

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 25 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21200011

研究課題名（和文）FOXP2 遺伝子改変マウスを用いた脳構造機能の進化と言語獲得の分子基盤の研究

研究課題名（英文）The mechanisms of language acquisition and evolution of mouse brain in Foxp2-KI mice

研究代表者

桃井 隆 (MOMOI TAKASHI)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40143507

研究成果の概要(和文):FOXP2のR553Hの変異は言語障害の原因であり、進化過程でのヒトFOXP2の2アミノ酸の置換は言語獲得と密接に関連している。Foxp2(R552H)-KIマウスの解析により、ヒト調音(articulation)機能とマウス超音波音声(USV)機能との間にFoxp2を共通基盤が存在することが明らかとなった(PNAS 2008)。本研究はUSV障害のFoxp2(R552H)マウス小脳にヒトFOXP2を発現させたTgマウスを解析し、USVと言語に関与する分子機構の解明を試みた。まず、言語障害をとまなうヒト自閉性疾患のシナプス不全に着目し、小脳が関与する言語障害と関連シナプスとの関係を明らかにした(PLoS One 2012)。また、小脳でFoxp2が発現制御する遺伝子として、自閉性障害の原因遺伝子でもあるCNTNAP2の関与を報告した(Neurosci. Lett. 2012)。小脳発達過程で、USV獲得時期、新たに発現するFoxp2のアイソフォームがプルキンエ細胞の樹状突起形成と関連していること(J. Neurochem. 2012)、Foxp2と結合する蛋白としてPOT1の存在を明らかにした(FEBS Letter 2012)。さらに、プルキンエ細胞に特異的なPcp2/L7プロモーターを用いて、MycTagを付加したヒトFOXP2をFoxp2(R552H)-KIホモマウスを小脳に発現させたTgマウスを解析し、障害の回復を観察した。

研究成果の概要(英文): The phenotype of speech-language disorder segregates as an autosomal dominant trait. One-half the members of the KE family with speech-language disorder have severe articulation difficulties accompanied by verbal and orofacial impairment. A missense mutation (R553H) in the forkhead domain of FOXP2 co-segregates with the affected members of the KE family. We have bridged the gap between the fMRI data and speech-language ability using knock-in mice with the *Foxp2*(R552H) mutation, *Foxp2*(R552H)-KI mice (*Foxp2*-KI mice), which is related to the FOXP2(R553H) mutation (PNAS 2008). *Foxp2*-KI mice exhibit impaired USV communication. *Foxp2*(R552H) increase cerebellar *CNTNAP2* gene expression (Neurosci. Lett. 2012). FOXP2 promotes the nuclear translocation of POT1, but FOXP2(R553H), mutation related to speech-language disorder, partially prevents it. *Cadm1*-expressing synapses on Purkinje cell dendrites are involved in mouse ultrasonic vocalization activity (PLoS One. 2012). We generated transgenic mouse lines (*Pcp2-FOXP2-myc-Tg;FOXP2-Tg*) that specifically express human FOXP2 in Purkinje cells, by using BAC transgenesis of *Pcp2* gene and *Foxp2*(R552H)-KI/*Pcp2-FOXP2-myc-Tg* mice (*Foxp2*-KI/*FOXP2*-Tg) by mating with *Foxp2*-KI mice and examined the effects of FOXP2 on the USV function and Purkinje cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
年度			
年度			
総計	22,500,000	6,750,000	29,250,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) 進化 (2) 言語 (3) 言語障害 (4) Broca (5) FOXP2

1. 研究の背景

ヒト言語障害 (SPCH1) の原因遺伝子である転写因子の KE family 患者は会話以外にも、語彙の記憶、言語の理解、文法の理解に障害があるが、2001年転写因子である FOXP2 遺伝子に FOXP2 (R553H) の変異が、発見された。ヒトは進化の過程で Broca 領域などの言語に関する特殊な脳構造を獲得し、複雑な情報を伝達する言語表現を獲得してきた。FOXP2 はチンパンジーなどの類人猿とは T303N, N325S (タンパク結合に関する Leucine-Zipper と Zinc finger 領域の近傍) の 2 アミノ酸の相違がある (Enard W et al., Nature, 2002)。FOXP2 の DNA 結合領域内の R553H の変異をもち、調音協調運動障害と Broca 領域の不活性化をしめすことから、FOXP2 とヒト言語獲得能力との関係が注目されてきた。しかし、fMRI などのイメージングの手法は活性化領域の特定は可能であるが、領域で実行されている分子機構を明らかにすることはできない。こうした分子機構の理解には、モデル動物を用いての分子生物学的解析が必要である。一方、マウス Foxp2 は、ヒト Foxp2 との相違は、ポリグルタミンのグルタミン残基が 1 つ少ない他、アミノ酸置換が 2 箇所存在する。

仔マウスは超音波領域 (Ultrasonic Vocalization; USV) で母親とコミュニケーションをとることが知られている (Branchi I et al., Behav. Brain Res., 2001)。ヒト言語障害変異に対応する変異 Foxp2 (R552H) ノックイン (KI) マウスは小脳発達障害を示し、生後 1 週間以内は異常を示さないが、その後 USV 障害と行動障害を示し、母親の育児放棄により授乳されず、生後 3-4 週間で餓死する (Fujita E et al., PNAS, 2008)。このよう

に Foxp2 のフォークヘッド領域が持つ転写制御機構はヒト言語とマウス USV に関与しており、脳における共通の分子機構の基盤を形成している。

2. 研究の目的

ヒトの言語能力獲得に必要な脳域として Broca 領域 (言語領域) 特定されている。しかし、ヒト言語獲得の分子機構は不明である。その解明には、非侵襲的な方法による解析とともに分子生物学、生理学アプローチを基礎とした神経回路の解析および言語障害の病因の解析を基盤とした分子機構の解析が必要である。

ヒト型 FOXP2 {Foxp2 (T303N, N325S)} を導入した KI マウスを作成し、USV 機能の変化、遺伝子発現を解析することで、進化の過程で獲得した FOXP2 の 2 アミノ酸置換が共通基盤に与えた言語領域の構造変化、機能変化 (シナプス機能) を解析するとともに、Foxp2 (R552H)-KI (USV 障害) マウスの小脳に、MycTag を付加した正常マウス Foxp2、ヒト FOXP2 を発現させたトランスジェニック (Tg) マウスを用いて、共通基盤である USV (言語) 機能と小脳 (行動機能) との関係解析が可能である。

また、ヒト自閉性障害は言語障害を伴う social communication 異常を呈する。申請者は、自閉性患者 (米国自閉症協会) の中にシナプス接着タンパク RA175/SynCAM1 (CADM1) 遺伝子に H246N, Y251S の変異を発見した (Zhiling Y, et al., 2008)。このことから、自閉性障害にみられるシナプス機能障害を原因とする言語障との関係に注目し、Foxp2 変異 (R552H) がもたらす USV 障害と Cadm1 シナプスとの関係についてモデルマウスを用いて解析をおこなった。

3. 研究の方法

(1) マウス

129/sv 系統の Wild-type、Foxp2 (R552H)-KI マウスを使用した。小脳プルキンエ細胞に特異的に発現させる Pcp/L7 プロモーターを用い MycTag を付加した正常 Foxp2 を発現させたトランスジェニックマウス (Tg) マウスを作製した。C57BL/6J への 10 世代までバッククロスを行なった Foxp2 (R552H)-KI マウスと Foxp2-Tg マウスと交配させたハイブリッドマウスを作製した。なお、マウスの解析には全てオスを使用した。

(2) USV 測定法

生後 10 日目の仔マウスを授乳している母マウスから離し、UltraSound Gate 116 detector set (Avisoft Bioacoustic) を用いて、40-100 kHz の音域を測定した。仔マウスをチャンパーに入れ、1 分後、3 分間の音を測定した。

(3) マイクロアレイ、リアル PCR

マウス (P10) の小脳から Qiagen RNeasy Mini kit を用いて Total RNA を抽出した。Agilent 社製 60 mer カタログオリゴ DNA マイクロアレイ Whole Mouse Genome 4x44K v2 を用いたマイクロアレイを行った。

(4) 小脳抽出液の調整

マウス発達過程の小脳を用いて、核分画と細胞質分画を調整した。組織 (5 検体) をその質量の 3 倍量の細胞質抽出バッファー [10 mM HEPES (pH 7.6), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL CA630, protease inhibitors] でシリンジを用いてホモジナイズし、氷上に 30 分間置いた後、遠心 (12000rpm, 30 分間) し、その上清を細胞質分画とした。ペレットは細胞質抽出バッファーと等量の核抽出バッファー [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, protease inhibitors] で再度懸たくし、氷上に 30 分間放置後、遠心 (12,000rpm, 4°C, 30 分間) し、その上清を核分画とした。得られた抽出物はタンパク定量後 SDS-PAGE 電気泳動により分離した。

(5) イムノブロット

10% アクリルアミドゲルにて電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後、ニトロセルロースフィルターに転写した。フィルターは、ブロッキング緩衝液 (0.1% TritonX-100, 0.5% スキムミルクを含む PBS 溶液) によりブロッキングし、同溶液で希釈した 1 次抗体溶液と反応 (4°C) させた。3 回洗浄後、2 次抗体反応を行った後、0.1% TritonX-100 を含む PBS 溶液で 3 回洗浄した。バンドの検出はアルカリホスファターゼ反応により行った。フィルターと発色液 [100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ 10 ml に対し発色基質

50 μg/ml NBT)、50 μg/ml BCIP を各 8 μl 加えた溶液] を反応させ、発色が見られた後、蒸留水により洗浄し、反応を停止させた。

(6) 細胞、組織染色法

COS 細胞を 2% パラホルムアルデヒドを含む PBS にて固定した。マウス発達過程 (E17, P0, P1, P2, P4, P10, P22) を 4% パラホルムアルデヒド/PBS により灌流固定を行った。その後脳を摘出し、4% パラホルムアルデヒドを含む PBS に浸した後、30% スクロースを含む PBS に置換した。組織を凍結組織包埋剤である OCT コンパウンドに包埋した。さらに包埋したブロックをクリオスタット (CM3000, Leica) により厚さ 10 μm で薄切しスライドガラスに貼りつけ、免疫染色に使用した。

固定細胞および凍結薄切片を PBS に浸し OCT コンパウンドを洗い流した後、ブロッキング緩衝液に 30 分間反応させ、1 次抗体を反応 (4°C、一晚) させた。1 次抗体はヤギ anti-Foxp2N (Santa Cruz)、ウサギ anti-Foxp2C (Abcam)、ウサギ anti-CNTNAP2 (Abcam)、マウス anti-calbindin (Sigma)、ヤギ anti-CTBP (Santa Cruz) を使用した。マウス、ウサギおよびヤギに対する二次抗体として Alexa488, 596 イムノグロブリン抗体を用い、核染色には Hoechst33346 を用いた。観察は蛍光顕微鏡 (AF6000, Leica) で行った。

4. 研究成果

自閉性障害の原因遺伝子 Cadm1 を欠損した Cadm1-KO マウスでは、Foxp2 (R552H)-KI マウス同様、USV 障害を示すことが明らかとなり、Cadm1 シナプスが Foxp2 による言語機能に密接に関係していることが示唆された。

小脳発達過程で、フォークヘッド領域を欠損する Foxp2 のアイソフォームがプルキンエ細胞の樹状突起形成や USV 機能の獲得と対応して、生後 2-10 日に一過性に発現し、樹状突起形成に発現することが明らかとなった (J. Neurochem. 2012)。また、酵母 two-hybrid 法と免疫沈降法を用いて、Foxp2 と結合する蛋白として POT1 の存在を明らかにした (FEBS Letter 2012)。

正常マウス、Foxp2 (R552H)-KI マウスと Foxp2-Tg マウスと交配させたハイブリッドマウスを作製し、USV、行動機能、致死の回避などを比較解析した。その結果、ホモ仔マウスでは FOXP2 を小脳に発現させてただけでは、母親の育児拒否による餓死を防ぐことはできなかったものの、USV 障害についてはヘテロマウスおよびホモマウスで USV の回復が認められた。さらに小脳プルキンエ細胞の発

達と dendrocyte 形成について、カルビンジエン、シナプトフィシン、受容体の抗体を用いて、免疫染色解析を行ったところ、小脳発達不全についても回復傾向を示した（投稿中）。

Foxp2 (R552H)-KI マウスおよび正常マウス脳で発現する遺伝子について解析し、Foxp2 が制御する USV (言語) 関連遺伝子の候補を 5 つ見出し、関連遺伝子の確認に免疫染色、プルダウン解析、免疫沈降などの生化学的、細胞分子生物学的手法を用いて行なった。

その一つは、自閉性障害の原因遺伝子である CNTNAP2 の mRNA が Foxp2 (R552H)-KI マウスで増加していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等（研究代表者には下線）
〔雑誌論文〕（計 5 件）査読あり。

- ① Fujita E, Tanabe Y, Momoi MY, and Momoi T. Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. *Neurosci Lett*. 2012;506:277-280.
- ② Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum. *J Neurochem*. 2012;123:886-894.
- ③ Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. Cadm1-expressing synapses on Purkinje cell dendrites are involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *PLoS One*. 2012;7:e30151.
- ④ Tanabe Y, Fujita E, Momoi T. FOXP2 promotes the nuclear translocation of POT1, but FOXP2(R553H), mutation related to speech-language disorder, partially prevents it. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;410:593-596.
- ⑤ Momoi T, Fujita E, Senoo H, Momoi MY. Genetic factors and epigenetic factors for autism: endoplasmic reticulum stress and impaired synaptic function. *Cell Biol. Int*. 2009;34:13-19.

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 田辺裕子、藤原裕士、松崎鮎美、笠原忠、湯浅茂樹、桃井隆、藤田恵理子；マウス

小脳発達過程におけるフォークヘッドドメインを欠いた Foxp2 アイソフォームの発現と局在の解析、第 35 回日本分子生物学会、福岡、2012 年 12 月 12 日、

- ② 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真子；Catnap2 expression in the cerebellum of the Foxp2(R552H) mice, with mutation related to the speech-language disorder、第 34 回日本分子生物学会年会、横浜、2011 年 12 月 14 日
- ③ 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子；自閉性障害候補遺伝子 CADM1 ノックアウトマウスにおける超音波音声、第 34 回日本神経科学大会、横浜、2011.09.15
- ④ Momoi T. Future Trends in the Biology of Language・The impaired Purkinje cell development in the Foxp2(R552H)-KI mice, linkage to autism spectrum disorder, 2011. 慶應義塾大学グローバル COE プログラム、2011 年 3 月 9 日
- ⑥ Fujita E、Tababe Y、Fujiwara Y、Momoi MY、Momoi T；Ultrasonic vocalization of the knock-in mice with mutated Foxp2 related to speech-language disorder and normal Foxp2 expressed in Purkinje cells. *Neuroscience2009*、名古屋、2009 年 9 月 18 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桃井 隆 (MOMOI TAKASHI)

国際医療福祉大学・保健医療学部 教授

研究者番号：40143507

(2) 研究分担者

桃井 真里子 (MOMOI MARIKO)

自治医科大学 医学部 教授

研究者番号：90166348

神保 恵理子 (JINBO ERIKO)

自治医科大学 医学部 講師

研究者番号：20291651

(3) 連携研究者

なし