

特集2 動物モデルから見た発達障害研究

3. Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant

Deeba Noreen Baig^{1, 2)} 柳川 徹³⁾ 田淵 克彦^{1, 4, 5)}

抄録：Neuroligin (NLGN) は、シナプス後終末に局在する1回膜貫通型細胞接着因子で、シナプス前終末に局在するNeurexin (NRXN) と結合することにより、シナプスの成熟を誘導すると考えられている。近年、NLGNおよびNRXNの遺伝子異常が自閉症患者のスクリーニングから頻りに発見されるようになったことから、これらの分子によって維持される正常なシナプス機能の破綻が、少なくとも一部の自閉症の原因と関係しているのではないかと考えられるようになってきた。我々は、ヒトの自閉症患者から最初に発見されたNLGNの単一アミノ酸変異である、NLGN 3タンパク質の451番目のアルギニンがシステインに置換された変異を有するマウスを作成し、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見られなかったが、行動解析により、自閉症特有の社会的相互作用の異常を再現することが証明された。また、Morris水迷路試験により、この変異マウスでは空間学習記憶能力が顕著に亢進することも見出した。このマウスの大脳皮質のシナプス機能を電気生理学的に解析したところ、抑制性シナプス機能の増強が認められ、GABA受容体遮断薬投与によってこのマウスの社会的相互作用の異常が改善されたことから、このマウスでは大脳皮質の抑制性シナプス機能の増強が、社会的相互作用の異常を引き起こしていることが示唆された。このマウスの海馬のシナプス機能を調べたところ、このマウスではシナプスの可塑性の亢進が認められ、NMDA受容体のうち、幼若型シナプスで特徴的な、NR2Bサブユニットの比率が優位になっていることを見出した。NR2Bの過剰発現マウスでは学習記憶能力が亢進する過去の知見と一致する。以上のことより、NLGN 3 R451C変異は、シナプスの成熟異常を起こし、大脳皮質機能を介した社会的相互作用の異常と、海馬機能を介した学習記憶能力の亢進という、ある種の自閉症の症状のパターンを生み出す原因になっていると考えられる。

日本生物学的精神医学会誌 23 (4) : 281-286, 2012

Key words : 自閉症サバン, シナプス, Neuroligin, NR2B, シナプス成熟

はじめに

信州大学医学部から南西に約40km下ったところに、かつて日本のゴッホと呼ばれた山下清の「放浪美術館」がある。山下は信州の自然や風景をこよな

く愛し、何度となく旅で訪れたことから、この地に美術館が建てられたとのことである。山下は1922年に東京浅草で生まれ、知的障害と言語障害があったことから、小学生の時に知的障害児施設「八幡学園」へ預けられた。学園において教育の一環として

Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant

1) 自然科学研究機構生理学研究所脳形態解析研究部門 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1) Deeba Noreen Baig, Katsuhiko Tabuchi : National Institute for Physiological Sciences. 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan

2) ネブラスカ大学医療センター マンロー・マイヤー研究所発達神経科学学科 Deeba Noreen Baig : Developmental Neurosciences Department, Munroe-Meyer Institute, 985960 Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198, USA.

3) 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻顎口腔外科学分野 (〒305-8575 つくば市天王台1-1-1) Toru Yanagawa : Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba. Tennoudai, Tsukuba 305-8575, Japan

4) 信州大学医学部神経生理学講座 (〒390-8621 長野県松本市旭3-1-1) Katsuhiko Tabuchi : Department of Neurophysiology, Shinshu University School of Medicine. 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, Japan

5) 独立行政法人科学技術振興機構さきがけ (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1) Katsuhiko Tabuchi : Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency Precursory. 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki 444-8787, Japan

【田淵 克彦 E-mail : ktabuchi@shinshu-u.ac.jp】

貼り絵をやらせていたところ、清は傑出した才能を発揮し、周囲を驚かせた。やがて清は学園を抜け出し、全国を放浪するようになる。この辺りのいきさつは、1980年代～90年代にかけてテレビのドラマで定期的に放映されていた「裸の大将放浪記」で再現されており、なじみの方も多いのではないか。清は自閉症だったと考えられる。自閉症はジョンズ・ホプキンス大学の児童精神科医レオ・カナーが1943年に報告したのが初めてで、日本では1950年代にごく一部の医師が研究対象として意識し始めた程度で、1971年に亡くなった山下は生前、自閉症として認識されてはいなかったと考えられる。テレビドラマでも、山下清を自閉症患者として扱っていない。ドラマで清は知的障害のため旅先でいじめられつつも、親切な人を見つけて居候させてもらう。その中で起こる家族や近所のいざこざを敏感にキャッチし、持ち前の人懐っこさで人々の緩衝材となり、やがては仲直りに導いていく。最後に居候させてもらったお礼として絵を残し、このとき何故か画廊が通りがかり、「これはもしやあの有名な山下画伯では！」と言って大騒ぎになり、みんなで探しまわりますが、このときに清はもう次の旅に出かけていなくなっているというのがだいたいのパターンだったと記憶している。しかし、実際の清はこれとはだいぶ違っていた様である。清の生前、生活を共にした甥の日記が残っている。これによると清はものすごく几帳面で、掃除のときにタンスの上のもの位置を少しでもずらすと怒って元に戻してしまう。医者から30分程度の犬の散歩を勧められて以来、犬の散歩は必ず30分行うようにし、もし数分早く戻ってしまった場合は家の前で30分たつまで待っているという具合である。貼り絵も旅先で作成することはなく、学園に戻ってから周りに勧められて作るというものであった。しかし、清の貼り絵は旅先で見た風景をかなり正確に再現していたとのことである。これらのエピソードから、清は映像記憶に優れた自閉症サバンだったのではないかと考えられる。

自閉症は、謎の多い疾患である。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（こだわり行動）という3つの行動異常をもって診断されるが、知的障害を伴う症例が多い反面、清の様に特定の物事に対して驚異的な記憶能力を有する例が頻繁にみられる。自閉症の原因として、近年シナプス異常との関係に注目が集まっているが、我々が作成したシナプス接着因子 Neuroigin の変異マウスでは社会的相互作用の異常と同時に空間学習記憶能力の亢進がみられる。本稿

では、Neuroigin のシナプスにおける機能および、我々が作成した Neuroigin の自閉症モデルマウスの解析について、自閉症サバンの病態への考察も含めて概説する。

1. シナプス接着因子 Neuroigin について

Neuroigin (NLGN) は、シナプス後終末に局在する1回膜貫通型タンパク質で、細胞外領域にアセチルコリンエステラーゼ様ドメイン、短い細胞内領域の末端にPDZ結合配列を有する。ヒトでは5種類の遺伝子が確認されており (NLGN1, NLGN2, NLGN3, NLGN4X, and NLGN4Y), このうちNLGN1, 2, 3は常染色体, NLGN4XはX染色体, NLGN4YはY染色体上に存在する。NLGNタンパク質は2量体を形成して機能し, NLGN1は興奮性シナプス, NLGN2は抑制性シナプスの後終末に特異的に局在する。NLGN3は興奮性, 抑制性両方のシナプスの後終末に局在し, 興奮性シナプスではNLGN1と, 抑制性シナプスではNLGN2とヘテロ2量体を形成する。NLGNは, 細胞外領域のアセチルコリンエステラーゼ様ドメインを介してカルシウム依存的にシナプス前終末局在性細胞接着因子 Neurexin (NRXN) と結合する。NRXNも1回膜貫通型タンパク質で, 細胞外領域にLNS (Laminin-a, Neurexin and Sex hormone-binding globulin) ドメイン, EGF様リピート, 短い細胞内領域の末端にPDZ結合配列を有する。NRXNはヒトでは3種類の遺伝子の存在が知られており (NRXN1, NRXN2 and NRXN3), それぞれの遺伝子は2種類のプロモーターによって長い α -と短い β -のアイソフォームを産生する。

シナプスは、神経細胞同士を結ぶ繋ぎ目であり、神経細胞と非神経細胞の間では一般に形成されない。しかし、不死化線維芽細胞株 (COS細胞やHEK293細胞) にNLGNを発現させたものを、分散神経培養に添加して共培養すると、神経細胞の軸索終末がNLGN発現線維芽細胞の表面に接着し、シナプス前終末構造の形成が誘導されることが示されている¹³⁾。このシナプス前終末にはNRXNタンパク質が凝集し、NRXNの細胞外ドメインの組換えタンパク質をこの培養系に添加することで、このシナプス形成が阻害されることから、NLGNとNRXNの結合がシナプス形成を誘導することが示唆されている。また、NLGN遺伝子を分散培養神経細胞に過剰発現させると、シナプスの数が増加する⁴⁾。NLGN1を過剰発現したトランスジェニックマウスでもシナ

プスの数が増加する¹⁵⁾。加えて、樹状棘突起の頭部が膨大し、頸部がくびれ、高さが低くなり、シナプスの成熟が促進される様相を呈する¹⁵⁾。一方、NLGNのノックアウトマウスでは、シナプス伝達の異常がみられるものの、シナプスの数の明確な減少は見られない⁷⁾。これらのことから、生体内でシナプスの初期形成においてNLGNとリダナントな機能を有する分子が有ることが予測される。近年、細胞接着因子LRRTMsがNLGN同様、シナプス後終末に局在し、NRXNと結合することが示された¹²⁾。また、shRNAを用いたノックダウン実験により、シナプス形成の初期段階にはLRRTMが主に作用し、NLGNはシナプス形成の後期段階（成熟段階）に主に機能していることが示されている⁸⁾。

2. Neuroligin と自閉症

2003年、フランスのThomas Bourgeronのグループが、スウェーデンのX伴性自閉症患者の遺伝子スクリーニングにより、NLGN3の1アミノ酸置換点変異（R451C変異）とNLGN4のフレームシフト変異を発見した¹⁶⁾。以後、NLGNやNRXN、更にはこれらとシナプスにおいて直接的、間接的に相互作用する分子の遺伝子異常が自閉症患者から多数見つかるようになり、現在では自閉症の原因としてのシナプス異常説の有力な傍証になっている^{5, 14)}。NLGN3のR451C変異は、NLGN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存在する変異で、NLGNファミリータンパク質の中で保存性の高い451番目のアルギニンがシステインに置換された変異である。この変異そのものは、NRXNとの結合を阻害するものではないが、この変異を有する遺伝子を培養細胞に過剰発現すると、NLGNタンパク質の細胞膜表面への移行が妨げられ、大部分が小胞体の中に蓄積される^{6, 3, 2, 1)}。野生型NLGN遺伝子の過剰発現で見られる培養神経細胞のシナプスの数の増加も誘導しない³⁾。我々は、ヒト自閉症患者から見つかったNLGNの遺伝子変異が、実際に自閉症を引き起こし得るかどうかを検証するため、この変異を有するノックインマウス（NLGN3 R451C KIマウス）を作成し解析を行った。

3. Neuroligin 自閉症モデルマウス

NLGN3 R451C KI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⁹⁾。自閉症との関連を調べるために、成熟マウスを用いて行動

実験を行った。オープンフィールドの箱の隅に小さなケージを設置し、その中に幼若標的マウスを入れ、これに対する接触時間を社会的相互作用の指標として計測した。空のケージに対する接触時間は、野生型マウスと変異マウスで差がみられなかったが、幼若標的マウスに対する接触時間は、NLGN3 R451C KIマウスで優位に低下していた⁹⁾。また、3つのコンパートメントに分けた箱を用意し、この両端のコンパートメントに小さなケージを設置し、一方に幼若標的マウス、もう一方は空のままにし、空のケージと幼若標的マウスに対する接触時間を同時に計測した。この実験においても、空のケージに対する接触時間は野生型と変異マウスで差がみられなかったが、幼若標的マウスに対する接触時間は、NLGN3 R451C KIマウスで優位に低下していた⁹⁾。このことから、NLGN3 R451C KIマウスは、社会的相互作用の障害があることが示唆される。運動機能や不安行動などで特に異常は認められなかったが、Morris水迷路試験において、NLGN3 R451C KIマウスは、空間学習記憶能力の顕著な亢進が認められた⁹⁾。このマウスは、ヒト遺伝子異常を再現した自閉症モデルとしては、最初期のものであるが、以後作成された同様の自閉症モデルマウスでは学習記憶能力は正常ないしは低下するものが多く、本マウスは自閉症サバンの病態メカニズムを研究する上で貴重なモデルになると考えられる。

NLGNはシナプス分子であり、このマウスのシナプス機能を解析することは、自閉症の病態を解明する上で必須である。急性スライスパッチクランプ法により、このマウスの大脳皮質体性感覚野2/3層の錐体神経細胞のシナプス機能の解析を行った。まず、テトロドトキシン存在下で微小シナプス後電流を測定したところ、興奮性シナプス電流に差は見られなかったが、抑制性微小シナプス後電流の頻度がR451C KIマウスで顕著に増加していた⁹⁾。次に電気刺激に対するシナプス応答を測定したところ、やはり興奮性のシナプス応答に変化は見られなかったが、抑制性シナプス応答の振幅の顕著な増大が認められた⁹⁾。このスライスに局所的に抑制性シナプス伝達物質であるGABAを投与したところ、これに対する応答がR451C KIで増強していた⁹⁾。一方、電子顕微鏡により、興奮性と抑制性シナプスの数について計測したが、これに関する異常は見られなかった⁹⁾。また、NLGN3のノックアウトマウスでは、興奮性・抑制性シナプス共に異常がみられないことから⁹⁾、R451C KIシナプスで見られる抑制性シナプス機能の亢進は、アミノ酸変異の機能獲得型効果に

よるものと考えられる。この抑制性シナプス機能の亢進が、社会的相互作用の異常の原因になっているかどうかを検証するため、GABA受容体遮断薬である PicROTOXIN を低用量マウスに投与して、抑制性シナプス機能の亢進を緩和した状態で社会的相互作用の実験を行ったところ、R451C KI マウスでも野生型と同様のレベルまで改善された。このことから、このマウスにおいては、抑制性シナプス機能の亢進が、自閉症様行動の原因となっていることが示唆される。

このマウスでは空間学習記憶能力の亢進も見られている。この原因を探るため、学習記憶能力と関わりの深い海馬のシナプス機能についても解析を行った。海馬 CA1 領域の錐体神経細胞では大脳皮質と異なり、抑制性シナプス機能の異常は見られなかったが、微小興奮性シナプス後電流の頻度の増加が認められた¹⁰⁾。電気刺激に対する AMPA 受容体と NMDA 受容体の応答比を測定した結果、NMDA 受容体の応答が優位に増強しており、また長期増強 (LTP) も亢進していることが判明した¹⁰⁾。この NMDA 受容体応答の減衰時間が、R451C KI マウスでは延長していた¹⁰⁾。海馬の NMDA 受容体は、NR1 サブユニットと NR2 サブユニットによる 4 量体により構成されており、NR2 サブユニットのうち、NR2B サブユニットは NR2A サブユニットに比較して、応答の減衰時間が長い特徴がある。R451C KI の NMDA 受容体は NR2B サブユニットが優位になっているのではないかと考え、NR2B サブユニット特異的遮断薬である ifenprodil を投与して NMDA 受容体応答を調べたところ、R451C KI マウスでは、ifenprodil により NMDA 受容体応答がより顕著に抑制された¹⁰⁾。このことから、やはり R451C KI の NMDA 受容体の組成は、NR2B サブユニットが優位になっていることが示唆される。海馬の錐体神経細胞のシナプスでは、形成過程においてまず最初に NMDA 受容体がシナプス後膜に挿入され、成熟に伴い AMPA 受容体の挿入が加わる。NMDA 受容体の組成に関して、幼若な時期では NR2B サブユニットが優位であるが、成熟に伴い、NR2B サブユニット優位に置換されることも知られている¹¹⁾。これらのことから、R451C KI マウスのシナプスでは、シナプスの成熟異常が起きていると考えられる。NLGN1 の過剰発現マウスではシナプス成熟の亢進がみられるが、興味深いことにこのマウスは電気生理学的に LTP の低下がみられるのと、Morris 水迷路試験において空間学習能力の低下がみられる¹⁵⁾。

すなわち R451C KI マウスと全く逆の表現型を呈するのである。NLGN3 は、興奮性・抑制性の両方のシナプス後終末に局在し、それぞれ NLGN1 および NLGN2 とヘテロ 2 量体を形成できることから、このマウスのシナプスでは、変異型 NLGN3 と NLGN1 および NLGN2 が異常な 2 量体を形成することにより、本来のシナプス成熟のために誘導するシグナルが歪んで伝達されるのではないかと想像される。海馬の錐体神経細胞に inputs するシナプスの 80% 以上が興奮性シナプスのため、この部位では NLGN1 と NLGN3 R451C とのヘテロ 2 量体によるシナプス効果が前面に現れて興奮性シナプス機能の異常が見られ、大脳皮質の錐体神経細胞は、相当数の抑制性シナプスの inputs を受けるため、NLGN2 と NLGN3 R451C のヘテロ 2 量体効果が前面に出ているのかもしれない。NR2B の過剰発現マウスでは、学習記憶能力が亢進することが示されている¹⁷⁾。映像記憶は幼児期には誰しも有しており、成長と共に消えてゆくとされているが、これが NR2B の密度と関係しているのではないかと私は考えている。

まとめ

NLGN3 R451C KI マウスモデルの解析から、自閉症病態としてのシナプス成熟異常の可能性が見えてきた。自閉症患者では、シナプスが幼若な状態のまま維持されることにより、成長と共に獲得するはずの社会性が身に付かず、一方で幼児が有する単純記憶に優れる傾向にあるのではないかと考えられる。

文 献

- 1) AA Chubykin, X Liu, D Comoletti, et al (2005) Dissection of synapse induction by neuroligins : effect of a neuroligin mutation associated with autism. *J Biol Chem*, 280 (23) : 22365-22374.
- 2) A De Jaco, Z Kovarik, D Comoletti, et al (2005) A single mutation near the C-terminus in alpha/beta hydrolase fold protein family causes a defect in protein processing. *Chem Biol Interact*, 157-158, 371-372.
- 3) B Chih, SK Afridi, L Clark, et al (2004) Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. *Hum Mol Genet*, 13 (14) : 1471-1477.
- 4) B Chih, H Engelman and P Scheiffele (2005) Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science*, 307 (5713) : 1324-1328.
- 5) CM Durand, C Betancur, TM Boeckers, et al (2007)

- Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*, 39 (1) : 25-27.
- 6) D Comoletti, A De Jaco, LL Jennings, et al (2004) The Arg451Cys-neurexin-3 mutation associated with autism reveals a defect in protein processing. *J Neurosci*, 24 (20) : 4889-4893.
 - 7) F Varoqueaux, G Aramuni, RL Rawson, et al (2006) Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron*, 51 (6) : 741-754.
 - 8) GJ Soler-Llavina, MV Fuccillo, J Ko, et al (2011) The neuroligin ligands, neuroligins and leucine-rich repeat transmembrane proteins, perform convergent and divergent synaptic functions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (40) : 16502-16509.
 - 9) K Tabuchi, J Blundell, MR Etherton, et al (2007) A neuroligin-3 mutation implicated in autism increases inhibitory synaptic transmission in mice. *Science*, 318 (5847) : 71-76.
 - 10) M Etherton, C Foldy, M Sharma, et al (2011) Autism-linked neuroligin-3 R451C mutation differentially alters hippocampal and cortical synaptic function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108 (33) : 13764-13769.
 - 11) M Sheng, J Cummings, LA Roldan, et al (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature*, 368 (6467) : 144-147.
 - 12) MW Linhoff, J Lauren, RM Cassidy, et al (2009) An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron*, 61 (5) : 734-749.
 - 13) P Scheiffele, J Fan, J Choih, et al (2000) Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*, 101 (6) : 657-669.
 - 14) P Szatmari, AD Paterson, L Zwaigenbaum, et al (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet*, 39 (3) : 319-328.
 - 15) R Dahlhaus, RM Hines, BD Eadie, et al (2010) Overexpression of the cell adhesion protein neuroligin-1 induces learning deficits and impairs synaptic plasticity by altering the ratio of excitation to inhibition in the hippocampus. *Hippocampus*, 20 (2) : 305-322.
 - 16) S Jamain, H Quach, C Betancur, et al (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34 (1) : 27-29.
 - 17) YP Tang, E Shimizu, GR Dube, et al (1999) Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401 (6748) : 63-69.

■ ABSTRACT

Analysis of Neuroligin-3 R451C knock-in mice as models for autistic savant

Deeba Noreen Baig^{1, 2)}, Toru Yanagawa³⁾, Katsuhiko Tabuchi^{1, 4, 5)}

1) *National Institute for Physiological Sciences*

2) *Developmental Neurosciences Department, Munroe-Meyer Institute, 985960 Nebraska Medical Center*

3) *Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba*

4) *Department of Neurophysiology, Shinshu University School of Medicine*

5) *Research for Embryonic Science and Technology, Japan Science and Technology Agency Precursory*

Neuroligins (NLGNs) are postsynaptic cell adhesion molecules that can induce synaptic maturation through the interaction with presynaptic adhesion molecules called Neurexins (NRXNs). In recent years, mutations, deletions and copy number variations in both NLGNs and NRXNs have been discovered in the patients with autism, indicating that impairment in synapses caused by dysfunction of these molecules may be responsible for autism. To study the relevance between these mutations and autism, we generated knock-in mice recapitulating a mutation of NLGN3 called R451C identified in patients with autism. NLGN3 R451C mice had normal locomotor activities but showed impaired social interaction and enhanced spatial learning and memory in behavioral tests, which are reminiscent of the clinical features of autism. Although numbers and structure of synapses are normal, inhibitory synaptic transmission was significantly enhanced in the pyramidal neurons in somatosensory cortex in the knock-in mice. Administration of GABA blocker, picrotoxin, ameliorated the impaired social interaction suggesting that this can be the cause of the social abnormality. On the other hand, parameters indicating impaired synaptic maturation (enhancement of NMDA/AMPA ratio, NR2B function, and LTP) were observed in CA1 hippocampal pyramidal neurons in the knock-in mice and these are likely enhancing memory ability in the mutants. We speculate that enhancement of inhibitory synaptic function in cortical neurons may also be a result of impaired synaptic maturation and this creates clinical features in some types of autism.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 23 (4) : 281-286, 2012)
