

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	仲西 萌絵
学位授与の条件	学位規則第4条第1・2項該当		
論文題目			
<p>Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism          （自閉症で同定された希少な neuroligin1 遺伝子変異の機能的意義）</p>			
論文審査担当者			
主査	教授 橋本 浩一	印	
審査委員	教授 相澤 秀紀		
審査委員	准教授 岡本 泰昌		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>自閉症（自閉スペクトラム症）は、社会的相互作用・コミュニケーションの障害、繰り返し行動、特定のものへの強いこだわりなどが特長的な発達障害の一つである。2010年にアメリカで行われた調査では、68人に1人が自閉症であると報告されている。自閉症の発症には遺伝的要因が強く関与することが明らかとなっており、様々な遺伝子の変異が発症と関与すると考えられているが、原因となる遺伝子の全容と詳しい分子メカニズムは明らかではない。近年の研究では、特にシナプスに関連する遺伝子の変異が多く同定されていることから、シナプス異常と自閉症の関連が強く示唆されている。特にシナプス膜に存在する分子 neuroligin (NLGN) と、その結合分子である neurexin (NRXN)、shank から構成される NLGN-NRXN-Shank 経路では、これまでに複数の自閉症関連遺伝子が同定されており、この分子経路の異常は自閉症の発症と強く関連していると考えられていた。これまでに NLGN ファミリーの NLGN3 や NLGN4 が自閉症関連遺伝子であることが報告されてきたが、最もよく研究されているファミリー分子である NLGN1 の自閉症への関与や、他の神経精神疾患への関与は明らかでなかった。</p> <p>今回我々は、自閉症の兄弟2名の全エクソーム解析から、新規に NLGN1 遺伝子のミスセンス変異（Pro89Leu, P89L）を同定し、さらに既存のデータセットを用いて、他に5名の患者から4つの NLGN1 ミスセンス変異（L269P, G297E, H795Y, T90I）を新たに同定し、これら変異がどのような機能的差異をもたらすかに関して解析を行った。</p>			

*in silico* の解析では、これら 5 つの変異のうち、少なくとも 3 つ (P89L, L269P, G297E) はタンパク質の構造に影響を及ぼす可能性が高いことが示唆された。また 2 つの変異 (P89L, T90I) は、同じプロリンリッチなループ状の構造に位置しており、この構造上には、NLGN3 と NLGN4 で複数の自閉症関連変異が報告されていた。

培養細胞へ変異型 NLGN1 を過剰発現したところ、変異型では、5 つのうち 4 つ (P89L, L269P, G297E, H795Y) で野生型と比較して発現量の減少が認められた。また、うち 3 つ (P89L, L269P, G297E) では細胞内局在の変化 (小胞体への局在) が観察され、これらの変異では共通する異常メカニズムによってタンパク質の発現減少が引き起こされていることが示唆された。発現量が減少するものの、局在に変化が見られなかった変異 1 つ (H795Y) を詳細に解析した所、細胞表面において、NLGN1 の細胞外ドメインが切断されるプロセスが亢進していることが明らかになり、このことから自閉症変異型での NLGN1 の発現量減少に、少なくとも 2 つの異常なメカニズムが関与することを示していると考えられた。NLGN1 は、初代培養神経細胞に過剰発現すると、スパインの形成を促進することが知られる。この機能を自閉症変異型で確認すると、4 つの変異型 (P89L, L269P, G297E, H795Y) ではスパイン誘導能が減少していた。

最後に、NLGN1 の変異が、実際に自閉症様の行動異常を引き起こすか確認するため、新規ゲノム編集技術 CRISPR/Cas を用いて一塩基置換を導入し、変異ノックインマウス (*Nlgn1* P89L マウス) を作製した。変異型マウスでは、脳に発現する NLGN1 タンパク質の減少が確認された。このマウスの行動を網羅的に解析した所、社会的相互作用を調べるテスト (three-chamber social interaction, caged social interaction, tube test) および空間記憶能力を調べるテスト (モリス水迷路) で異常が見られることが明らかになった。このことは、NLGN1 遺伝子変異が、NLGN1 タンパク質の減少をもたらし、自閉症様の行動変化を起こしうることを示していると考えられた。以上より、NLGN1 遺伝子の変異は、自閉症の発症に繋がり、NLGN1 は新たな自閉症候補遺伝子である可能性が示唆された。

本研究は自閉症患者から新たな遺伝子変異 NLGN1 P89L を同定、また NLGN1 の自閉症変異体を包括的に機能解析し、さらに NLGN1 自閉症変異体モデルマウスを作製・解析することにより自閉症と NLGN1 との関わりを明らかにしたもので、自閉症の発病メカニズムを理解する上で重要な知見と考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

学力確認の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	仲西 萌絵
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目			
Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism (自閉症で同定された希少な neuroligin1 遺伝子変異の機能的意義)			
試問担当者			
主 査	教授	橋本 浩一	印
審査委員	教授	相澤 秀紀	
審査委員	准教授	岡本 泰昌	
〔学力確認の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記 3 名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成 29 年 11 月 2 日の第 71 回広島大学研究科発表会（医学）及び平成 29 年 11 月 2 日日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p>			
<ol style="list-style-type: none"> <li>1 NLGN1 自閉症変異体の新規性と意義</li> <li>2 変異体の <i>in silico</i> 評価法の詳細と意義</li> <li>3 シナプス表現型及びシナプス伝達と自閉症との関連</li> <li>4 スパイン変化と社会行動との関連</li> <li>5 シナプス分子の <i>shedding</i> の機能的意義に関する考察</li> <li>6 患者家族の臨床症状</li> <li>7 自閉症変異体研究に関する今後の戦略</li> </ol>			
<p>これらに対して極めて適切な解答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試問した結果、本学大学院博士課程を修了して学位を授与される者と同等以上の広い学識を有することを全員一致で確認した。</p>			