

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31日現在

機関番号：34310

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800081

研究課題名（和文） Neuroigin 変異を持つ自閉症モデルマウスのシナプス機能異常の解明

研究課題名（英文） Studies of impaired synaptic functions in autism model mice that express a mutant neuroigin

研究代表者

江頭 良明 (EGASHIRA YOSHIHIRO)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号：80582410

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、自閉症患者から見つかったシナプス接着因子 *neuroigin* の1アミノ酸変異を再現したノックインマウス、及び野生型マウスにおいて RNA 干渉により *neuroigin* をノックダウンした神経細胞で、シナプス機能を電気生理学的に解析した。体性感覚野での解析から、*neuroigin* の点変異とノックダウンのいずれにおいても、興奮性シナプス入力と抑制性シナプス入力のバランスが崩れることが明らかとなった。また、海馬での解析からは、ノックインマウスにおいて長期増強現象の後期相が選択的に消失していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this research project, I studied the synaptic functions electrophysiologically in mutant mice that possess a single amino acid mutation of a synaptic adhesion molecule *neuroigin* that was found in human autism patients as well as in wild type neurons in which *neuroigin* expression was suppressed by RNA interference. In the somatosensory cortex, both single amino acid mutation and knock-down of *neuroigin* led to an imbalance between excitatory and inhibitory synaptic inputs. Moreover, it was found that the late phase of long-term potentiation in the hippocampus was selectively impaired in the knock-in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：自閉症・シナプス接着因子・*neuroigin*・*neurexin*

1. 研究開始当初の背景

(1) 自閉症は、社会的相互作用やコミュニケーション能力の障害を特徴とする神経発達疾患である。その具体的症例は大変多岐にわたるものの、原因は遺伝学的素因と深い関係があることが指摘されてきた。2003年に

Bourgeron らのグループによって、X 伴性遺伝が見られるスウェーデンの自閉症家系から *neuroigin* 遺伝子の変異が同定されると、その後の自閉症患者の大規模なスクリーニングでも、*neuroigin* とその関連タンパクをコードする遺伝子の部分欠損が次々と見出

された。これは、自閉症が neuroligin という特定分子の異常に起因している可能性を示す大変センセーショナルな発見であった。

(2) neuroligin は、ポストシナプスに局在する細胞接着因子で、プレシナプスに存在する neurexin と結合する。これまでの研究から、neuroligin/neurexin の相互作用は正常なシナプス機能の発現に必須であることが示されているため、自閉症病態の最小構成単位はシナプス機能の異常にあるのではないかと予想される。そこで田淵克彦（生理研准教授）らは、自閉症家系から最初に発見された、neuroligin-3 の 451 番目のアルギニンがシステインに置換された変異（以下 R451C）を再現したノックインマウスを作成し解析した。その結果、この neuroligin-3 R451C ノックインマウスは、行動レベルでは社会的相互作用の低下という自閉症類似症状を示すとともに、細胞レベルでは体性感覚野の抑制性シナプス機能の亢進という異常を示すことが明らかとなった。さらに興味深いことに、このノックインマウスは高い空間学習能力を示した。これは、一部の自閉症患者に見られる、特定の物事に対し驚異的な記憶力を持つ症例（サヴァン症候群）を連想させ、記憶の細胞基盤と考えられるシナプス可塑性と自閉症病態との関連を示唆する。

(3) 以上の知見から、自閉症の神経的基盤として、neuroligin の異常にともなう「興奮性シナプスと抑制性シナプスの活動不均衡」が脳皮質において生じていること、また記憶の座といわれる海馬において「シナプス可塑性異常」が生じている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

すでに自閉症様病態が報告されている neuroligin-3 R451C ノックインマウスと、新たに家族性の自閉症患者から見つかった neuroligin-3 の R704C 変異（704 番目のアルギニンがシステインに置換された変異）を導入したノックインマウス（以下 neuroligin-3 R704C マウス）をモデルとして、neuroligin 変異による自閉症様病態の原因として、「興奮性シナプス応答と抑制性シナプス応答の不均衡」と「シナプス可塑性異常」があると仮説の検証を電気生理学的・形態学的に行う。これにより、自閉症病理をシナプスレベル、さらには分子レベルで理解することを目的として、本研究計画を立案した。

①第一の仮説「興奮性シナプス応答と抑制性シナプス応答の不均衡」については、R451C マウスのバレル皮質においてすでに実証されている。そこで、R704C マウスの同領域で

も同様の異常が見られるかどうかを調べる。neuroligin-3 のノックアウトマウスの解析では、そのような変化は見られないことが分かっているため、R451C 変異によるシナプス活動の不均衡は、neuroligin-3 の loss of function によるのではなく gain of function によるものと想定されている。しかしながら、無数に存在するシナプス関連分子の中のいずれに作用して、シナプス異常を付加したのかなど、不明な点が多い。R451C と R704C という異なる変異 neuroligin-3 について、シナプスの機能的及び形態的表現型を比較検討することで、どのような gain of function が起きているのか、またその様式は両者で同一のものなのかという点の検証を目指す。また、neuroligin-1 や 2 といった他のアイソフォームを in vivo でノックダウンした際の興奮性・抑制性バランス (e/i バランス) についても検討する。neuroligin-1 及び 2 はそれぞれ興奮性、抑制性シナプスの形成・維持に必要とされている。したがって、これらのアイソフォームの欠損により e/i バランスに異常が見られた場合、neuroligin の loss of function による効果といえる。これらとの比較により、neuroligin-3 変異による表現型の分子基盤について考察することを目的とする。

②第二の仮説「シナプス可塑性異常」については、R451C マウスの海馬 CA3-CA1 シナプスにおいて解析する。まずは、長期記憶の細胞過程と考えられている long-term potentiation (LTP: 長期増強) の成立または持続に異常がないかどうかを検証する。もし LTP に異常が見られなければ、post tetanic potentiation や short-term depression といった短期可塑性についても検討する。これにより、行動レベルで明らかとなった空間学習能力の変化に対し、細胞レベルでのメカニズムを提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) neuroligin-3 R704C マウスの脳について、「興奮性シナプスと抑制性シナプスの活動不均衡」が生じていないかどうかを調べるために、生後 2 週齢のマウスから作成したバレル皮質のスライス標本に対しホールセルパッチクランプ法を適用し、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) と微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) をそれぞれ測定する。野生型マウスとの比較から特定された異常なシナプスについては、電子顕微鏡観察によってシナプス微細形態及び受容体の分布や密度を正確に調べる。

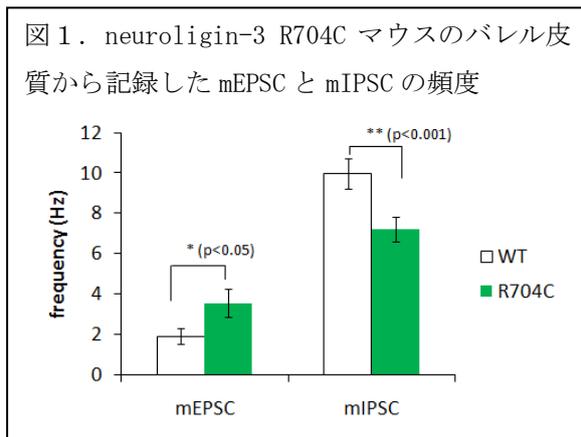
(2) 「シナプス可塑性異常」がないかどうかを調べるために、neuroligin-3 R451C マウスから作成した海馬スライスで、細胞外記録法によって LTP を測定する。可塑性に異常があれば、電気生理学的測定を終えたスライス標本の CA1 領域から lysate を作成し、受容体のリン酸化レベルを定量的ウエスタンブロット法により評価する。

(3) in vivo で neuroligin をノックダウンするために、in utero electroporation 法によって shRNA コンストラクトを導入する。遺伝子導入できた個体について、生後 2-3 週齢で (1) と同様にバレル皮質のスライスを作成し、パッチクランプ法により電気生理学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) neuroligin-3 R704C マウスのバレル皮質第 2・3 層の錐体細胞から mEPSC 及び mIPSC を記録したところ、野生型マウスに比べ mEPSC の頻度が増加している一方で、mIPSC の頻度が減少していることがわかった (図 1)。

図 1. neuroligin-3 R704C マウスのバレル皮質から記録した mEPSC と mIPSC の頻度



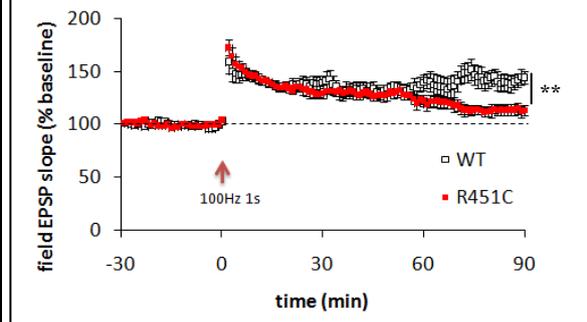
mEPSC、mIPSC ともに振幅には変化が見られなかったため、頻度の変化はシナプスの数の変化を反映していると考えられる。つまり、R704C マウスの大脳皮質では、興奮性入力が増加し、逆に抑制性入力が増加しており、e/i バランスが大きく損なわれていると予想される。

実はこの R704C の表現型は、すでに報告されている R451C マウスの表現型とは異なっている。R451C マウスでは、mEPSC の頻度は変わらず、mIPSC の頻度のみが増加しているという結果であった。自閉症患者から見つかった neuroligin-3 の変異という点では同じでも、変異の部位が違うことで、神経細胞レベルで見られる異常は全く異なることが分かる。つまり、一口に自閉症といっても、細胞病態の上では一様ではないことが予想される。

また、同部位で、シナプスの放出確率の指標となる paired pulse ratio やグルタミン酸受容体である AMPA 受容体と NMDA 受容体の存在比を調べたが、これらの指標には野生型との間で差は見られなかった。以上を考え合わせると、R704C の大脳皮質の神経細胞では、個々のシナプスの機能は正常であるが、シナプスの総数が増加しており、全体の e/i バランスが崩れていると言える。

(2) neuroligin-3 R451C マウスの海馬 CA3-CA1 シナプスで、100Hz 1s という高頻度刺激による LTP を測定した。野生型のマウスでは、60 分以上にわたってシナプス伝達強度 (fEPSP) の持続的増強が見られたが、R451C では、高頻度刺激後しばらくは増強が見られるものの、60 分以降は減衰していくのが見られた。90 分の時点で比較すると、R451C での増強は野生型に比べ有意に小さいことが分かる (図 2)。

図 2. neuroligin-3 R451C マウスの海馬から記録した LTP



LTP には AMPA 受容体のリン酸化や表在化によって成立する初期相とタンパク質の合成を必要とする後期相が存在することが知られている。後期相の誘発には、100Hz 1s などの刺激を複数回繰り返す方法が一般的だが、今回の実験条件では、野生型においては、1 回の高頻度刺激で LTP 後期相が誘発されている。それに対して R451C では、その後期相が選択的に消失しているように見える。R451C マウスでは空間学習能力が向上しているという行動解析の結果と合わせて考察すると、R451C の海馬では、記憶の固定化・維持に関わるとされる LTP 後期相に必要なシグナル因子が常に活性化されているのではないかと考えられる。今後、CREB や ERK といったシグナル因子の発現量やリン酸化レベルを定量的に解析したい。

(3) neuroligin-1 と 2 に対する shRNA を in utero electroporation によって大脳皮質 2・3 層に導入し、遺伝子導入された錐体細胞

胞群 (shNL1 または shNL2) と導入されていない control 群から電気生理学的測定を行った。neuroigin-1 をノックダウンすると mEPSC の頻度が増加する傾向が見られたが、振幅には差は見られなかった (図 3)。neuroigin-2 をノックダウンすると、mIPSC の頻度・振幅ともに減少した (図 4)。

図 3. neuroigin-1 をノックダウンしたバレル皮質の錐体細胞から記録した mEPSC の頻度と振幅

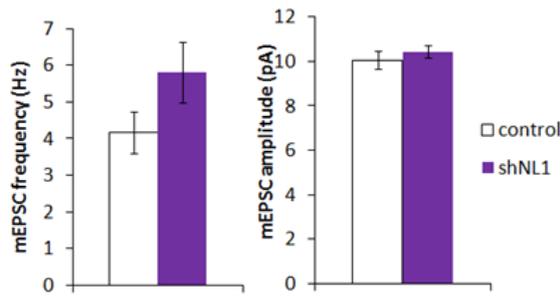
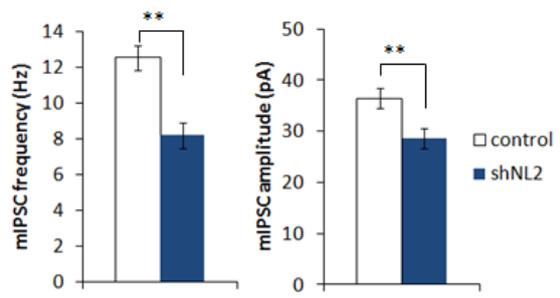


図 4. neuroigin-2 をノックダウンしたバレル皮質の錐体細胞から記録した mIPSC の頻度と振幅



また、neuroigin-1 をノックダウンすると、paired pulse ratio が有意に増加する、すなわち伝達物質の放出確率が減少することが分かった。

neuroigin-1 が興奮性シナプスの形成に、neuroigin-2 が抑制性シナプスの形成に重要な働きをするという以前の報告と、上記の結果はよく対応しており、neuroigin の異常が e/i バランスを崩すという仮説をより強調する。しかし、R451C や R704C といった neuroigin-3 の点変異体とは、その作用点が異なっている。同じ neuroigin の分子異常でも、アイソフォームや変異の部位によって、細胞レベルでの表現型が異なるという事実は、自閉症の細胞病理を理解する上で、重要な知見となるだろう。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江頭 良明 (EGASHIRA YOSHIHIRO)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号 : 80582410