

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07348

研究課題名(和文) ヒト染色体15q11-q13自閉症領域の責任遺伝子同定と病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of a driver gene for 15q11-q13 duplication syndrome and elucidation of the molecular mechanism

研究代表者

玉田 紘太 (Tamada, Kota)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10550957

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)：染色体15q11-q13の重複(Dup15q)は自閉症スペクトラム障害(ASD)に関連するコピー数変異(CNV)として知られているが、ASD発症の鍵となる遺伝子は不明である。本研究ではマウスの遺伝的手法により、Necdin(Ndn)が父系Dup15q症候群の原因遺伝子であり、行動学的異常、樹状突起スパイン異常の原因となることを明らかとした。また、形態学的解析から核内Ndnが樹状突起スパインの密度/成熟度に重要であることが分かった。Ndnの下流遺伝子を探索するために、過剰発現系に基づく標的核RNA seq法を確立し、高純度の神経細胞核を組織から抽出することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

15q11-q13領域のように、大きな単位で染色体が欠失/重複/転座などの異常が生じる場合、自閉症だけでなく、統合失調症などでもよく見受けられる。しかし、それぞれの染色体領域は往々にして大きなサイズであり、含まれている遺伝子も10個を超えることが多い。そのため、どの遺伝子が鍵となっているかを同定することは困難を極める。このため本研究で行ったような、生物学的根拠をもって1つの遺伝子に絞り込む研究の例は非常に少ない。

研究成果の概要(英文)：Duplication of chromosome 15q11-q13(Dup15q) is known as a pathogenic copy number variation(CNV) associated with autism spectrum disorder(ASD). However, we still don't know a key gene for the pathogenesis for ASD in Dup15q. In this study, we conducted genetic and overexpression screening, and identified Necdin(Ndn) as a driver gene for paternal Dup15q syndrome, resulting in the development of ASD-like behavioral phenotypes and dendritic spine abnormalities in mice. We then tried to evaluate whether nuclear or cytoplasmic Ndn is important for abnormal spine development. We found NLS(Nuclear localization signal) tagged Ndn affected dendritic spine density and maturity as similar to WT-NDN. We next establish in utero electroporation based target nuclei RNA seq to identify the downstream genes of Ndn in cortical neurons. We successfully extract high purity neuronal nuclei from adult cerebral cortex in mice. Our study provides a new insight into the role of Ndn in paternal 15q duplication.

研究分野：神経科学

キーワード：自閉症 Necdin 樹状突起スパイン 15q11-q13 マウスモデル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム症は2-3歳から認められ、男性に多い脳の発達障害と考えられている。双生児研究などから、自閉症は遺伝的素因が強く関与することが明らかとなっている。遺伝的素因には単一遺伝子の変異に加え、より大きな単位、染色体レベルでの欠失や重複などの染色体異常を含む。ヒト染色体 15q11-q13 領域の重複という現象は自閉症者で高頻度に認められる染色体異常である。この重複は母性由来染色体であることがほとんどであることから、Ube3a(母性由来染色体から発現する遺伝子)であると考えられている。一方、近年の研究では父性由来染色体の重複も自閉症のリスクになることが示唆されてきている。しかし、本領域の父性由来染色体発現遺伝子は数が多く、どの遺伝子が重要であるかはわかっていない。そこで、我々はヒト染色体 15q11-q13 の重複をマウスにてモデル化し、父性由来染色体重複マウスの詳細な解析を行ったところ、自閉症様の行動学的異常、セロトニンの減少、あるいは自閉症者の脳で示唆されているシナプスの異常が認められた(Nakatani et al., 2009., Tamada et al., 2010, Isshiki et al., 2014)。しかし、本領域は数 Mb と非常に長い染色体領域であることから、父性由来染色体重複による自閉症誘発に対してキーとなる遺伝子は不明のままである。そこで代表者らは遺伝学的なスクリーニングアプローチをとり、1つの重要な遺伝子の同定を試みた。なお、本研究開始当初の段階では Ndn 遺伝子が自閉症様の行動学的異常、あるいは樹状突起スパイン(シナプス後部)の形成に重要であることを見出だしており、論文として投稿中であった。

### 2. 研究の目的

本研究の最終目的は、Ndn 遺伝子の樹状突起スパイン形成に関わる分子メカニズムを解明することである。そのために、

(1) NDN は極めて多機能なタンパク質であり、細胞内局在も核、細胞質の両方に存在することから、まず核内、細胞質のどちらの NDN が樹状突起スパイン形成に対して重要であるかを明らかにする。

(2) NDN の下流遺伝子を探索することで、既存の樹状突起スパイン形成メカニズムとどのように経路をシェアするのか、あるいは新規のメカニズムがあるのかを明らかにする。

という2点について調べる。

### 3. 研究の方法

(1) 核内/細胞質 NDN の樹状突起スパイン形成への影響

#### ① 核内/外型 NDN 発現ベクターの構築

核内の NDN、細胞質の NDN のどちらが樹状突起スパイン形成に重要かを調べるために、核移行シグナル(NLS)、あるいは核外移行シグナル(NES)を付加した NDN を beta-actin プロモーター下に挿入した発現ベクターを構築した。NLS には SV40 T antigen の配列を、NES には MAPKK の配列を用いた。また、これらの発現ベクターをリポフェクション法にて Cos7 培養細胞に、または子宮内電気穿孔法(IUE; in utero electroporation)により大脳皮質神経細胞に導入した。導入後、NDN に付加した HA タグを認識する抗体を用いて、免疫染色を行い、その評価を行った。

#### ② NDN 過剰発現のための Supernova ベクターの構築と系の確立

樹状突起スパインを正確に測定/解析するには、外来の DNA が密に導入されることなく、ある程度、疎に導入されなければならない。そのため、TRE(テトラサイクリン応答配列)依存的な Flpe による組換えが生じたときのみ GFP により神経細胞が標識される、Supernova 法を用いた。Supernova ベクター(CAG-FRT-stop-FRT-EGFP-ires-tTA-WPRE)のEGFPの上流にHA-NDN-P2A, NLS-HA-NDN-P2A, または NES-HA-NDN-P2A を挿入し、大脳皮質神経細胞を GFP で疎に標識させ、かつ、NDN の核内/外型を発現させるベクターを構築した。

#### ③ 核内型 NDN 過剰発現による樹状突起スパインの定量

②で構築した Supernova ベクターを胎生 15.5 日齢の脳室に注入後、IUE にて遺伝子導入を行った。IUE の条件として、30V パルス、50 msec ON - 950 msec OFF を 1 サイクルとし、4 サイクルの電気パルスを与えた。産後、P21 日齢(3 週齢)にて、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、1晩、後固定を行った。その後、50um の切片を作製し、退色防止剤で封入した。観察には VS120 スライドスキャナーを用いて、GFP 陽性細胞の位置を同定後、FV3000 共焦点レーザー顕微鏡にて樹状突起スパインの画像を取得した。取得した画像を ImageJ で前処理した後、Spiso-3D ソフトウェアにてスパインの密度、ネック長を計測した。

(2) マウス生体脳から高純度核抽出法の検討、および単離した RNA の発現評価

#### ① 生体脳から高純度神経細胞核の抽出法の検討

マウス生体脳から、NDN が過剰発現された神経細胞核のみを抽出するプロトコルの確立を行った。まず、遺伝子導入された細胞核を標識するために、beta-actin プロモーター下流に GFP-3xNLS 断片を挿入したベクターを作製し、その評価を行った。次に生体脳から高純度な核抽出が必要となることから、スクロース密度勾配を用いた方法、イオジキサノール密度勾配を用いた方法などを検討した。評価系としては、直接的に 7-AAD で核を蛍光標識し、顕微鏡による観察と FACS による純度、精製度を検証した。

② qRT-PCR による各種マーカー遺伝子での評価

①の方法により抽出した神経細胞核から RNA を精製し、qRT-PCR により神経細胞核単離の評価を行った。マーカー遺伝子としては、神経細胞のマーカーである Map2, Rbfox3, Syp およびアストロサイトのマーカーである Gfap, Aldh1L1, またオリゴデンドロサイトのマーカーである Olig2 遺伝子を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 核内/細胞質 NDN の樹状突起スパイン形成への影響

作製した発現ベクターをリポフェクション法で培養細胞に、IUE 法でマウス大脳皮質神経細胞に発現させ、NDN 抗体で免疫染色したところ、想定通り、NLS を付加したベクターでは核内に、NES を付加したベクターでは核外に局在することを確認した。一方で、native 型については神経細胞では主に核内に発現していることを確認した。次に形態学的解析を行うために、これらのベクターを IUE-Supernova 法にてマウス大脳皮質神経細胞に発現させた。その結果、極めて疎に神経細胞を標識することができ、1 細胞レベルでの解析が可能であることを示した。また、同時に神経細胞内での NDN の過剰発現、および核内外の局在化も確認できた。in vivo や ex vivo での樹状突起スパインの定量は自動的解析が難しく、手動での補正が必要となるため、非常に時間がかかる。このため、まだ全ての群を解析できていないが、native 型と NLS 型の NDN の過剰発現については解析が完了した。これらの神経細胞の樹状突起スパインの密度、スパインの頭径、ネック長(成熟度に相当)を調べたところ、NLS-NDN では NDN 過剰発現時とほぼ同等の密度、ネック長を示した(図 1)。

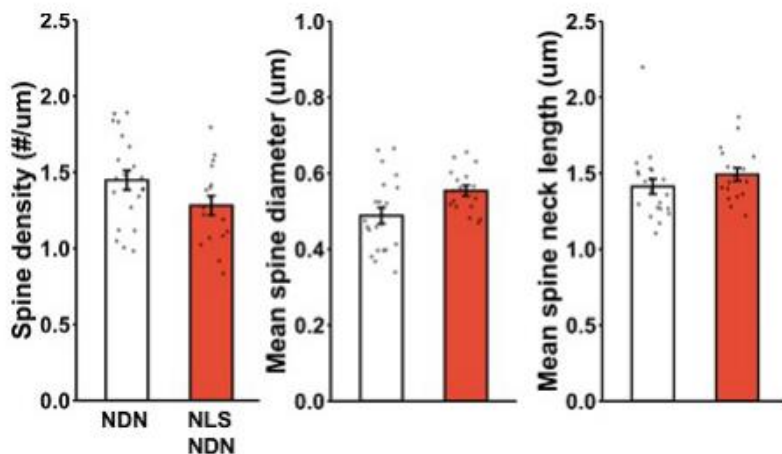


図 1. Spiso-3D を用いた NDN 過剰発現神経細胞の樹状突起スパインの解析

NDN、および NLS-NDN が過剰発現された神経の樹状突起スパインの密度(図中左)、スパインの頭径(図中真ん中)、スパインのネック長(図中右)を調べた。それぞれ NDN は 21, NLS-NDN は 17 本の樹状突起を調べた。統計検定には Welch の t-test を用いたが統計的に有意な差は認められなかった。

##### (2) マウス生体脳から高純度細胞核抽出法の検討、および単離した RNA の発現評価

(1)の実験結果は解析が途中であるものの、1)native 型の NDN を神経細胞に導入したときは主に核内に集積すること、2) NLS 型の NDN は樹状突起スパインの量と成熟度について、native 型と同程度の影響を及ぼす、という 2 点が明らかとなったことから、核内の NDN が樹状突起スパインの量と成熟度について重要と考えられる。そこで核内の NDN が何らかの転写制御に関与するものと想定し、下流遺伝子の同定を検討した。生体内の特定の神経細胞での遺伝子発現を調べるには、標的の核を抽出することが必要となる。そのため、遺伝子導入された神経細胞核を標識するために、beta-actin プロモーター下流に GFP-3xNLS 断片を挿入したベクターを作製し、その評価を培養細胞とマウスの生体脳神経細胞にて行った結果、想定通り、GFP は核内に集積し、極めて強いシグナルをもって核を標識できることがわかった。

次に生体脳から高純度の核を抽出する方法を検討した。核抽出法そのものは様々な手法が既に報告されているが、夾雑物の割合が手法により異なることが予想されたためである。そこで、まず一般的なスクロース密度勾配を用いた方法を用いたところ、核は抽出できたものの、核以外の夾雑物や凝集した核の混在が多数、認められた。そこで、いくつかプロトコルの最適化を行い、最終的にイオジキサノールの密度勾配を用いた方法が極めて高純度に核を抽出できることを明

らかとした。本方法を用いて、GPF-3xNLS 発現ベクターを実際にマウスの生体脳へ IUE 法で導入し、FACS にかけたところ、7-AAD により染色された核のうち、およそ 70%ほどの GFP 陽性細胞核が得られることがわかった(図 2)。

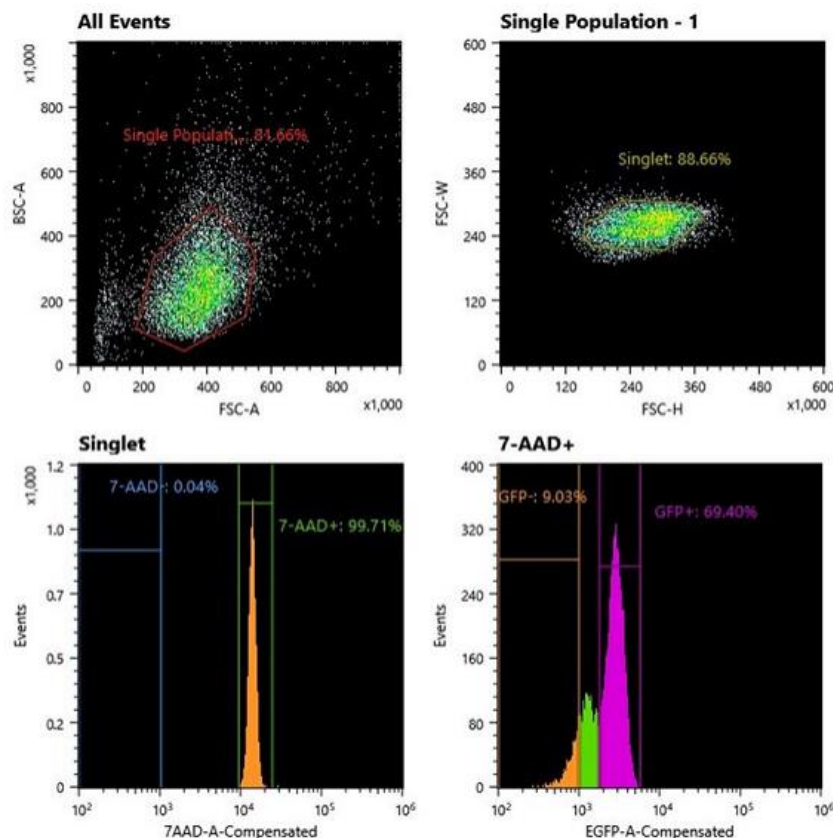


図 2. FACS による GFP 陽性核の選別  
FACS により GFP 陽性細胞核の選別を行った。核の標識には 7-AAD を用いた。採取した核のおよそ 70%ほどが GFP 陽性細胞核であることを見出した。

また、神経細胞核の抽出の精製度を調べるために、マウス生体脳から抽出した核を NeuN で染色し、FACS にかき、NeuN 陽性細胞核 (NeuN+) と陰性核 (NeuN-) を選別し、それぞれ RNA を抽出後、各種マーカー遺伝子による評価を行ったところ、NeuN+ では NeuN- に比べて神経細胞特異的マーカー遺伝子の発現上昇、神経細胞以外のマーカー遺伝子の発現低下が認められた(図 3)。

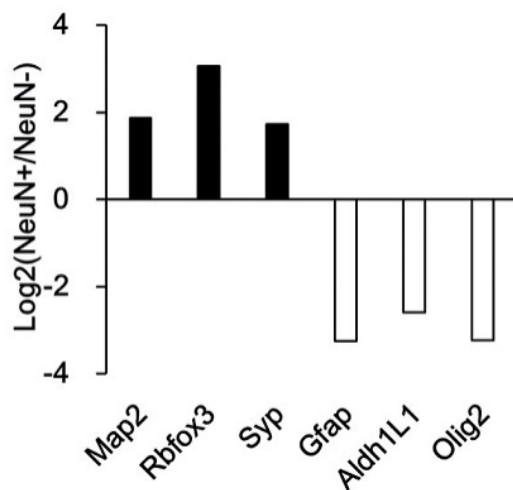


図 3. qRT-PCR を用いた各種マーカー遺伝子の発現による神経細胞核の純度評価  
マウス生体脳より核抽出を行い、NeuN 抗体で染色後、FACS にかき、NeuN+ と NeuN- に分けてソーティングを行い、qRT-PCR により神経細胞核の純度評価を行った。神経細胞特異的マーカーとして、Map2, Rbfox3, Syp、アストロサイトのマーカーとして、Gfap, Aldh1L1、オリゴデンドロサイトのマーカーとして Olig2 の発現を調べた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tamada Kota, Fukumoto Keita, Toya Tsuyoshi, Nakai Nobuhiro, Awasthi Janak R., Tanaka Shinji, Okabe Shigeo, Spitz Francois, Saitow Fumihito, Suzuki Hidenori, Takumi Toru	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in a mouse model of paternal 15q duplications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24359-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kota Tamada, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak Awasthi, Shunji Tanaka, Shigeo Okabe, Francois Spitz, Toru Takumi
2. 発表標題 Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in 15q duplication syndrome
3. 学会等名 Seattle-Kobe Virtual Symposium, The 5th UW-KU International Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kota Tamada, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak Awasthi, Shinji Tanaka, Shigeo Okabe, Francois Spitz, Toru Takumi.
2. 発表標題 Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in 15q duplication syndrome.
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kota Tamada, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak Awasthi, Shinji Tanaka, Shigeo Okabe, Francois Spitz, Toru Takumi.
2. 発表標題 Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in 15q duplication syndrome
3. 学会等名 The 3rd Kobe U - RIKEN BDR Joint Symposiums（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉田 紘太, 福本 景太, 戸谷 豪志, 中井 信裕, Janak R Awasthi, Ruf Sandra, Spitz Francois, 内匠 透
2. 発表標題 モデルマウスを用いた自閉症責任領域15q11-q13におけるリスク遺伝子の同定
3. 学会等名 第13回 自閉症学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kota Tamada, Keita Fukumoto, Tsuyoshi Toya, Nobuhiro Nakai, Janak Awasthi, Shunji Tanaka, Shigeo Okabe, Francois Spitz, Toru Takumi
2. 発表標題 Genetic dissection identified Necdin as a driver gene in 15q11-q13 duplication syndrome
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------