

自閉症責任遺伝子 USP15 によるシナプス形成の制御

濱田 千晴 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

自閉症とは学習障害や認知障害、社会行動に異常が見られる発達障害の一つである。自閉症関連疾患の患者の脳においては未熟なスパインの密度が上昇し、異常なシナプス構造も認められる。自閉症の発症には遺伝的要因が主原因となるが、近年の研究から、胎児期ならびに幼児期の環境要因も発達障害の発症や重篤度に関与することが示唆されている。先行研究から、これまで数多くの自閉症関連遺伝子が同定されてきた。中でも *Usp15* は Simons Foundation Autism Research Initiative (SFARI) でカテゴリー2の Strong candidate gene に分類される遺伝子である。USP15 は脱ユビキチン化酵素の一つで、細胞内で様々なシグナル伝達や代謝経路を調節している。また、当研究室の先行研究において USP15 が大脳皮質第5層に多く発現していることを見出している。しかしながら、USP15 がどのような分子メカニズムで自閉症のリスク亢進の要因となっているのか、詳細な分子メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、中枢神経系における USP15 の機能解析を中心に、USP15 の異常がなぜ発達障害につながるのか、詳細なメカニズム解明を目的とした。

【方法】

(1) 免疫組織染色

野生型 (WT) マウス、USP15 KO マウスを 4%PFA/PBS 溶液で灌流固定後、脳を取り出し、4%PFA/PBS 溶液により 1 日間 4°C で静置した。その後 30%スクロース/PBS 溶液に移し、4°C で静置した。30%スクロース/OCT コンパウンドで包埋し、-80°C で凍結した。その後クライオスタットを用いて 30 μm の凍結切片を作成した。大脳皮質第5層の神経細胞の検出のために抗 CTIP2 抗体 (1:500, abcam)、プレシナプス検出のために抗 VGLUT1 抗体 (1:500, Millipore) と抗 VGLUT2 抗体 (1:500, SYSY)、ポストシナプス検出のために抗 PSD95 抗体 (1:500, NeuroMab) を一次抗体として用いた。核の染色には Hoechst33342 (5.0 μg/ml, Invitrogen) を用いた。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) を用いて観察した。

(2) 細胞免疫染色

カバーガラスに初代マウス神経細胞を播種し、7 日間培養した後、4%PFA/PBS で固定した。一次抗体として抗 USP15 抗体 (1:1000, CST)、神経細胞の核を検出するために抗 NeuN 抗体 (1:1000, Millipore)、神経細胞の樹状突起の検出のために抗 Map2 抗体 (1:1000, Millipore) を用いた。

(3) シナプスの定量

染色画像をもとに、プレシナプスのマーカーとポストシナプスのマーカーが共局在している領域をシナプスとみなし、定量を行った。分析には FIJI Image J の puncta analyzer を用いた。

【結果】

自閉症患者の原因の一つとしてシナプス形成の破綻が挙げられる。まず、USP15 がシナプス形成に関与するか調べるために、生

後 14 日 (以下 P14)、P21、P 28 の WT および USP15 KO マウスの大脳皮質第5層におけるシナプスの定量を行った。USP15 KO マウスの大脳皮質第5層で興奮性シナプスの数が減少、抑制性シナプスの数が増加していることがわかった。このことから、USP15 KO マウスではシナプス形成のバランスが異常となることが示唆された。

次に神経活動依存的な USP15 の発現の制御について検証した。これまでに当研究室では、USP15 は新生仔期の光刺激依存的に局在が変化することを見出している。そこで、細胞に脱分極を引き起こす KCl、または神経伝達物質の一つであるグルタミン酸を添加することにより刺激を与え、USP15 の局在が神経活動依存的に変化するかどうか観察した。細胞の観察は、刺激を添加してから 0~24 時間でタイムコースをとった。その結果、USP15 は通常細胞内で核に多く発現しているが、刺激を与えることにより細胞質や軸索へと周期的に局在が変動することがわかった。これらの結果から、USP15 の局在は神経活動依存的に制御されることが示唆された。

【展望】

本研究では、USP15 KO マウスの大脳皮質第5層においてシナプス形成のバランスが異常になることを見出した。また、USP15 の局在は神経活動依存的に変化することが示唆された。しかしながら、神経活動依存的な USP15 の変化がシナプス形成にどのように影響をもたらすのかは明らかでない。今後 USP15 のイメージングや細胞培養を用いた実験で明らかにしていく予定である。

大脳皮質には神経細胞だけでなくアストロサイトといったグリア細胞も存在する。アストロサイトは脳内でシナプス形成を誘導し、神経細胞の栄養的・機能的補助を行う。それゆえ、USP15 の機能はアストロサイトからの作用により制御される可能性がある。今後 WT および KO のマウスの脳から単離したアストロサイトの培養上清をマウス初代培養神経細胞に添加する実験やアストロサイトとの共培養を行い、神経細胞における USP15 の機能変化が神経細胞自律的、または非自律的に制御されるのかどうかを検証していく予定である。