

3. 発生障害学部

研究の概況

中山 敦雄

発生（胎児形成）は、一つの受精卵から人の体が形成されるという神秘に満ちた生命現象であり、細胞の増殖・移動・分化が遺伝情報に規定されて極めて複雑に進行する。発生障害、すなわち発生過程の破綻や変調は先天奇形の原因になるのみでなく、出生後に顕かになってくる発達障害にも直接的、間接的に影響を与えている。発生障害学部はこういった疾病や障害の基盤となる発生過程の破綻や変調の詳細を明らかにし、その知見を臨床に還元することを目的として研究を行っている。

具体的なテーマとしては自閉症感受性遺伝子ニューロリギン4xとその産物に焦点を当てた研究、ヒストン脱アセチル化酵素の脳機能・神経発達における役割の解明を目指した研究を中心に大学や国外の研究機関との共同研究も行っている。

研究所の重点課題でもある自閉症に関しては、社会性やコミュニケーションといった複雑な高次神経機能の障害であることから、その生物学的な病態の詳細はなかなか理解が進まないのが現状である。一方で臨床遺伝学的解析から自閉症の原因遺伝子や感受性遺伝子の候補が多数報告されており、原因解明に向けては着実な進歩を見せている。この様な背景で平成20年度も自閉症感受性遺伝子ニューロリギン4xの遺伝子構造の解析と遺伝子産物の生理機能の解明に焦点を当て、これにより自閉症の病態理解を深めることを目的に研究を進めた。遺伝子構造の解析ではこれまで見つかった4つの転写開始エクソンにつきそれぞれが生体内で本当に利用されているかを検討するとともに、主要な転写開始エクソンと考えられるエクソン1Aの正確な転写開始点マッピングを進めた。生理機能の解明のためにはニューロリギン4xタンパクの細胞内領域と結合する分子の探索を進めており、これをコードする複数の候補遺伝子が得られている。本年はその妥当性につき生化学的検討を進めた。詳細に関してはそれぞれ個別研究での報告を参照されたい。

翻訳後修飾の中で近年注目を集めているのがタンパクのアセチル化修飾で、リン酸化修飾による様々な生理機能の制御に比べると已然未知の部分が多い。ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）6はその命名とは異なり非ヒストン蛋白のアセチル化制御が主要な機能と考えられ、特に神経系で重要な役割を担うことが示唆されている。これは当部門の川口によるHDAC6ノックアウトマウスの予備研究からも裏付けられて来たが、今年度は川口、深田の2名によりノックアウトマウスの行動解析、生化学的解析、形態病理学的解析が精力的に進められ、新たな知

見を学会で発表した。HDAC6の神経系における機能の解明は大きなテーマであり、そのためにはさらに多くの実験と長い年月を要するものと考えられる。研究体制も整いさらに発展して行くことが期待される。

今年度はさらに海外との共同研究を再開し、中胚葉形成におけるホメオボックス遺伝子 *Moex1* の役割について互いに補完性があると考えられて来た *Moex2* との役割の違いを明らかにすることができた。実験は実質的に共同研究先で実施されたものであるが、研究計画、情報の交換を進めて論文発表（掲載は次年度）に至った。

人事の移動として前年度末の2名の定年退職を受け、今年度は4月からリサーチレジデントの深田が研究員として採用され、代わって田中をリサーチレジデントとして迎え、ニューロリギン4xの研究グループに加わった。また前年度に続き実験補助をアルバイトの竹島京子さんをお願いしている。

今年度の研究資金として日本学術振興会科学研究費補助金、若手研究B1件、民間財団からの補助金2件の研究助成を受けて研究を進めた。

MEOX1の中軸骨格形成における役割の検討

Skuntz S¹、中山敦雄、Arnheiter H¹

Meox1 と *Meox2* は中胚葉形成に係るホメオボックス遺伝子として発見され、ホメオドメイン型の転写因子をコードする。両遺伝子は胎生期にともに体節に発現し、コードするタンパクも類似することから広く重複した役割を果たしていると考えられる。しかし遺伝子導入の副次的な結果としてエクソン1以外の *Meox1* 遺伝子が欠失したホモマウス (*Meox1^{im/im}*) は体長の短縮、折れ曲がった短い尾を有するといった表現型を示した。このため *Meox1* には *Meox2* により代償されない特異的機能があると考え、さらに解析を進めてきた。その結果、*Meox1^{im/im}* では胎生期に *Meox1* の mRNA、タンパクともに発現が見られないこと、*Meox2* の mRNA 発現には変化が見られないことが確認された。一方成体の骨格では高頻度で後頭骨と第一頸椎（環椎）の癒合、第二頸椎（軸椎）の変形が見られた。体節形成に関わる種々の遺伝子群の発現を *Meox1^{im/im}* と *Meox1^{+/+}*（ワイルドタイプ）とで比較検討したところ、*Meox1^{im/im}* では上記後頭骨～第二頸椎の原器となる吻側体節において、別のホメオボックス遺伝子 *Uncx4.1* の発現低下が見られた。またほぼすべての体節において転写因子をコードする *Tbx18* の発現消失ないし低下をみた。これら二つの遺伝子上流域のホメオドメイン結合配列の一部に *Meox1* が結合することがクロマチン免疫沈降により確認された。以上より *Meox1* は軸骨格形成において *Meox2* により代償しえない特異的な働きを有し、それは直接的

に *Uncx4.1*, *Tbx18* といった遺伝子発現制御を介して発揮されることが明らかとなった。

¹米国立衛生研究所

自閉症因子ニューロリギン4の未知の機能の解明

正木茂夫、青木英子、中山敦雄

2008年までに報告された、自閉症に関連した変異遺伝子の数は30にもものぼる。これらのうちニューレキシン1、SHANK3、コンタクチン3、CNTAP2はその産物が神経細胞シナプス領域でニューロリギンを含む複合体を形成していることが知られている。これらはシナプス形成とその機能調節に重要で、その変異は自閉症の発症に深く関わりと推測されている。われわれは、上述した遺伝子産物以外にもシナプス形成/機能調節、自閉症に関与するような分子が存在すると考え、ニューロリギン4に注目し、この分子に特異的に結合する未知の脳タンパク質の検索を、酵母ツーハイブリッド法を用いて行なっている。ヒト脳cDNAライブラリより得た、ポストシナプスタンパク質部分配列を持つ約60個のクローンについて、それぞれpCMV-Myc発現プラスミドに組み込み、HEK293細胞内での発現を確認した。以降数回のスクリーニングを経て最終的に得られたクローン5個について、発現タンパク質とニューロリギン4および1、2、3との結合について、免疫沈降法により検定を行っている。得られたクローンには、細胞内輸送に関わる因子の部分配列が複数含まれるので、特にこれらに注目して解析を行っている。

自閉症関連遺伝子ニューロリギン4の発現調節機構の検討

田中聖之、中山敦雄

近年自閉症の原因を単一遺伝子の異常に求めることには限界があり、染色体の微小重複等による複数遺伝子のコピー数異常(CNV)の報告が多くなっている。一方で頻度は低いものの、単一の遺伝子変異が自閉症状を引き起こす場合もある。シナプス形成と維持に関与する膜タンパク質ニューロリギン4をコードする遺伝子 *NLGN4* もその一つであり、その産物の特性からも深く脳機能に関与することが期待される。

我々は *NLGN4* の発現制御機構に着目し、その解明により自閉症の病態形成理解に貢献することを目指して研究を進めている。これまで5'RACE法により *NLGN4* 遺伝子には翻訳開始コドンをもつエクソン2の上流に独立した4つの非翻訳エクソン(エクソン1A、1B、1C、1Dと命名)が存在し、それぞれからエクソン2に繋がるmRNA

が転写されていることが示唆された。また発現制御解析として遺伝子の最も5'側に存在するエクソン1Aの上流プロモーターの解析を進めて来た。20年度はエクソン1Aからの転写産物につき、RNase protection assayによる、より厳密な転写開始点マッピングを行った。またエクソン1B、1C、1Dから読み出されるmRNAが実際にヒト脳でも転写されているかを、ヒト脳由来RNAを用いたRT-PCRにより検討した。この結果上記エクソン1B、1C、1Dはいずれもヒト脳で転写されていることが確認された。これによりエクソン1B、1C、1Dそれぞれの上流に独立したプロモーターが存在することが示唆された。今後、脳での *NLGN4* 転写産物におけるエクソン1バリエーションの比率の検討と、エクソン1B、1C、1Dに対応するプロモーターの転写活性をレポーターアッセイにより検討して行く。

タンパク質の可逆的アセチル化制御から見た高次脳機能障害の分子基盤研究

川口禎晴、深田齊秀、竹島京子、花井敦子

アセチル化と呼ばれるタンパク質分子の翻訳後修飾は分子の機能特性に変化を与え、結果としてその分子が関与する生命システムに影響を及ぼす。我々は、この現象を手がかりにして、うつ病や統合失調症などの精神疾患の解明を試みている。既に我々は脱アセチル化反応を担うHDAC6分子の遺伝子欠損によってうつ病と関連した症状がマウスに起きること、このHDAC6は脳の中では情動や各種精神疾患と関連深いニューロンに多いことを見出してきた。本年度は昨年引き続きHDAC6のニューロンにおける役割を明らかにする目的で培養神経系細胞を用いたHDAC6の機能解析を実施しており、新たなHDAC6発現不全モデル細胞を幾つか樹立した。特に本年度はHDAC6のターゲットとなる分子の探索に力を入れ、分子量50kDaから75kDaの範囲でHDAC6のターゲットとなる分子を3つ見出した。現在これら分子の同定を行っているが、既知HDAC6のターゲット分子と分子量が異なる点で興味深い。今後はこれら分子のアセチル化がどのように分子の機能を調節しているか、またアセチル化自身がどのように制御されているかを明らかにし、HDAC6機能不全とニューロンの機能異常との関連を解明したい。

ヒストン脱アセチル化酵素6(HDAC6)遺伝子欠損マウスの行動薬理的解析

深田齊秀、花井敦子、竹島京子、川口禎晴

HDAC6は主に細胞質に局在する脱アセチル化酵素で、

α -tubulin, HSP90, cortactin が基質として報告されている。私たちはこれまでに、Hdac6 遺伝子欠損マウス (Hdac6 KO マウス) が情動障害様行動を示すこと、HDAC6 はヒト及びマウス脳において、背側縫線核、黒質、青斑核の神経細胞に強く発現していることを見出している。これらの神経核は情動行動に深く関与することから、神経細胞内におけるアセチル化調節と情動行動の関連が推察される。細胞質性脱アセチル化酵素の欠損が情動障害を引き起こす分子メカニズムは、既知の病態に関する知見からは想定されず、HDAC6 の生理機能解明は情動障害の病態理解に重要な貢献をすることが期待される。

今年度は、Hdac6KO マウスについて、新たに3種類の行動テスト (オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、テールサスペンションテスト) を実施した。さらにHdac6KO マウスで観察された異常行動の原因となる脳領域 (神経核) 及び神経伝達物質を推定するために、既存の抗うつ薬を用いた行動薬理学的解析を行った。この結果、本マウスはあたかも抗うつ薬を投与されたかのような状態にあることを見出した。また、本年度から共同研究により、HDAC6 特異的阻害剤が情動行動に与える影響を検討している。

研究業績

原著論文

Lee Y-S¹, Lim K-H¹, Guo X¹, Kawaguchi Y, Gao Y¹, Barrientos T¹, Ordentlich P¹, Wang X-F¹, Counter C¹, Yao T-P¹ (¹Duke Univ) : The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res* 68 : 7561-7569, 2008.

Katoh-Semba R, Tsuzuki M, Miyazaki N, Matsuda M, Nakagawa C, Ichisaka S¹, Sudo K, Kitajima S, Hamatake M, Hata Y¹, Nagata K (¹Tottori Univ) : A phase advance of the light-dark cycle stimulates production of BDNF, but not of other neurotrophins, in the adult rat cerebral cortex : association with the activation of CREB. *J Neurochem* 106 : 2131-2142, 2008.

学会発表

深田齊秀, 竹島京子, 花井敦子, 正木茂夫, 青木英子, 中山敦雄, 川口禎晴 : Anxiety-like behaviors in *Hdac6*-deficient mice. 日本神経科学大会 (東京) 2008.7.10.
深田齊秀, 花井敦子, 竹島京子, 中山敦雄, 川口禎晴 : 不安様行動を呈する *Hdac6* 遺伝子欠損マウスの解析.

日本分子生物学会年会・日本生化学会大会合同大会 (神戸) 2008.12.11.

川口禎晴, 深田齊秀, 竹島京子, 花井敦子, 正木茂夫, 青木英子, 中山敦雄 : Anxiety-related behavior in *Hdac6*-deficient mice. グローバル COE 国際シンポジウム (名古屋) 2009.1.29.

その他の印刷物

川口禎晴 : コロニープロジェクト研究からうつ病の病態解明をめざして. コロニーだより 352 : p 7, 2008.

川口禎晴, 深田齊秀, 菱川 学¹, 竹島京子, 花井敦子 (¹中央病院) : うつ状態モデルである HDAC6 欠損マウスの解析. 平成 20 年度愛知県心身障害者コロニープロジェクト研究報告書, pp 1-3, 2009.

山田憲一郎, 福士大輔, 山田裕一, 木村礼子, 若松延昭, 深田齊秀, 中山敦雄, 水野誠司¹, 鈴木基正¹, 丸山幸一¹, 熊谷俊幸¹ (¹中央病院) : 自閉症スペクトラム障害の染色体・遺伝子解析. 平成 20 年度愛知県心身障害者コロニープロジェクト研究報告書, pp 7-10, 2009.

教育活動

中山敦雄 : 病理学各論・神経病理 (名古屋大学医学部) 2008.4.1. ~ 2009.3.31.