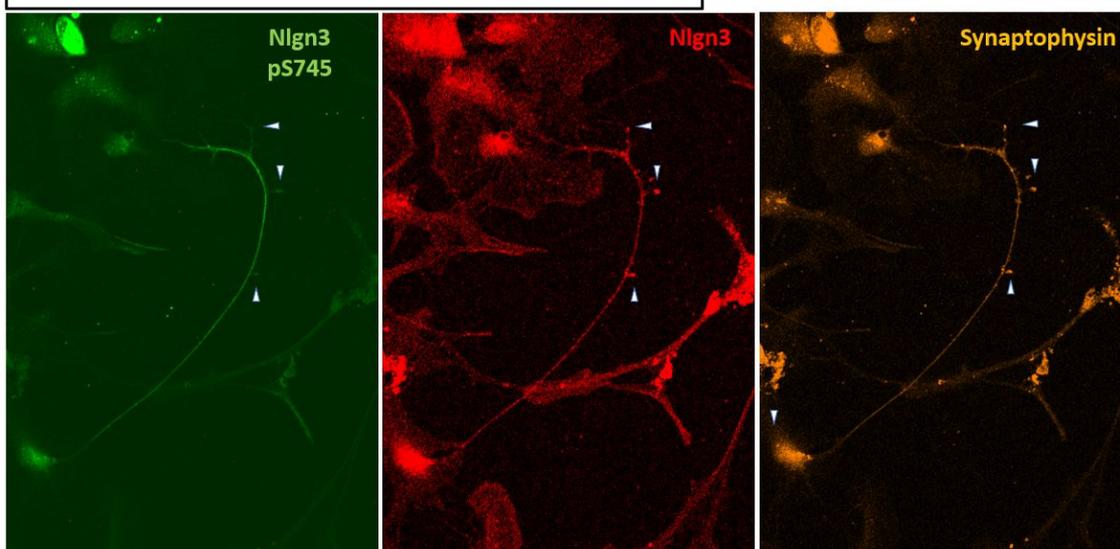


図3. マウス初代培養神経細胞（培養21日目に固定）



以上よりこの pS745 リン酸化 NLGN3 が軸索先端およびシナプスで機能している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kushima I, Aleksic B, Nakatochi M, Shimamura T, Okada T, Uno Y, Morikawa M, Ishizuka K, Shiino T, Kimura H, Arioka Y, Yoshimi A, Takasaki Y, Yu Y, Nakamura Y, Yamamoto M, Iidaka T, Iritani S, Inada T, Ogawa N, Shishido E, Torii Y, Kawano N, Omura Y, Yoshikawa T, Uchiyama T, Yamamoto T, Ikeda M, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Someya T, Watanabe Y, Egawa J, Nunokawa A, Itokawa M, Arai M, Miyashita M, Kobori A, Suzuki M, Takahashi T, Usami M, Kodaira M, Watanabe K, Sasaki T, Kuwabara H, Tochigi M, Nishimura F, Yamasue H, Eriguchi Y, Benner S, Kojima M, Yassin W, Munosue T, Yokoyama S, Kimura R, Funabiki Y, Kosaka H, Ishitobi M, Ohmori T, Numata S, Yoshikawa T, Toyota T, Yamakawa K, Suzuki T, Inoue Y, Nakaoka K, Goto YI, Inagaki M, Hashimoto N,

- Kusumi I, Son S, Murai T, Ikegame T, Okada N, Kasai K, Kunimoto S, Mori D, Iwata N, Ozaki N. Comparative Analyses of Copy-Number Variation in Autism Spectrum Disorder and Schizophrenia Reveal Etiological Overlap and Biological Insights. Cell Rep. 2018 Sep 11;24(11):2838-2856. doi: 10.1016/j.celrep.2018.08.022. PubMed PMID: 30208311.
2. Yu Y, Lin Y, Takasaki Y, Wang C, Kimura H, Xing J, Ishizuka K, Toyama M, Kushima I, Mori D, Arioka Y, Uno Y, Shiino T, Nakamura Y, Okada T, Morikawa M, Ikeda M, Iwata N, Okahisa Y, Takaki M, Sakamoto S, Someya T, Egawa J, Usami M, Kodaira M, Yoshimi A, Oya-Ito T, Aleksic B, Ohno K, Ozaki N. Rare loss of function mutations in N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and their contributions to schizophrenia susceptibility. Transl Psychiatry. 2018 Jan 10;8(1):12. doi: 10.1038/s41398-017-0061-y. PubMed PMID: 29317596; PubMed Central PMCID: PMC5802496.

〔学会発表〕(計1件)

1. <第115回日本精神神経学会 2019.6.20-22. 神戸> ○江川純, 五十嵐道弘, 染矢俊幸: 自閉症リスク遺伝子 Neuroligin3 の機能的リン酸化部位の機能解析.

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：五十嵐 道弘
ローマ字氏名：Michihiro Igarashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。