

ミノ酸配列中にはタンパク質間相互作用に関わる F-box モチーフが含まれている。

生合成調節以外にも、豊富な AsA が関わる生理的役割の解明も重要である。光合成生物は、AsA ペルオキシダーゼを中心とした AsA/グルタチオンサイクルを発達させて、効率的な活性酸素種の代謝系を発達させているが<sup>16)</sup>、他にも未知の合目的な生理機能の存在が期待される。最近筆者らのグループでは、シロイヌナズナを用いた解析から、アスパラギン酸プロテアーゼや RING-Zn フィンガータンパク質などの遺伝子が細胞内の AsA レベルに応じて発現制御されることを明らかにしており、AsA は遺伝子発現制御を通じて生育や細胞周期制御などさまざまな生理作用に寄与することを提唱している<sup>17)</sup>。AsA はその知名度から研究対象としてはすでに過去のものと思われがちであるが、このように解決すべき重要課題にはまだ枚挙にいとまがなく、今後の研究の進展が楽しみである。

- 1) Kawai, T., Nishikimi, M., Ozawa, T., & Yagi, K. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 21973–21976.
- 2) Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y., Handa, S., Kubo, S., Shimokado, K., Goto, S., Nishikimi, M., Maruyama, N., & Ishigami, A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 5723–5728.
- 3) Ishikawa, T., Dowdle, J., & Smirnov, N. (2006) *Physiol. Plant*, 126, 343–355.
- 4) Ishikawa, T. & Shigeoka, S. (2008) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1143–1154.
- 5) Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., & Smirnov, N. (2007) *Plant J.*, 52, 673–689.
- 6) Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., & De Paepe, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 32500–32505.
- 7) Maruta, T., Yonemitsu, M., Yabuta, Y., Tamoi, M., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 28842–28851.
- 8) Maruta, T., Ichikawa, Y., Mieda, T., Takeda, T., Tamoi, M., Yabuta, Y., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2010) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 1494–1497.
- 9) Shigeoka, S., Nakano, Y., & Kitaoka, S. (1979) *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 25, 299–307.
- 10) Ishikawa, T., Nishikawa, H., Gao, Y., Sawa, Y., Shibata, H., Yabuta, Y., Maruta, T., & Shigeoka, S. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 31133–31141.
- 11) Ishikawa, T., Masumoto, I., Iwasa, N., Nishikawa, H., Sawa, Y., Shibata, H., Nakamura, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2006) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 2720–2726.
- 12) Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M.A., & Valpuesta, V. (2003) *Nat. Biotechnol.*, 21, 177–181.
- 13) Badejo, A.A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. (2011) *J. Exp. Bot.*, in press.
- 14) Yabuta, Y., Mieda, T., Rapolu, M., Nakamura, A., Motoki, T., Maruta, T., Yoshimura, K., Ishikawa, T., & Shigeoka, S. (2007) *J. Exp. Bot.*, 58, 2661–2671.

- 15) Zhang, W., Lorence, A., Gruszewski, H.A., Chevone, B.I., & Nessler, C.L. (2009) *Plant Physiol.*, 150, 942–950.
- 16) Foyer, C.H. & Shigeoka, S. (2011) *Plant Physiol.*, 155, 93–100.
- 17) Gao, Y., Nishikawa, H., Badejo, A.A., Shibata, H., Sawa, Y., Nakagawa, T., Maruta, T., Shigeoka, S., Smirnov, N., & Ishikawa, T. (2011) *J. Exp. Bot.*, 62, 3647–3657.

石川 孝博

(島根大学生物資源科学部生命工学科)

Recent advance in the study of ascorbic acid in photosynthesizing organisms

Takahiro Ishikawa (Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsu, Matsue, Shimane 690–8504, Japan)

## 自閉症ヒト型モデルマウスの開発

### 1. はじめに

自閉症とは社会的相互作用の質的な欠如、言語・非言語での意思伝達の障害、常同行動・固執的行動の顕在化という三つの主症状で DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) や ICD-10 (International Classification of Disorders) により定義される脳の発達障害である。近年では自閉症スペクトラム (autism spectrum disorders; ASD) という連続体の一部に自閉症が内在すると規定されており、ASD には *Fmr1* を原因遺伝子とする脆弱 X 症候群、*Mecp2* を原因遺伝子とするレット症候群なども含まれるとされる。その特徴として、男性と女性の比率が 4:1 であり、診断は 3 歳までに下されるのが通常である。その罹患率は報告により異なるものの、現在では 0.6–1% にも及ぶと推定されている<sup>1)</sup>。また、1. 様々な遺伝子の変異や構造変化が自閉症患者で認められていること、2. ASD 患者の家系ではその相対危険度が 25 倍以上であること、3. 双生児研究から、一卵性双生児における発病一致率が 70–90% と非常に高い一方、二卵性双生児においては 0–10% と、一致率の大きな違いがあることなどから、ASD は遺伝的素因がその原因として大きく関与することが知られている<sup>2)</sup>。無論、その発病一致率が 100% でないことから、環境要因も関与することは間違いない。例えば、1960 年代に発生した、妊婦へのサリドマイド投与が自閉症児を多

く発生させたという薬害事件はその際たる例である。この ASD に対しては現在も遺伝学的要因、環境要因の両側面からの研究がなされているが、自閉症患者の症状・原因とは極めて多様であり、その発症メカニズムはほとんど分かっていない。本稿では主に ASD モデルマウスの近年の研究を紹介すると共に、最近、筆者らが染色体工学を用いて作製した新しい自閉症モデルマウスの解析結果<sup>3,4)</sup>をまとめた。

## 2. 自閉症モデル動物

疾患の病態解明や新薬開発を直接ヒトで試みることは倫理的にも方法論的にも不可能である。よって ASD を含む精神疾患の病態解明、治療法の確立にはそのモデル動物が必須であると考えられる。精神疾患のモデル動物確立には、その疾患の症状とモデル動物で認められる行動上の類似性（表面妥当性）、その疾患に対するモデル動物の構造的類似性（構成妥当性）、およびその疾患に対する治療薬

がモデル動物で効果を示すか否か（予測妥当性）の3点を満たすことが必要であると考えられている。ASD の症状に対する表面妥当性を動物モデル、特にマウスを用いて示すために、Silverman, Moy らはいくつかの行動試験により評価できるのではないかと報告している<sup>5,6)</sup>。社会的相互作用の質的欠如を示すための試験として3チャンバー社会的相互作用試験、コミュニケーションの異常を調べるための試験として、超音波啼鳴反応試験、また固執性に対してはモリス水迷路などを用いた逆転学習試験などが提唱されている。自閉症を含む精神疾患の初期の動物モデルは、この表面妥当性のみに基づいたものが多く、実際の自閉症患者との遺伝的・分子的关系性は不明であり、モデルとしては十分とは言えなかった。しかしながら、近年の成熟した遺伝子工学技術により様々な遺伝子改変マウスが作製され、新たな「自閉症モデルマウス」として報告されてきた（表1）。これらのモデルマウスの内、いくつかは自閉症様の行動異常を示すのみならず、ヒトの遺伝学を基にしているこ

表1 自閉症のモデルマウス

モデルマウス名	社会性の異常	超音波発生の異常	固執性あるいは反復常同性の異常	引用文献
<i>Nlgn3</i> <sup>R451C</sup>	有・無	有	無	Tabuchi, Science, 2007 Chadman, Autism Res, 2008
<i>Nlgn3 KO</i>	有	有	無	Radyushkin, Genes Brain Behav, 2009
<i>Nlgn4 KO</i>	有	有	—	Jamain, PNAS, 2008
<i>Pten conditional KO (Nse-Cre)</i>	有	—	—	Kwon, Neuron, 2006
<i>Nlgn1 KO</i>	無	—	有	Blundell, J Neurosci, 2010
<i>Neurexin 1α KO</i>	無	—	有	Etherton, PNAS, 2009
<i>En2 KO</i>	有・無	無	有	Cheh, Brain Res, 2006 Moy, Genes Brain Behav, 2009
<i>Slc6a4 KO</i>	有	—	—	Moy, Genes Brain Behav, 2009
<i>Cadps2 KO</i>	有	—	—	Sadakata, J Clin Invest, 2007
<i>Shank3 +/-</i>	有	有	—	Bozdagi, Mol Autism, 2010
<i>Oxt KO</i>	有・無	有	—	Winslow, Horm Behav, 2000 Ferguson, Nat Genet, 2000
<i>Fmr1 KO</i>	有	—	無	Mineur, Behav Brain Res, 2006 Baker, Genes Brain Behav, 2010
<i>Avpr1b</i>	有	有	—	Wersinger, Mol Psychiatry, 2002 Scattoni, Behav Brain Res, 2008
<i>Gabrb3</i>	有	—	有	DeLorey, Behav Brain Res, 2008
<i>Mecp2 null</i>	有	有	有	Moretti, Hum Mol Genet, 2005 Filippis, Genes Brain Behav, 2010
<i>15q11-13 duplication</i>	有	有	有	Nakatani, Cell, 2009
<i>17p11.2 duplication [Dp(11)17/+]</i>	有	—	無	Molina, Hum Mol Genet, 2008

とから構成妥当性を充足しているといえる<sup>7)</sup>。例えば Tabuchi らは、ある特定の ASD 患者で認められる Nlgn3 のアミノ酸変異 (R451C) をマウスにて導入することでモデルマウスを作製した<sup>8)</sup>。従来までのモデルと異なり、より強い証拠が必要となる自閉症モデルの研究は新たな段階に突入したと言える。

### 3. 15q11-13 領域の重複

自閉症患者では単一遺伝子変異の他に、いくつかの領域 (15q11-13, 17p11.2 また 16p11.2 など) において重複、欠失などの染色体異常が認められている。我々はその中でも自閉症患者で最も高頻度に発生しているヒト染色体 15q11-13 領域に注目した。本領域の重複が 1-4% の自閉症患者において認められている。本領域に位置づけられている遺伝子はマウス染色体 7 番 B-C 領域に極めてよく保存されていることを利用し、我々は、染色体工学的手法により、マウス染色体 7 番 B-C 領域重複マウスを作製することに成功した<sup>3)</sup>。また、本領域はインプリンティング遺伝子が集積している箇所としても知られている。本領域では父性由来染色体から発現する遺伝子、母性由来染色体から発現する遺伝子、両親由来染色体から発現する遺伝子の 3 種の遺伝子が存在する。この遺伝的性質を裏付けるものとして、実際、本領域の父性由来染色体の欠失は過食、中程度の精神遅滞、筋肉の低緊張などを症状とする Prader-Willi 症候群、母性由来染色体の欠失がてんかん、重度の精神遅滞、運動失調を症状とする Angelman 症候群という別々の疾患を引き起こすことが知られている。よって、我々の作製した重複マウスも父性由来染色体重複マウス (*patDp/+*) と母性由来染色体重複マウス (*matDp/+*) の二つに分けられる。

### 4. 15q 重複マウスの行動解析

我々はまず本重複マウスが自閉症モデルマウスとして適したものであるかを調べるために、自閉症の三つの主症状に対応する行動試験を含めた計 20 種類に及ぶ網羅的行動試験を行った<sup>3)</sup>。その結果、*matDp/+* には顕著な異常は認められなかったが、*patDp/+* に自閉症様の行動学的異常が認められた。具体的には上述した ASD における三つの症状に対応する行動試験、すなわち 3 チャンバー社会的相互作用試験により社会性の低下 (図 1a, b)、母子単離による超音波啼鳴反応試験により超音波啼鳴発達の異常 (図 1c)、またモリスの水迷路を用いた逆転学習試験により固執性の上昇を見出した (図 1d, e)。また、この他に

も *patDp/+* はオープンフィールド試験における活動量の低下、中心部滞在時間の低下、立ち上がり回数の減少や、Y 字迷路における各アームへの進入回数の低下等の新奇環境下における不安度の上昇が認められた<sup>4)</sup>。

### 5. 15q 重複マウスの神経化学的解析

神経化学的研究により、ASD 患者では様々な神経伝達物質の量的異常、または受容体の異常がその病態に関与するということが報告されてきた。その中には矛盾するような結果も様々あるため、まだまだ議論の余地があるが、比較的一貫した結果が得られている分子の一つにセロトニン (5-hydroxytryptamine; 5-HT) がある。ASD 患者において、血中 5-HT の上昇、発達期における 5-HT 合成能の異常などが報告されている<sup>9,10)</sup>。さらに、5-HT の ASD への関与を示唆するものとして、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI) の投与が一部の自閉症患者において、中心的な症状のうちの一つの常同行動を改善したという報告もある<sup>11)</sup>。これらの理由から我々は HPLC を用いて *patDp/+* 脳内各領域における 5-HT 量を調べた<sup>4)</sup>。成体においては、中脳、嗅球においてセロトニンの減少が認められる。ASD は発達障害であるため、本マウスにおいても発達期に異常が認められるかを調べたところ、発達期における *patDp/+* では、調べた脳領域全てにわたってセロトニンの減少が認められた (図 2)。

### 6. 5-HTT ノックアウトマウスとの関連性

我々の作製した *patDp/+* は行動学的側面からも神経化学的側面においても、5-HTT ノックアウトマウス (5-HTTKO) と非常に良く似ている。行動レベルでは、5-HTTKO は新奇環境下において探索活動が低い、ガラス玉覆い隠し行動が少ない、novelty suppressed feeding 試験においてエサを食べに行くまでの時間が長い、などの表現型を示し、今回の我々の研究で明らかになった *patDp/+* の行動学的異常との類似性がある<sup>12-14)</sup>。さらに 5-HTTKO の脳内における細胞内 5-HT 量は 70% 減少しており、程度の差はあるが、この点も *patDp/+* と類似している<sup>12,15)</sup>。この *patDp/+* における 5-HTTKO との行動学的・神経化学的類似性から、発達期、あるいは胎生期の 5-HT シグナルが破綻し、その行動学的表現型に対して大きな影響をもっている可能性が考えられる。

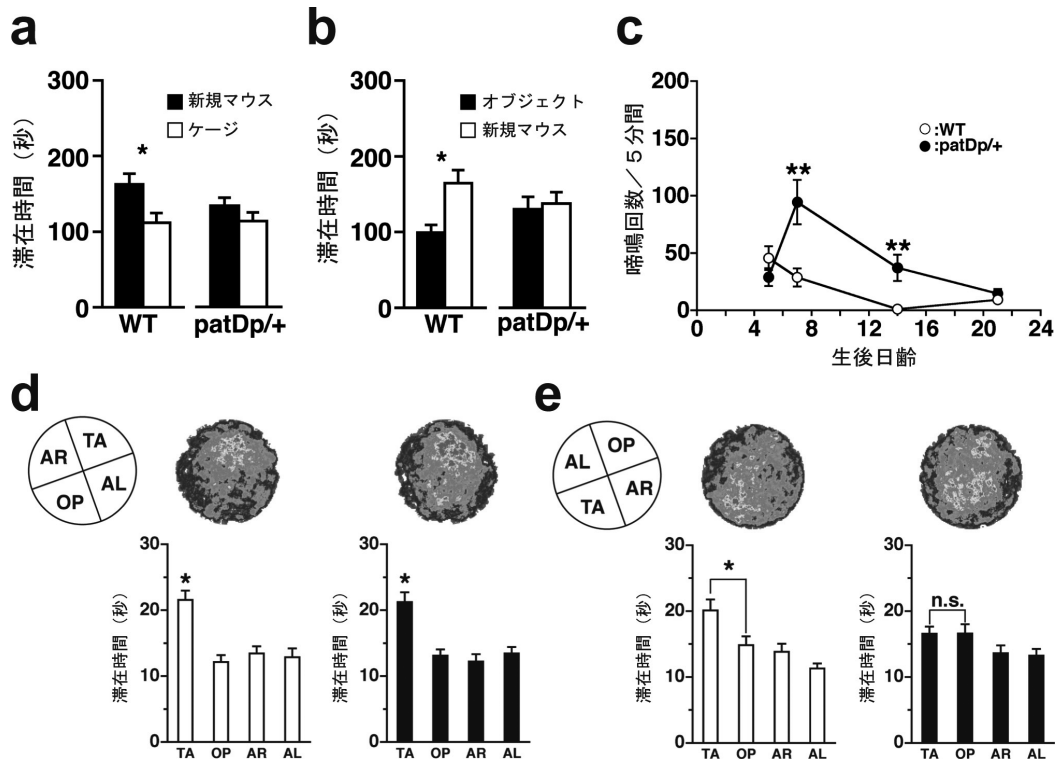


図1 *patDp/+* における自閉症様の行動学的異常

(a, b) 3チャンバー社会的相互作用試験の結果. 野生型マウス (WT) がコントロールに比べて, これまで遭遇したことのないマウス (新規マウス) 付近で多くの時間を費やす一方, *patDp/+* ではこの差がなかった. (b) ではコントロールとしてケージの中にオブジェクトを入れた. \* $p < 0.05$ . (c) 母子単離による超音波啼鳴反応試験の結果. WT では反応回数が生後5日齢でピークに達し, その後, 減少し, 生後14日齢でほとんど消失する. しかし, *patDp/+* では生後7日齢でピークに達し, 14日齢でも反応していた. \*\* $p < 0.005$ . (d) モリス水迷路における学習後のプロブ試験の結果. *patDp/+* (黒) ではWT (白) 同様にプラットフォームの場所を記憶することができた. TA: プラットフォームのあった場所, AR: TA に対して右側, AL: TA に対して左側, OP: TA と反対側の四分円領域. 滞在時間の長い場所を薄い色で, 短い場所を濃い色で示している. (e) (d) のTAを逆の位置にして再学習させた後のプロブ試験の結果. WT (白) は新しいTAを記憶することができたが, *patDp/+* (黒) は前のプラットフォームの場所付近で長く滞在した (図中OP). \* $p < 0.01$ .

## おわりに

本稿では筆者らの新しく作製した自閉症モデルマウスを中心に, 最近の自閉症モデルマウスについて紹介した. 一方で, ヒトの高次脳機能を考慮に入れると, マウスにおける精神疾患モデルには疑問が持たれているのもまた確かである. しかしながら, 自閉症モデル動物の研究は現段階では始まったばかりともいえる. 今後, 上記のような自閉症モデル動物を多種作製し, ASD という大きな集団の“共通性”を見出すことが自閉症発症のメカニズムに迫れるものと考えられる.

## 謝辞

本研究は広島大学, 大阪バイオサイエンス研究所を中心として数多くの共同研究者の協力の下に行われたものです. 行動実験に関する様々なアドバイスをいただいた宮川剛先生, 高雄啓三先生に感謝の意を表したいと思います. 改めて関係者の皆様にお礼申し上げます.

- 1) Kogan, M.D., Blumberg, S.J., Schieve, L.A., Boyle, C.A., Perin, J.M., Ghandour, R.M., Singh, G.K., Strickland, B.B., Trevaathan, E., & van Dyck, P.C. (2009) *Pediatrics*, 124, 1395-1403.
- 2) Abrahams, B.S. & Geschwind, D.H. (2008) *Nat. Rev. Genet.*, 9, 341-355.

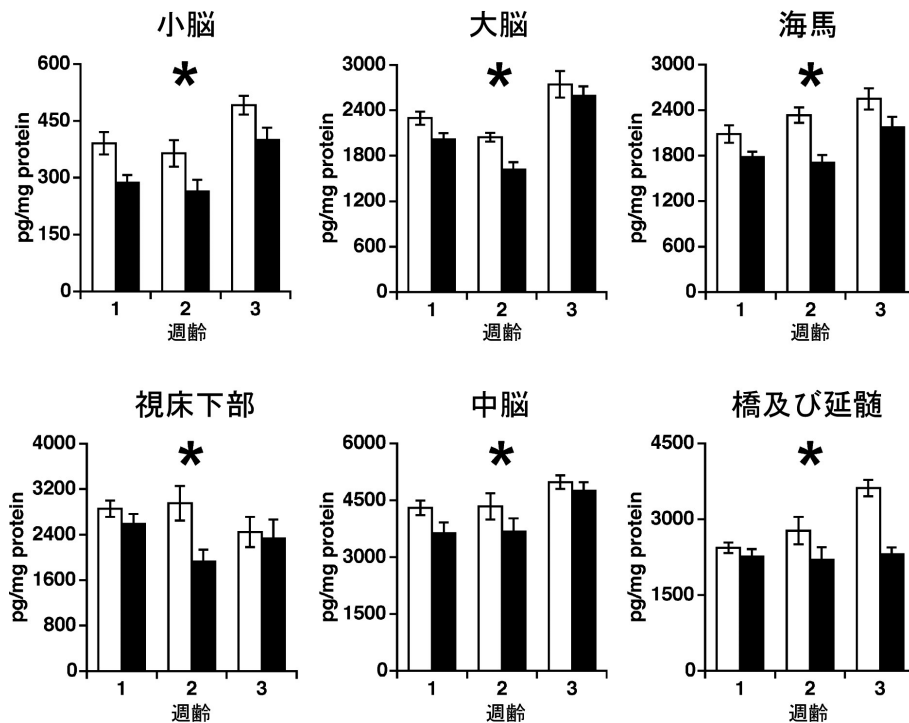


図2 発達段階における *patDp/+* 脳内各領域の 5-HT 量  
生後 1, 2, 3 週齢における *patDp/+* (黒) および, WT (白) の脳内各領域における 5-HT 量を調べた。\* $p < 0.05$

- 3) Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., Ise, S., Ohta, H., Inoue, K., Tomonaga, S., Watanabe, Y., Chung, Y.J., Banerjee, R., Iwamoto, K., Kato, T., Okazawa, M., Yamauchi, K., Tanda, K., Takao, K., Miyakawa, T., Bradley, A., & Takumi, T. (2009) *Cell*, 137, 1235-1246.
- 4) Tamada, K., Tomonaga, S., Hatanaka, F., Nakai, N., Takao, K., Miyakawa, T., Nakatani, J., & Takumi, T. (2010) *PLoS One*, 5, e15126.
- 5) Silverman, J.L., Yang, M., Lord, C., & Crawley, J.N. (2010) *Nat. Rev. Neurosci.*, 11, 490-502.
- 6) Moy, S.S., Nadler, J.J., Young, N.B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R.P., Barbaro, J.R., Wilson, L.M., Threadgill, D. W., Lauder, J.M., Magnuson, T.R., & Crawley, J.N. (2007) *Behav. Brain Res.*, 176, 4-20.
- 7) Takumi, T. (2010) *Brain Dev.*, 49, 753-758.
- 8) Tabuchi, K., Blundell, J., Etherton, M.R., Hammer, R.E., Liu, X., Powell, C.M., & Südhof, T.C. (2007) *Science*, 318, 71-76.
- 9) Lam, K.S., Aman, M.G., & Arnold, L.E. (2006) *Res. Dev. Disabil.*, 27, 254-289.
- 10) Chugani, D.C., Muzik, O., Behen, M., Rothermel, R., Janisse, J.J., Lee, J., & Chugani, H.T. (1999) *Ann. Neurol.*, 45, 287-295.
- 11) Hollander, E., Phillips, A., Chaplin, W., Zagursky, K., Novotny, S., Wasserman, S., & Iyengar, R. (2005) *Neuropsychopharmacology*, 30, 582-589.
- 12) Zhao, S., Edwards, J., Carroll, J., Wiedholz, L., Millstein, R.A., Jaing, C., Murphy, D.L., Lanthorn, T.H., & Holmes, A. (2006) *Neuroscience*, 140, 321-334.
- 13) Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansoorge, M.S., Gordon, J.A., Francis, J.H., Bradley-Moore, M., Lira, J., Underwood, M.D., Arango, V., Kung, H.F., Hofer, M.A., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2003) *Biol. Psychiatry*, 54, 960-971.
- 14) Olivier, J.D., Van Der Hart, M.G., Van Swelm, R.P., Dederen, P.J., Homberg, J.R., Cremers, T., Deen, P.M., Cuppen, E., Cools, A.R., & Ellenbroek, B.A. (2008) *Neuroscience*, 152, 573-584.
- 15) Fabre, V., Beaufour, C., Evrard, A., Rioux, A., Hanoun, N., Lesch, K.P., Murphy, D.L., Lanfumey, L., Hamon, M., Martres, M.P. (2000) *Eur. J. Neurosci.*, 12, 2299-2310.

玉田 紘太<sup>1)</sup>, 中井 信裕<sup>1),2)</sup>, 内匠 透<sup>1),3)</sup>

<sup>1)</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科,

<sup>2)</sup>京都大学大学院生命科学研究所, <sup>3)</sup>JST, CREST)

A humanized mouse model of autism

Kota Tamada<sup>1)</sup>, Nobuhiro Nakai<sup>1),2)</sup>, and Toru Takumi<sup>1),3)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 1-2-3, Kasumi, Minami, Hiroshima 734-8553, Japan, <sup>2)</sup>Graduate School of Biostudies, Kyoto University, <sup>3)</sup>JST, CREST)