

研究報告書

「精神発達障害原因解明のための Neuroligin/Neurexin モデルの確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 田淵 克彦

1. 研究のねらい

自閉症は、社会的相互作用の障害、コミュニケーションの障害、興味の範囲と行動の著しい限局性を特徴とする精神発達障害である。罹患率は年々増加傾向にあるが(近年の統計では 100 人に 2 人以上というものもある)、原因が不明であるため、診断のためのバイオマーカーや根本的治療法は存在せず、社会問題として認識されるようになってきた。原因として、以前より遺伝学的素因との関係が指摘されてきたが、必ずしもメンデル型遺伝をするわけではなく、同一家系の患者同士でも症状が異なることが多いことから、自閉症の多くは、複数の遺伝子異常の総合的結果によって引き起こされる(多因性遺伝性)と考えられている。このため、特定の遺伝子に焦点を絞って原因解明のための研究を行うことが困難であった。我々は以前の研究において、自閉症の患者から発見されたシナプス接着因子 Neuroligin-3 の単一アミノ酸置換変異(R451C 変異)を導入したノックインマウスを作成し、解析を行ったところ、このマウスで自閉症様行動異常が再現されることが確認された。これは、Neuroligin-3 遺伝子の変異が単独で自閉症を起こし得ることを世界で初めて示したものである。また、このマウスでは大脳皮質の抑制性シナプス機能の亢進が認められたが、シナプス以外での異常が認められないことから、シナプス異常が自閉症発症の最小構成要素ではないかと考えるに至った。近年、自閉症患者からの遺伝学的スクリーニングにおいて、Neuroligin のシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子異常も頻繁に報告されるようになってきた。これらのことから、Neuroligin と Neurexin の結合がシナプス機能獲得に果たす役割およびその破綻が引き起こす病態を研究することは、自閉症の原因解明につながるのではないかと考えた。本研究では、Neuroligin および Neurexin の、自閉症およびシナプス機能に関連した変異マウスを作成し、これらのシナプス機能を解析して自閉症の原因解明を目指すと同時に、これらのマウスを自閉症のモデルマウスとして評価・確立することをねらいとする。

2. 研究成果

(1) 概要

自閉症モデルとして、以前作出した neuroligin-3 R451C KI マウスに加え、Neuroligin の細胞内領域の 1 アミノ酸変異を導入した neuroligin-3 R704C KI マウス、Neuroligin の結合相手である Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定することが知られている Neurexin-3 の第 4 選択的スプライス部位(ss4)の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを新規に作出した。

neuroligin-3 R451C KI マウスの海馬でのシナプス機能を解析し、LTPの増強、AMPA 受容体機能に対する NMDA 受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進を検出した。これらは幼若なシナプスの特徴であり、シナプスの成熟異常が自閉症の病態モ

デルの一つである可能性を見出した。また、neuroligin-3 R704C KI マウスのシナプス機能を解析し、海馬で AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。

neuroligin-3 KO マウスのシナプス機能を解析し、AMPA 受容体機能が選択的に低下していることを見出した。neuroligin-3 ss4 KI ニューロン (Neurocligin との結合不全型) でも同様の結果を得たが、ss4 KO ニューロン (Neurocligin との結合可能型) では AMPA 機能は正常であった。このことから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が、Neurocligin と結合することにより経シナプ的にシナプス後終末の AMPA 受容体機能を制御していることを見出した。

Calsyntenin ファミリータンパク質が、Neurexin を介したシナプス誘導に関わっていることを新たに見出した。Calsyntenin は Neurexin と直接結合はしないが、複合体を形成して興奮性、抑制性の両方のシナプス前終末を誘導することを見出した。

Neurexin のシナプスでの機能発現のメカニズムを解明する目的で、Neurexin の細胞内領域の構造機能解析を行った。NMR および円偏光二色性スペクトルにより、この領域は天然変性タンパク質の構造を呈し、静電学的に PI(4,5)P2 と結合し、これは PKC による Neurexin のセリンリン酸化によって解除されることを見出した。また、この領域が AP2 タンパク質と結合することを見出した。PKC シグナルが、AP2・PI(4,5)P2 複合体を介した Neurexin のエンドサイトーシスや下流遺伝子の転写を制御している可能性を考え、解析を継続している。

(2) 詳細

研究テーマA「細胞外領域にアミノ酸変異のある Neurocligin 自閉症モデルの海馬のシナプス機能の解析」

Neurocligin-3 の細胞外領域のアセチルコリンエステラーゼ様ドメイン内にアミノ酸置換変異のある自閉症変異を導入したノックインマウス (neuroligin-3 R451C KI マウス) では、社会的相互作用の障害と、空間学習記憶能力の亢進がみられ、大脳皮質では GABA 受容体機能が亢進がみられる。今回、このマウスに GABA 遮断薬を投与し、GABA 受容体機能の亢進を軽減したところ、社会的相互作用の障害が正常化した。このことから、この変異による GABA 受容体機能の亢進が社会的相互作用の障害の原因になっている可能性を見出した。また、このマウスにおける空間学習能力の亢進の原因についても未解明であったため、海馬のシナプス機能の解析を行った。電気生理学的解析により、このマウスの海馬の錐体ニューロンでは LTP の増強がみられ、NMDA/AMPA 応答比が上昇していた。更に、NMDA 受容体のサブユニット構成が NR2B 優位になっていることも見出した。海馬錐体ニューロンのシナプスの成熟過程において、幼若なシナプスでは NMDA 受容体が AMPA 受容体に先立ってシナプス後膜に挿入されるが、このときの NMDA 受容体は NR2B が主体であり、成熟するに従って NR2A サブユニット主体に置き換わり、同時 AMPA 受容体も挿入されることが知られている。他のグループの NR2B の過剰発現マウスでは、シナプスの可塑性が亢進し、空間学習記憶能力の亢進がみられることから、本自閉症モデルマウスでは、Neurocligin-3 の R451C 変異

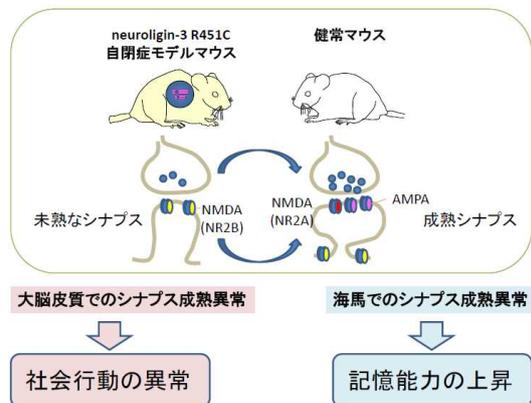


図1. シナプス成熟異常による自閉症の病態モデル

によりシナプスの成熟が妨げられ、本来発達に伴って獲得すべき社会的相互作用に障害をきたすと同時に、単純な学習記憶能力が亢進するという自閉症の病態を引き起こしているのではないかと結論付けた(図1。論文1及び未発表の内容)。これは当初計画していた研究内容であり、シナプス機能の解析および自閉症の病態モデルを導き出す目標が達成できた。

研究テーマB「細胞内領域にアミノ酸変異のある Neuroligin 自閉症モデルの開発」

自閉症患者から発見された、Neuroligin の細胞内領域のアミノ酸変異(R704C 変異)の、シナプスおよび自閉症の病態に及ぼす影響を、細胞外領域の変異(R451C)と比較検討する目的で、この変異を有するノックインマウス(neuroligin-3 R704C)を作成し、解析を行った。このマウスは正常に発生・成長し、目立った外見的異常は認められなかったが、R451C 変異マウスとは異なり、海馬において AMPA 受容体機能の低下が認められた。一方で、NMDA 受容体機能や、GABA 受容体機能には変化がなかった(論文2)。neuroligin-3 R704C マウスの作出及び解析は、さきがけ当初の目標としたもので、これに関しては達成できた。一方、自閉症関連行動についての詳細な解析は今後の課題である。

研究テーマC「neurexin-3 遺伝子改変マウスのシナプス機能の解析」

Neurexin の第4選択的スプライス部位(ss4)の挿入の有無は、Neurexin/Neuroligin の結合の特異性を規定することが知られており、ss4 の挿入の無いフォームは、どのタイプの Neuroligin とも結合できるが、ss4 の挿入の有る Neurexin は、殆どの Neuroligin アイソフォームと結合しない。まず、この ss4 の挿入の有無は、脳の部位特異的な特徴があり、嗅球や小脳では ss4 を含むフォームが優位に発現し、大脳皮質や海馬では ss4 を欠くフォームが優位に発現していることを定量的 PCR により見出した。この傾向は、Neurexin-3 で特に顕著であることも見出した。我々は neurexin-3 の欠損マウス及び、ss4 の挿入の有無を遺伝学的に操作したマウス(neurexin-3 ss4 KI/KO マウス)を作成し、Neurexin/Neuroligin の結合とシナプス成熟との関連について研究を行った。Cre 組換え酵素をレンチウィルスで導入することにより作成した neurexin-3 KO 培養神経細胞のシナプス機能を、パッチクランプ法により解析したところ、neurexin-3 KO シナプスでは、シナプス前終末機能を反映したパラメータの異常は見られなかったが、シナプス後終末の AMPA 受容体機能の選択的低下が認められた。Neurexin はシナプス前終末タンパク質であるため、これは Neurexin が Neuroligin との結合を介して経シナプ的にシナプス終末に影響を与えている可能性が考えられた。これを検証するために、neurexin-3 ss4 KI および ss4 KO の培養神経細胞を用いて、Neurexin の Neuroligin との結合能と、AMPA 受容体機能との関係について解析を行った。この結果、ss4 KI において、KO 神経細胞と同様 AMPA 受容体機能の低下が認められた。また、界面活性剤有りおよび無しの条件下で AMPA 受容体の主要サブユニット GluR1 に対する抗体で AMPA 受容体を標識した実験で、neurexin-3 ss4 KI マウスでは AMPA 受容体のエンドサイトーシスが亢進して、シナプス表面に局在する数が低下していることを見出した。このことから、Neurexin はリガンドの結合を介して、シナプス後終末の AMPA 受容体の機能を制御していると結論付けた(論文4及び未発表の内容)。これらのマウスは当初の計画で作出及び解析を目標としており、これに関しては達成できた。一方、自閉症関連行動解析は、今後の課題である。

研究テーマD「Neurexin を介してシナプス形成を誘導する新たなシナプス接着因子の発見」

我々は、以前 Neurexin の細胞外領域と結合する分子を、親和性沈降後 MASS SPEC により探索していた際、シナプス接着分子 Calsyntenin ファミリータンパク質が検出されていた。今回、Calsyntenin ファミリータンパク質に着目し、Calsyntenin の Neurexin を介したシナプス誘導能について解析を行った。マウス海馬分散培養ニューロンに Calsyntenin-1, -2, -3 の全ての shRNA をレンチウイルスにより同時に導入すると(triple knock-down)、興奮性、抑制性両方のシナプスの数の減少がみられた。また、patch clamp 法によりシナプスの活動性を解析したところ、興奮性、抑制性ともに微小電流の頻度の減少がみられた。子宮内エレクトロポレーション法により、Calsyntenin-1, -2, -3 の shRNA を大脳皮質 II/III 層の錐体ニューロンに導入して、電気生理学的に解析したところ、やはり同様の結果が得られた。野生型 Calsyntenin をレンチウイルスにより導入すると、これらはレスキューされた。Calsyntenin のうち、特にシナプス誘導効果の高かった Calsyntenin-3 について、細胞外ドメインを用いて親和性沈降して MASS SPEC で解析した結果、Neurexin の沈降がみられたが、Neurexin と Calsyntenin の直接結合実験ではネガティブな結果が出たため、Calsyntenin は第3の分子を介して、Neurexin によるシナプス前終末の誘導を引き起こしていることが示唆された(論文4)。この研究は、当初のさきがけテーマとして予定していなかったものだが、さきがけ研究の重点が Neurexin の分子機能の解析に移行していく中で行うことにしたものである。

3. 今後の展開

本研究の成果として、少なくともある種類の自閉症の原因として、シナプスの成熟異常が関係しているという病態モデルを導くことができた。今後、これを更に検証していき、治療法の開発に結び付けたいと考えている。特に、neuroligin-3 R451C ノックインマウスは、作成時に R451C 変異周辺エクソンを loxP で挟んでおり、Cre 組換え酵素導入により neuroligin-3 遺伝子の発現が除去できる。neuroligin-3 R451C 変異は機能獲得型変異であり、neuroligin-3 の機能欠損では、少なくとも海馬や大脳皮質では目立ったシナプス機能や行動異常をきたさないため、neuroligin-3 R451C ノックインマウスが成熟した後、neuroligin-3 遺伝子を除去し、自閉症様行動異常が改善されるかどうか、シナプス成熟異常が改善されるかどうかについて検討を加える。また、自閉症モデルに対し、シナプス成熟促進因子として知られる Neuroligin-1などを過剰発現することにより、シナプス成熟異常が改善され、自閉症様行動異常が改善されるかについて研究を行い、自閉症の根本的治療法の開発の可能性を探りたい。これらに加え、Neurexin を軸としたシナプス成熟の分子機構に関する研究を継続し、シナプス成熟を効果的に誘導するための分子基盤の確立に努めたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は、近年自閉症との関連が指摘されるようになったシナプス接着因子、Neuroligin 及び Neurexin に着目し、これらの遺伝子改変マウスを作出し、シナプス機能及び自閉症関連行動を解析することにより、自閉症の病態像を解明すると同時にこれらのマウスを自閉症モデルとして確立することを目指したものであった。当初の研究計画として、具体的な遺伝子改変マ

ウスを4系統列挙していた。これらは研究開始時点でおおむね作出できつつあるものであったが、研究開始後、全てを完成させ系統化できた。そして、これらすべてにおいて、シナプス機能を解析し、それぞれの系統で起こっているシナプス異常を見出した。また、これらの研究の中で、シナプス成熟の異常が自閉症の原因と深いかわりがあるという病態モデルを導くことができた。これは、自閉症の根本的治療法を開発していく上で、重要な知見であり、社会的波及効果に繋がると信じている。研究期間中に、研究室の上司が海外へ異動することになったことや、その後自分自身が信州大学へ異動して新しい研究室を立ち上げるようになったことなどがあり、研究環境のイレギュラーな変化に伴い、研究費の執行が当初の計画から大幅に変更せざるを得ない状況になったが、さきがけから柔軟に対応していただき、乗り切ることができた。当初の計画では、作出したマウスの行動解析を精力的に行い、モデルマウスとして確立することを目標の一つに掲げていたが、実際の研究では、シナプス成熟に関わる分子機構の解明に重点をシフトすることになり、行動解析が当初の計画ほど進行していない結果となってしまった。また、得られた成果は論文投稿中や準備中のものの中に含まれるものも多く、これらに関しては、世に出るのがさきがけ期間終了後になる予定である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

自閉症は多数の遺伝子がかかわる疾患と考えられているが、自閉症家系に見出される Neuroligin-3 遺伝子とそのシナプスにおける結合パートナーである Neurexin の遺伝子の異常から、これらのシナプス分子が自閉症原因理解の橋頭堡となる可能性がある。本研究はこの点に着目し、すでに作成していた neuroligin-3 R451C 変異導入ノックインマウスに加えて、neuroligin-3 R704C KI マウス、Neurexin-3 の KO マウス、Neurexin と Neuroligin との結合特異性を規定するスプライス部位(ss4)の挿入を操作した neurexin-3 ss4KI/KO マウスを作出して、それらの自閉症関連症状を解析することにより、その病態との関係に迫ったものである。neuroligin-3 R451C KI マウスの海馬でのシナプス機能についてはLTP増強、AMPA 受容体機能に対する NMDA 受容体機能の上昇、NMDA 受容体の NR2B サブユニットの機能亢進などの幼若シナプスの特徴を見出し、一方 neurexin-3 KO マウスの解析などから、シナプス前終末タンパク質である Neurexin が Neuroligin と結合することにより経シナプ斯的にシナプス後終末の AMPA 受容体機能を制御していることなどを見出したものである。これらの成果は今後の展開によっては一部の自閉症の治療法の開発にもつながる成果である。成果の一部は論文報告を行っている。主要な成果は責任著者として早い時期に論文報告が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Etherton M, Földy C, Sharma M, Tabuchi K, Liu X, Shamloo M, Malenka RC, Südhof TC. Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(33):13764-9.
2. Etherton MR, Tabuchi K, Sharma M, Ko J, Südhof TC. An autism-associated point mutation

in the neuroligin cytoplasmic tail selectively impairs AMPA receptor-mediated synaptic transmission in hippocampus. EMBO J. 2011; 30(14):2908-19.

3. Budreck EC, Kwon OB, Jung JH, Baudouin S, Thommen A, Kim HS, Fukazawa Y, Harada H, Tabuchi K, Shigemoto R, Scheiffele P, Kim JH. Neuroligin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 110(2):725-30.

4. Aoto J, Martinelli DC, Malenka RC, Tabuchi K, Südhof TC. Presynaptic neuroligin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. Cell. 2013; 154(1):75-88.

5. Um, J. W., Pramanik, G., Ko, J. S., Song, M. Y., Lee, D., Kim, H., Park, K. S., Südhof, T. C., Tabuchi K. and Ko, J. Calsyntenins function as synaptogenic adhesion molecules in concert with neuroligins. Cell Rep. 2014; 6(6): 1096-109.

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(著書)

1. Tabuchi, K.: Neuroligins and Neurexins in Autism. In "TEXTBOOK OF AUTISM SPECTRUM DISORDERS" ed. E. Hollander, A. Kolevzon and J. T. Coyle, pp.347-352, American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, DC, London, England, 2011

(総説)

2. 田淵克彦: 自閉症とニューロリギン. Clinical Neuroscience, Vol.27, No.10, PP.1092-1093, 中外医学社, 2009

3. 田淵克彦: Neuroligin.分子精神医学, Vol.11, No.3, PP.207-208, 先端医学社, 2011

4. Deeba Noreen Baig, Toru Yanagawa, Katsuhiko Tabuchi: Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant.: Japanese Journal of Biological Psychiatry, Vol.23, No.4, 2012

5. 田淵克彦: シナプスと自閉症, 生体の科学, 65(1): 3-6., 医学書院, 2014