

201122087A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらす
シナプス機能障害と小胞体ストレス誘導
についての研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらす
シナプス機能障害と小胞体ストレス誘導
についての研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成24（2012）年 5月

目 次

I. 総括研究報告

(研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況、健康危険情報を含む)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらすシナプス機能障害と

小胞体ストレス誘導 についての研究

神保恵理子----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 10

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）
総括研究報告書

自閉性障害における遺伝子変異がもたらすシナプス機能障害と
小胞体ストレス誘導 についての研究

研究代表者 神保 恵理子 自治医科大学・医学部・助教

研究要旨

脳発達障害である自閉性障害は、社会的な大きな問題であり、治療法の確立が緊急な課題であるものの、分子病態が未だ十分に把握されていない。これまで申請者らが見出した機能シナプスに関与するCADM1の2つの変異は、小胞体ストレスを誘導した。Cadm1ノックアウトマウスにおいて、マウス幼少仔と母の間で交わされるコミュニケーション(超音波音声)を測定したところ、野生型と比較して数および質の変化が見られた。シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性が示唆され、Loss-of-function、また変異によるGain-of-functionが病態に関わっている可能性について検討する。

A. 研究目的

脳発達障害である自閉性障害は、その社会行動性、コミュニケーションの欠如という特徴を持ち、近年社会的な大きな問題となっている。しかしながら、分子病態が未だ十分に把握されていない。その原因は発達期の脳は、多様な要因に脆弱性を持ち遺伝的要因と環境要因の双方が影響し、分子病態が把握されていない点にある。

変異タンパク質は、小胞体ストレスセンサーを介してCHOP、ATF4などの様々なUPR (Unfolded protein response) を誘導し、GABA受容体などのシナプスへの膜輸送を障害する。

本研究は患者細胞、モデルマウスを用いて、自閉性障害に見出された遺伝子変異産物（神経接

着蛋白CADM1）が誘導するCADM1変異タンパク質が誘導する小胞体ストレスシグナルにより、UPRが引き起こすシナプス機能タンパク質の膜輸送障害と自閉性障害統一的病態との関係を明らかにする。

かつて神経変性疾患において、少数ではあるが遺伝性家族性パーキンソン病、アルツハイマー病など分子病態の解明が疾患病態解明に大いに役立ったように、自閉性障害患者群の一部ではあっても単一遺伝子の変異で説明できる遺伝子変異データの集積が自閉性障害の統一的病態解明の飛躍的理解につながるものと考えられる。すでに遺伝子変異が確定した症例を中心に、遺伝子変異産物による小胞体ストレスに注目することで、自閉性障害における遺伝的要因と環境的要因の相互作用を解析するもの

であり、本研究により自閉性障害におけるシナプス機能障害との関係が明らかにされることが期待される。

本研究は、治療戦略構築の研究の突破口につながる研究であると考えており、自閉性障害患者の社会的不適応に対する治療法の開発は医療費、治療費を減額するだけでなく、患者本人自身の社会生活の改善、また患者に関わる社会的な問題および家庭の問題の改善が見込まれる。厚生行政に貢献するのみならず、人間の個々の生活、日本の労働力を向上する点においても大いに貢献することが期待される。

B. 研究方法

- ① Cadm1ノックアウトマウスにおける音声解析：Cadm1ノックアウトマウスを用いて、音声であるUltra sonic vocalization (USV) の解析を行った。
- ② Cadm1ノックアウトマウスの組織免疫染色：音声解析に用いた仔マウスの脳について免疫染色を行なった。
- ③ Cadm1ノックアウトマウスにおける行動解析：Cadm1ノックアウトマウスを用いて、不安様行動、攻撃行動、社会性行動などの行動解析を行った。
- ④ CADM1変異タンパク質の機能障害についての解析：Cadm1の変異を、培養細胞系およびCadm1ノックアウトマウス初代神経細胞系に導入し、免疫染色を行い、シナプス機能タンパク質膜輸送障害との関係について解析を行った。
- ⑤ Cadm1変異モデルマウスの作製：Y251Sの変異を導入したCadm1ノックインマウスを作製した。

<実験操作法>

1) 細胞培養

COS細胞およびC2C5細胞は、37℃ 5.0%CO₂インキュベーターで培養した。トランスフェクションはリン酸カルシウム法、あるいはlipofectamine 2000を用いて行った。

2) 神経細胞の培養

マウス胎児の脳から海馬を採取した後、高グルコースDMEM溶液に入れ、終濃度0.25 % になるようトリプシンを加えて37℃で15 分インキュベートした後、900rpmで5分間遠心分離を行った後、上清を取り除き、Hanks solutionを5 ml加え、1～2分静置後、上清を取り除き、Hanks solutionを5 ml加えて（3回繰り返す）、ピペティング1×10⁵ cells/cm²、神経細胞用培養液を0.3ml/well入れ、3週間程度37℃ 5.0%CO₂インキュベーターで培養後、トランスフェクションを行った後、免疫染色法を行った。

3) 免疫染色法

細胞を終濃度2 % パラホルムアルデヒドを含むPBSにて固定後、PBSで洗浄した後、ブロッキングとして1%ヤギ血清および0.5%スキムミルク含むPBS溶液を用い室温で一時間置いた。一次抗体に小胞体関連マーカーを4℃で一昼夜反応させ、さらに二次抗体としてFITCあるいはテキサスレッド標識抗イムノグロブリン抗体を加え、37℃一時間反応後PBSで希釈した後グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4) イムノブロット分析

組織および細胞を回収し、PBSで2回洗浄し遠心分離後、上清を捨て沈殿した細胞を50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM

NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail(Sigma)にて細胞を可溶化し回収した後、蛋白質量をBradford法にて測定した。得られた上清をSDS-アクリルアミドゲルにて泳動した。ニトロセルロースフィルターに転写し、一次抗体で反応させた後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識イムノグロブリンを用い、BCIPおよびNBTを含む発色液で反応させた。

5)実験動物（ノックインマウス）の作製

5-1) CADM1遺伝子のターゲティングストラテジー

マウスCADM1遺伝子のcDNA配列をもとにしてマウスドラフトゲノムを検索し、CADM1遺伝子が存在する染色体とその領域を確認した。さらにcDNA配列とゲノム配列を整列させて、CADM1遺伝子のエキソン-イントロン構造を明らかにした。CADM1遺伝子のゲノム配列を検索して、配列の特異性が高い領域を抽出した。これらの情報から、CADM1遺伝子産物の機能ドメインである第3イムノグロブリンドメインをコードしているエキソン6に変異を含む遺伝子置換がおこるように、ターゲティングストラテジーを作製した。

5-2) CADM1遺伝子を含むBACクローンのスクリーニング

CADM1遺伝子のゲノムDNA配列をもとにして、イントロン5に配列のPCRプライマーを設定した。このプライマーの組み合わせで、マウスES細胞から調製したゲノムDNAをテンプレートにして、LA-Taq(タカラ)を用いてCADM1遺伝子の5'隣接領域のゲノムDNAフラグメント601 bpを増幅した。そのPCR産物をTAクローニングベクター(pGEM-T Easy,

Promega)にサブクローニングし、シーケンス解析を行ってフラグメントが目的のゲノムDNAクローンであることを確認した。このプラスミドからEcoRI消化で生成するDNAフラグメントをプローブDNAフラグメントとした。DNAラベル化キット(Megaprime DNA Labelling System; Amersham Bioscience)を用いて、ランダムプライム法によりプローブDNAフラグメントを $[^{32}\text{P}]$ ラベルした。セファデックススピンカラム(ProbeQuant G-50 Micro Columns; Amersham Bioscience)を用いてラベル化されたDNA断片を精製し、BACクローンスクリーニング用プローブとした。

129S6/SvEvTac系統マウスのゲノムDNAのBACライブラリー、RPCI-22のBACクローンがドットされた高密度メンブレン (BACPAC Resource Center at Children's Hospital Oakland Research Institute, CA) をハイブリダイゼーションバッファーに入れて、65°Cプレインキュベートさせた後、95°C5分間加熱し、直後に5分間氷冷させて変性させた $[^{32}\text{P}]$ ラベル化CADM1遺伝子のBACクローンスクリーニング用プローブを加えて、65°Cで4時間インキュベートした。終了後にナイロンメンブレンを洗浄し、サーベイメーターでメンブレンに結合したプローブに由来する放射活性をモニターし、放射活性がほぼ一定になるまでこの洗浄を繰り返した。洗浄したメンブレンにX線フィルム(BioMax MS; Kodak)を重ねてオートラジオグラフィー後、ドットハイブリダイゼーションシグナルから陽性クローンを同定し、CADM1遺伝子を含むBACクローン

を得た。得られたBACクローンはPCRを行い、確認した。

5-3)CADM1遺伝子ターゲティングベクターの構築

大腸菌内での能動型相同組み換え反応であるRed/ET Recombination Technology (Zhang Y et al., Nature, 1998) を利用し、CADM1遺伝子を含むBACクローンからCADM1遺伝子ターゲティングベクターを構築した。ターゲティングベクターのロングアーム、およびショートアームに相当するCADM1遺伝子のゲノム領域の両端の配列を、大腸菌内での能動型相同組み換え反応のためのキー配列とした。まず、CADM1-H5配列、カナマイシン耐性遺伝子、*rpsL*遺伝子、およびCADM1-H6配列をタンデムにつないだDNAカセットを構築した (CADM1ブレークインフラグメント)。Red/ET反応の能力を有する大腸菌株に、CADM1遺伝子のBACクローンとCADM1ブレークインフラグメント1をエレクトロポレーション (バイオラッド、ジーンパルサー2) により導入した。宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導させ、カナマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、CADM1ブレークインフラグメントがBACクローンのエキソン6に挿入された組み換えBACクローンをスクリーニングした (CADM1 RecBAC Inter1)。次に、CADM1-H5配列、*DraI*切断部位、変異型CADM1エキソン6 およびCADM1-H6配列をタンデムにつないだDNAカセットを構築した (CADM1 レペアーフラグメント)。Red/ET反応の能力を有する大腸菌株に、CADM1 RecBAC Inter1とCADM1レペアーフラグメントをエレクトロポレーシ

ョンにより導入した。この宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導させ、ストレプトマイシン耐性コロニーをピックアップすることにより、変異型CADM1エキソン6が挿入された組み換えBACクローンをスクリーニングした (CADM1 RecBAC Inter2)。そして、CADM1遺伝子座のイントロン6の領域にPGK/Neoカセットを挿入するために、CADM1-H3配列、*EcoRV*サイト、*floxed*-PGK-*gb2*-Neo/Kan遺伝子カセット、*DraI*、およびCADM1-H4配列をタンデムにつないだDNAフラグメントを、PCRにより構築した (CADM1 Dual Neoブレークインフラグメント)。Red/ET反応の能力を有した大腸菌株に、CADM1 RecBAC Inter2とCADM1 Dual Neoブレークインフラグメントを導入し、この宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導させ、カナマイシン耐性のコロニーをピックアップすることにより、CADM1 Dual NeoブレークインフラグメントがCADM1遺伝子座のイントロン6に挿入された組み換えBACクローンをスクリーニングした (CADM1 RecBAC Intermediate3)。CADM1-H1配列、DT-A遺伝子、pBluescriptベクター配列、およびCADM1-H2配列をタンデムにつないだDNAカセットを構築した (CADM1 カットアウトプラスミド)。上記と同様の方法で、Red/ET反応の能力を有する大腸菌株にCADM1 RecBAC Intermediate3とCADM1カットアウトプラスミドを導入した。宿主大腸菌内でRed/ET反応を誘導させアンピシリン耐性コロニーをピックアップすることにより、ターゲティングベクターのロングアーム、およびショートアームに相当するCADM1遺伝子のゲノム領域を

持つプラスミドをスクリーニングし、
CADM1 KITVを構築した。制限酵素マッピングとシーケンス解析により、CADM1遺伝子ターゲティングベクターのコンフィグレーションとロングアーム、ショートアームの接合部のDNA配列を確認した。

5-4)ES細胞へのCADM1遺伝子ターゲティングベクターの導入とG418耐性株の樹立
CADM1遺伝子ターゲティングベクターを精製し、制限酵素NotIにより直鎖にしたものをES細胞に導入した。不活性化処理したマウス胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、129Sv/EvTac系統マウス由来ES細胞を培養した。ES細胞をエレクトロポレーションバッファーにサスペンドし、直鎖にしたCADM1遺伝子ターゲティングベクターを加えて、室温で5分間インキュベートした。その後、ジーンパルサーキューベット（バイオラッド）にES細胞のサスペンドを加え、ジーンパルサーを用いて、エレクトロポレーションを行った。PGK/Neo遺伝子のトランスジェニックマウス由来の胎児繊維芽細胞をフィーダー細胞にして、40～60%の生存率のES細胞を一晩培養し、その後は200 μ g/mlのG418を含む培地を交換しながら7日間培養した。その後に形成されるG418耐性ES細胞のコロニーをピックアップして培養することにより、ターゲティングベクターが導入されたES細胞をクローニングした。これらのES細胞株を凍結保存するとともに、さらフィーダー細胞の上に継代して増殖させ、それぞれの細胞株からゲノムDNAを抽出した。

5-5)G418耐性ES細胞株のサザンスクリーニング

樹立されたES細胞株のゲノムDNAをEcoRVで完全分解させ、生成したゲノムDNA断片をイソプロパノール沈澱により析出させ、洗浄後TEに再溶解させた。これらのゲノムDNA断片をアガロースゲルで電気泳動し、アガロースゲル中に分離されたゲノムDNA断片をナイロンメンブレンにトランスファーさせた。ゲノムDNA断片がトランスファーされたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーションバッファーに入れて65 $^{\circ}$ Cでプレインキュベートした後、変性させた[32 P]ラベル化CADM1 3'プローブを加えて、65 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートした。終了後にナイロンメンブレンを洗浄し、オートラジオグラフィ後、ドットハイブリダイゼーションシグナルから陽性細胞株を同定した。

5-6)ES細胞株の凍結保存、ジェノタイピング、およびカリオタイピング
サザンスクリーニングにより選択され、CADM1遺伝子座にターゲティングを受けたES細胞株を融解してフィーダー細胞上に培養した。さらにこのES細胞株からゲノムDNAを抽出し、CADM1 5'プローブ、3'プローブ、およびKIプローブを用いたサザン解析により遺伝子ターゲティングを受けたCADM1遺伝子座の確認、またES細胞株のカリオタイプを調べた。

5-7)キメラマウスの作製

樹立したES細胞株をマウス初期胚に注入して標的遺伝子座がターゲティングを受けたES細胞株をC57BL/6系統マウスのブラストシスト合計60個に注入し、CD-1系統の偽、妊娠マウスに移植した。ES細胞株を注入された胚から産まれた子を哺育させ、離乳時点の産子の毛色から、各キメラマウス

におけるES細胞由来の組織の寄与率を判定した。

5-8) F1ヘテロミュータントマウスの作製
ES細胞由来の組織の寄与率が良好な雄性キメラマウス10週齢を野生型雌性C57BL/6系統マウスと交配させた。さらに過排卵処理を施した野生型雌性C57BL/6系統マウスと交配させ、交配成立後に受精卵を採取して、偽妊娠マウスに移植し、産まれた仔の離乳時点の産子の毛色から、雄性キメラマウスのES細胞由来の精子に由来する産子を選択した。得られたF1ヘテロミュータントマウス同士を交配した。

(倫理面への配慮)

あらかじめ当該研究機関である自治医科大学の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に手続を行った後、研究を行った。

本邦自閉性障害児（3-15歳）のシナプス関連遺伝子群の変異解析に用いる末梢血液細胞は、自治医科大学において、自閉症の原因遺伝子解析を課題として、研究倫理委員会の承諾を得て、実施された。人体から採取された試料等を用いる場合は、文書により説明し、文書による同意（研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意、インフォームド・コンセント）を得た検体に対して実験を行った。

組換えDNA実験に関しては、所属施設での承認を受け指針に従う。取扱いは組換えDNA実験および微生物の取り扱いの技術を持ち合わせ、内容に関しても熟知しており、適切な対応を行った。
マウスを用いた動物実験は、施設にて設定

されている動物取り扱いマニュアルに沿って行う。マウス各組織の採取およびやむを得ず施行した安楽死に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、筋肉弛緩剤であるネンブタール麻酔下あるいは二酸化炭素充満させた箱内で無痛下において二度と覚醒しないよう安楽死させてから行うことにしており、苦痛の無いように動物に対する倫理面での十分な配慮がなされた本研究で行う動物実験はいずれも脊椎動物に対し全く苦痛や不快感を与えないと期待される実験あるいは瞬間的なわずかな苦痛、不快感しかおこさない処理、および脊椎動物に対し限局的な短時間継続する軽いあるいは中程度の痛みを起こす処置に属するものであり、実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、麻酔下で行うことにしており、動物に対する倫理面での十分な配慮がなされた。マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔を行い無痛下で二度と覚せいしないよう、安楽死させてから行い、苦痛の無いよう配慮をした。

C. 研究結果

これまで、自閉性障害の患者とその家族に見出したCADM1の2つの変異(H246N, Y251S)により、小胞体ストレスが誘導され、Cadm1変異を発現させた神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制されており、Cadm1変異タンパク質は、シナプスマーカーと共局在する割合が少なかった。このことからシナプス障害が起こっていることが示唆された（平成22年度受理：Cell Death Disease 2010）。またBourgeronらが発見した自閉性障害患者由来Neurologin-3(R451C)変異についても小胞体ストレスが誘導され、CHOPの発現増大が観察さ

れた（平成22年度受理：Cell Death Disease 2010）。Cadm1ノックアウトマウスは、行動異常、Social Communicationの異常を示し、シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性を示した（平成22年度受理：BBRC 2010）。

本年度は、Cadm1ノックアウトマウスを用いて自閉性障害の特徴の1つであるコミュニケーション障害について検討したところ、Cadm1ノックアウトマウスは言語障害のモデルマウスFoxp2(R552H)変異ノックインマウスと同様に、超音波音声によるコミュニケーションの異常と小脳の発達障害を示した。Cadm1は分子層のプルキンエ細胞の樹状突起の端に発現しており、Cadm1ノックアウトマウスではグルタミン酸作動性神経のマーカであるvesicular glutamate transporter 1 (vGluT1)の発現が減少した。この現象は、Foxp2KIマウスと同じであり、Cadm1の発現している小脳（プルキンエ細胞）が超音波音声に関与していることを示唆した（平成23年度受理：PLoS ONE 2012）。そして、CADM1と同様にPDZ結合領域を持つシナプス蛋白CNTNAP2が、Foxp2の関与する超音波音声コミュニケーションに関わっていることを明らかにした（平成23年度受理：Neurosci. Lett. 2012）。

また、CADM1脳発達過程におけるそれぞれの領域でのCadm1アイソフォームの発現の違いを明らかにした（投稿予定）。

自閉性患者に見出したCADM1変異を導入したノックインマウスを作製したものの、震災による物資不足や温度管理不十分により繁殖が予定より遅れたため、ノックインマウスを用いた解析は次年度に実施する。

D. 考察

Cadm1ノックアウトマウスは、言語障害のモデルマウスであるFoxp2変異ノックインマウスと同様に、自閉性障害の特徴の1つであるコミュニケーション障害に相当する超音波音声によるコミュニケーションの異常と、小脳の発達障害を示した。Cadm1ノックアウトマウスではグルタミン酸作動性神経のマーカの発現が減少したことから、興奮性のシナプスの関与が示唆された。

平成22、23年度で作製した、Cadm1ノックアウトマウスとは異なる、Cadm1変異(Y251S)ノックインマウスを次年度解析することが、研究の進展につながると考えている。ノックインマウスの生理学のおよび行動解析、シナプスについての解析を予定している。Loss-of-function、変異によるGain-of-functionが病態に関わっているかについて検討する。

E. 結論

CADM1の変異は、小胞体ストレスを誘導し、Cadm1変異を発現させた神経細胞においてシナプス障害が起こっていたこと、またCadm1ノックアウトマウスの超音波音声を測定することでCadm1がコミュニケーション障害に関わっていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 (Fujita, Eおよび藤田恵理子; 旧姓)
 1. Fujita, E., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., and Momoi T. Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity. PLoS ONE.

online, e30151.

2. Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, M.Y., and Momoi, T. Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. Neurosci Lett.506: 277~280. 2012
3. Maekawa, M., Ito, C., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Fujita, E., Momoi, T., and Toshimori, K. Localisation of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis, and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse. Andrologia 43: 180~188, 2011

2. 学会発表

1. 藤田恵理子、山形崇倫、桃井真里子；自閉性障害患者に見出された変異蛋白による小胞体ストレスと分子病態との関係、第53回日本小児神経科学学会総会、2011年5月27日、横浜
2. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子；Catnap2 expression in the cerebellum of the Foxp2(R552H) mice, with mutation related to the speech-language disorder、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜
3. 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真

里子；自閉性障害候補遺伝子CADM1ノックアウトマウスにおける超音波音声、第34回日本神経科学大会年会、2011年9月15日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ．研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujita, E., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., Momoi T.	Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity.	PLoS ONE	-	e30151	2012
Fujita, E., Tanabe, Y., Momoi, M.Y., Momoi, T.	Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder.	Neurosci Lett.	506	277-280	2012
Maekawa, M., Ito, C., Toyama, Y., Suzuki-Toyota, F., Fujita, E., Momoi, T., Toshimori, K.	Localisation of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis, and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse.	Andrologia	43	180~188	2011

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Cadm1-Expressing Synapses on Purkinje Cell Dendrites Are Involved in Mouse Ultrasonic Vocalization Activity

Eriko Fujita^{1,2}, Yuko Tanabe¹, Beat A. Imhof³, Mariko Y. Momoi^{2*}, Takashi Momoi^{1*}

1 Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Kitakanemaru, Ohtawara, Tochigi, Japan, **2** Department of Pediatrics, Jichi Medical University, Yakushiji, Shimotsukeshi, Tochigi, Japan, **3** Department of Pathology and Immunology, Centre Médical Universitaire, University of Geneva, Geneva, Switzerland

Abstract

Foxp2(R552H) knock-in (KI) mouse pups with a mutation related to human speech-language disorders exhibit poor development of cerebellar Purkinje cells and impaired ultrasonic vocalization (USV), a communication tool for mother-offspring interactions. Thus, human speech and mouse USV appear to have a *Foxp2*-mediated common molecular basis in the cerebellum. Mutations in the gene encoding the synaptic adhesion molecule CADM1 (RA175/Nect2/SynCAM1/Cadm1) have been identified in people with autism spectrum disorder (ASD) who have impaired speech and language. In the present study, we show that both *Cadm1*-deficient knockout (KO) pups and *Foxp2*(R552H) KI pups exhibit impaired USV and smaller cerebellums. *Cadm1* was preferentially localized to the apical-distal portion of the dendritic arbor of Purkinje cells in the molecular layer of wild-type pups, and VGLUT1 level decreased in the cerebellum of *Cadm1* KO mice. In addition, we detected reduced immunoreactivity of *Cadm1* and VGLUT1 on the poorly developed dendritic arbor of Purkinje cells in the *Foxp2*(R552H) KI pups. However, *Cadm1* mRNA expression was not altered in the *Foxp2*(R552H) KI pups. These results suggest that although the *Foxp2* transcription factor does not target *Cadm1*, *Cadm1* at the synapses of Purkinje cells and parallel fibers is necessary for USV function. The loss of *Cadm1*-expressing synapses on the dendrites of Purkinje cells may be associated with the USV impairment that *Cadm1* KO and *Foxp2*(R552H) KI mice exhibit.

Citation: Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T (2012) Cadm1-Expressing Synapses on Purkinje Cell Dendrites Are Involved in Mouse Ultrasonic Vocalization Activity. PLoS ONE 7(1): e30151. doi:10.1371/journal.pone.0030151

Editor: Michael A. Fox, Virginia Commonwealth University Medical Center, United States of America

Received: June 9, 2011; **Accepted:** December 11, 2011; **Published:** January 17, 2012

Copyright: © 2012 Fujita et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (21200011, 21700377), Grants-in-Aid for Health Labour Scientific Research of the Ministry of the Health, Labour and Welfare, Japan (10103243). We are extremely grateful to all the families. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: momoi@iuhw.ac.jp (TM); mymomoi@jichi.ac.jp (MM)

Introduction

Cadm1 (also known as RA175, Nect2, and SynCAM1), a member of the immunoglobulin superfamily (IgSF), localizes to both sides of the synaptic cleft and functions as a synaptic cell-cell adhesion molecule. Cadm1 induces functional synapses [1]. The extracellular domain of Cadm1 mediates calcium-independent, homophilic *trans* interactions [1,2], and its cytoplasmic tail has a band 4.1 region and a PSD95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-binding motif [2]. At the pre-synapse, Cadm1 associates with calmodulin associated serine/threonine kinase (CASK) via a single PDZ domain [1].

Mutations in genes encoding synaptic adhesion proteins, including *neurexin* (*NLGN*) 3 and 4, *contactin-associated protein-like 2* (*CNTNAP2*, *Caspr2*), and *CADM1*, are associated with autism spectrum disorder (ASD) [3–5]; the *CADM1* mutations H246N and Y251S specifically have been found in people diagnosed with ASD who had impaired social interactions and communication, including speech and language impairments [5]. Mutations in *CADM1* increase its susceptibility to processing errors and the accumulation of *CADM1* peptide fragments in the endoplasmic reticulum [5,6]; they also reduce *CADM1* affinity in cell adhesion and lead to synaptic defects in neuron cultures [6]. *Cadm1* knockout (KO) mice [7] exhibit abnormal social and emotional behaviors that share similarities with some behaviors associated with ASD [8]. These findings suggest that *CADM1* loss of function may be linked to ASD.

Speech-language impairment is one of the most prominent symptoms in some types of ASD. Impaired speech-language communication frequently also occurs as a phenotype of people with mutations in the adhesion molecule gene *CNTNAP2* [4]. A previous study found an R553H mutation in human *FOXP2* in patients with speech-language disorders [9]. Normal *FOXP2* associates with a corepressor and acts as a transcriptional repressor [10]; however, mutated *FOXP2* (R553H) lacks DNA-binding activity [11]. Infant mice emit and use ultrasonic vocalizations (USVs) as an essential communication tool for mother-offspring interactions [12]. *Foxp2* KO mice and knock-in (KI) mice for *Foxp2* (R552H), which corresponds to the human *FOXP2* (R553H) mutation, exhibit severe USV impairments, suggesting human speech and mouse USVs may have a common molecular basis in the brain [13,14]. *Foxp2*(R552H) KI pups with USV impairment show poor development of Purkinje cells in the cerebellum [13], and the number of synapses on the dendrites of Purkinje cells is decreased in these pups.

Of interest, cerebellar abnormalities, including Purkinje cell loss, have been found in autopsy samples from ASD patients [15]. We have observed that *Cadm1* KO mice have smaller cerebellums. Furthermore, *Cadm1* mRNA is expressed not only in various regions of the cerebrum but also in the developing cerebellum [16]. *Cadm1* is predominantly localized to the thalamus cortical afferent pathway in the cerebrum [17]; however, little is known about *Cadm1* expression at synapses in the cerebellum.

In the present study, we examined USV of *Cadm1* KO mice, *Cadm1* localization in the cerebellum, and the relationship between loss of *Cadm1* at the synapses and impaired USV in *Cadm1* KO and *Foxp2*(R552H) KI pups.

Results

We established a strain of *Cadm1* KO (C57BL/6J) mice (*Cadm1* KO mice) by mating heterozygous *Cadm1* KO (129Sv) mice [7] with C57BL/6J for more than 10 generations. The homozygous *Cadm1* KO mice (postnatal day [P] 50) were smaller than their wild-type counterparts (Figure 1A). At P10, we detected a significant difference in mean body weight between homozygous *Cadm1* KO mice and their wild-type littermates, a difference that increased over the next 20 days. The mean body weight of the homozygous *Cadm1* KO mice was 20–25% less than that of the wild-type mice (Figure 1B). In addition, compared to the wild-type mice, the brains of homozygous *Cadm1* KO mice were smaller (Figure 1C). In particular, the cerebellum of homozygous *Cadm1* KO mice showed a reduction in size (Figure 1D, upper panel) and weight (Figure 1D, lower panel) of approximately 20%.

We next investigated the pups' USV because we previously found poor development of Purkinje cells in *Foxp2*(R552H) KI mice with impaired USV [13]. The *Cadm1* KO pups exhibited impaired USV upon separation from their mothers and litters, an effect similar to that which we recently observed in *Foxp2*(R552H) KI pups (Figure 2A) [13]. The *Cadm1* KO pups produced some click-type USVs but only low levels of whistle-type USVs, compared to the predominant whistle-type USVs among wild-type pups (Figure 2B, C).

The detection of these functional effects associated with *Cadm1* deficiency led us to investigate more thoroughly the distribution pattern of *Cadm1* in the cerebellum. In P11 wild-type pups, but not *Cadm1* KO pups, *Cadm1* was detected in the dendritic arbor of Purkinje cells and some of the granular cells in the cerebellum (Figure 3A). *Cadm1* preferentially localized to the apical–distal portion of the dendritic arbor (Figure 3B). The dendrite development of Purkinje cells in *Cadm1* KO mice appeared poor compared to that of wild-type mice (Figure 3B and Figure S1).

Purkinje cells receive two excitatory afferents, parallel fibers and climbing fibers, which can be distinguished based on the expression of VGluT1 and VGluT2 [18,19]; climbing fibers express VGluT2 throughout development while parallel fibers shift from VGluT2 expression to VGluT1. The onset of VGluT2 expression in the individual parallel fiber terminals was clearly earlier than that of VGluT1 in the samples; in the early postnatal stages (P6–8), *Cadm1* was mainly expressed in the molecular layer with the expression of VGluT2 (Figure 4A). During P6–11, *Cadm1* expression intensity increased. At P11, VGluT2 intensity decreased, while VGluT1 intensity increased (Figure 4B). Thus, VGluT2 in parallel fibers expressing *Cadm1* was replaced with VGluT1, which extended its expression from proximal regions to apical–distal regions in the molecular layer (Figure 4A). After this deep-to-superficial replacement, *Cadm1* and VGluT1 immunoreactivity was detected throughout the molecular layer and appeared to co-localize at P14 (Figure 4A).

We next examined the levels of *Foxp2*, Synaptophysin, and VGluT1 in the cerebellum of *Cadm1* KO mice (Figure 5A). VGluT1 levels were markedly decreased in the cerebellum of *Cadm1* KO compared to wild-type mice. Compared to VGluT1, the decrease in

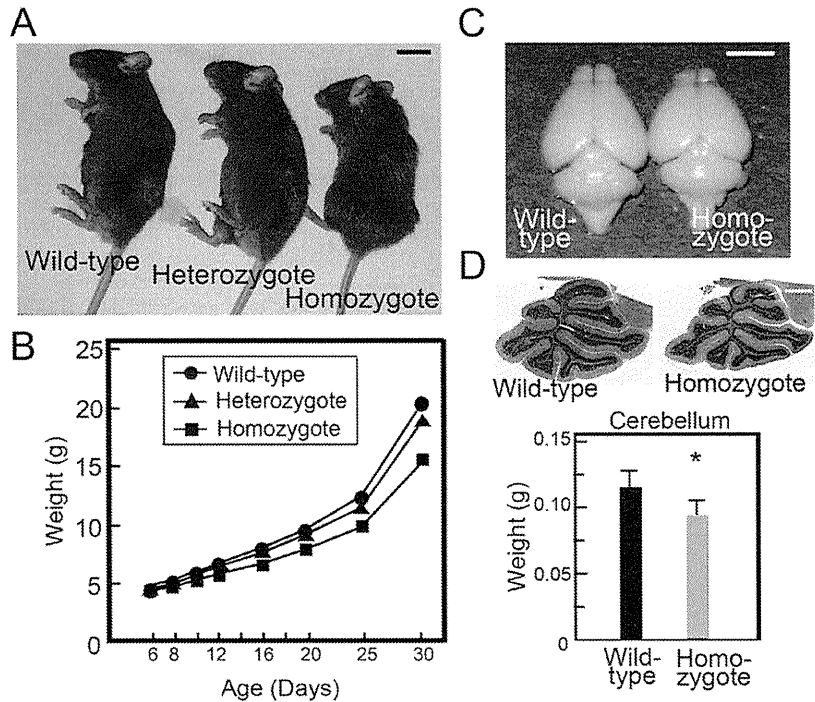


Figure 1. Abnormal cerebellum development of *Cadm1* KO. (A) Wild-type, heterozygote, and homozygous *Cadm1* KO mice. (P50) (B) The difference in mean weight between homozygous *Cadm1* KO mice and their wild-type littermates (five each) was significant at P10 and increased over the next 20 days (A, B); at P30, the mean weight of the homozygous *Cadm1* KO mice was 20–25% less than that of the wild-type mice. In addition, the brains of homozygous *Cadm1* KO mice were smaller (C, n=22), and the cerebellums of homozygous *Cadm1* KO mice had an approximately 20% reduction in size and weight (D, n=10). Bars in the graph indicate mean±standard error (SEM). Student's *t*-test (**p*<0.05). Bars in the pictures indicate 1 cm (A), 5 mm (C), and 0.75 mm (D), respectively. doi:10.1371/journal.pone.0030151.g001

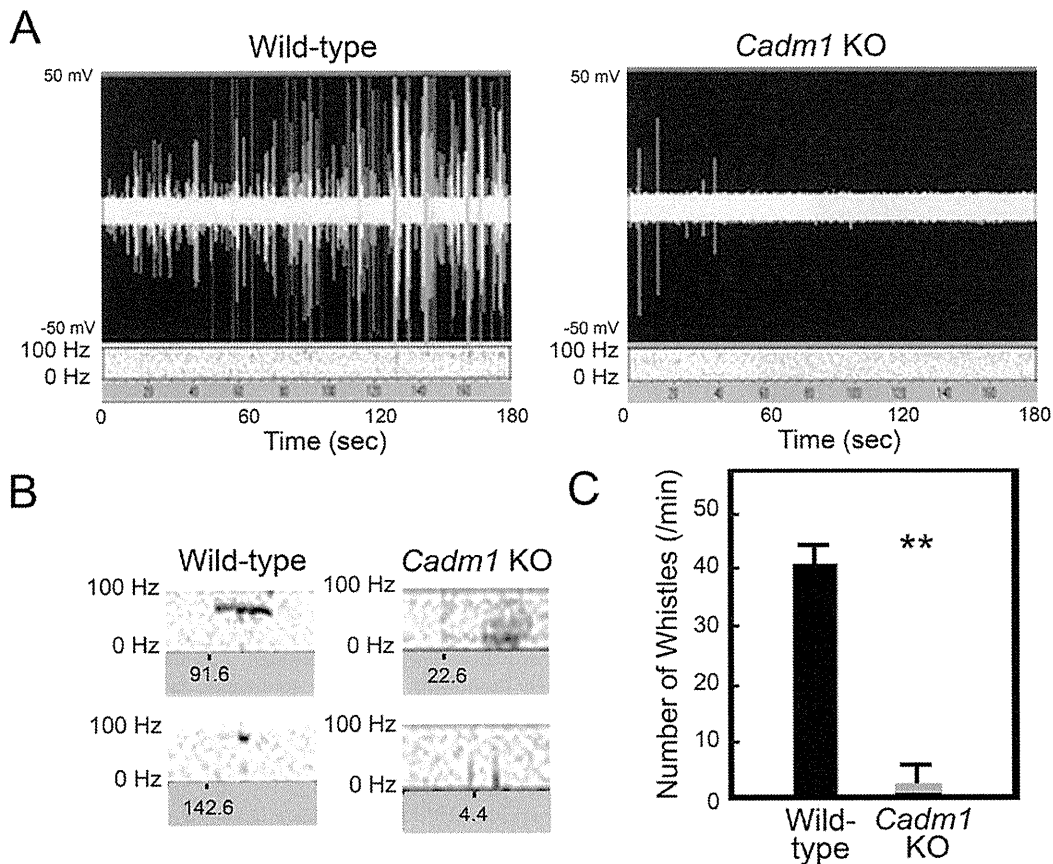


Figure 2. Analysis of ultrasonic vocalizations (USVs) of *Cadm1* KO mice (P8). (A) Real-time spectrography of the USVs by pups after separation from the dam. (B) Major vocalization patterns of *Cadm1* KO and wild-type pups. Wild-type vocalization was mainly whistle-type USVs, but *Cadm1* KO mice exhibited only a small number of click-type vocalizations. (C) The number of whistle-type USVs per min by pups. Vocalizations were recorded for 3 min. Experiments were done three times for 5 pups in each group, and an example of typical results is shown. Values are mean \pm standard error (SEM). Student's *t*-test (** $p < 0.01$). doi:10.1371/journal.pone.0030151.g002

Synaptophysin was not marked, but it was significant; however, *Foxp2* levels were unchanged. Real-time PCR analysis confirmed that there was no alteration in *Foxp2* mRNA levels in the cerebellum of *Cadm1* KO compared to wild-type mice (Figure 5B).

Thus, *Cadm1* deficiency did not appear to affect *Foxp2* expression and *Foxp2*-mediated development of Purkinje cell dendrites; however, it may have influenced synapse formation.

We also examined the localization of *Cadm1* in the cerebellum of *Foxp2*(R552H) KI mice and found that *Foxp2*(R552H) KI pups (P11) had poorly developed Purkinje cell dendrites with reduced immunoreactivity for Synaptophysin [13] (Figure 6). Overall, the immunoreactivity of *Cadm1*, as well as of VGluT1, was reduced on dendritic arbors in *Foxp2*(R552H) KI mice (Figure 6 and Figure S2), although *Cadm1* mRNA levels were unchanged (Figure S3).

Discussion

Foxp2-mediated USV and *Cadm1* activity in synapses in the cerebellum

Human speech and mouse USV have a common molecular basis in the brain, and *Foxp2*(R552H) KI mice exhibit abnormal cerebellar development and poor dendrite development [13]. In humans, some of the areas associated with speech and language

skills are located in the frontal/superior cerebellar articulation control system and the parietal/inferior cerebellar phonological storage system [20,21]. The cerebellar molecular systems control both human spoken language and mouse USVs and therefore share function in the two species.

In the present study, we found that *Cadm1* KO mice had smaller cerebellums, poor development of dendrites of Purkinje cells, and impaired USV (Figures 1, 2, 3 and S1), as observed in *Foxp2*(R552H) KI mouse pups. *Cadm1* was preferentially localized to the apical-distal portion of the dendritic arbor of Purkinje cells in the molecular layer of wild-type pups (Figure 3), and the level of VGluT1 decreased in the cerebellum of *Cadm1* KO mice (Figure 5).

VGluT1/2-positive synapses have been detected in the brains of transgenic mice overexpressing *Cadm1* [22]. In the cerebellum, the two excitatory afferents of Purkinje cells are the parallel fibers and climbing fibers; climbing fiber terminals selectively express VGluT2 throughout the postnatal period, but parallel fiber terminals first express VGluT2 and then switch to VGluT1 [18,19]. In the current work, *Cadm1* was expressed in the granular cells and appeared to co-localize with VGluT1 at the pre-synapse (Figure 4). Both *Cadm1* and VGluT1 immunoreactivity decreased in the Purkinje cells of *Foxp2*(R552H) KI pups (P11) with impaired USV (Figure 6), however. Of note, *Cadm1*

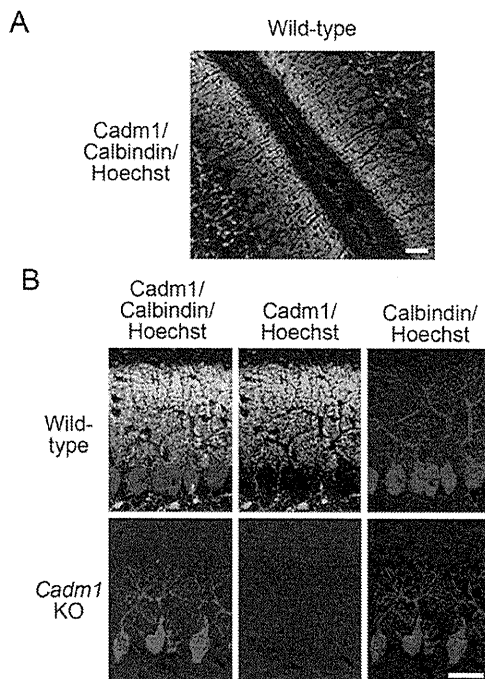


Figure 3. Distribution of Cadml in the cerebellum (P11). The Cadml intensity preferentially distributed in an apical-distal dendritic portion. Wild-type (A, B, upper panel) and *Cadml* KO mice (B, lower panel). Green, Cadml. Red, Calbindin. Blue, Hoechst. Bars, 30 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0030151.g003

homophilically *trans* interacts at the synapse [1,2]. In this study, at P11, in addition to VGluT1, Cadml partly co-localized with Synaptophysin, a pre-synaptic marker, and PSD-95, a post-synaptic marker, in the molecular layer (Figure S4). In a separate study, we found that Cadml also co-localized with GABBR2 on the dendrites of Purkinje cells during development (Fujita et al., submitted). Thus, Cadml may localize at the pre-synapse and post-synapse of the parallel fiber-Purkinje cells. The reduced immunoreactivity of Cadml on the dendrites of Purkinje cells in the *Foxp2*(R552H) KI mice could result from the decreased number of synapses. Foxp2 is essential for Purkinje cell development, while Cadml activity at parallel fiber-Purkinje cell synapses may be involved in mouse USV, and perhaps also in human spoken language. However, we note that loss of Cadml activity in other brain regions could also contribute to or even cause the vocalization phenotype, an important issue that future studies should address.

Cadml expression and Foxp2

The *CADML* mutations H246N and Y251S have been identified in people with ASD who also had speech and language impairment [5]. In the current study, we found that *Cadml* KO male mice (C57BL/6) had small cerebellums (Figure 1), impaired USV (Figure 2), and abnormal social and emotional behaviors, analogous to some behaviors associated with ASD [8].

ASD patients with mutations in the *CNTNAP2* gene also exhibit impaired speech and language [23]. A recent study showed that FOXP2 binds to the CAAATT motif in an intron of the human *CNTNAP2* gene, resulting in negative regulation of *CNTNAP2* expression; mutant FOXP2 (R553H) lacking DNA-binding activity resulted in increased *CNTNAP2* expression in *in vitro*

experiments [11]. Human *CADML* and mouse *Cadml* have the same CAAATT binding motif for FOXP2 (accession no. NC_000011.9 for human *CADML* and accession no. NC_000075.5 for mouse *Cadml*). In contrast to *CNTNAP2*, we found here that Cadml mRNA levels were unchanged in the cerebellum of *Foxp2*(R552H) KI mice (Figure S1). Therefore, Foxp2 does not appear to regulate directly the expression of mouse *Cadml* in the cerebellum. Thus, *Cadml* and *CNTNAP2* exhibit different sensitivities to Foxp2 regulation, although they have the same CAAATT motif. This distinction may be attributable to different conditions in *in vitro* and *in vivo* experiments or to subtle variations in the binding motifs in the *Cadml* and *CNTNAP2* genes; the nucleotide sequence of the repeated CAAATT motif, which is necessary for binding of dimerized Foxp2, may differ between the two genes.

In conclusion, *Cadml* is not a target of the Foxp2 transcription factor, but Cadml activity at parallel fiber-Purkinje cell synapses may be necessary for USV function. Loss of Cadml activity at the synapse may be associated not only with USV impairment in mice but also with impaired speech and language communication skills in people with ASD.

Materials and Methods

Ethics statement

We followed the Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments and Related Activities in Academic Research Institutions under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and all of the protocols for animal handling and treatment were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of Jichi University (approval numbers, H22-179, 10-179) and International University of Health and Welfare (approval numbers, D1008; 10118). Wild-type, *Cadml* KO and *Foxp2*(R552H) KI mice [7,13] (male mice) were used for the experiments.

Ultrasonic vocalization

We mated *Cadml* KO (129Sv) mice [7] with C57BL/6J strain mice for 10 generations and established a strain of *Cadml* KO (C57BL/6J) mice. USVs of five *Cadml* KO and five wild-type pups (P8) were assayed as described previously [13]. Briefly, each pup was separated from its mother and littermates, one at a time, placed in a shallow beaker in a soundproof chamber, and then positioned below a microphone connected to the UltraSound Gate 116 detector set (Avisoft Bioacoustics) to detect USVs of 40–100 kHz. Analysis began after the pup had been habituated to the chamber for 60 s. Sounds were recorded for 3 min.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared from a combined five pieces of cerebellum of wild-type and *Cadml* KO and *Foxp2*(R552H) KI male mice (P10), respectively, using the RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's specifications. Complementary DNAs were synthesized from total RNA (1 μ g) using reverse transcriptase (Invitrogen) as described previously [24]. Real-time PCR analysis was performed using the Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems) with the TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) based on published sequences for genes encoding the respective mouse Cadml, Foxp2, and VIC-labeled mouse Gapd (VIC-labeled MGD probe; Applied Biosystems) as endogenous control. For each sample, the 20 μ l total volume consisted of 10 μ l TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x; Applied Biosystems), 1 μ l TaqMan Gene Expression Assays, and 5 μ l of each first-strand cDNA sample. The real-time PCR fragments were amplified as follows: 1 cycle at

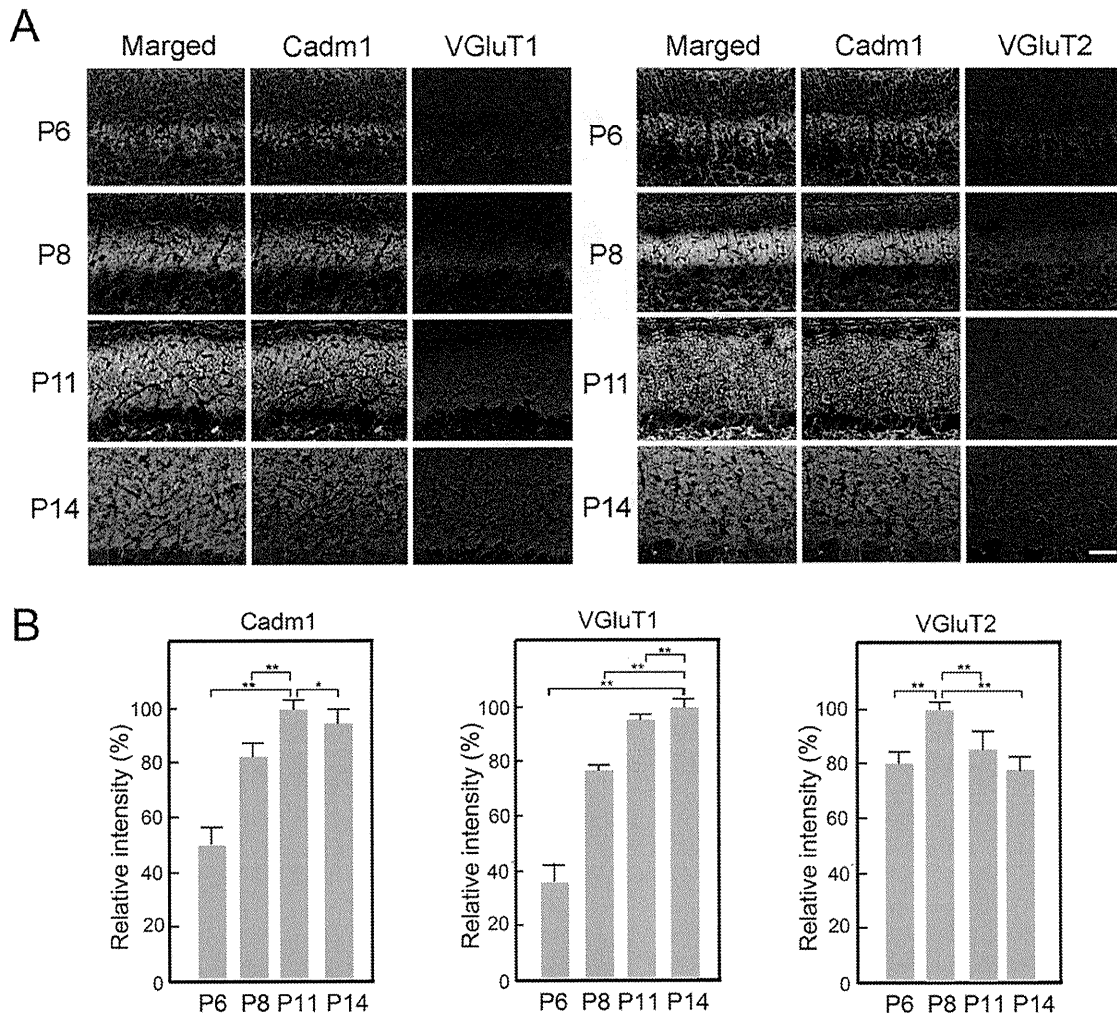


Figure 4. Developmental changes of Cadm1, VGLUT1, and VGLUT2 in wild-type pups. Alteration of the distribution of Cadm1, VGLUT1, and VGLUT2 was examined in the molecular layer of the developing cerebellum (P6–14). VGLUT2 first appeared in the molecular layer in the early postnatal cerebellum (P6–8), in which Cadm1 co-localized with VGLUT2, and then the level of VGLUT2 decreased. VGLUT1 increased in the later postnatal cerebellum (P11–14), in which Cadm1 co-localized with VGLUT1. Green, Cadm1. Red, VGLUT1 or VGLUT2. Blue, Hoechst. Bar, 30 μ m. Values are mean \pm standard error (SEM). Student's *t*-test (* p <0.05, ** p <0.01). Pups: n =3. Images: n =8. doi:10.1371/journal.pone.0030151.g004

95°C for 20 s, 60 cycles at 95°C for 3 s, and 60°C for 30 s. Results were analyzed using student's *t*-tests (p <0.05 was considered statistically significant).

Immunoblot analysis

Five cerebellums each from wild-type and *Cadm1* KO mice, respectively, were combined and lysed in lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5% IGEPAL CA630, and protease inhibitors; complete mini (Roche Diagnostics)] at 4°C for 15 min, and then each extract was subjected to immunoblot analysis using mouse anti-Synaptophysin (Millipore), rabbit anti-VGLUT1 (Synaptic Systems), rabbit anti-Foxp2 (Abcam), and mouse anti-Tubulin (Sigma). Immunoreactivity was visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG, Nitro blue tetrazolium, and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphate (Roche Diagnostics). Data from three experiments were scanned and analyzed for quantification with Image J

software (National Institutes of Health). Results compared with wild-type were analyzed using the student's *t*-test (p <0.05 was considered statistically significant).

Immunostaining

Wild-type, *Cadm1* KO, and *Foxp2*(R552H) KI mice cerebellums were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline at 4°C overnight. Frozen sections (10 μ m thick) were cut on a cryostat and immunostained with chicken anti-SynCAM1 (Cadm1; MBL), mouse anti-Calbindin (Sigma), rabbit anti-Calbindin (Sigma), mouse anti-Synaptophysin, rabbit anti-VGLUT1, or rabbit anti-VGLUT2 (Synaptic Systems). Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies against mouse, rabbit, and goat IgGs were purchased from Molecular Probes. Nuclei were detected by Hoechst 33342 (Molecular Probes). The reactivity was viewed using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). At least three