

博士論文

双極性障害患者で同定されたデノボ変異の
病態生理学的意義に関する研究

中村 匠

目次

略語.....	4
序論.....	6
第1章 培養細胞株を用いた <i>UNC13B</i> 遺伝子変異の機能解析	9
1.1 序論.....	9
1.1.1 双極性障害患者で同定された <i>UNC13B</i> 遺伝子のデノボ変異.....	9
1.1.2 細胞内における <i>UNC13B</i> の機能について	9
1.1.3 統合失調症と <i>UNC13B</i>	10
1.2 方法.....	13
1.2.1 変異がスプライシングに与える影響の予測	13
1.2.2 <i>UNC13B</i> ミニジーンを作製.....	13
1.2.3 スプライシングアッセイ	13
1.2.4 ヒト脳由来 total RNA を用いた RT-PCR	14
1.3 結果.....	15
1.3.1 <i>UNC13B</i> のスプライシングアッセイ	15
1.3.2 変異非保有者 RNA サンプルにおけるエクソンスキップバリエントの同定15	
1.4 考察.....	19
1.4.1 双極性障害患者変異が <i>UNC13B</i> に与える影響.....	19
1.4.2 エクソンスキップバリエントについて	19
第2章 培養細胞株を用いた <i>EHD1</i> 遺伝子変異の機能解析	20
2.1 序論.....	20
2.1.1 双極性障害患者で同定された <i>EHD1</i> 遺伝子のデノボ変異	20
2.1.2 <i>EHD1</i> について	20
2.2 方法.....	23
2.2.1 mCherry- <i>EHD1</i> 発現ベクターの作製.....	23
2.2.2 トランスフェクション	23
2.2.3 ウェスタンブロット	24
2.2.4 神経突起伸長測定実験	24
2.2.5 エンドサイトーシス定量実験	24
2.3 結果.....	26
2.3.1 mCherry- <i>EHD1</i> 発現ベクターの作製および品質評価.....	26
2.3.2 <i>EHD1</i> 患者変異による神経突起伸長能への影響	26
2.3.3 患者変異がエンドサイトーシスに与える影響	26

2.4	考察.....	32
2.4.1	患者型 EHD1 の機能について	32
2.4.2	患者型 EHD1 と双極性障害の関係をさらに明らかにするために	33
第3章	マウスを用いたデノボ変異の機能解析	34
3.1	序論.....	34
3.1.1	候補遺伝子の絞り込み	34
3.1.2	<i>MACF1</i> について	34
3.1.3	<i>KMT2C</i> について	35
3.1.4	双極性障害のマウス研究	36
3.2	方法.....	42
3.2.1	pLi および RVIS の取得.....	42
3.2.2	Surveyor assay	42
3.2.3	遺伝子改変マウスの作製	43
3.2.4	エクソーム解析	44
3.2.5	<i>Ehd1</i> 改変 PC12 細胞の作製	45
3.2.6	ウエスタンブロット	46
3.2.7	輪回し行動解析	47
3.2.8	インテリケージ	47
3.2.9	超音波発声測定	49
3.2.10	マイクロアレイ解析	49
3.2.11	モザイク変異解析	50
3.3	結果.....	52
3.3.1	各遺伝子改変マウスの作製	52
3.3.2	遺伝子改変マウスの作製とオフターゲット変異解析	52
3.3.3	<i>Ehd1</i> 切断マウスのジェノタイプ分布について	53
3.3.4	インテリケージ解析と輪回し行動解析	54
3.3.5	<i>KMT2C</i> マウスのマイクロアレイ解析	55
3.3.6	双極性障害患者デノボ変異の再解析	56
3.4	考察.....	84
3.4.1	結果のまとめ	84
3.4.2	RVIS と pLi について	84
3.4.3	CRISPR/Cas9 によるオフターゲット変異について.....	84
3.4.4	各変異マウスで見いだした表現型について	85
3.4.5	各遺伝子改変マウスの行動の雌雄差について	87

3.4.6 本研究の課題	88
総括.....	89
参考文献.....	90
謝辞.....	107

略語

ATP:	adenosine triphosphate アデノシン 3 リン酸
AMPA:	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid α -アミノ-3 ヒドロキシ-5-イソオキサゾール-4-プロピオン酸
bp:	base pair 塩基対
CRISPR:	clustered regularly interspaed short palindromic repeat クリスパー
DTT:	dithiothreitol ジチオトレイトール
EDTA:	ethylenediaminetetraacetic acid エチレンジアミン四酢酸
FACS:	fluorescent activated cell sorting 蛍光フローサイトメトリー
GFP:	green fluorescent protein 緑色蛍光タンパク質
LED:	light emitting diode 発光ダイオード
Mut:	mutant 変異体、変異型
PBS:	phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
PCR:	polymerase chain reaction ポリメラーゼ連鎖反応
PFA:	paraformaldehyde パラホルムアルデヒド
rmANOVA:	repeated measures analysis of variance 反復測定分散分析
RT:	reverse transcription 逆転写
SEM:	standard error of the mean 標準誤差

SNP: single nucleotide polymorphism
一塩基多型

ssODN: single strand oligo deoxynucleotide
一本鎖オリゴヌクレオチド

WT: wild type
野生型

序論

双極性障害について

双極性障害は、躁およびうつ状態を繰り返し示す精神疾患である(1)(2)。生涯有病率は、1%前後と非常に高く(3)、その症状の特徴から、患者本人だけでなく、患者の周りの人々の生活にも大きな影響を与えてしまう。躁状態においては、気分が高ぶるなどして、無計画な借金を繰り返すなど、社会的信用を失うような行動が見られる場合があり、患者にとって大きな社会的問題が生じるものである。一方、うつ状態においては逆に、活動意欲が低下し、労働が困難になるなど、こちらも患者の生活に大きな影響を与える。患者の多くは、20~30歳代の働き盛りに双極性障害を発症し、労働が困難になる場合も多く、患者本人への影響だけではなく、国全体の労働力低下を招き、国力の低下にもつながるため、社会的な影響も大きい。

双極性障害の診断は、アメリカ精神医学会により定められた「精神障害の診断と統計マニュアル (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth edition, DSM-V)」を基準に、問診により確定される。患者の多くは、最初はうつ状態になることが多く、その状態で受診するため大うつ病との鑑別が困難である場合が多い。抗うつ薬の中には、双極性障害の症状を悪化させてしまうものもあるため、大うつ病との区別が重要であるが、上記の理由からたびたび抗うつ薬を処方され、症状が悪化する例も少なくなく、正確な診断法の確立が重要である。しかしながら、明確な脳病変部位やバイオマーカーなどは見つかっておらず、生物学的な診断が困難であるのが現状である。

治療については、気分安定薬リチウムが第一選択薬であるが、抵抗性を示す患者も存在する(4)。そのほか、バルプロ酸やカルバマゼピンなどの気分安定薬も用いられている。これと並行して、心理社会的治療も行われる。

双極性障害と遺伝

双極性障害の発症には、遺伝要因が大きな寄与をしていることが知られている。一卵性双生児の方が、二卵性双生児に比べて、両者とも双極性障害を発症する割合が高いことが報告されている(5)。また、ミトコンドリア DNA 合成酵素 *Polymerase γ* (*POLG1*) や *Adenine nucleotide translocase type 1* (*ANT1*) が原因遺伝子の慢性進行性外眼筋麻痺 (Chronic progressive external ophthalmoplegia, CPEO) (6-8)、小胞体ストレスシグナル伝達を調節する *Wolfram syndrome 1* (*WFS1*) を原因遺伝子とするウォルフラム症候群(9)、小胞体カルシウムポンプ *ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} transporting 2* (*ATP2A2*) 遺伝子が原因遺伝子の遺伝性皮膚疾患ダリエ病などの(10)(11)、一部のまれな遺伝性疾患で双極性障害の発症率が高いなどの知見も、双極性障害の発症に遺伝要因

が大きく寄与していることを示唆している。

精神疾患の遺伝学的研究

また近年、次世代シーケンサーの発展により、精神疾患患者を対象にした全ゲノム解析や全エクソーム解析が盛んに行われており、特に統合失調症や自閉スペクトラム症（自閉症）を対象にした大規模解析がこれまで報告されている。そのような遺伝学的研究の例として、SNPに着目し、健常者群と患者群の SNP 群を比較することにより患者で頻度高く見られる SNP を同定するゲノムワイド関連解析（genome-wide association study, GWAS）が挙げられる(12)。統合失調症では、2014年に初の大規模 GWAS 研究の結果が報告されており、113,075人の健常者群と36,989人の患者群を比較し、108の遺伝子座位が統合失調症に有意に関係していることが報告された(13)。この中には、前述の遺伝性皮膚疾患ダリエ病の原因遺伝子 *ATP2A2* が含まれていた。2018年には、上記のデータにさらにサンプル数を追加したメタ解析なども報告されており、40,675人の患者群を対象にした GWAS では、計145の遺伝子座位の関連が報告された(14)。このように、現在もデータ数は増え続けており、精神疾患患者を対象にした大規模遺伝学的研究は発展し続けている。

しかし、上記のような GWAS 研究で見つかる遺伝子多型は、多くの患者で共通して見つかるものの、オッズ比は小さいため、双極性障害は、ひとつの遺伝子の異常で生じる疾患ではなく、複数の遺伝子の異常により引き起こされる、ポリジェニックな疾患であると考えられている。そのため、上記の GWAS 研究で見つかった遺伝子ひとつに着目し、*in vitro* または *in vivo* な研究を行っても、顕著な違いを見いだすことが困難であることも十分に予想される。そこで、頻度は高いが効果の小さい遺伝子多型探索研究が進む一方で、頻度は小さいが効果の大きな変異探索も着目されてきた。この中には、上記のような、双極性障害を併発する遺伝性疾患の原因遺伝子も含まれる。

そのような、頻度は小さいが効果の大きな変異として、デノボ (*de novo*) 変異が大きく注目されてきた。デノボ変異とは、両親では見られないが、子では見られる新生突然変異のことで、健常な両親から生まれた患者である子において見られるデノボ変異は、疾患発症に関係がある可能性が高いとして、精神疾患研究において、デノボ変異探索が盛んに行われている。

そのような例として、自閉症および統合失調症で有力な関連遺伝子が同定されている。自閉症については、2014年に大規模デノボ変異探索の結果が2報で報告されており(15,16)、クロマチンリモデリングタンパク質を発現する *Chromatin-helicase DNA binding protein 8 (CHD8)* などが見出された。その後、*Chd8* ヘテロノックアウトマウスの解析結果が報告されており、自閉症患者でたびたび見られる脳重の増加や、自閉症の主症状で

ある社会性の異常や固執行動が見出された(17)。その他にも多数の、自閉症患者デノボ変異探索論文が多数報告されている(18)。一方、統合失調症についてもデノボ変異解析により、現在では統合失調症と最も関連が高いとされている遺伝子のひとつである、ヒストンメチル基転移酵素 *SET domain containing 1a* (*SETD1A*) が報告されている(19)。*SETD1A* については、最初はデノボ変異探索により同定されたが、その後、症例対照研究でも、ゲノムワイドにも有意に関連していることが明らかとなっており、デノボ変異探索の有用性を支持している(20)。*Setd1a* ヘテロノックアウトマウスの解析も近年報告されており、認知機能の低下や不安行動を示すことが報告されている(21)。

このように、精神疾患研究の遺伝学的研究は近年非常に活発に行われており、様々な関連遺伝子が報告されている。

双極性障害の遺伝学的研究

上記と同様に、双極性障害患者を対象にした大規模な遺伝学的研究も盛んに行われており、遺伝要因の寄与を強く支持した結果や、有力な関連遺伝子が報告されている(22)(23)(24)。ヨーロッパ人を対象とした、31,358 人の健常者群と 20,352 人の患者群を比較した GWAS では、30 の遺伝子座位が有意に双極性障害と関連していることを報告している(25)。この中には、61,887 人の健常者群と 2,964 人の日本人患者群を対象とした GWAS 研究において、双極性障害との有意な関連が報告された脂質代謝を制御する、*Fatty acid desaturase 1/2* (*FADS1/2*) 遺伝子座位も含まれている(26)。

その一方で、双極性障害患者を対象にしたデノボ変異探索が 2016 年に報告された。この報告では、一般人口ではミスセンス変異やナンセンス変異が見られることがまれな遺伝子において、双極性障害患者では有意に多くのデノボ変異があることが明らかになった。また、双極性障害患者で計 71 種のヘテロ遺伝子変異が報告され、その中で 9 種の機能喪失型デノボ変異が報告された(27)。

本研究では、機能喪失型変異が報告された 9 個の遺伝子のうち、様々な観点から生体内でより大きな影響があると予測される 4 つの遺伝子、*UNC13B*、*EHD1*、*MACF1*、*KMT2C* の 4 遺伝子に着目し、研究を行った。

第 1 章 培養細胞株を用いた *UNC13B* 遺伝子変異の機能解析

1.1 序論

1.1.1 双極性障害患者で同定された *UNC13B* 遺伝子のデノボ変異

双極性障害患者で報告された *UNC13 Homolog B* (*UNC13B*) 遺伝子のデノボ変異は、71 個の中で唯一スプライスサイトに存在する変異であった (図 1A)。この変異により、スプライスドナーサイト配列”GT”が”AT”に置換され、*UNC13B* のエクソン 38 のドナーサイト配列が喪失するため、患者では *UNC13B* のスプライシング様式が変化することが予測された。実際に、塩基置換がスプライシングに与える影響を予測することのできる、スプライシング予測サイト NetGene2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) (28) および SPANR (<http://tools.genes.toronto.edu/>) (29)において、*UNC13B* 遺伝子のデノボ変異がスプライシング様式を変化させるという予測結果が得られた。Netgene 2 では、変異配列により、エクソン 38 のドナーサイトが喪失することが予測された (図 1B)。SPANR では、変異配列により、percent spliced in (PSI) が 15.62 低下しており、スプライスに大きな影響を与えると予測される目安値とされている 5 を(29)、大幅に超える結果を得た。

しかしながら、患者で同定されたデノボ変異が実際に生体内でスプライシングに影響を与えるかどうかは確認されていない。患者変異によるスプライシング様式の変化は、培養細胞株を用いたミニジーンスプライシングアッセイによる確認が可能であると考え、本章では、患者変異による *UNC13B* のスプライシング様式の変化を、ミニジーンスプライシングアッセイにより検討することとした(11,30,31)。

1.1.2 細胞内における *UNC13B* の機能について

UNC13B は、エクソサイトーシスのプライミングステップを制御することが知られており、特にプレシナプス終末における機能を担っていることが知られている(32) (33)。また、タンパク質情報データベースである Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)における Gene ontology (GO) 分類によると、”Calcium ion binding”にも分類されている。双極性障害患者の血液細胞において、カルシウムシグナリングに異常が報告されており(35)、双極性障害とカルシウムとの関係が示唆されている。また、双極性障害患者を対象にした GWAS でも、L 型カルシウムチャネルのサブユニットである *Calcium voltage-gated channel subunit alpha 1 C* (*CACNA1C*) が、双極性障害と有意に関与していることが報告されている(22)。また、双極性障害の併発率が高い遺伝性皮膚疾患ダリエ病の原因遺伝子 *ATP2A2* は、小胞体膜上に存在するカルシウムポンプであり、双極性障害の発症にカルシウムが関係し

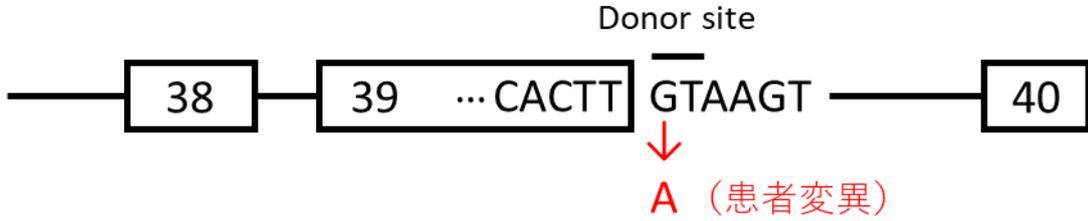
ている可能性が示唆される(11)。上記から、カルシウムに結合することが示唆される UNC13B は、双極性障害の発症に関与している可能性がある。

1.1.3 統合失調症と *UNC13B*

ある統合失調症多発家系において、患者を対象にした全エクソーム解析を行った研究において、患者の多くで *UNC13B* の稀なミスセンス変異が存在していることが報告されており、*UNC13B* と統合失調症との関係も示唆されている(36)。

A

UNC13B



B

WT

Donor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
189		1	+	0.70	ACACACCCTG	^	GTA	CTGGGGA
219		1	+	0.93	ACAGTGAAAG	^	GTGAGT	GATG H
538		2	+	0.24	GGGCCCCCAA	^	GTACAAT	GAG
559		2	+	0.71	CATTCCACTT	^	GTAAGT	TACG
598		0	+	0.54	TGGGATGGGG	^	GTAAGACT	TG

Mut

Donor splice sites, direct strand

pos	5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
189		1	+	0.70	ACACACCCTG	^	GTA	CTGGGGA
219		1	+	0.93	ACAGTGAAAG	^	GTGAGT	GATG H
538		2	+	0.24	GGGCCCCCAA	^	GTACAAT	GAG
598		0	+	0.50	TGGGATGGGG	^	GTAAGACT	TG

C

Domain Name Database NH₃->COOH

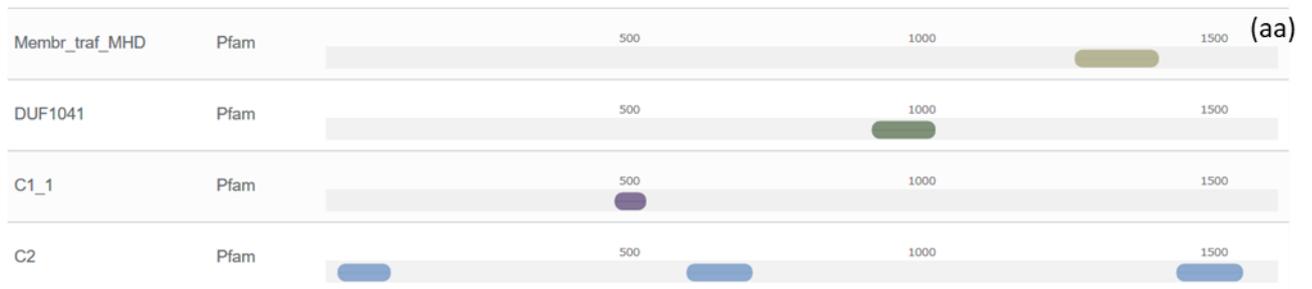


図1 *UNC13B* デノボ変異

- A. 患者で同定されたデノボ変異の模式図
- B. Netgene 2 によるスプライシング予測の結果。赤枠が野生型配列のエクソン 38 ドナーサイト。
- C. タンパク質ドメインデータベース Pfam による、*UNC13B* タンパク質のドメイン検索結果。矢印はフレームシフトが生じる部位を示す。aa; amino acids, Membr_traf_MHD; Munc13 homology domain, DUF1041; Domain of Unknown Function, C1_1; Phorbol esters/diacylglycerol binding domain, C2; C2 domain.

1.2 方法

1.2.1 変異がスプライシングに与える影響の予測

患者変異によるスプライシングへの影響を予測するために、二つのスプライシング予測サイト、Netgene 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) と SPANR (<http://tools.genes.toronto.edu/>)を使用した。Netgene 2 には、野生型および変異型塩基配列を含んだ、UNC13B エクソン 37-39 領域をそれぞれインプットした。SPANR については、患者変異の塩基配列情報をインプットし、使用した。

1.2.2 UNC13B ミニジーン の作製

片岡、的場らにより報告された双極性障害患者の DNA を使用し、PrimeSTAR GXL (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いて、nested PCR により患者変異近傍部を増幅した。1st PCR は Fw プライマー: 5'-CCTCAGGTTTACCTCCTACAGTTCTCC-3'、Rv プライマー: 5'-CCTGATTGGCACAGGAGTCGAAGG-3'により行い、2nd PCR は Fw プライマー: 5'-TTTTctcgagGGTCTGGTGTGGACGATCCTGTG-3'、Rv プライマー: 5'-AAAAgaattcTCAGCTCCCCTCCTCCGTGGAACG-3'により行った。増幅した PCR 産物および pAcGFP-C1 プラスミドを、XhoI および EcoRI により切断した。各切断後サンプルを Ligation High (TOYOBO, Osaka, Japan) によりライゲーションし、ミニジーンコンストラクトを作製した。得られたコンストラクトは、PureLink™ HiPurePlasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) によって増幅した。

1.2.3 スプライシングアッセイ

1 トランスフェクション

UNC13B のスプライシングアッセイは、ヒト胎児腎細胞由来 HEK293 細胞により行った。HEK293 細胞は、100U/mL ペニシリン、100μg/mL ストレプトマイシン (Wako, Osaka, Japan)、非働化した 10%v/v ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS; NICHIREI, Tokyo, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D5796; Merck Millipore) 培地中で、37°C、CO₂ 環境下で培養した。

継代時には、細胞密度が 90~100%コンフルエントに達した段階で、培養液を取り除き 1×PBS で洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) を加え、3 分間 37°C で静置後、接着細胞を剥がした。適量の培地で細胞を 15mL チューブに回収後、500×g で 3 分間遠心し上清を除去後、培地により細胞を懸濁し 1×10⁵ 細胞を 10cm ディッシュに播種した。

トランスフェクションは、下記の通り行った。トランスフェクション前日に、6.0×10⁵

の HEK293 細胞を 6 well プレートの well ごとに播種した。24 時間後、1 μ g のミニジーンコンストラクトを、3 μ L の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によりトランスフェクションした。48 時間後に細胞を回収し、その後の実験に使用した。

2 RT-PCR およびシーケンス解析

トランスフェクションした細胞を回収し、TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific) により、RNA 抽出を行った。抽出した RNA を 1 μ g 使用し、Super Script III First-Strand (Invitrogen) を用いて、oligo dT プライマーを用いて逆転写を行った。

逆転写により得られた cDNA を 5 倍希釈し、RT-PCR のテンプレートとした。RT-PCR は、Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) を用いて、Fw プライマー: 5' - CTGACCGGCACCGATTTC AAGGAG - 3'、Rv プライマー: 5' - GCTGCCCTTGGCTGTGACATC - 3'により行った。PCR 条件は、96°C、2 \rightarrow 30 \times (98°C、10 秒 \rightarrow 60°C、30 秒 \rightarrow 72°C、1 分) \rightarrow 72°C、5 分とした。

電気泳動ののち、スプライシング産物のバンドを切り出し、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) により、目的産物を精製した。精製した DNA 断片を、TOPO® TA cloning kit (Invitrogen) に挿入し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) により配列解析を行った。各試行は 3 回ずつ行った。

1.2.4 ヒト脳由来 total RNA を用いた RT-PCR

購入可能なヒト脳由来 total RNA である Premium Total RNA (#636561, Takara) を用いて、Super Script III First-Strand (Invitrogen) により逆転写を行った。1st PCR は、得られた cDNA を用いて、UNC13B のエクソン 35/36 ジャンクションを認識する Fw プライマー: 5' - CCTGGACACCATCAAGCAATACTTCC - 3' と、エクソン 39 を認識する Rv プライマー: 5' - CCTTGGCTGTGACATCCCTCAGAG - 3' によって、Ex Taq (Takara) による増幅を行った。PCR 条件は、96°C、2 分 \rightarrow 35 \times (98°C、10 秒 \rightarrow 58°C、30 秒 \rightarrow 72°C、35 秒) \rightarrow 72°C、5 分とした。2nd PCR は、100 倍希釈した 1st PCR の PCR 反応液を用いて、UNC13B のエクソン 37/39 ジャンクションを認識する Fw プライマー: 5' - GCACAAGGTCACAGTGAAAGCCTC - 3' と、エクソン 39 を認識する Rv プライマー: 5' - GACATCCCTCAGAGGCATCACAG - 3' によって、Ex Taq (Takara) による増幅を行った。PCR 条件は、96°C、2 分 \rightarrow 30 \times (98°C、10 秒 \rightarrow 60°C、15 秒 \rightarrow 72°C、30 秒) \rightarrow 72°C、5 分とした。各 PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動により分離した。

1.3 結果

1.3.1 *UNC13B* のスプライシングアッセイ

UNC13B の患者変異は、*UNC13B* エクソン 38 のスプライシングドナーサイトに存在しており、ドナーサイト配列を喪失させる。この変異は *UNC13B* のスプライシング様式を変化させることが予想されたので、*UNC13B* 患者変異がスプライシングに与える影響を調べるために、ミニジーンスプライシングアッセイを行った。患者ゲノムを鋳型に PCR を行い、*UNC13B* のエクソン 37-39 領域を増幅した。増幅した *UNC13B* ex37-39 領域を pAcGFP-C1 ベクターに挿入し、ミニジーンコンストラクトを作製した (図 2A)。

作製したコンストラクトを HEK293 細胞にトランスフェクションし、抽出した RNA を用いて RT-PCR を行った。その結果、野生型と変異型で、それぞれ異なる泳動パターンを示した (図 2B)。得られた PCR 産物を精製し、サブクロニングを行い、配列解析を行ったところ、変異型ミニジーンを導入した細胞由来 cDNA では、野生型スプライシングは完全に失われ、様々なスプライシング様式を示すことを見いだした (図 2C)。一方で、野生型ミニジーン由来 cDNA でも、エクソン 38 がスキップされたスプライシングパターンが、わずかながら見られることを明らかにした (図 2C)。

1.3.2 変異非保有者 RNA サンプルにおけるエクソンスキップバリエントの同定

同定したエクソンスキップバリエントが、実際に変異非保有者でも見られるのかを調べるために、ヒト大脳皮質由来 total RNA から cDNA ライブラリーを作製し、RT-PCR を行った。エクソン 35-39 領域を増幅したところ、既知のオルタナティブスプライスバリエントを含む 2 つのバンドを確認した (図 3A、B)。

ミニジーンスプライシングアッセイの結果から、エクソンスキップバリエントの発現量は小さいと予測できたため、エクソン 37/39 ジャンクションを特異的に認識できるプライマーにより、図 3A、B の PCR 産物を用いて nested PCR を行い、エクソンスキップバリエントを増幅した。その結果、非特異的増幅が見られたものの、変異非保有者サンプルでもエクソン 38 をスキップしたスプライスバリエントが存在していることを確認した (図 3C)。

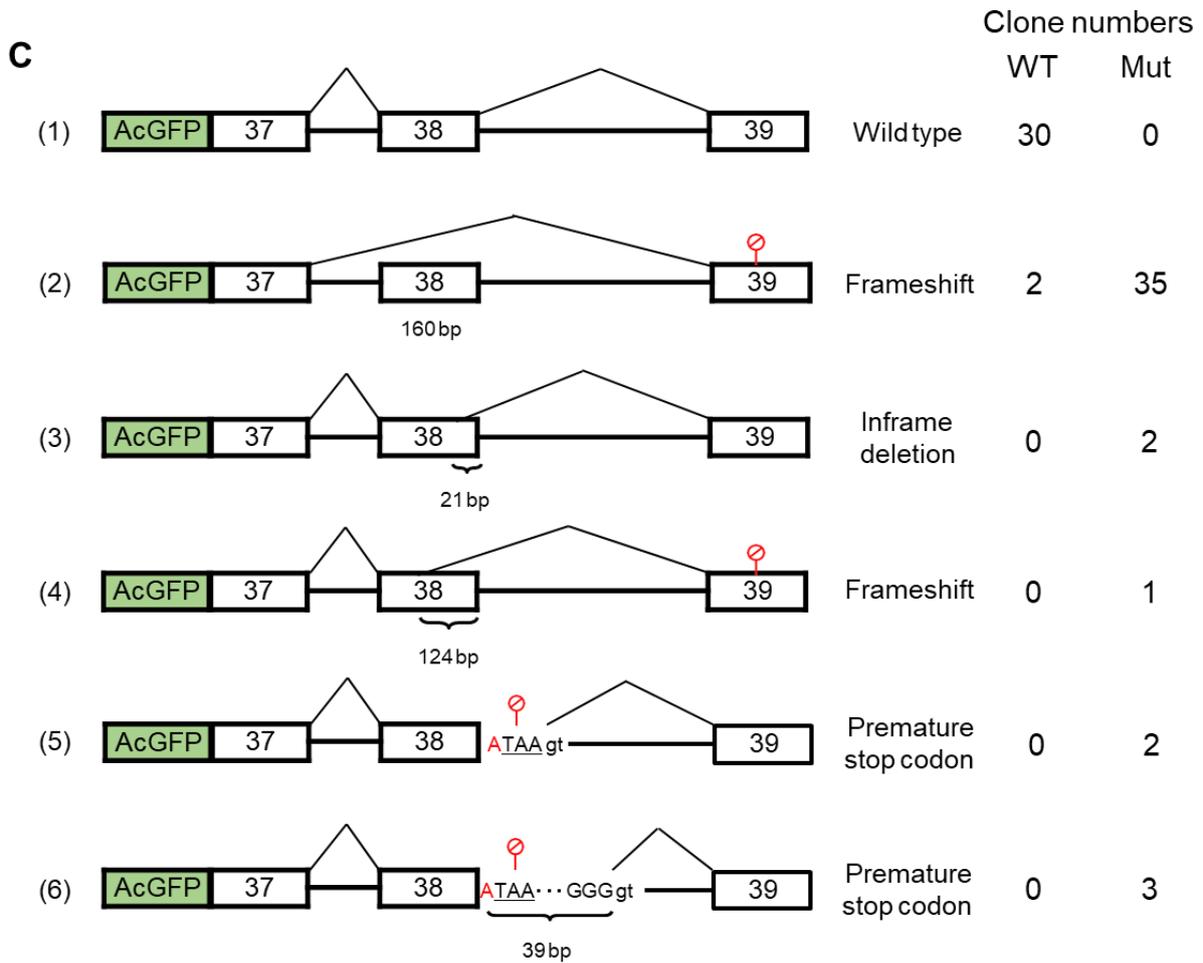
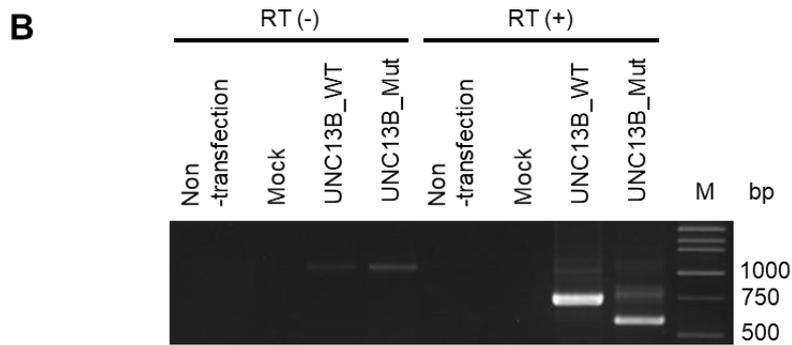
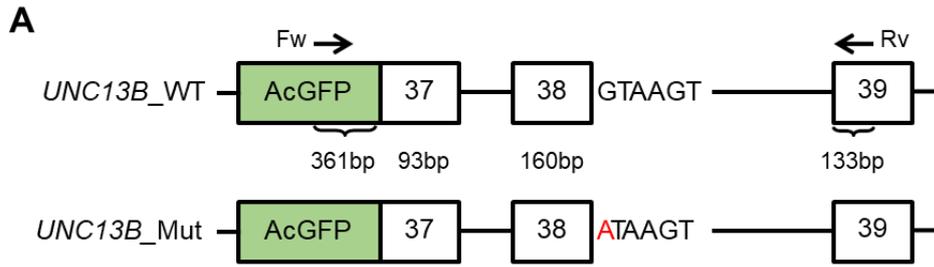


図 2 患者型 *UNC13B* のミニジーンスプライシングアッセイ

- A. ミニジーンコンストラクトの模式図。
- B. ミニジーンをトランスフェクションした HEK293 細胞由来 cDNA による RT-PCR。
患者型ミニジーン由来 cDNA で、スプライシングパターンの変化を確認した。
- C. 各スプライシングバリエーションのクローン数。

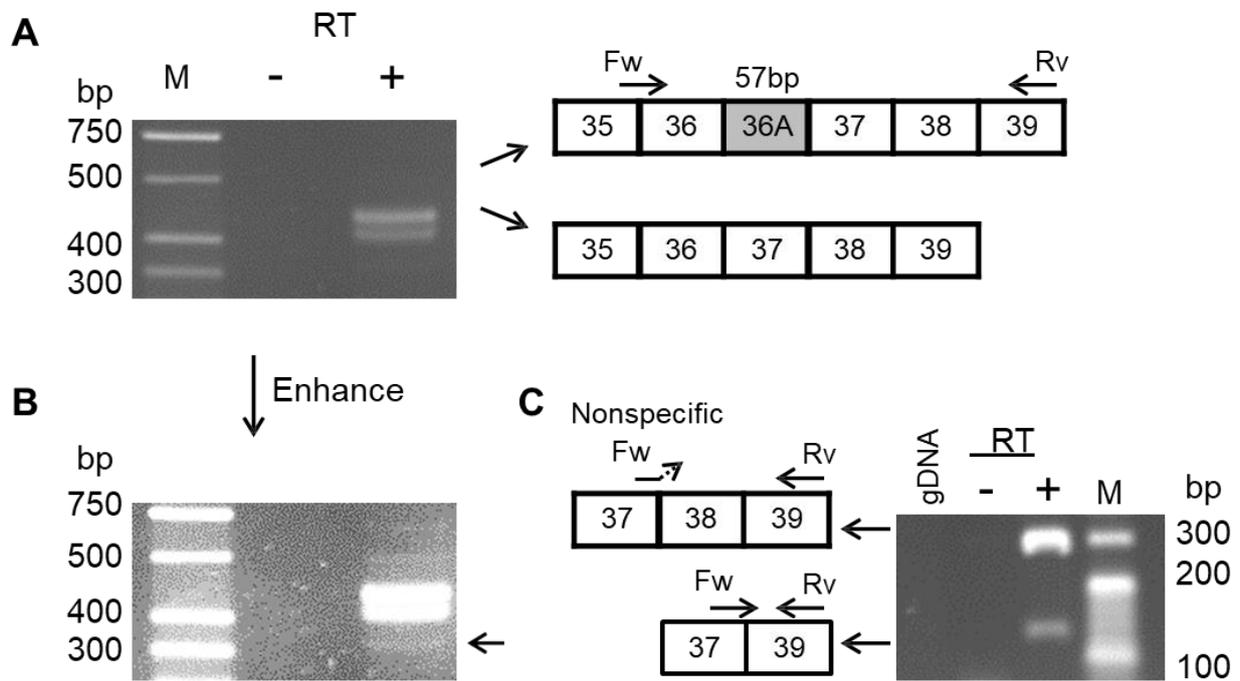


図3 健常者 cDNA を用いた *UNC13B* スプライシングバリエントの検討

- A. 健常者由来 cDNA を用いた RT-PCR。スプライシングアッセイにおいて正常型でも見られる、exon 36A-inclusion variant 由来のバンドを見いだした。
- B. A の泳動図のコントラストを上げたもの。メインバンドの下にエクソンスキップバリエント由来のバンドを確認した (矢印部)
- C. エクソン 38-skipping バリエント由来のバンドを見いだした。

1.4 考察

1.4.1 双極性障害患者変異が *UNC13B* に与える影響

本研究により、*UNC13B* のデノボ変異がエクソン 38 のドナーサイトを喪失させ、エクソンスキッピングを引き起こし、フレームシフトによる未成熟終始コドンを生成する可能性を見いだした。この未成熟終始コドンは *UNC13B* の最終コドンに生じるため、異常 mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) による分解を逃れ、C 末端の一部を失った短い異常タンパク質を生成すると考えられる。この異常タンパク質は、脂質結合ドメインである C2C ドメインを失っており、*UNC13B* の機能を喪失している可能性が高いだけでなく、異常タンパク質が野生型 *UNC13B* の機能を阻害するなどして、ドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性もある。

UNC13B は、プレシナプス終末において、エクソサイトーシス機能に関与しており、シナプス伝達の機能を担っていると考えられており、*UNC13B* 変異によるシナプス機能の異常が双極性障害発症に関与している可能性がある。双極性障害患者由来 iPS 細胞を海馬歯状回様神経に分化させたところ、健常者由来 iPS 細胞に比べて神経の過活動が生じており、双極性障害患者のシナプス伝達に異常が生じている可能性を示唆する報告がある(37)。また、患者死後脳では、シナプス構造に異常が生じていることが報告されており(38)、シナプス伝達と双極性障害との間に何らかの関係がある可能性があり、シナプス伝達に異常を生じると予測される。そのため、シナプス伝達に関わる *UNC13B* の変異が、双極性障害の発症に関与している可能性は十分あると考える。

また、*UNC13B* は、一般人口における機能喪失変異の起こりやすさの指標のひとつである probability of Loss-of-function intolerance (pLi) が 0 であり、一般人口においても機能喪失型変異が生じる頻度は高いと予測されている。すなわち、*UNC13B* に機能喪失変異を持っている健常者も存在していると考えられる。しかし、双極性障害患者変異は、*UNC13B* のドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性があるため、通常の機能喪失型変異よりもより重篤な異常を引き起こす可能性がある。つまり、*UNC13B* のドミナントネガティブ効果が、双極性障害発症に関与している可能性が考えられる。

1.4.2 エクソンスキップバリエントについて

今回、患者変異により生じるエクソンスキップバリエントが、健常者でも発現している可能性を見いだした。このエクソンスキップバリエントがドミナントネガティブ効果を有している場合、*UNC13B* の機能を負に制御する機構が存在している可能性がある。この調節機構が本当に存在しているのかや、その意義については、更なる研究が必要であると考える。

第2章 培養細胞株を用いた *EHD1* 遺伝子変異の機能解析

2.1 序論

2.1.1 双極性障害患者で同定された *EHD1* 遺伝子のデノゴ変異

患者で同定された *Eps15 Homology Domain Containing 1* (*EHD1*) のデノゴ変異 c.1414del.G は、*EHD1* の最終エクソン上に存在する一塩基欠失である(27)。この変異によりフレームシフトが起こり、直近のバリンが停止コドンに変化する(図4A)。この未成熟終止コドンは、最終エクソン上に生じるため、変異アリルより生じた異常 mRNA は、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) による分解を逃れ、野生型よりも短い異常 *EHD1* タンパク質が生成されることが考えられる。この患者型 *EHD1* は、*EHD1* の重要な機能ドメインである EH ドメインを喪失した状態で生体内に存在すると予測されるので、単純に機能を喪失しているだけではなく、ドミナントネガティブ効果を引き起こす可能性もあり、通常の発現量が低下するだけの機能喪失型変異に比べ、より重篤な影響を生体を与える可能性もある。

このような患者型異常タンパク質は、タンパク質発現コンストラクトを使用した過剰発現実験によって、その機能を評価することが出来ると考えられる。そこで、本章では、野生型および患者型 *EHD1* を発現するプラスミドコンストラクトを作製し、培養細胞株を用いた過剰発現実験により、患者型 *EHD1* の細胞内での機能を検討することとした。

2.1.2 *EHD1* について

EHD1 は、進化的にも保存されており、線虫にも *Rme-1* 遺伝子としてオルソログが存在している(39) (40)。ヒトでは、*EHD1*~4 の4つのアイソフォームが存在しており、特に *EHD1* と *EHD3* は、86%の高い配列相同性を示している(41)。*EHD1* には ATP 結合領域が存在し、C 末端側に EH ドメインが存在している。EH ドメインには、カルシウム結合部位 EF ドメインが含まれている(図4B) (42)。*EHD1* は、EH ドメインを介して、他タンパク質の NPF というアミノ酸配列に結合することにより、足場タンパク質として機能することが知られている(43)。これまで、*Rab35* をはじめとする Rab タンパク質や、脂質結合タンパク質のひとつである *Molecules Interacting with CasL-like 1* (*MICAL-L1*) (44)、*SNAP-29* などの SNARE タンパク質などと相互作用することが知られている(45)。また、*EHD* ファミリー間でも、EH ドメインを介して相互作用することも知られている(46)。

EHD1 は、細胞内のエンドサイトーシスをはじめとする小胞輸送を制御していることが知られている(41)。前述の Rab や *MICAL-L1* を介して、ミオシンやダイニンと結合

し、小胞輸送複合体を形成する(47)。また、エンドソームからトランス-ゴルジネットワーク (TGN) への輸送を制御するという報告もされている(48)。さらに、エンドサイトーシスにより取り込まれた細胞膜に局在する受容体をエンドソームから再び細胞膜へ輸送する、リサイクリングエンドサイトーシスの制御も担うことが知られており、トランスフェリンレセプターのリサイクリングも EHD1 により制御されると考えられている(39)。一方で、クラスリン非依存性エンドソームのリサイクリングも制御し、Major Histocompatibility Complex (MHC) や、 β 1 インテグリンのリサイクリングにも関係がある可能性が示唆されている(49) (50)。このほかにも、インスリン依存性グルコーストランスポーターである GLUT4 や(51)、AMPA 型グルタミン酸受容体のリサイクリングエンドサイトーシスにも関与している(52)。また、Low density lipoprotein (LDL) 受容体の細胞内取り込みや(53)、神経接着因子である L1/neuron-glia cell adhesion molecule (L1/NgCAM) を細胞外から軸索への輸送に関係することも知られている(46)。また、SNARE タンパク質である Snapin と結合し、エクソサイトーシスの制御にも関係があるとの報告もある(54)。

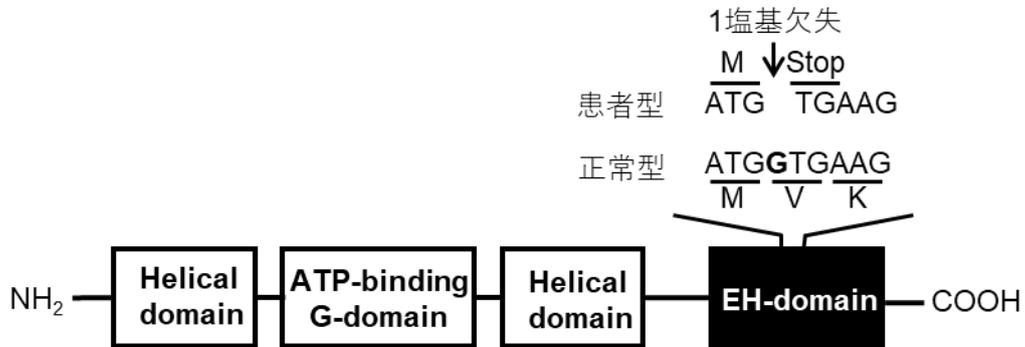
このほかの細胞内での機能として、神経突起伸長 (Neurite outgrowth) への関与が報告されている(55)。Rab35 や MICAL-L1 と複合体を形成し、ラット副腎皮質由来 PC12 細胞株の神経突起伸長を制御しているが、詳細な分子機構はまだ分かっていない(44)。

Ehd1 欠損マウスの報告も複数存在している。*Ehd1* のホモ欠損マウスは、一部において胎生致死を示すが、多くは出生や離乳に至る、preweaning lethality, incomplete penetrance を示す(56)。*Ehd1* ホモ欠損マウスでは、野生型やヘテロ欠損マウスに比べて、体重が小さくなる。また、ホモ欠損のオスマウスには生殖機能がなく、精巣も小さくなることが知られている。胎生致死の *Ehd1* ホモ欠損マウスについては、そのマウス胚では発生時の一次繊毛 (primary cilia) の形成異常が見られる。一次繊毛は、ヘッジホッグシグナル経路に重要な役割を果たすが、EHD1 欠損によりこのシグナル経路が抑制されることも確認されており、EHD1 が発生ステージで大きな機能を担っていることを示唆している(57)。また、*Ehd1* ヘテロ欠損マウスでは、筋肉の横行小管の形成に異常が見られることも知られており、EHD1 は個体形成や発達に関係していると考えられる(58)。

さらに、EHD1 は、Amyloid- β precursor protein (APP) からアミロイド β を産制する β -secretase (BACE1) の、神経における逆行性輸送を制御している。アミロイド β は、アルツハイマー病と関係があることが知られているため、EHD1 と脳疾患との関連性も示唆される(59)。

本章では、作製した EHD1 発現コンストラクトを用いて、患者型 EHD1 が、上記の小胞輸送機能や神経突起伸長機能にどのような影響を与えているのかを検証した。

A



B

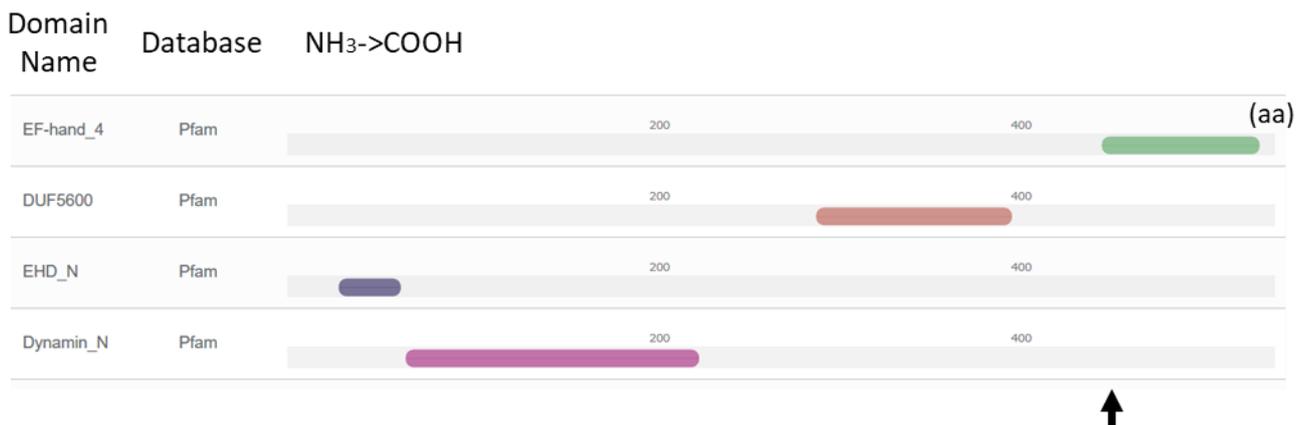


図 4 EHD1 の双極性障害患者変異の模式図

- A. 1 塩基欠失により、直前に終始コドンが生成され、EH ドメインの大部分を欠損する。
- B. タンパク質ドメインデータベース Pfam による、EHD1 タンパク質のドメイン検索結果。矢印は変異部を示す。aa; amino acids, EF-hand_4; Cytoskeletal-regulatory complex EF hand, DUF5600; Domain of unknown function 5600, EHD_N; N-terminal EH-domain containing protein, Dynamamin_N; Dynamamin family/

2.2 方法

2.2.1 mCherry-EHD1 発現ベクターの作製

先行研究で報告された、EHD1-WT-Myc および EHD1-Mut-Myc ベクターをテンプレートとし(27)、Fw プライマー: 5'-TTTTCTCGAGCTATGTTTCAGCTGGGTCAGC-3' および Rv プライマー: 5'-TTTTGAATTCTCACTCATGTCTGCGCTTGG-3' により、Pfu Ultra (Stratagene California, La Jolla, California, USA) により、EHD1 配列を増幅した。PCR 反応液を電気泳動し、目的断片のバンドを切り出した後、Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により EHD1 配列を精製した。得られた精製産物を、pmCherry-C1 ベクター (Invitrogen) の XhoI/EcoRI 部位に挿入した。得られたコンストラクトは、PureLink™ HiPurePlasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) によって増幅した。

2.2.2 トランスフェクション

EHD1 変異体の解析には、ラット副腎髄質由来細胞株である PC12 細胞を使用した。PC12 細胞は、1 g/L D-グルコース、L-グルタミン、110 mg/L ピルビン酸ナトリウムを含む DMEM (Thermo Fisher Scientific) に、10% v/v FBS、10% v/v ウマ胎児血清、100 U/mL、100 µg/mL ストレプトマイシン (Wako) を加えた培養培地を用いて、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。継代は、HEK293 細胞と同様の手順で行った。トランスフェクションについては、下記の通り行った。

ウエスタンブロット用サンプルについては、継代時と同様に回収した PC12 細胞を、6 well プレートに 6.0×10^5 cells 播種し、37°C、5% CO₂ 環境下で 48 時間培養したのち、3.5 µg のプラスミドを 6 µL の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) によりトランスフェクションした。

神経突起伸長測定実験では、継代時と同様に回収した PC12 細胞を、 12.5×10^5 cells/mL となるように培地に懸濁し、35 mm ガラスボトムディッシュ (松浪硝子工業株式会社) のガラスボトム上に、調製した細胞懸濁液を 200 µL 滴下した。37°C、5% CO₂ 環境下で 30 分静置したのち、1.8 mL の培地を新たに添加し、37°C、5% CO₂ 環境下で培養した。細胞播種から 48 時間後、0.5 µg の pVenus-C1 ベクターと 3.5 µg の mCherry-EHD1 発現ベクターを、6 µL の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) により、トランスフェクションした。

エンドサイトーシス定量実験については、10 cm ディッシュに PC12 を継代して 2 日後に、21.4 µg の mCherry-EHD1 発現ベクターを 38 µL の Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) によりトランスフェクションした。24 時間後に培地交換を行い、48 時間後にエンドサイトーシスの定量を行った。

2.2.3 ウェスタンブロット

トランスフェクションした細胞については、24 時間後に培地交換を行い、48 時間後に培地除去後、1 mL の 1×PBS により洗浄した。その後、10 mL 当たり 1 錠の cOmplete Mini, EDTA-free protease inhibitors (Roche, Upper Bavaria, Germany) を含む Radioimmunoprecipitation (RIPA) バッファー (0.15M NaCl、1% NP-40、0.05% Deoxycholate, 0.1% SDS、0.05M Tris-HCl (pH 8.0)) を 50 μ L 添加し、30 分氷上で静置した。静置後、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心し、上清を回収後、Micro BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質定量を行った。

調製したタンパク質サンプル 15 μ g を、8% SDS-ポリアクリルアミドゲルにより分離後、ウェット式により PVDF 膜 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) に転写した。その後、TBST に溶かした 5% スキムミルク溶液により室温で 30 分間ブロッキングを行い、1 次抗体として抗 EHD1 ウサギモノクローナル抗体 (1:5000, ab109747; Abcam, Cambridge, UK) と、抗 β アクチンマウスモノクローナル抗体 (1:6000, sc-2030; Santa Cruz biotechnology, Dallas, Texas, USA) を 4°C で一晩反応させた。翌日、TBST で 5 分室温振蕩を 5 回行ったのち、EHD1 に対しては抗ラビット IgG 二次抗体 (1:5000; Santacruz biotechnology) を、 β アクチンに対しては抗マウス IgG 二次抗体 (1:6000; Santacruz biotechnology) を 1 時間室温で反応させ、再び TBST で 5 分洗浄を 5 回行ったのち、Pierce Western Blotting Substate (Thermo Fisher Scientific) による検出を行った。

2.2.4 神経突起伸長測定実験

トランスフェクションから 24 時間後に培地交換を行い、48 時間後に最終濃度 50 ng/mL となるように、Murine β -NGF (#1210394; PEPROTECH INC. Rocky Hill, New Jersey, USA) を添加し、さらに 48 時間後に共焦点顕微鏡 (FLUOVIEW FV1000; Olympus, Center Valley, Pennsylvania, USA) により、盲検状態にて蛍光画像取得を行った。各試行で、1 サンプルごとに 20 枚の写真が無作為に取得した。これを 3 試行行い、画像解析を行った。なお、NGF 刺激なしの細胞でも最大 13.4 μ m の神経突起が見られたため、それ以下の長さの神経突起については、バックグラウンドとして除外した。

画像解析については、画像解析ソフト NeuroLucida (mbf BIOSCIENCE, Williston, Vermont, USA) の Dendrite Autotrace モードを用いて、mCherry 陽性細胞について、GFP の蛍光画像により神経突起の長さを測定した。各画像は、盲検状態で解析した。

2.2.5 エンドサイトーシス定量実験

トランスフェクションを行った PC12 細胞を、培地除去後に 4 mL の 1×PBS で洗浄し、

5 mL の飢餓状態誘導培地 (0.1% BSA in DMEM) を曝露後、37°C、5% CO₂ 環境下で 35 分静置した。飢餓状態誘導培地を除去した後に、0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) を 1mL 添加し、37°C で 3 分間静置した。その後、9 mL の 1×PBS を添加し、剥がれた細胞を回収し、300×g で 3 分遠心し、上清を除去した。沈殿した細胞塊に、1 mL の 1×PBS を添加し、細胞懸濁液を作製した。細胞懸濁液を 330 μL ずつ 2 本のチューブに分注し、それぞれ A および B とした。

A には 8% PFA/PBS 溶液を 330μL 添加し、室温に 10 分間静置し固定した。300×g で 3 分間遠心し、固定した細胞を回収後、300 μL の 1×PBS に懸濁した。B については、300×g で 3 分間遠心し細胞を回収後、50 μg/mL に調整したトランスフェリン-Alexa488 in DMEM 溶液を添加し、37°C の恒温槽に 20 分置き、トランスフェリンの取り込みを誘導した。300×g で 3 分間遠心し、細胞を回収したのち、4% PFA/PBS を 1 mL 添加し、室温で 10 分間静置して細胞を固定した。その後、A と同じ手順で 300 μL の PBS に置換した。

調整した A および B の固定細胞懸濁液を、BD FACSAria (BD Science, San Jose, California, USA) により、mCherry と Alexa-488 の蛍光強度を測定した。得られたデータは、解析ソフト FlowJo (Digital Biology, Tokyo, Japan) により解析した。未染色の細胞をコントロールとして、mCherry 陽性細胞群について、Alexa-488 の平均蛍光強度を算出し、比較した。

2.3 結果

2.3.1 mCherry-EHD1 発現ベクターの作製および品質評価

過剰発現実験を行うために、mCherry で標識した、野生型および患者型 EHD1 発現ベクター (mCherry-EHD1-WT および mCherry-EHD1-Mut) を作製した (図 5A)。mCherry-EHD1 を PC12 細胞で過剰発現させ局在を確認したところ、既報と同様に細胞質に分布していたことを確認した (図 5B)。また、mCherry-EHD1-Mut 由来タンパク質が、mCherry-EHD1-WT 由来タンパク質よりも短いことを確認した (図 5C)。

2.3.2 EHD1 患者変異による神経突起伸長能への影響

神経成長因子 (nerve growth factor, NGF) により、PC12 の神経突起伸長を誘導することができる。mCherry-EHD1 を発現する PC12 細胞における神経突起伸長を計測した。NGF 曝露後 48 時間の細胞の神経突起の長さを計測したところ、mCherry-EHD1-WT を過剰発現させた PC12 細胞では、mCherry のみを発現させた細胞に比べ、有意に神経突起が長かった (図 6)。一方、この突起伸長を促進する作用は、mCherry-EHD1-Mut では見られなかった。

2.3.3 患者変異がエンドサイトーシスに与える影響

既報より、EHD1 は小胞輸送に関わっていることが知られているため、患者型 EHD1 が PC12 細胞のエンドサイトーシス機能に与える影響を調べることにした。各 mCherry-EHD1 発現ベクターを導入した PC12 細胞を回収した細胞懸濁液に、Alexa488 で蛍光標識したトランスフェリンを曝露し、Alexa488-トランスフェリンの取り込み量を FACS により測定した (図 7A、B)。その結果、mCherry-EHD1-Mut を発現する PC12 細胞では、コントロールに比べてトランスフェリンの取り込みが有意に低下していた (図 7C)。

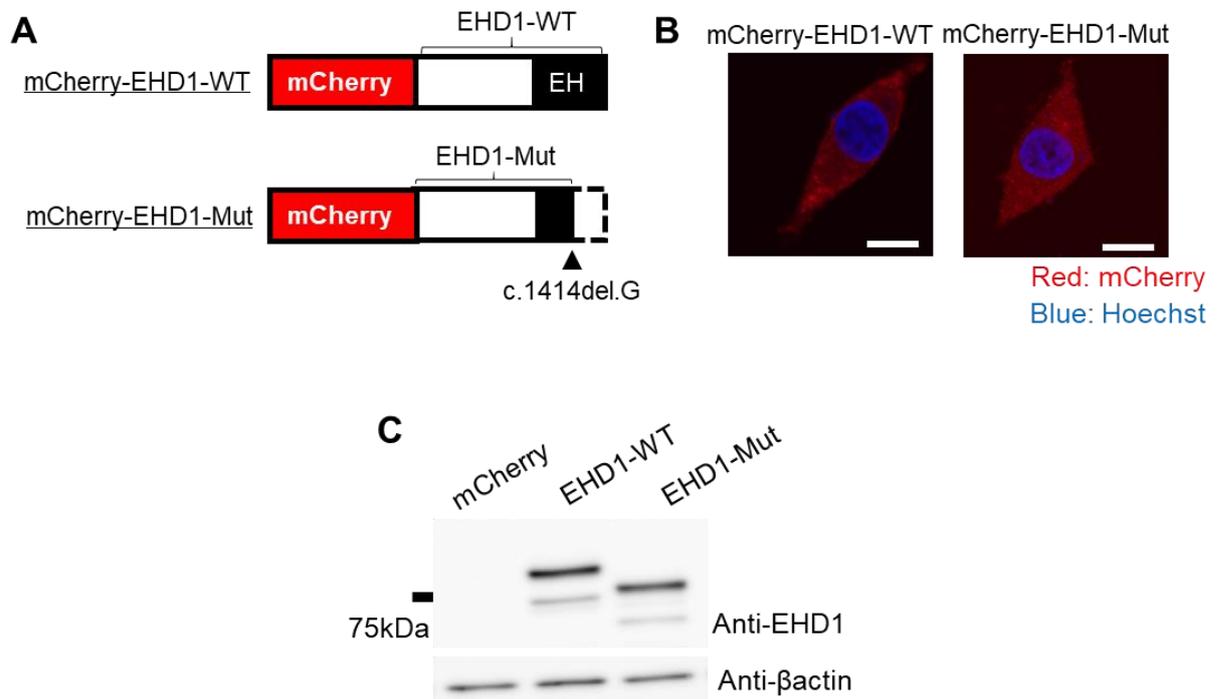


図5 EHD1 発現ベクターの品質評価

- A. 野生型、患者型 mCherry-EHD1 発現ベクターの模式図。
- B. mCherry-EHD1 を発現する PC122 細胞の代表例。赤は mCherry、青は Hoechst の蛍光である。スケールバーは 10 μ m。
- C. ウェスタンブロットによる mCherry-EHD1 の発現確認。内部標準として、抗 β アクチン抗体を使用し、 β アクチンを検出した。

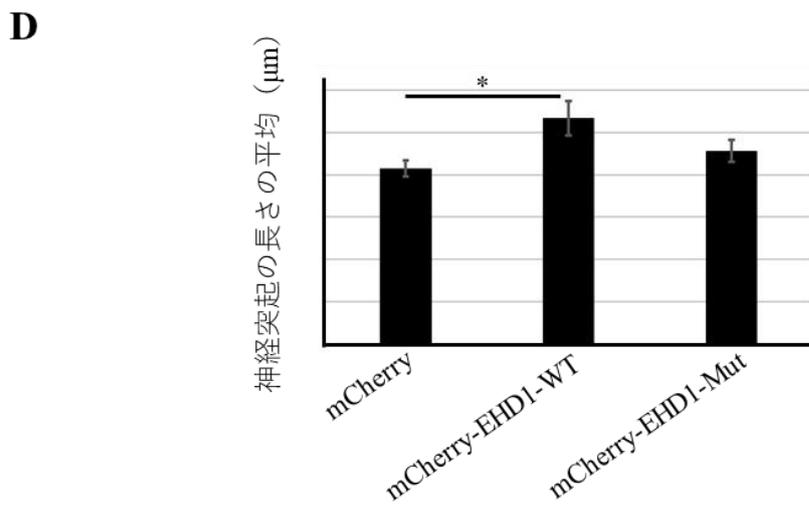
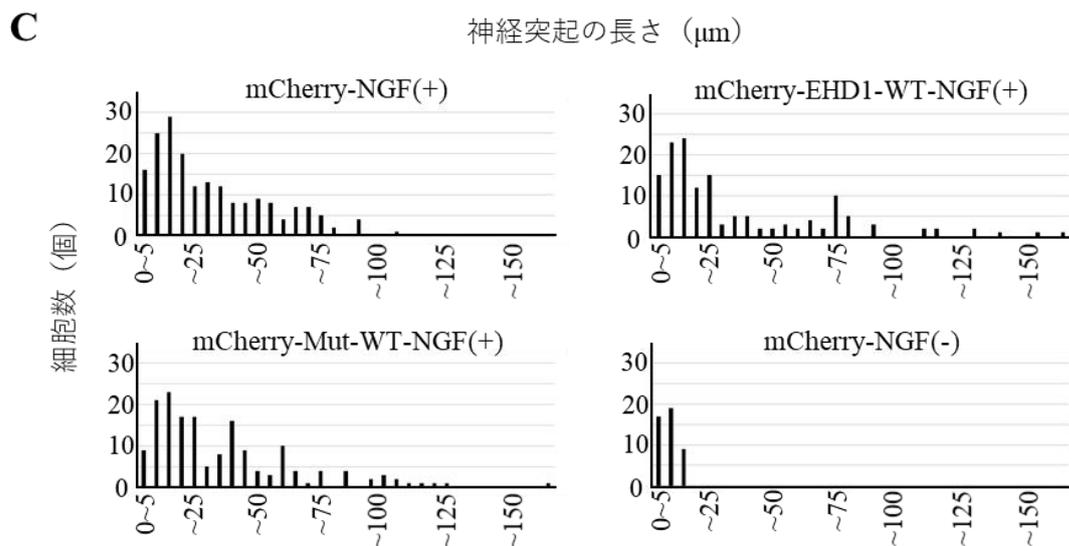
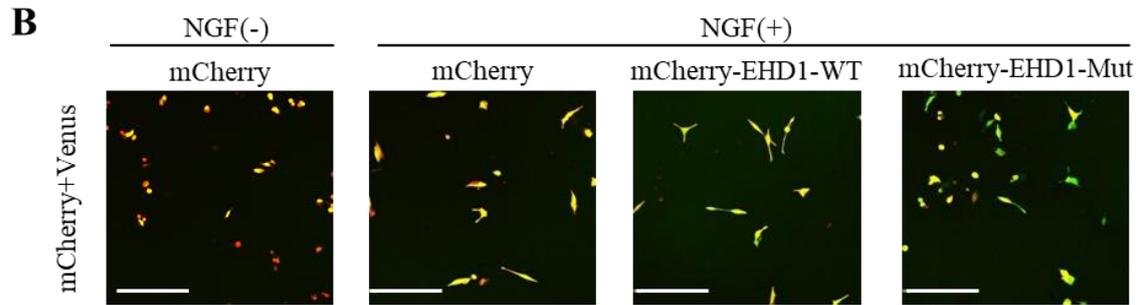
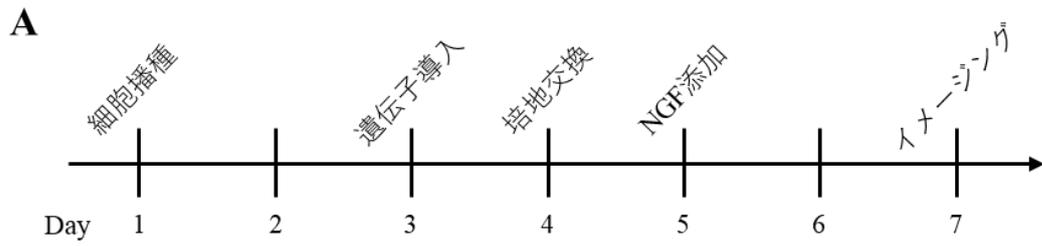
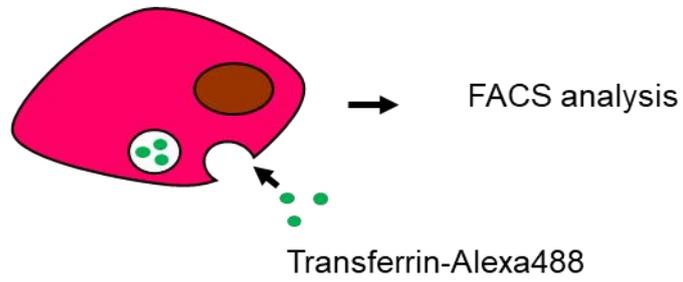


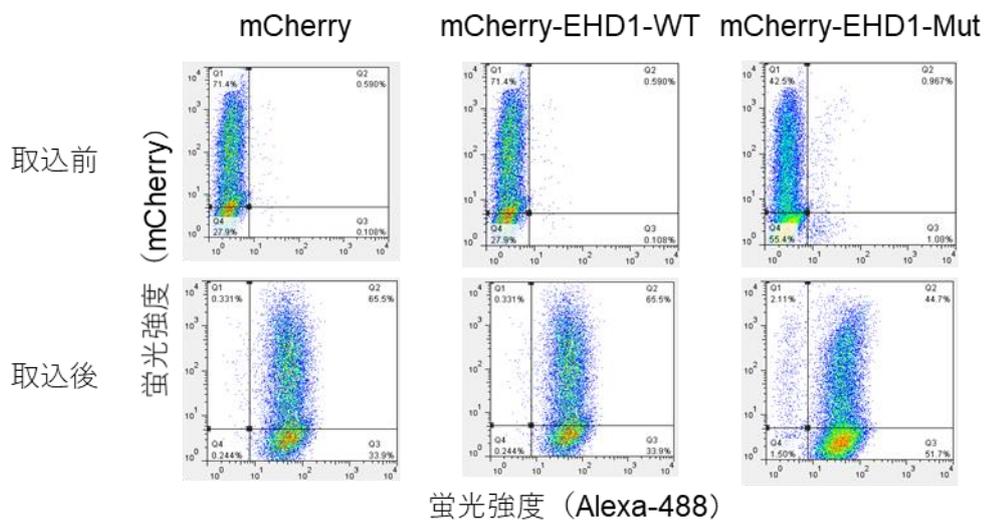
図 6 神経突起伸長測定実験

- A. 神経突起伸長測定実験の流れ。
- B. 各 mCherry-EHD1 発現 PC12 細胞の代表例。NGF 添加細胞について、神経突起伸長が観察された。スケールバーは、200 μm 。
- C. 神経突起の長さのヒストグラム。各サンプルで見られた神経突起の長さを 5 μm ずつのヒストグラムにプロットした。NGF 添加なしの PC12 細胞では、最長で 13.4 μm の神経突起が観察された。
- D. 神経突起の長さの平均。Mean \pm SEM。N > 80。Tukey の多重検定。* $p < 0.05$ 。

A PC12 cells



B



C

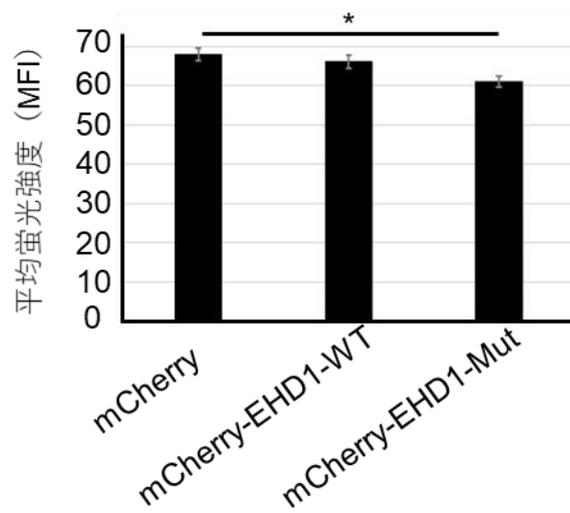


図7 エンドサイトーシス定量実験

- A. 実験の流れ。
- B. FACS のプロット図。各細胞を mCherry および Alexa-488 の蛍光について展開した。縦軸は mCherry、横軸は Alexa-488 の蛍光強度。
- C. 平均蛍光強度の比較。各試行について、mCherry 陽性細胞における Alexa-488 の平均蛍光強度の平均を算出した。Mean \pm SEM。N = 3。* p < 0.05。MFI, Mean Fluorescent Intensity。

2.4 考察

2.4.1 患者型 EHD1 の機能について

神経突起伸長計測実験の結果、野生型 EHD1 を過剰発現させた PC12 細胞で見られた神経突起伸長の促進が、患者型 EHD1 の過剰発現では見られないことを明らかにした。この結果は、患者型 EHD1 の、神経突起伸長促進機能の喪失、すなわち患者変異による機能喪失を示唆する結果である。EHD1 が神経突起伸長にどのように関係しているのか明らかになってはいないが、考えられる候補として、ふたつの経路が挙げられる。ひとつめは、EHD1 が関与する輸送小胞が、伸長する神経突起の growth cone まで輸送され、突起伸長に必要な膜成分を供給する可能性である(44)。もうひとつの経路として、EHD1 が NGF 受容体である Neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 (NTRK1) と結合するという事実から、EHD1 が NGF シグナル経路を介在することにより、神経突起伸長誘導を制御するというものである。患者型 EHD1 は、これらの経路に関係する機能を失っている可能性があると考えられる(60)。

ところが一方で、エンドサイトーシス定量実験では、患者型 EHD1 過剰発現 PC12 細胞のエンドサイトーシスが、EHD1 発現ベクターを導入しなかった PC12 細胞のものより有意に低下していた。この結果は、患者型 EHD1 が、PC12 細胞が有している内在性エンドサイトーシス機能を阻害した可能性を示唆しており、患者型 EHD1 のドミナントネガティブ効果を示唆する結果である。「2.1.2 EHD1 について」で述べたように、EHD1 は、EH ドメインを介して足場タンパク質として機能することで、エンドサイトーシス関連タンパク質と相互作用し、エンドサイトーシスに関与すると考えられる。EH ドメインの大部分を欠失した EHD1 が、野生型 EHD1 もしくはエンドサイトーシス関連タンパク質の機能を阻害した結果、患者型 EHD1 がドミナントネガティブ効果を呈したと考えられる。

以上から、患者型 EHD1 は、機能喪失とドミナントネガティブ効果という、一見相反する表現型を示したように見える。しかしながら、このように機能喪失とドミナントネガティブ効果の双方の表現型を示す疾患関連遺伝子変異は複数報告されている。精神疾患多発家系で様々な変異が見られる Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) は、EHD1 と同様に足場タンパク質として機能する。一部の患者型 DISC1 は、相互作用することで神経突起伸長などを制御する Nuclear distribution element like 1 (NDEL1) との結合能が低下し、神経突起伸長能を喪失する。その一方で、患者型 DISC1 は、野生型 DISC1 と高分子オリゴマーを形成し、ミトコンドリアに結合してその形態を変化させるなどの機能を獲得することも報告されている(61)(62)。また、筋委縮性側索硬化症 (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS) に関連する、TAR DNA-binding protein 43 kDa (TDP-43) タンパク

質は、核内においてスプライシングや翻訳などの RNA 制御に関係しており、患者型 TDP-43 がその機能を欠損している一方で、細胞質に局在したり凝集体を形成したりするなど、患者型 TDP-43 特有の機能を獲得し、ALS 発症に寄与することが報告されている(63)。以上のような観点からも、患者型 EHD1 が機能喪失とドミナントネガティブ効果の両方を示す可能性は、十分に考えられる。

2.4.2 患者型 EHD1 と双極性障害の関係をさらに明らかにするために

EHD1 の患者変異が実際に双極性障害発症に関与しているのかを調べるためには、マウスを用いた行動解析を行う必要がある。上記のように、患者型 EHD1 は、単純な機能喪失を呈するだけでなく、ドミナントネガティブ効果を獲得する可能性があるため、双極性障害研究のために *Ehd1* の遺伝子改変マウスを作製するためには、*Ehd1* 遺伝子を破壊した単純なノックアウトマウスではなく、双極性障害患者の変異を再現した、*Ehd1* 患者変異ノックインマウスの作製が重要であることが示唆される。そこで、次章のマウス研究においては、*EHD1* 変異を再現した *Ehd1* 遺伝子改変マウスを作製し、*in vivo* の解析を行った。

第3章 マウスを用いたデノボ変異の機能解析

3.1 序論

本章では、報告されたデノボ変異が双極性障害発症に寄与しているのかを明らかにするために、デノボ変異を再現した遺伝子改変マウスを作製し、行動評価および生理学的解析を行う。

3.1.1 候補遺伝子の絞り込み

片岡、的場らに報告された、機能喪失型変異を有していた9個の遺伝子の中から(27)、さらに疾患発症に関与している可能性が高い遺伝子を絞り込み、遺伝子改変マウスを作製することとした。

そこで、より生体内で重要な機能をしていると予測される遺伝子を予測するため、疾患遺伝学の分野で多用される遺伝子の指標である、pLi および Residual Variation Intolerance Score (RVIS) に着目した。pLi は、ある遺伝子について、一般人口において機能喪失型変異が生じている頻度を示す値である(64)。一方 RVIS は、ある遺伝子について、一般人口において、ナンセンス変異変異なども含むアミノ酸配列変化変異の生じた頻度を示す値である(65)。いずれの指標も、重篤な疾患が生じる頻度などと相関しており、生体の維持における遺伝子の重要性の尺度として有用であることが知られている。

双極性障害患者において機能喪失型変異を有していた9個の遺伝子の pLi および RVIS を取得し比較した結果、*Microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1)*、*Lysine methyltransferase 2C (KMT2C)*、*EHD1* 遺伝子が、両指標で最も変異が起こりにくいと予測される3つの遺伝子であった(図8)。そこで私は、双極性障害とデノボ変異の関係を調べるうえで、これら3つの遺伝子が最も有力であると考え、各遺伝子を改変したマウスを作製し、行動解析および生理学的解析を行うこととした。

3.1.2 MACF1 について

MACF1 は、細胞骨格と結合するプラキンファミリーのひとつである。ヒト *MACF1* は、少なくとも110のエクソンから構成され、402 kbp からなる巨大な遺伝子であり、複数種のスプライシングバリエーションが存在する(66)(67)。そのため、メインアイソフォームから生成される *MACF1* タンパク質は、約620kDa と非常に巨大である。双極性障害患者で同定されたデノボ変異は、複数ある *MACF1* アイソフォームのうちひとつ (*MACF1A3*) (68)のみが有するエクソン1上に存在するフレームシフト変異であり、*MACF1A3* のみの発現が低下する変異であると予測される(図9)。しかしながら、このアイソフォームの細胞内での機能は不明である。

MACF1 は、神経突起の伸長、神経移動などに関与していることや(69)(70)、小胞輸送に関与していることが報告されている。また、Wnt シグナルに関与することが明らかになっており(71)、Wnt シグナルパスウェイに存在する Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)の機能を抑制するという報告がなされている(72)。一方、GSK3 β により MACF1 と微小管の結合が制御されているという報告もあり(73)、MACF1 と GSK3 β 間に何らかのフィードバック機構が存在する可能性があるが、明らかになってはいない。また、*Macf1* のホモノックアウトマウスは、胎生致死を示すことが報告されており(74)(75)、生体にとって重要な遺伝子であることが示唆される。また、小腸特異的 *Macf1* ノックアウトマウスでは、小腸や直腸の形成異常や、DSS 誘導による大腸炎がより重篤になることも報告されている(76)。

近年、滑脳症や脳幹委縮を呈する患者において、MACF1 の GAR ドメイン上の、保存性が高い亜鉛イオン結合残基に存在する、デノボミスセンス変異が複数存在していることが報告された(77)。この論文では、このような変異により、神経移動や軸索伸長機能に異常が生じる可能性を報告しており、MACF1 が脳の発達形成に重要な役割をしていることを示唆している。

3.1.3 KMT2C について

KMT2C は、ヒストン 3 の 4 番目リジン (H3K4) をモノまたはジメチル化するメチル基転移酵素である。4022 アミノ酸からできており、約 550 kDa の巨大なタンパク質をコードしている(78)。胎児発生の段階で最も発現するが、成体でも発現は維持されており、ヒト脳では海馬、尾状核、黒質など、学習や記憶、社会性行動に関わる脳領域で強く発現することが知られている(79)。ヒストンメチル化を制御するだけではなく、RNA ポリメラーゼ II (PolII) と複合体を形成し、エンハンサー/プロモーター領域において転写制御をすることも知られている(80)(81)。双極性障害患者で同定されたデノボ変異は、*KMT2C* のエクソン 43 上に存在するナンセンス変異であり、*KMT2C* のハプロ不全を引き起こすと予測される。

KMT2C の機能についてのマウスを用いた研究も報告されているが、脳を対象にした *KMT2C* の研究は、ほとんど報告されていない。*KMT2C* は、ヒストンメチル化活性を担う SET ドメインを有しており、SET ドメインを欠失した *Kmt2c-C* 末端欠損 (ΔC) マウスが報告されている(78)(82)。*Kmt2c* ヘテロ欠損マウスの肝臓サンプルを用いた RNA-seq の結果では、*KMT2C* が脂質生成やタンパク質翻訳に関わる遺伝子群の発現を制御することが明らかになっているが、マウス脳を用いた同様の研究の報告は現在までない(83)。また、*KMT2C* の発現は circadian rhythm の制御を受けることが知られており、*KMT2C* の ChIP-seq 解析により *KMT2C* の DNA 結合領域が時間に応じて変化している

ことが報告された(83) (84)。

KMT2C は、様々な疾患との関与が報告されている。特に、*KMT2C* は、がん抑制遺伝子として知られており、白血病患者などで多くの変異が見つかった(85) (86)。*KMT2C* をノックダウンしたヒト膀胱がん培養細胞株 HBT9 細胞を用いた RNA-seq の結果によると、*KMT2C* は、DNA 修復に関わる遺伝子群の発現を制御することが明らかになっている(87)。

また、神経発達障害患者においても、多くの機能喪失型変異が報告されている(88)。身長体重の低下、重篤な知的障害、てんかんなどを示す発達障害である Kleefstra 症候群患者では(89)、複数の機能喪失型デノボ変異が報告されており、Kleefstra 症候群の原因遺伝子のひとつとされている(90) (91)。また、自閉症患者においても複数の機能喪失型デノボ変異が報告されている(92) (93)。自閉症関連遺伝子データベースである SFARI gene (<https://gene.sfari.org/>) では、有力な関連遺伝子として登録され、自閉症との関与が期待されており、近年注目を浴びている遺伝子である。また、統合失調症患者でも機能喪失型デノボ変異が報告されている(94)。このように、自閉症をはじめとする神経発達障害、統合失調症、そして双極性障害患者で同様に機能喪失型変異が報告されている(図 10)。しかしながら、同じ *KMT2C* の機能喪失がどのように発症する疾患の違いを生み出しているのかは、全く不明である。

3.1.4 双極性障害のマウス研究

神経生物学レベルでの双極性障害研究を行うためにはモデルマウスが必要であるが、双極性障害の確立した双極性障害のモデルマウスは存在していない、というのが現状である。それでもこれまで、モデルマウスを確立するための研究が行われてきた。例えば、双極性障害の GWAS で有意な関連が報告された *Cacnal1c* の変異マウスが挙げられる(95)。*Cacnal1c* のヘテロ欠損マウスは、不安様行動の増加や、うつ状態の評価尺度のひとつである強制水泳試験などではうつ様行動の低下なども見られている(96,97)。別の例として、同じく GWAS で、双極性障害と有意な関連が見られる *Ank3* の前脳特異的ノックアウトマウスでは、不安様行動の低下やうつ様行動の低下などが報告されている(98)。しかし、通常の行動テストバッテリーでは、長期的かつ自発的に躁およびうつ状態が切り替わるという、双極性障害の複雑かつ特徴的な症状を評価することは難しいという問題点がある。

そこで近年、輪回し行動解析を長期間行ったマウスの行動解析が報告された。輪回し行動解析は、マウスの自発的な行動量を長期間測定することができるため、双極性障害様行動を評価するのに、現状最も適した解析法であると考えられる。双極性障害の併発率が高い、稀な遺伝性疾患 CPEO の原因遺伝子のひとつである *Polg1* の変異体トランスジェ

ニックマウスについて、輪回し行動解析の結果が報告されている。この解析により、*Polg1* トランスジェニックマウスは、自発的に2週間ほど行動量が低下するうつ様エピソードを示すことが明らかになり、世界初の反復性うつ状態モデルマウスとして報告された(8)。

双極性障害併発率の高い遺伝性疾患の原因遺伝子の解析は、*POLG1* 以外でも報告されている。CPEO のその他の原因遺伝子である *Ant1* の脳特異的ヘテロマウスの行動解析が報告されている(99)。*Ant1* 変異マウスでは、輪回し行動解析の結果は報告されていないが、マウスの行動試験を集団環境下で半自動的に行うことのできるインテリケージ解析(100,101)の結果が報告されており、すぐに飲める水を選ぶか、待ってでもマウスの好むサッカリン水を飲むかを調べる Delay discounting test (遅延報酬割引課題)で、顕著な行動を見いだしている。

上記のインテリケージ解析は、マウスの行動解析を比較的簡便かつ複数群を同時に行うことが可能なため、3つのマウス系統の行動を網羅的に調べることができると考え、本研究で行うこととした。さらに、双極性障害様行動の評価に適していると考えられる輪回し行動解析も、作製したすべてのマウス系統で行い、双極性障害様行動の評価を行うこととした。なお、患者で同定されたデノボ変異はすべてヘテロ変異であったため、本章の解析はすべてヘテロ変異マウスを用いて行った。

A

	Mutation type	Amino-acid change	RVIS percentile	pLi
<i>MACF1</i>	Frameshift	p.V266fs	0.21	1.00
<i>UNC13B</i>	Splice site	—	0.59	0.00
<i>KMT2C</i>	Nonsense	p.K3601X	0.91	1.00
<i>EHD1</i>	Frameshift	p.V472X	4.39	0.89
<i>XPO4</i>	Nonsense	p.Y100X	12.97	1.00
<i>KLF4</i>	Frameshift	p.S327fs	24.19	0.98
<i>UVRAG</i>	Nonsense	p.W131X	28.16	0.86
<i>DDHD1</i>	Frameshift	p.L881X	48.78	0.97
<i>GSTM3</i>	Nonsense	p.R100X	78.28	0.00

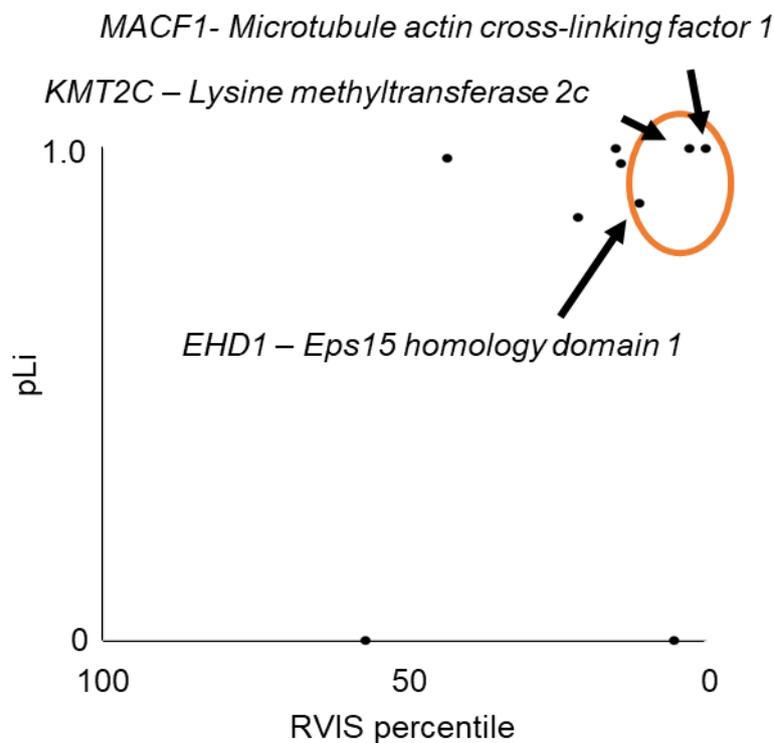
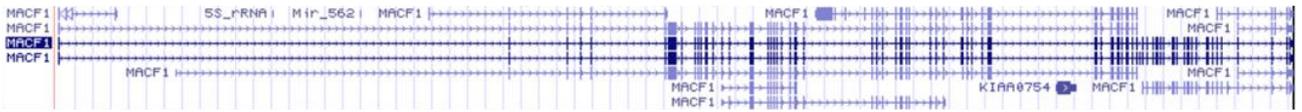
B

図 8 機能喪失型デノボ変異を有した遺伝子の RVIS と pLi

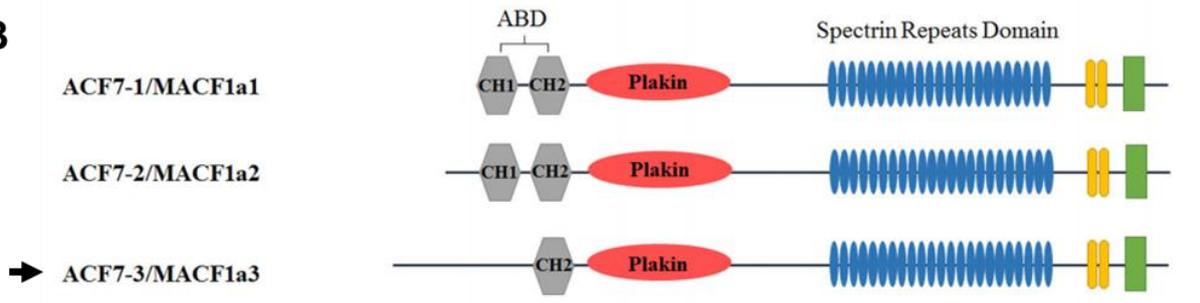
- A. 各遺伝子の変異の種類、RVIS、および pLi のまとめ。
- B. 各遺伝子の RVIS および pLi のプロット図。

A



▲
一塩基挿入変異

B



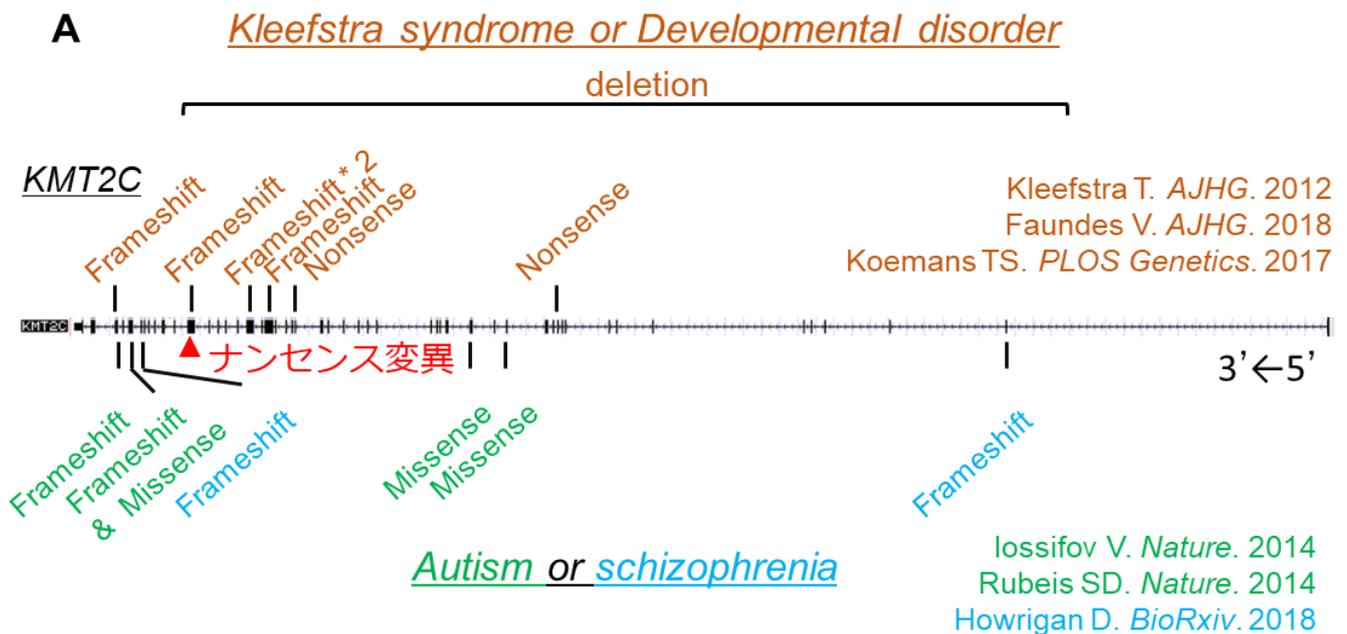
(Hu L. et al. BMB Reports. 2016 を一部改編)

C



図9 MACF1における双極性障害患者デノボ変異

- A. *MACF1* 変異の存在部位。一つのアイソフォームにのみ存在するエクソン上に存在している。患者では、矢頭で示したエクソン上に一塩基挿入変異が存在した。
- B. *MACF1A3* の模式図。
- C. タンパク質ドメインデータベース Pfam による、*MACF1A3* タンパク質のドメイン検索結果。矢印は変異部を示す。aa; amino acids, EF-hand_7; EF-hand domain pair, Spectrin_like; Spectrin like domain, Spectrin; Spectrin repeat, SH3_10; SH3 domain, GAS2; Growth-Arrest-Specific Protein 2 Domain, CH; Calponin homology (CH) domain.



B

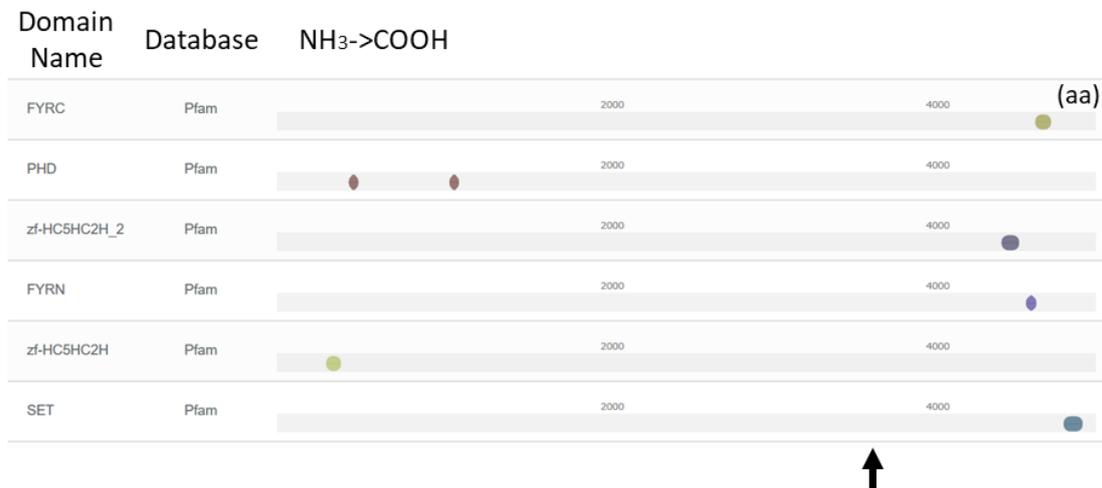


図 10 *KMT2C* における双極性障害患者デノボ変異

- A. *KMT2C* で見つかっているデノボ変異。矢頭が双極性障害患者で同定されたナンセンス変異の存在エクソン。
- B. タンパク質ドメインデータベース Pfam による、*KMT2C* タンパク質のドメイン検索結果。矢印は変異部を示す。aa; amino acids, FYRC; F/Y rich C-terminus, PHD; PHD-finger, zf-HC5HC2H_2; PHD-zinc-finger like domain 2, FYRN; F/Y-rich N-terminus, zf-HC5HC2H; PHD-like zinc-binding domain, SET; SET domain.

3.2 方法

3.2.1 pLi および RVIS の取得

pLi は、Exome Aggregation Consortium (ExAC) データベースより取得した。RVIS については、<http://genic-intolerance.org> より取得した。

3.2.2 Surveyor assay

1. sgRNA-pSpCas9-EGFP オールインワンベクターの作製

Ehd1 切断用の sgRNA-pSpCas9-EGFP オールインワンベクターは、既報のものを使用した。*Macf1* と *Kmt2c* に使用したベクターも、既報と同様の手法で作製した。下記に詳細を記載する。sgRNA の設計には、CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) を使用した。

表 1A に示したプライマーセットを使用し、以下の組成の反応液により、37°C、30 分で反応させ、95°C、5 分でオリゴヌクレオチドを完全に変性させたのち、-5°C/min で温度を下げ、sgRNA フラグメントの作製およびリン酸化を行った。

sgRNA top (100 μM)	1	
sgRNA bottom (100 μM)	1	
10× T4 ligase buffer (NEW ENGLAND BioLabs)	1	
T4 polymerase kinase (NEW ENGLAND BioLabs)	1	
滅菌水	6	
計	10	(μL)

上記オリゴ溶液を用いた以下の反応液により、pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)ベクター (48138, Addgene, Cambridge, Massachusetts, USA) の切断とライゲーションを行った。

pSpCas9-GFP (100 ng/μL)	1	
オリゴ溶液 (200 倍希釈)	2	
10× Fastdigest buffer (Thermo Fisher Scientific)	2	
DTT (10 mM)	1	
ATP (10 mM, NEW ENGLAND BioLabs.)	1	
Fastdigest BbsI (Thermo Fisher Scientific)	0.5	
T7 ligase (NEW ENGLAND BioLabs.)	0.5	
滅菌水	12	
計	20	(μL)

上記反応液 2 μ L を、25 μ L の Stable Competent E.coli cells (NEW ENGLAND BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) に添加し、形質転換を行い、30°C、24 時間培養を行った。コロニーから得られたプラスミドベクターは、PureLink™ HiPurePlasmid Filter Midiprep kit (Thermo Fisher Scientific) により増幅した。

2. Surveyor assay

マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を使用した。Neuro2a 細胞は、1.2.3 スプライシングアッセイに記載の、HEK293 細胞と同様の継代方法により維持した。ただし、細胞播種数は、全体の 10%とした。

トランスフェクションは、下記の通り行った。トランスフェクション前日に 10×10^5 の Neuro2A 細胞を、6-well プレートに播種した。24 時間後、3 μ g のオールインワンベクターを、12 μ L の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によりトランスフェクションをした。24 時間後に細胞を回収し、DNA 抽出を行った。

トランスフェクションした細胞を 500 μ L の 0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) により細胞を剥がし、4.5 mL の 1 \times PBS を添加して細胞回収した。3 分間、300 \times g で遠心し、細胞を回収したあと、ゲノム回収用の Lysis バッファー (0.01M Tris-HCl (pH 8.0)、0.1M NaCl、0.01M EDTA、0.1% SDS) に溶解し、細胞溶解液の全量から、フェノールクロロホルム処理によりゲノム抽出を行った。

Surveyor assay のための PCR 増幅は下記の通り行った。*Ehd1* については、5 ng のゲノム DNA をテンプレートとし、Ex Taq polymerase (Takara) により 50 μ L スケールで増幅した。プライマーセットは、表 1B のものを使用した。PCR 条件は、96°C、2 分 \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 63°C、30 秒 \rightarrow 72°C、30 秒) \times 30 \rightarrow 72°C、5 分とした。*Macf1* と *Kmt2c* は、同様の PCR 条件で行った。25 ng のゲノム DNA をテンプレートとし、LA Taq polymerase (Takara) により 50 μ L スケールで増幅した。プライマーセットは、表 1B のものを使用した。PCR 条件は、96°C、2 分 \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 68°C、1 分) \times 30 \rightarrow 72°C、5 分とした。

Ehd1 については、1 サンプルにつき 2 チューブ分、*Macf1* と *Kmt2c* については、1 サンプルにつき 1 チューブ分の PCR を行い、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、PCR 産物を精製した。精製した PCR 産物を 40 ng/ μ L に調製し、SURVEYOR® Mutation Detection Kit For Standard Gel Electrophoresis (Transgenomic, Omaha, Nebraska, USA) により Surveyor assay を行った。手順は説明書に従って行った。

3.3.3 遺伝子改変マウスの作製

決定した sgRNA 配列をもとに、作製した sgRNA-pSpCas9-EGFP オールインワンベク

ターを鋳型として、受精卵インジェクション用の sgRNA を MEGAshortscript kit により作製した。ssODN には、sgRNA 配列のアンチセンス配列を使用し、ノックイン変異を中心とし、両側 60 bp ずつを使用した。変異ノックイン用 ssODN(表 1C)(Merck Millipore)、sgRNA および Cas9-mRNA (Merck Millipore) を、C57BL/6N 由来受精卵細胞質に顕微鏡下でインジェクションし、偽妊娠させた ICR マウスの輸卵管に戻した。インジェクション作業から個体化までは、理化学研究所研究基盤開発部門に依頼した。なお、インジェクションした核酸溶液は、sgRNA: 50 ng/μL, Cas9-mRNA: 100 ng/μL, ssODN: 200 ng/μL とした。*Ehd1* 変異ノックインマウスについては、初回インジェクションではノックインマウスを得られなかったため、計 2 回行った。

得られた産仔の尾を使用しジェノタイピングを行った。切断した尾を、100 μL の Lysis バッファー (25mM NaOH, 0.2mM EDTA) に入れ、95°C、30 分で溶解した。その後、同量の 40mM Tris-HCl 溶液を添加したのち、MilliQ 水により 2 倍希釈し、DNA 溶液を調製した。得られた DNA 溶液を 1 μL 使用し、遺伝子ごとに下記条件により切断部位近傍を増幅し、サンガー法によりジェノタイプを決定した。各プライマーセットは、表 1D のものを使用した。

Ehd1: Tks Gflex Polymerase (Takara)

94°C、1 分 → (98°C、10 秒→68°C、1 分) × 30

Macf1: Tks Gflex Polymerase (Takara)

94°C、1 分 → (98°C、10 秒→68°C、1 分) × 30

Kmt2c: Ex Taq polymerase (Takara)

96°C、2 分 → (94°C、30 秒→68°C、1 分) × 30 → 72°C、5 分

各マウスの系統維持用のジェノタイピングについては、*Ehd1* と *Macf1* については、上記と同様の方法で行った。*Kmt2c* 変異マウスについては、表 1E のプライマーセットを用いて、Tks Gflex polymerase (Takara) により PCR を行った。PCR 条件は、94°C、1 分 → (98°C、10 秒→68°C、30 秒) × 30 とした。

3.2.4 エクソーム解析

エクソーム解析に用いたマウスの DNA は、tail サンプルより、GenElute Mammalian Miniprep kit (Merck Millipore) を用いて抽出した。エクソーム解析および変異候補の検出は、(株) 理研ジェネシスに依頼した。機能喪失型かつ系統内で新奇の変異は、先行研究を参考に、下記条件を満たすものとして抽出した。

(1) "known"の変異を除去 (2) "missense"の変異を除去 (3) 10 reads 未満の変異を

除去 (4) 野生型で見られた変異を除去 (5) ホモ変異を除去 (6) Reference sequence reads/alternative sequence reads が 0.5 未満の変異を除去 (7) 3 変異以上を有していた遺伝子を除去。

3.2.5 *Ehd1* 改変 PC12 細胞の作製

1. トランスフェクションおよびシングルセルソーティング

既報の通り *Ehd1* 遺伝子改変 PC12 細胞を樹立した(56)。トランスフェクション 48 時間前に 12×10^5 の PC12 細胞を 6 well プレートに播種した。プラスミドトランスフェクションは、2 回に分けて行い、sgRNA-Cas9-EGFP オールインワンベクターを $4.0 \mu\text{g}$ と、変異ノックインのために表 1F の ssODN (1 回目; 10ng , 2 回目; 100ng) を、 $6.0 \mu\text{L}$ の Lipofectamine2000 によりトランスフェクションした。24 時間後に培地交換を行い、48 時間後に細胞を回収し、FACS によるシングルセルクローニングを行った。なお、sgRNA は、*Ehd1* 変異マウス作製時と同様のものを使用した。

トランスフェクションした PC12 細胞を、 $500 \mu\text{L}$ の 0.025% Trypsin-EDTA (Gibco) に 1.5 分曝露し剥がした。トリプシン処理後の PC12 細胞は、 4.5 mL の $1 \times \text{PBS}$ により希釈し、 1.5 mL チューブに回収した。回収した細胞懸濁液を $200 \times \text{g}$ で 3 分間遠心し、細胞ペレットを回収後、FACS suspension バッファー (2% FBS, 20 mM glucose, $1 \times \text{penicillin-streptomycin}$ in $1 \times \text{PBS}$) により再懸濁し、FACS (BD Bioscience) により、96 well プレートにシングルセルソートを行った。シングルセルソートの際には、 $5 \mu\text{L}/1.0 \times 10^6$ 細胞の 7-AAD を添加し、生細胞 (7-AAD (-)) と死細胞 (7-AAD(+)) の区別を行った。

2. 馴化培養液 (conditioned medium) の調製

PC12 細胞を通常培養時に得られた培地を継代時に回収し、 $500 \times \text{g}$ で 5 分間遠心し、夾雑物を除去した。得られた上清を $0.22\text{-}\mu\text{m}$ filter (Merck Millipore) によりろ過滅菌した。この培地を、通常培養用培地で 10 倍希釈し、馴化用培地として使用した。

3. シングル PC12 細胞のスケールアップ

シングルセルソートを行った日を day 0 とする。Day 7 まで、 37°C 、5% CO_2 環境下で静置した。Day 7 で一度細胞を確認し、細胞が増殖していることを確認し、 $100 \mu\text{L}$ の馴化用培地を添加した。その後、4-5 日ごとに $150 \mu\text{L}$ の馴化用培地を置換し、細胞を増殖させた。その後、96-、24-、6-well プレートに順次スケールアップし、Cell Banker 1 plus (日本全薬工業) による細胞凍結およびジェノタイピングを行った。

4. *Ehd1* 改変 PC12 細胞のジェノタイピング

96-well プレートで培養した PC12 細胞に、Lysis バッファー (10mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% Triton-X, 10mM EDTA, 1/100 Protein K) を 50 μ L 直接添加し、37°C 環境に一晩静置し、細胞を溶解した。この細胞懸濁液を 10 倍希釈したものの 1 μ L をテンプレートとして使用し、Ex Taq ポリメラーゼ (Takara) により切断部位近傍を増幅した。プライマーセットは、Fw; 5'-CAACGATATAGCTCGGCTGATGGTG-3'、Rv; 5'-GTGTGGGGTATCTCAGGCACAGAAG-3'とした。PCR 条件は、96°C、2 分 \rightarrow (94°C、30 秒 \rightarrow 63°C、30 秒 \rightarrow 72°C、30 秒) \times 30 \rightarrow 72°C、5 分とした。シーケンス解析は、ジェノタイピング用 Rv プライマーを使用し、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) により行った。

3.2.6 ウェスタンブロット

1. EHD1 について

Ehd1 変異マウスサンプルにおける EHD1 ウェスタンブロットについては、50 週齢のマウスより海馬を抽出後、10 mL 当たり 1 錠の cOmplete Mini, EDTA-free protease inhibitors (Roche) を含む膜溶解バッファー (50mM Tris-HCl (pH8.0)、150mM NaCl、1mM DTT、0.5mM EDTA、1% NP-40、10% Glycerol) を、300 μ L 添加し、dounce homogenizer を 10 往復した。その後、組織溶液を 15,000rpm、4°C、15 分遠心し、上清を回収後、Micro BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質定量を行った。以降は、調製したタンパク質サンプル 20 μ g を用いて、「2.2.3. ウェスタンブロット」と同様の手順で検出した。

2. KMT2C について

Kmt2c のヘテロ変異マウスを掛け合わせて得られた、*Kmt2c*+/+、+/-、-/- の E.16.5 のマウス胎児サンプルから全脳を取り出し使用した。マウス胎児脳サンプルを用いて、NEPER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) を使用し、核および細胞質分画を行った。得られたタンパク質溶について、Micro BCA™ Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) によりタンパク質定量を行った。13 μ g のタンパク質を、3-8% NuPAGE Tris-Acetate Gels および NuPAGE Tris-Acetate SDS running buffer (Thermo Fisher Scientific) により分離した。分離したタンパク質は、NuPAGE Transfer buffer (Thermo Fisher Scientific) を用いてウェット式により、30V、4°C、18 時間の条件で PVDF 膜に転写した。その後、TBST を溶媒とした 5% Skim milk 溶液により室温で 30 分間ブロッキングを行い、一次抗体として抗 KMT2C ウサギポリクローナル抗体 (1:5000, ABE 1851, Merck Millipore)、抗 Lamin A マウスモノクローナル抗体 (1:1000, 4E7A6; Santa Cruz biotechnology) および抗 β アクチンマウスモノクローナル抗体 (1:20000, sc-2030; Santa

Cruz biotechnology) を、4°C で一晩反応させた。翌日、TBST による 5 分洗浄を 5 回行った後、抗 KMT2C 抗体については、抗ウサギ IgG 抗体 (1:10000, Santa Cruz biotechnology)、抗 Lamin A 抗体と抗 β アクチン抗体については抗マウス IgG 抗体 (1:10000, Santa Cruz biotechnology) を 1 時間室温反応させ、再び TBST による 5 分洗浄を 5 回行い、Amersham ECL Prime (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) による検出を行った。

3.2.7 輪回し行動解析

既報の通り行った。各マウスは輪回し解析用ケージ (24cm, 横 ×11 cm, 縦×14 cm, 高さ; O'Hara&Co., Tokyo, Japan) にて、一匹ごとに飼育した。明暗条件は 12 時間周期で維持し、午前 8 時から午後 8 時までを明期、午後 8 時から午前 8 時を暗期とした。餌および水は常に取得可能とした。2 週間ごとにケージおよび餌の交換を行い、1 週間ごとに飲水の交換を行った。マウスは、15 週齢からのものを用いた。

3.2.8 インテリケージ

インテリケージ (株式会社ニューロサイエンス) のゲートにはセンサーが設置されており、nosepoke により開く。基本的に各マウスは、飲水を目的として下記の試験を行う。1 ケージ内に、同系統かつ同性のマウスを集団飼育した。遺伝子型は、野生型および変異型のものを同ケージにて飼育した。各試験の詳細は、下記に示す。データの解析は、IntelliCage Analyzer により行った。各マウスは、頸部に打ち込んだトランスポンダー (DATAMARS, Lamone, Switzerland) によって区別し、16 週齢のマウスを使用した。

1. Free adaptation

マウスをインテリケージに慣れさせる。飲水ボトルには常時開いており、いつでも飲水が可能である。

2. Nosepoke adaptation

マウスに、nosepoke をすれば飲水が可能であることを覚えさせる、馴化ステップである。nosepoke 後、5 秒間ゲートが開く。なお、常時飲水が可能である。

3. Drinking session adaptation

21-24 時の間のみ、nosepoke 後 5 秒間ゲートが開く。

4. Place learning test

1 個体に 1 コーナーを割り当てて、そのコーナーでのみ飲水が可能である。それ以外

のコーナーではゲートは開かない。その他の条件は、Drinking session adaptation と同様とした。各群間で、飲水の成功率を比較した。計 7 日間行った。

5. Place learning reversal test

Place learning test で飲水可能だったコーナーと逆のコーナーで飲水が可能となる。その他条件はすべて Place learning test と同じである。逆転学習の成績を評価する。計 5 日間行った。

6. Impulsivity test

マウスの衝動性を調べる試験である。訓練期間では、コーナーのステージに侵入後、1、2、4 秒後以降に nosepoke すると、ゲート上部の LED ライトが点灯し、5 秒間ゲートが開く。本試験では、コーナーに侵入後 2 秒以内に nosepoke をしてしまうと、premature nosepoke としてゲートが開かなくなる。2 秒経ってから nosepoke を行くと、LED ライトが点灯し、飲水が可能となる。21 時から翌朝 4 時まで飲水が可能であり、それ以外の時間ではゲートは開かない。計 4 日間行った。

7. Attention test

マウスの注意力を評価する試験である。訓練時には、コーナーのステージに侵入してから 4 秒後に、両ゲート上部の LED が 0.5、1、2 秒間光り、その後 nosepoke をするとゲートが開く。試験時には、ステージに侵入してから 4 秒後に、いずれかのゲートの LED が、0.3、0.5、1、2 秒間点灯する。点灯した側のゲートに nosepoke することで、飲水が可能となる。なお、点灯の持続時間はランダムに変わる。計 5 日間行った。

8. Place avoidance test

忌避学習を評価する試験である。1 個体に 1 コーナーを割り当て、割り当てたコーナーにマウスが侵入すると、air puff が出る。この条件で 24 時間飼育したのち、ホームケージに戻し、24 時間飼育する。その後再度インテリケージ内にマウスを戻し、air puff コーナーへの侵入率から、記憶学習とその消去を評価する。計 10 日間行った。

9. Delay discounting test

2 つのボトルのうち、右側のボトルの水を、マウスが好む 0.5% サッカリン水に変更する。この変更は、すべてのコーナーで行った。訓練時は、両ゲートが同時に開くため、サッカリン水に嗜好性が生じる。試験時には、各コーナーのステージに侵入後、まず水のゲートが開き、数秒の遅延ののちサッカリン水のゲートが開く。この遅延時間を一日

ごとに長くして、サッカリン水の嗜好性の変化を評価した。

10. Social dominance test

Drinking session adaptation と同様に、21-24 時で、nosepoke により飲水可能とする。飲水可能な時間には、インテリケージ外部に設置した青色 LED ライトを点灯し、飲水可能状態の cue とした。コーナーへの侵入数を、最初の 5 分間計測し、それを指標に各マウスの社会的優位性を評価した。計 8 日間行った。

11. Serial reversal test

Place learning test と Place learning reversal test を 5 日間と 7 日間行い、1 コーナーのみ飲水可能であることを再記憶させた。そのあと、飲水可能コーナーを 1 つ右のコーナーに移動させ、飲水可能コーナーを 1 日おきに対角線上に交互に移動させた。4 日間を 1 セットとし、1 セット終了後に別の対角線に飲水可能コーナーを移動する。これを計 3 セット行った。最初の 15 分間の成功率と、前日の飲水可能コーナーへの侵入率を調べた。

3.2.9 超音波発声測定

馴化のため、測定の一時間前に測定室にホームケージを移動させた。超音波発声は、各仔を、脱脂綿を敷き詰めたプラスチックビーカー内に隔離しすぐに、プリアンプ (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) を接続した測定用マイク (UC-29, RION Co., LTD, Tokyo, Japan) により、300 kHz sampling rate で 5 分間測定した。得られた音声データの call 数および発生パターンは、既報の R スクリプトを使用した(102)。

3.2.10 マイクロアレイ解析

16 週齢のマウスより採取した海馬サンプルより、TRIzol RNA Isolation Reagent (Thermo Fisher Scientific) により回収した total RNA を使用して解析を行った。なお、海馬回収時に、嗅球を除いた全脳の重さを計測した。マイクロアレイ解析には、Clariom™ D Array, mouse (Thermo Fisher Scientific) を使用し、生データ取得は理化学研究所脳神経科学研究センター研究基盤開発センターに依頼した。得られたデータをもとに、GeneSpring (トミーデジタルバイオロジー株式会社, Tokyo, Japan) により Differentially expressed genes (DEG) を検出した。DEG の定義は、fold change (FC) >1.1 かつ $p < 0.05$ (Mann-Whitney の検定) を満たすものとした。得られた DEG データセットについて、Gene ontology (GO) 解析を行った。 p 値は多重比較補正を行ったものを使用した。

3.2.11 モザイク変異解析

患者変異と、その近傍の SNP を増幅するための PCR は、変異保有患者の唾液、頭髪および爪サンプルより抽出したゲノム DNA サンプル 25 ng をテンプレートとして、Fw プライマー：5'- CAGGGGTTTCCATGGAGAGCTTGTC-3'、Rv プライマー：5'- GCTTTACCAGCAGCACCTCCAGTAG-3'を用いて、PrimeSTAR GXL Polymerase (Takara) により、50 μ L スケールで行った。PCR 条件は、(98°C、10 秒 \rightarrow 68°C、30 秒) \times 30 \rightarrow 68°C、5 分とした。PCR 産物の一部を ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) により処理し、上記 Fw プライマーを用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) により PCR 産物の配列解析を行った。また、PCR 産物を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) により精製し、Zero Blunt® TOPO® PCR cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) によりクローニングした。各クローンを LB 培地により 8~16 時間培養し、GENE PREP STAR PI-480 (KURABO, Osaka, Japan) によりプラスミドを精製した。各プラスミドは、PCR に使用した Fw プライマーを使用し BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Thermo Fisher Scientific) により配列解析した。クローニングから配列解析を 1 試行とし、計 3 試行を行った。

表1

A. sgRNA作製用のプライマーセット (5'→3')

	top	bottom
<i>Macf1</i>	caccgGCAGGACACGAGACCTACAT	aaacATGTAGGTCTCGTGTCTGCCTGCc
	caccgGTAGGTCTCGTGTCTGCCTGCAA	aaacTTGCAGGACACGAGACCTACc
	caccgTGTAGGTCTCGTGTCTGCCTGCA	aaacTGCAGGACACGAGACCTACAc
<i>Kmt2c</i>	caccgGAATGGACCACCACCTCGAG	aaacCTCGAGGTGGTGGTCCATTCCc
	caccgGGTAAACTGGGCATTCTCGC	aaacGCGAGAATGCCAGTTTACCc
	caccgGCGAGAATGCCAGTTTACC	aaacGGTAAACTGGGCATTCTCGCc
<i>Ehd1</i>	caccgGGACTTCACCATCTCCTTCT	aaacAGAAGGAGATGGTGAAGTCC

B. Surveyor assay用のプライマーセット (5'→3')

	Fw	Rv
<i>Macf1</i>	CAGGTAAAGGAGAGCTTCCAAGCAG	CACACTCCACTTCGATATGCCTGAG
<i>Kmt2c</i>	GGAAACAACAGAAAGAGCATGCTGAGC	CCTACCTGCCTTTGCTCATTGGTTTTGC
<i>Ehd1</i>	CAGACCCAGGACTTCAGCAAGTCC	GGATGAGTGTGGGGCTGTCAGACAG

C. 変異ノックインマウス作製のssODN (5'→3')

<i>Macf1</i>	TGATGCCACTGACAGATAAATCACTCTGAGAAGCAGGCATTATGGGA _g CCTTGCAGGAC _g ACGAGACCTACATGGGTAGGCTCTGTGTGAATAGGGTCTCCTGACTGTTTTGGTATTGAT
<i>Ehd1-A</i>	TTCTACACACTGTCTCCTGTCAACGGCAAGATCACAGGTGCTAATGCCAAGAAGGAGATGTGAA GTCCAAGCTGCCCAACACAGTGCTGGGGAAGATCTGGAAGTTGGCAGATGTGGACA
<i>Ehd1-B</i>	TTCTACACACTGTCTCCTGTCAACGGCAAGATCACAGGTGCTAATGC _t AAGAAGGAGATGTGAA GTCCAAGCTGCCCAACACAGTGCTGGGGAAGATCTGGAAGTTGGCAGATGTGGACA

D. 変異ノックインマウスのジェノタイピングシーケンス解析用プライマー

	5'→3'
<i>Macf1</i>	CCTCTGAAACAGTAGATCAAGACCAACC
<i>Kmt2c</i>	GCAGCACACAGCAGTCATCTCAGG
<i>Ehd1</i>	CCTCCGTTTGGAGGGTGAATGAG

E. *Kmt2c*変異マウスのジェノタイピング用プライマー (5'→3')

Fw	CCTCCTAGAATTCAGCCCCCAATTGC
Rv	CTGCTGTTCTCGTAAGCGTTCCTCC

F. 変異ノックインPC12細胞作製のssODN (5'→3')

<i>Ehd1-C</i>	CTTCTACACACTGTCTCCTGTCAATGGCAAGATCACGGGCGCTAATGCCAAGAAGGAGATGTG AAGTCCAAGCT _t CCTAACACAGTGCTGGGGAAGATCTGGAAGCTGGCTGATGTGGAC
<i>Ehd1-D</i>	ATCTTCTACACACTGTCTCCTGTCAATGGCAAGATCACGGGCGCTAATGCCAAGAAGGAGATG _g TGAA _a TCCAAGCTGCCTAACACAGTGCTGGGGAAGATCTGGAAGCTGGCTGATGTG

3.3 結果

3.3.1 各遺伝子改変マウスの作製

各遺伝子改変マウスは、CRISPR/Cas9 システムにより作製した。本研究では、患者変異を再現したノックインマウスを作製することとした。

まず、遺伝子切断を行うための single guide RNA (sgRNA) を設計した。ノックインを成功させるためには、ノックインを行いたい部位の近傍を切断する必要がある。*Macf1* と *Ehd1* については、患者変異部近傍の特異性が高かったため、変異部位に最も近い 3 種の sgRNA を設計した。*Kmt2c* については、変異近傍部の配列特異性が低く、適切な sgRNA の設計が困難であったため、変異ノックインではなく、患者変異が存在していたエクソンと同じエクソンを切断したノックアウトマウスを作製することとし、そのような sgRNA を 3 種設計した。

培養細胞株を用いて、設計した sgRNA がゲノム切断能を有しているのかを検討した。sgRNA、Cas9 および EGFP を発現するオールインワンプラスミドベクターを作製し、マウス神経芽細胞由来 Neuro2A 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞から DNA を回収し、Surveyor assay を行った。Surveyor assay は、ゲノム切断により生じたミスマッチ部を認識することのできる解析手法である。これにより、各 sgRNA によるゲノム切断を評価した (図 11)。複数の sgRNA で切断を確認できたので、*Macf1* では、切断部位が患者変異と最も近かった sgRNA-2 により、遺伝子改変マウスを作製した。一方 *Kmt2c* については、オフターゲット変異を予測できる CRISPRdirect により、最もオフターゲット変異が小さいと予測された sgRNA により遺伝子改変マウスを作製することとした。*Ehd1* については、既報で用いたものを使用した。

3.3.2 遺伝子改変マウスの作製とオフターゲット変異解析

決定した sgRNA 配列をもとに、sgRNA および Cas9-mRNA を作製し、マウスの受精卵にインジェクションした。*Macf1* および *Ehd1* については、変異ノックインのための single strand oligo DNA (ssODN) も合わせて導入し、各遺伝子変異マウスを作製した (図 12)。

得られた F₀ マウスについて、genotyping を行い、変異ノックインまたはフレームシフトの遺伝子切断が起こっていたマウスを選別した。なお、*Ehd1* 変異マウスについては、ヘテロまたはホモ変異ノックインが起きた F₀ マウスを得ることが出来なかったが、シーケンスシグナルが 3 本以上あるモザイク切断が起きていたマウスにおいて、変異アリルを有するマウスを取得し、交配を行った。その後野生型マウスと交配を行い取得した F₁ マウスのゲノム DNA を用いて、機能喪失型のオフターゲット変異の有無を確認す

ることを目的とした、全エクソーム解析を行った（図 13）。各マウスラインに特異的な機能喪失型変異は見られなかったため、このマウスを第一世代とし交配を行い、各遺伝子改変マウスラインを確立した。今後は、これらマウスを用いて解析を行った。

さらに、患者変異により生じた truncated EHD1 が、実際に生体内で発現しているのかを確認するために、*Ehd1* ヘテロ変異マウスの海馬サンプルを用いて、EHD1 の N 末端領域を認識する抗 EHD1 抗体により、ウエスタンブロットを行った。これにより、野生型 EHD1 由来のバンドの下に、患者型の短い EHD1 由来バンドを見だし、その発現を確認した（図 14A）。

Kmt2c 変異がハプロ不全を引き起こすのか、truncated protein が生じるのかを調べるために、抗 KMT2C 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。ハプロ不全かを明らかにするためには、*Kmt2c* ホモ変異マウスサンプルを使用するのが適しているが、*Kmt2c* ホモ変異マウスは胎生致死であることが知られていたため、E16.5 のマウス胎児サンプルから全脳を取り出し、ウエスタンブロットを行った。その結果、*Kmt2c* ホモ変異マウスにおいて、完全に喪失するバンドを確認し、*Kmt2c* 変異アリルからは KMT2C が発現しないことを見いだした（図 14B）。

3.3.3 *Ehd1* 切断マウスのジェノタイプ分布について

Ehd1 変異マウス作製時に、変異ノックインマウス以外の、*Ehd1* 切断マウスが複数取得できた。その中には、フレームシフトが起きる切断が起きているアリルをふたつ有している、ホモフレームシフトマウスも複数取得できた。International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) によると、*Ehd1* ホモノックアウトマウスは、離乳前不完全致死性を示し、ホモマウスの一部が離乳の前に死亡してしまう。同様の結果を CRISPR/Cas9 による遺伝子改変マウスで得られた場合、変異近傍部以降を欠損したマウスの変異 EHD1 は、少なくとも機能喪失を示すことは明らかである。そこで、ホモフレームシフトマウスの生存率を評価することとした。

CRISPR/Cas9 による切断パターンに偏りが無い場合、遺伝子切断が起きた *Ehd1* アリルのうち、3分の2がフレームシフト切断になるはずである。しかしながら、CRISPR/Cas9 による遺伝子切断パターンには通常偏りがあるため、切断パターンを考慮してジェノタイプ分布を評価する必要がある。そこで、*EHD1* 欠損はヒト細胞株では致死を示さないことが知られていたため(103)、培養細胞株 PC12 細胞でも同様の sgRNA を用いて *Ehd1* 変異 PC12 細胞を樹立し、致死を考慮しない CRISPR/Cas9 によるホモ切断の割合を評価し、マウスと細胞株間のジェノタイプを比較することにより、ホモフレームシフトマウスの分布が遺伝子改変 PC12 細胞と異なるのかを評価することとした（図 15）。その結果、*Ehd1* 遺伝子改変マウスと PC12 細胞では、ジェノタイプの分布が有意に異なること

を明らかにした (2×6 フィッシャーの正確確率検定、 $p < 5 \times 10^{-8}$)。

3.3.4 インテリケージ解析と輪回し行動解析

作製したマウスにおいて、どのような行動異常が見られるのかをスクリーニングするために、輪回し行動解析とインテリケージ解析を行った。インテリケージは、集団飼育下において、様々な行動試験を半自動的に行うことが出来る装置であり、マウスの異常行動を簡便にスクリーニングすることに適している。一方、輪回し行動解析は、マウスの行動量を経時的かつ長期的に計測できる行動試験であり、双極性障害の特徴である躁およびうつという相反するエピソードを調べるのに適している。実際これまで、この手法により、自発的かつ周期的に行動量が低下する、反復性うつモデルマウスが報告されている。上記2つの行動試験を行い、作製した各遺伝子改変マウスが双極性障害様行動を示すのかを検討した。

下記より、遺伝子改変マウスごとに解析結果を記述することとする。

3.3.4.1 *Ehd1* 変異マウスについて

Ehd1 変異マウスでは、輪回し行動解析で顕著な行動を見いだした。各遺伝子改変マウスについて、暗記の行動量に対する明期の行動量を比較したところ、*Ehd1* 変異マウスで有意に明期の活動量が増加していることを見いだした (図 16)。このような明期の行動量増加は、糖尿病モデルマウスである *db/db* マウスでも見られたため(104)、*Ehd1* 変異マウスが糖尿病様行動を示しているのかを確認するため、グルコース負荷試験を行ったが (図 17A)、野生型と変異型で、顕著な違いは見られなかった (図 17B)。また、*Ehd1* 変異マウスは、インテリケージ解析について顕著な行動は示さなかった (図 18、19)。

3.3.4.2 *Macf1* 変異マウスについて

Macf1 変異マウスについては、インテリケージの2つの行動試験、Attention test と Delay discounting test で顕著な行動を見いだした。

Attention test では、各コーナーに設置されている2つの飲水ボトルのゲート上に設置されているLEDライトが短時間点灯し、点灯した側のゲートに nosepoke することで飲水が可能となる。この試験では、短時間点灯を見逃さないために、注意深くLEDライトを見ている必要があり、マウスの注意力の指標になると考えられる。*Macf1* 変異マウスでは、attention test の成功率が有意に低下していた (図 20A、B)。

次に、Delay discounting test では、2つのボトルのうち片方を、マウスが好むサッカリン水に変え、水のゲートが開いたしばらく後にサッカリン水のゲートが開く。この遅延時間を操作し、どの程度待つまで報酬を欲しがるのかを調べることが可能である。こ

の試験において、*Macfl* 変異マウスは、サッカリン水のゲートが開くまでの遅延時間が長くなっても、サッカリン水を飲み続けるということを見いだした (図 20C、D)。なお、その他のインテリケージの試験では、顕著な違いは見られなかった (図 21、22)。

3.3.4.3 *Kmt2c* 変異マウスについて

Kmt2c 変異マウスでは、serial reversal test で異常行動を見いだした。この試験では、4 コーナーのうち、1 コーナーでのみ飲水が可能にする。飲水可能コーナーを、一日ごとに対角線上に移動させ、その成功率を測定する。この移動が2 往復すると、別の対角線に飲水可能コーナーが移動し、1 日ごとに再度対角線上に移動する。2 往復を1 セットとし、3 セットこの解析を行ったところ、*Kmt2c* 変異マウスでその成功率が有意に低下していた (図 23A、B)。特に、対角線が変更される日において、前日に飲水できたコーナーに有意に多く訪れることを見いだした (図 23C)。それ以外のインテリケージ解析の試験では、顕著な行動は見られなかった (図 24、25)。

Kmt2c 変異マウスについては、身体の発達形成にも異常を見いだした。*Kmt2c* 変異マウスでは、野生型に比べ、体重が有意に低下していることを見いだした (図 26A)。一方、変異マウスにおいて、脳の重さが有意に増加していることも見いだした (図 26B)。

上記のような、ルール変更への柔軟性の低下や脳重の増加などは、いずれも自閉症患者でたびたび見られる特徴である。実際に、自閉症患者でも *KMT2C* 変異は複数報告されている。そこで、自閉症の特徴のひとつである発語能力の低下を調べるために、*Kmt2c* 変異マウスにおいて超音波発生 (ultrasonic vocalization, USV) を測定した。しかしながら、*Kmt2c* 変異マウスにおいて、USV call 数や USV パターンに顕著な異常は見られなかった (図 27)。

3.3.5 *KMT2C* マウスのマイクロアレイ解析

KMT2C は、ヒストン 3 の 4 番目のリジン (H3K4) のメチル化を制御していることが知られている、エピジェネティック因子である。そのため、*Kmt2c* 変異マウスにおいて、遺伝子の発現が広範に変化すると予測されたので、変異マウスの海馬サンプル由来 total mRNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。FC > 1.1 かつ $p < 0.05$ を満たす DEG を抽出し、GO 解析を行ったところ、有意に増加または減少している遺伝子群を複数見いだした (図 28、29)。*Kmt2c* 変異マウスで有意に増加していた遺伝子群の中には、造血系に関わる遺伝子群が複数存在しており、白血病に関わる *KMT2C* の異常を反映した結果を示した一方、有意に減少した遺伝子群の中には、ミエリン化に関する遺伝子群を見いだした。

3.3.6 双極性障害患者デノボ変異の再解析

最後に、*KMT2C* において、発達障害患者で多くの機能喪失型変異が見つかった一方、なぜ気分障害である双極性障害においても機能喪失型変異が同定されているのかを明らかにするために、双極性障害患者の *KMT2C* 変異の再解析を行った。*KMT2C* 変異部の配列をサンガー法により再確認したところ、変異のシグナルが野生型シグナルに比べて小さかった (図 30B)。そこで、双極性障害患者で見られた *KMT2C* デノボ変異が、全身性のヘテロ変異ではなく、体の一部でのみ変異細胞が存在する体細胞モザイク変異である可能性を検討した。患者変異近傍に存在していたヘテロ SNP に着目し、患者変異部およびヘテロ SNP 部をまとめて増幅する PCR を行い (図 30C)、PCR 産物をサブクローニングしたところ、“G” SNP が存在しているアリル上で、野生型塩基および変異塩基の両方が存在していることを明らかにした (図 30D)。この結果は、“G” SNP 上で 2 細胞期以降に変異が生じたことを示唆しており、双極性障害患者で同定された *KMT2C* 変異は体細胞モザイク変異であったことを見いだした。

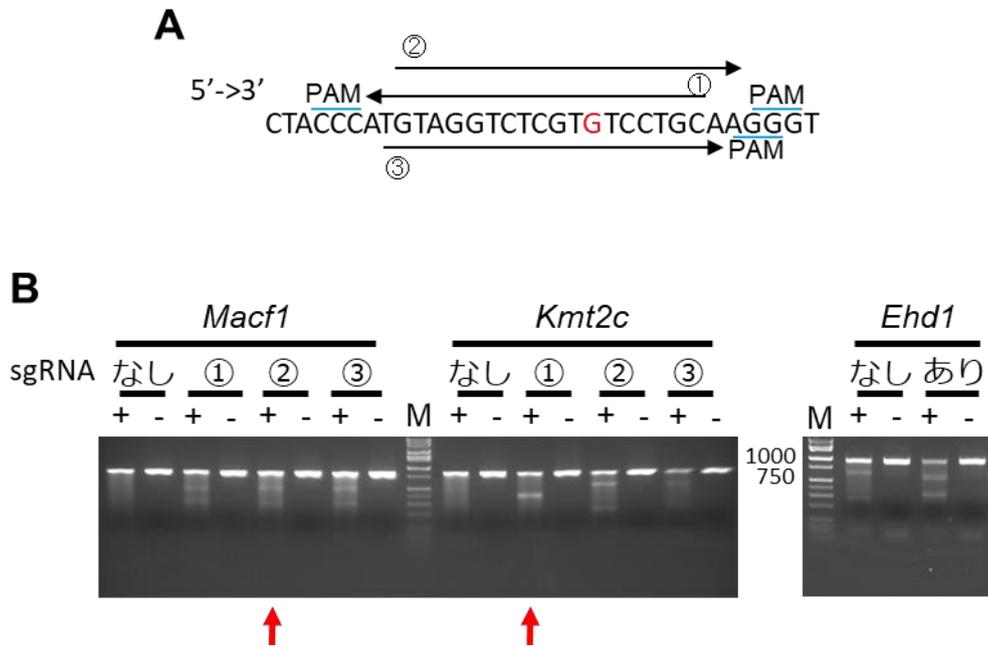
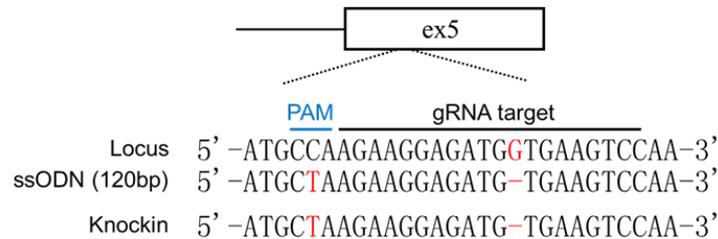


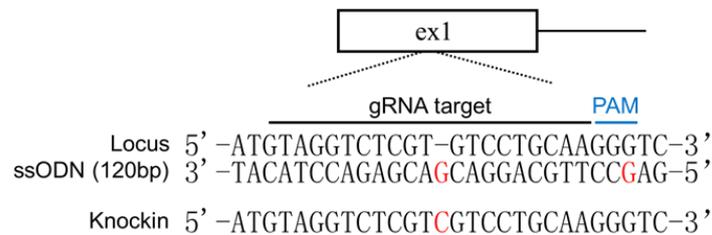
図 11 Surveyor assay

- A. *Macf1* の sgRNA 配列。患者では赤字の直前にシトシンが挿入される。
- B. 各 sgRNA についての Surveyor assay の結果。sgRNA があるレーンではミスマッチによる切断産物が見られた。赤矢印の sgRNA を、マウス受精卵への注入に使用した。

A *Ehd1* → 1塩基欠失患者変異導入



B *Macf1* → 1塩基挿入患者変異導入



C *Kmt2c* → 19塩基欠失変異導入

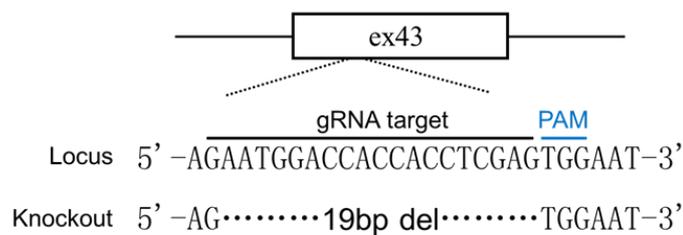


図 12 各遺伝子改変マウスの遺伝子型

Locus はマウスの野生型配列。ssODN は、変異ノックインのために導入した ssODN 配列の一部。最下段の配列が、遺伝子改変マウスの実際の遺伝子型。

- A. *Ehd1* 変異マウスの遺伝子型
- B. *Macf1* 変異マウスの遺伝子型
- C. *Kmt2c* 変異マウスの遺伝子型

A

Gene	Reference	Alternatives	Allele frequency			
			Wild type	<i>Macf1</i> knockin	<i>Kmt2c</i> knockout	<i>Ehd1</i> knockin
<i>Macf1</i>	-	G	0	0.4875	0	0
<i>Kmt2c</i>	CTCGAGGTGGTGGTCCATT	-	0	0	0.3636	0
<i>Ehd1</i>	G	-	0	0	0	0.3571

図 13 各遺伝子改変マウスのエクソーム解析結果

フィルタリング後の機能喪失型変異のリスト。CRISPR/Cas9により導入したもの以外の機能喪失型変異は見られなかった。

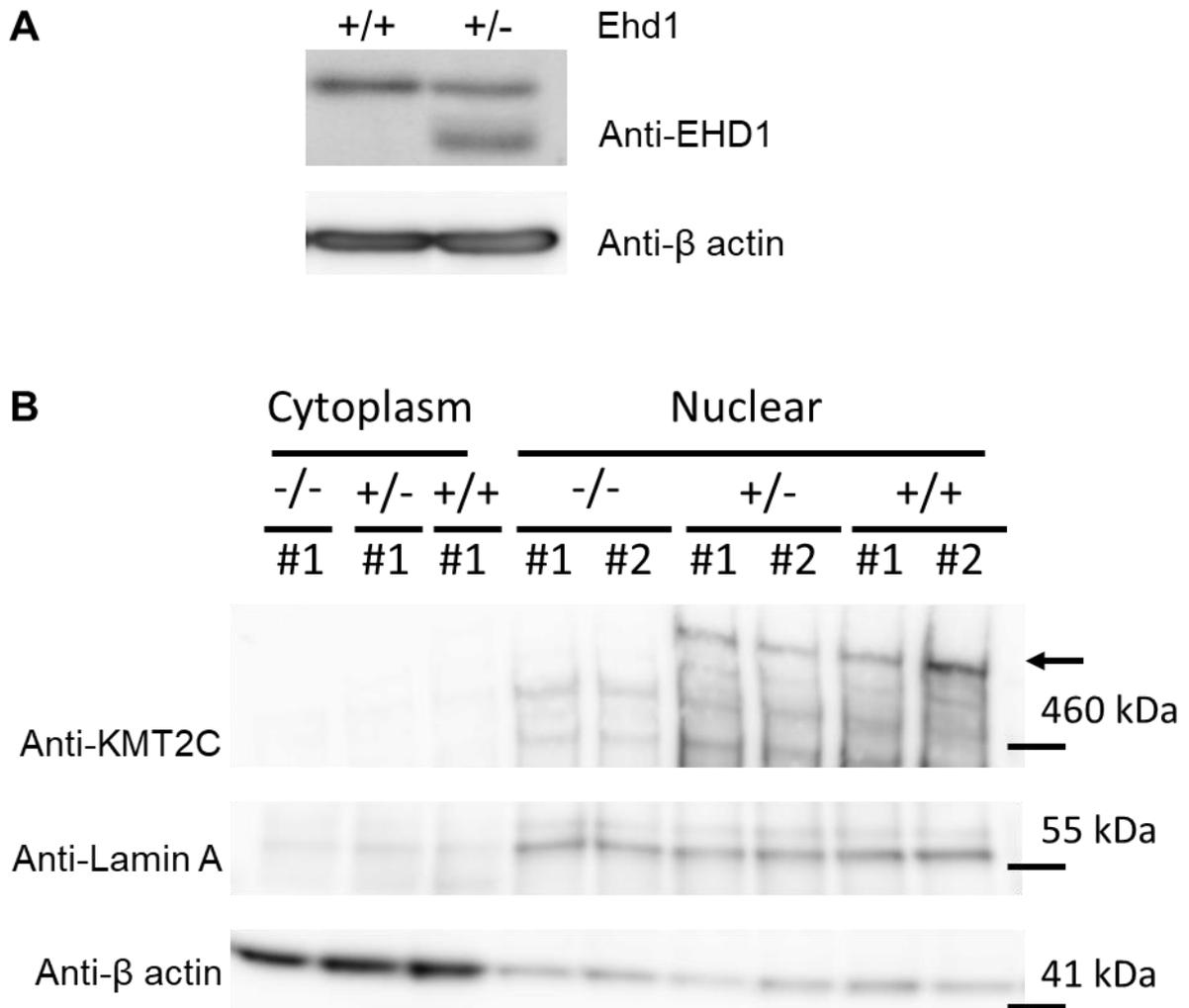


図 14 Ehd1 および Kmt2c 変異マウスサンプルのウエスタンブロット

- A. EHD1 のウエスタンブロット。ヘテロ変異マウスで、短い EHD1 の発現を確認した。
- B. E16.5 胎児の全脳サンプルを用いたウエスタンブロット。*Kmt2c* ホモ変異マウスでバンドが消失したことを確認した (矢印部)。Cytoplasm は細胞質画分、Nuclear は核画分サンプル。

	マウス	PC12細胞
WT	2	8
WT/in-frame	16	1
WT/frameshift	8	6
in-frame/in-frame	14	2
in-frame/frameshift	9	12
frameshift/frameshift	6	26
total	55	55

図 15 *Ehd1* を切断したマウスおよび PC12 細胞の遺伝子型の分布

両者の間に、有意な分布の違いが存在した。2×6 フィッシャーの正確確率検定、 $p < 5 \times 10^{-8}$ 。

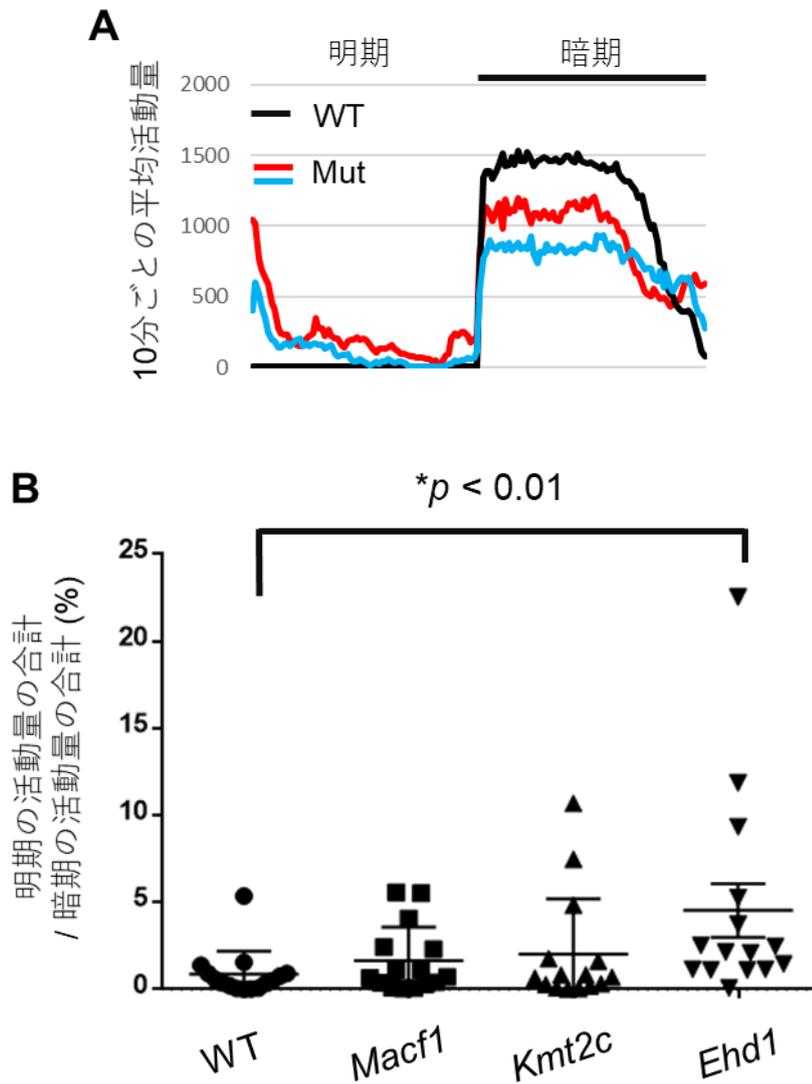


図 16 輪回し行動解析の結果

- A. 一日の平均行動量について、野生型 (WT) および *Ehd1* 変異マウス (Mut) の代表例。
- B. 各変異マウスの暗期に対する明期の活動量。N = 15。Mean \pm SEM。Kruskal-Walis の検定。 $p = 0.0029$ 。

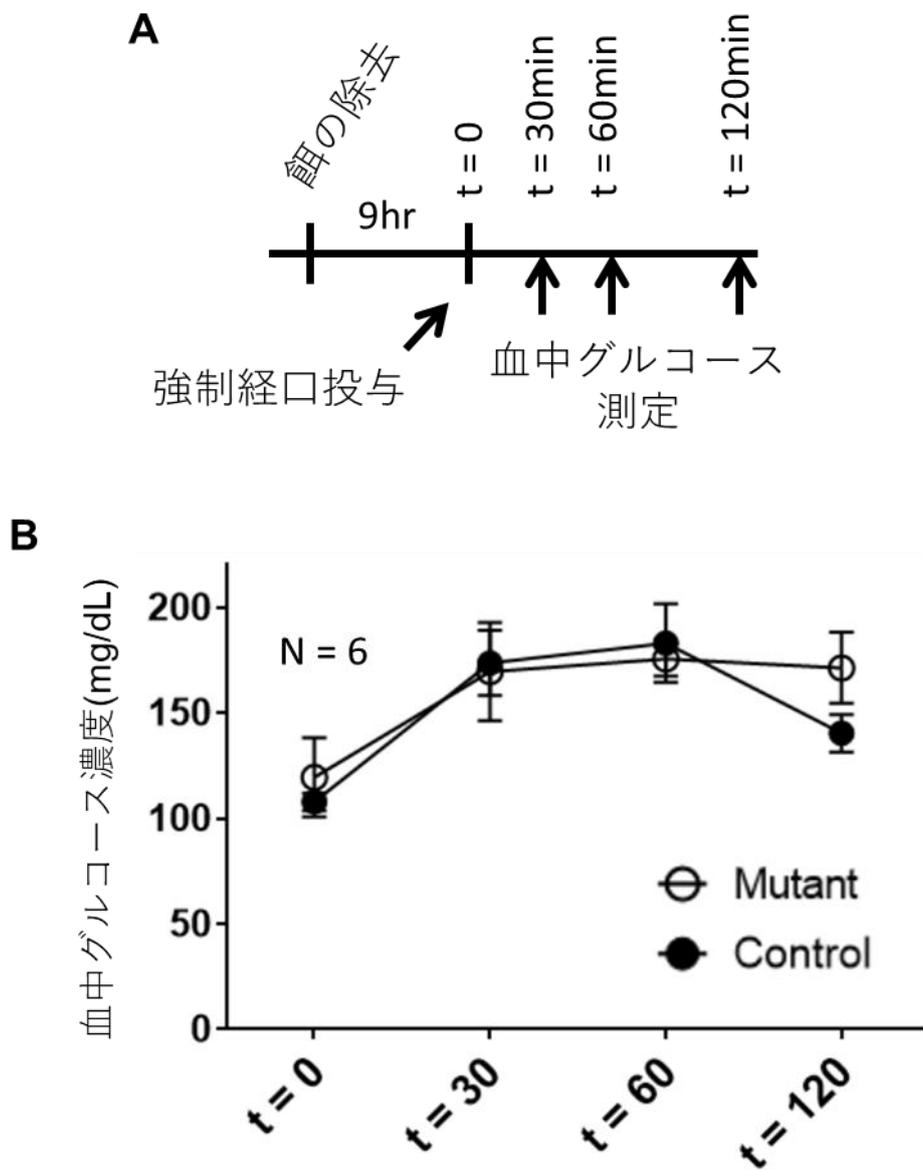


図 17 グルコース血中濃度測定実験

A. グルコース血中濃度測定実験の流れ。

B. 野生型と変異型マウスで、グルコース投与後の血中グルコース濃度に有意な差は見られなかった。Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 6. Interaction; $p = 0.54$, Time; $p = 0.0005$, Genotype; $p = 0.55$.

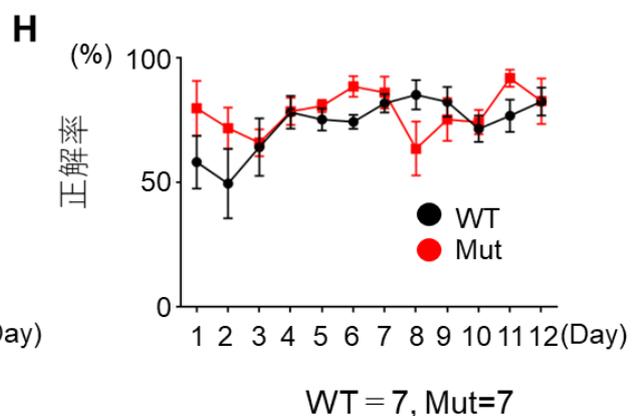
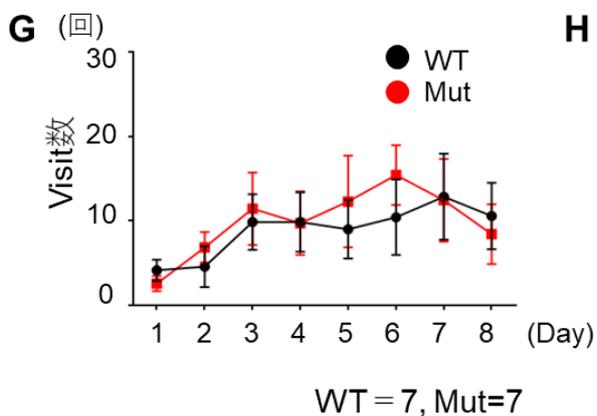
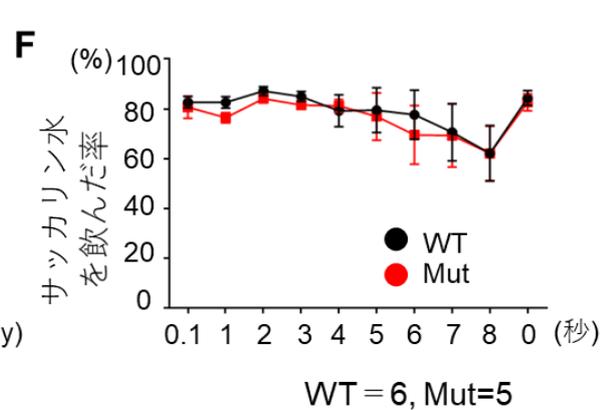
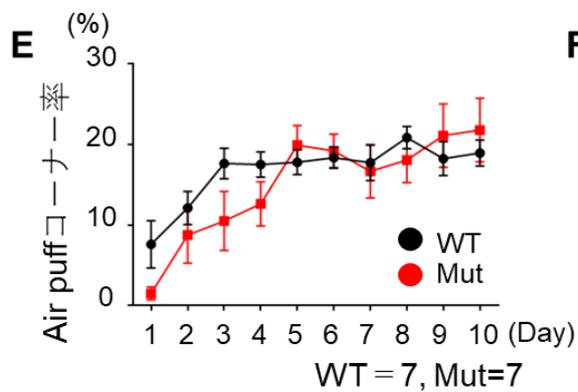
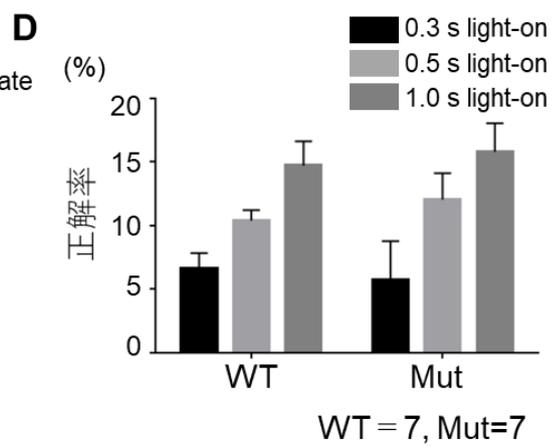
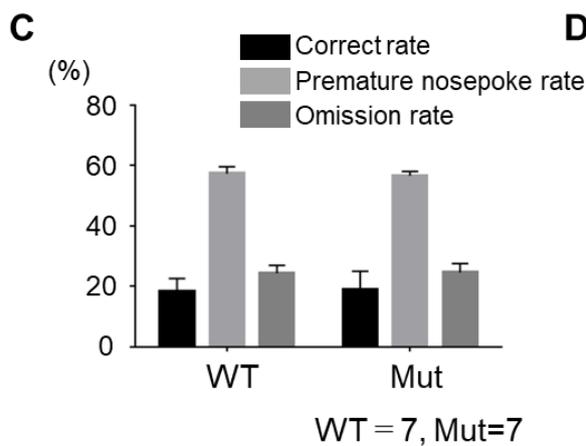
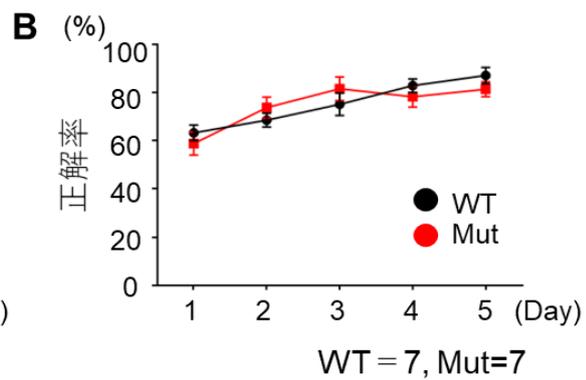
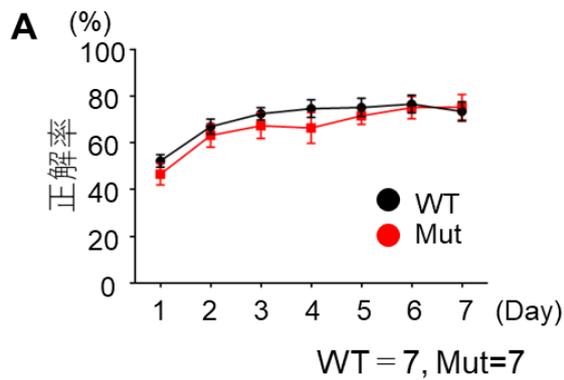


図 18 Ehd1 変異オスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.81$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.42$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.075$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.88$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.94$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.70$, Stimulation; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.64$.
- E. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.16$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.45$.
- F. Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 5. Interaction; $p > 0.99$, Time; $p = 0.0022$, Genotype; $p = 0.71$.
- G. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.91$, Time; $p = 0.035$, Genotype; $p = 0.21$.
- H. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.054$, Time; $p = 0.0028$, Genotype; $p = 0.43$.

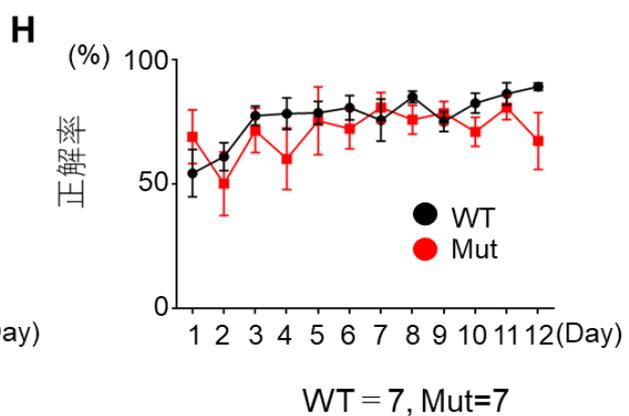
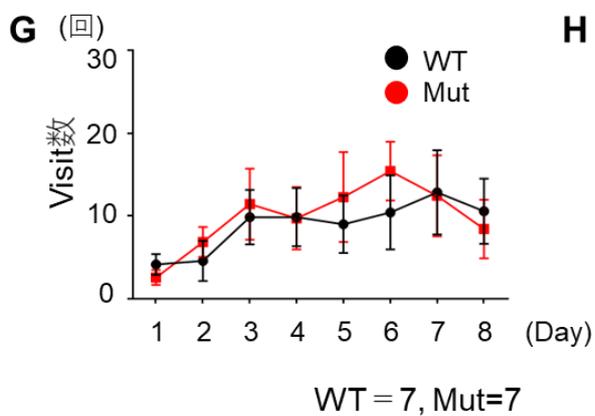
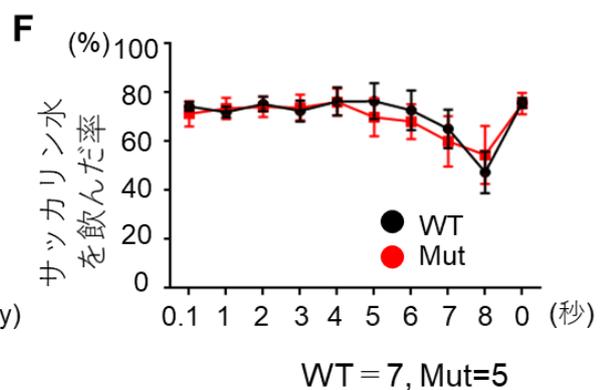
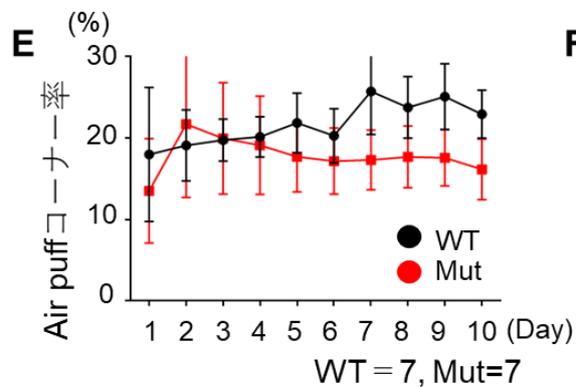
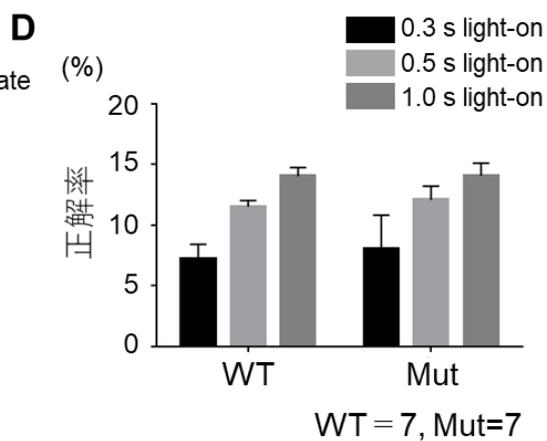
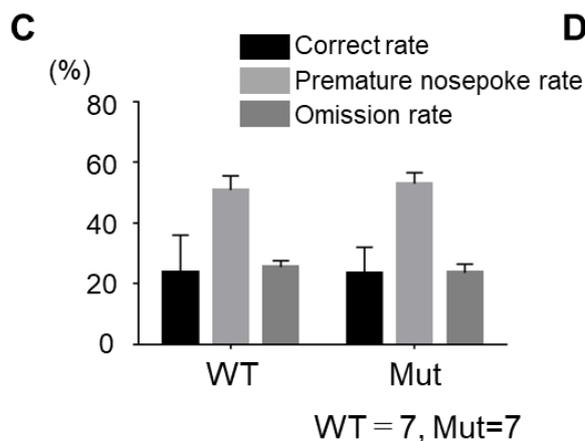
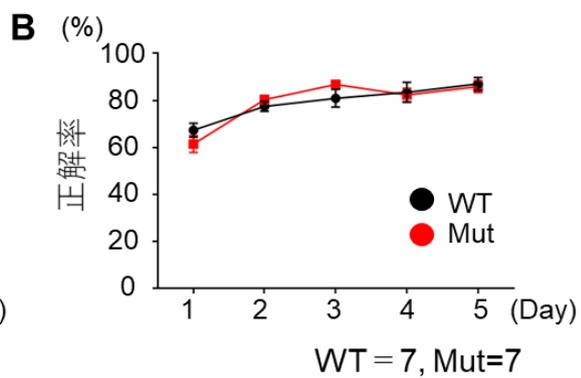
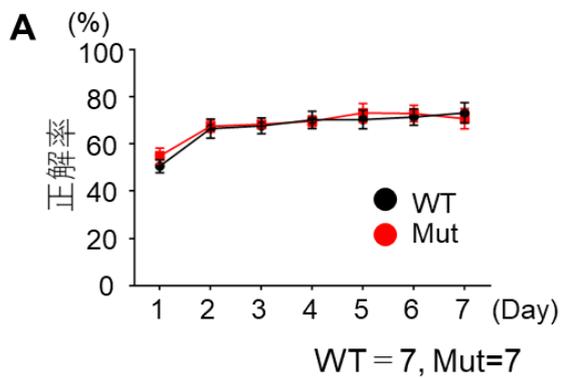


図 19 Ehd1 変異メスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.76$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.80$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.11$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.97$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.84$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.90$, Stimulation; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.49$.
- E. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.84$, Time; $p = 0.90$, Genotype; $p = 0.47$.
- F. Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 5. Interaction; $p = 0.94$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.87$.
- G. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.90$, Time; $p = 0.01$, Genotype; $p = 0.80$.
- H. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 5. Interaction; $p = 0.54$, Time; $p = 0.012$, Genotype; $p = 0.13$.

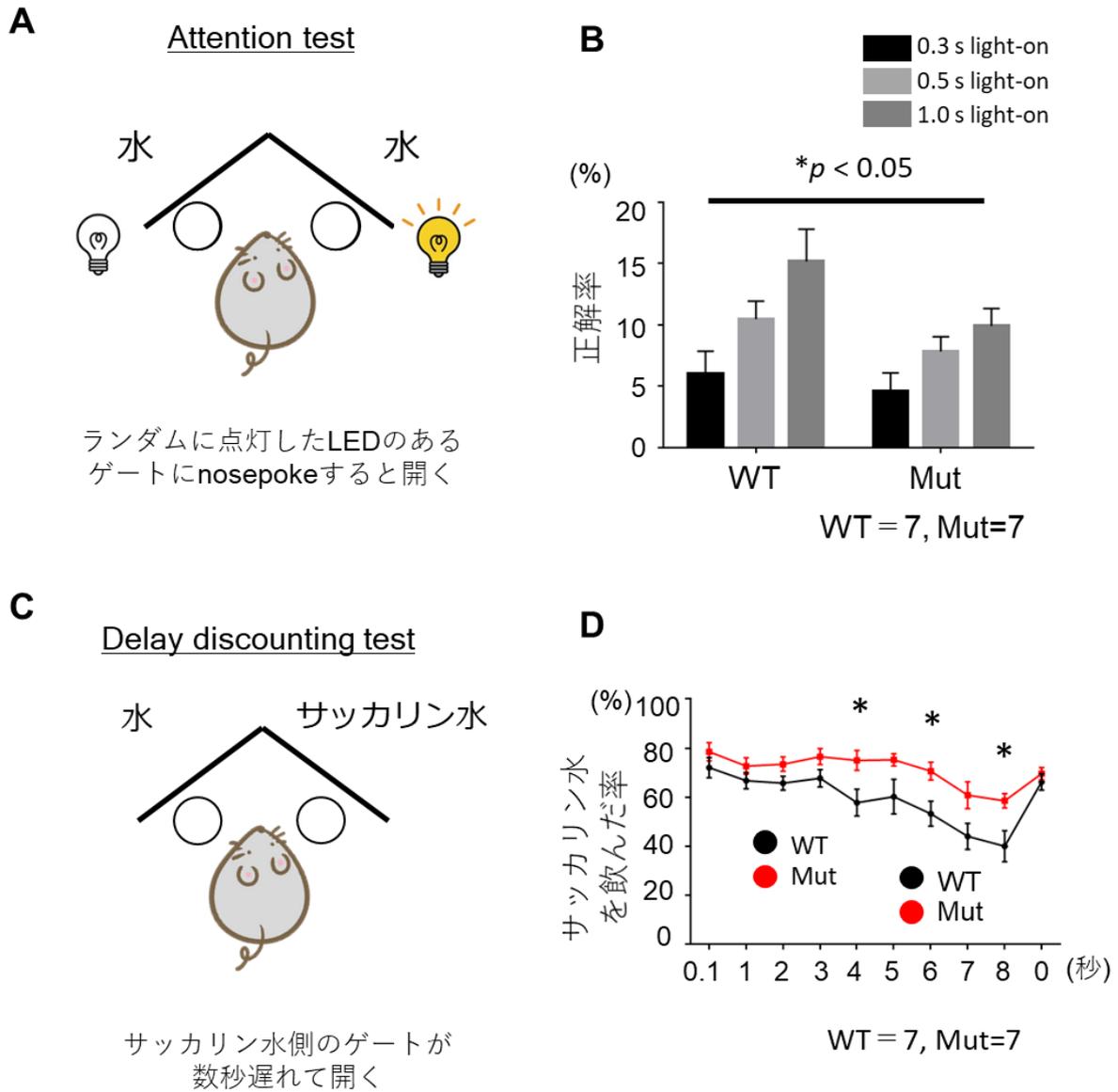


図 20 *Macf1* 変異マウスのインテリケージ解析結果

- A. Attention test の模式図。
- B. *Macf1* 変異オスマウスにおいて、Attention test の正解率が有意に低下した。Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.43$, Stimulation; $p = 0.0001$, Genotype; $p = 0.016$.
- C. Delay discounting test の模式図。
- D. *Macf1* 変異メスマウスは、遅延時間が長くなっても、サッカリン水を有意に飲み続けた。Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.14$, Time; $p = 0.0001$, Genotype; $p = 0.014$.

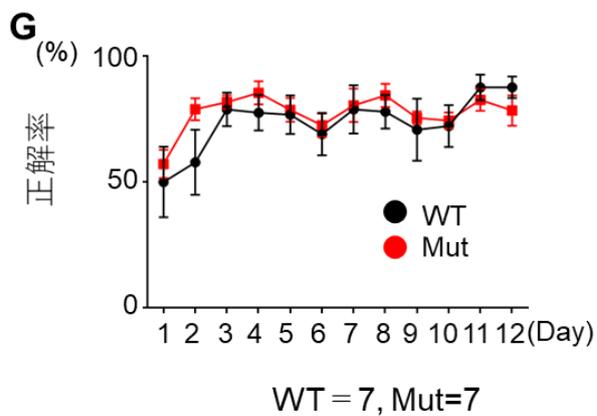
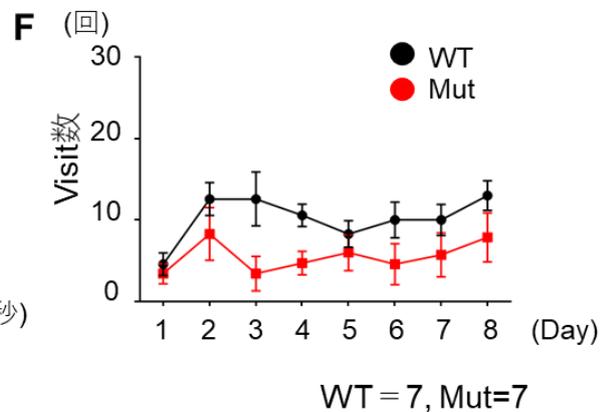
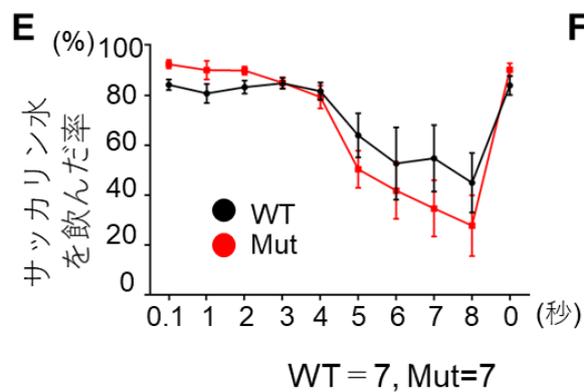
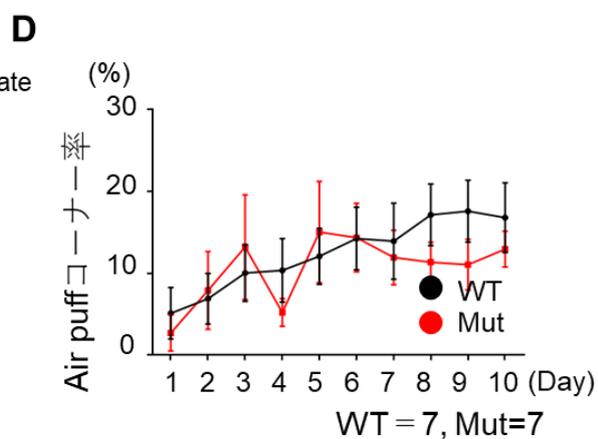
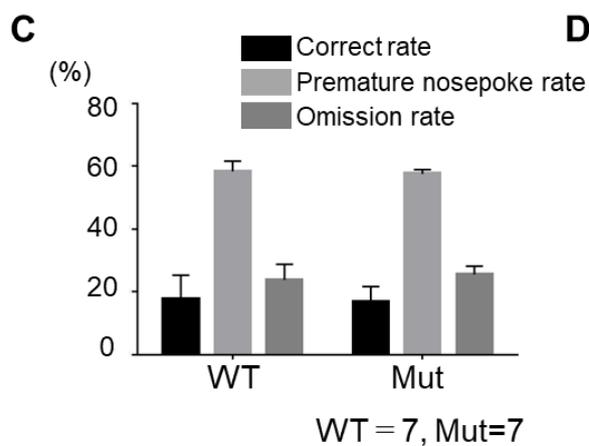
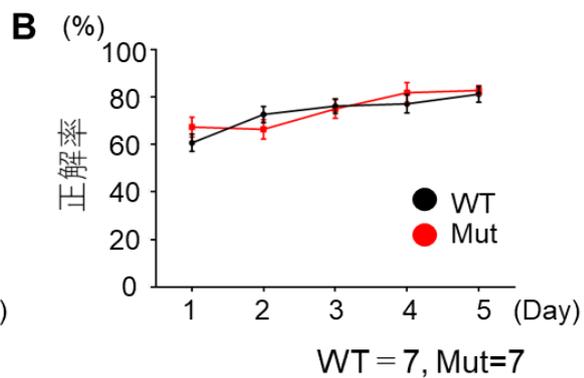
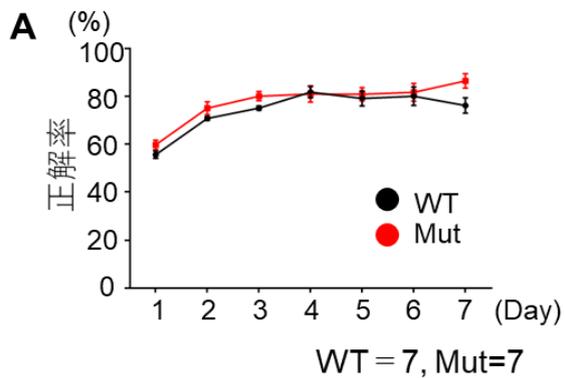


図 21 *Macf1* 変異オスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.25$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.17$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.29$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.74$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.10$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.50$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.67$.
- E. Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.061$, Time; $p = 0.0001$, Genotype; $p = 0.66$.
- F. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.17$, Time; $p = 0.0004$, Genotype; $p = 0.092$.
- G. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.85$, Time; $p = 0.0007$, Genotype; $p = 0.39$.

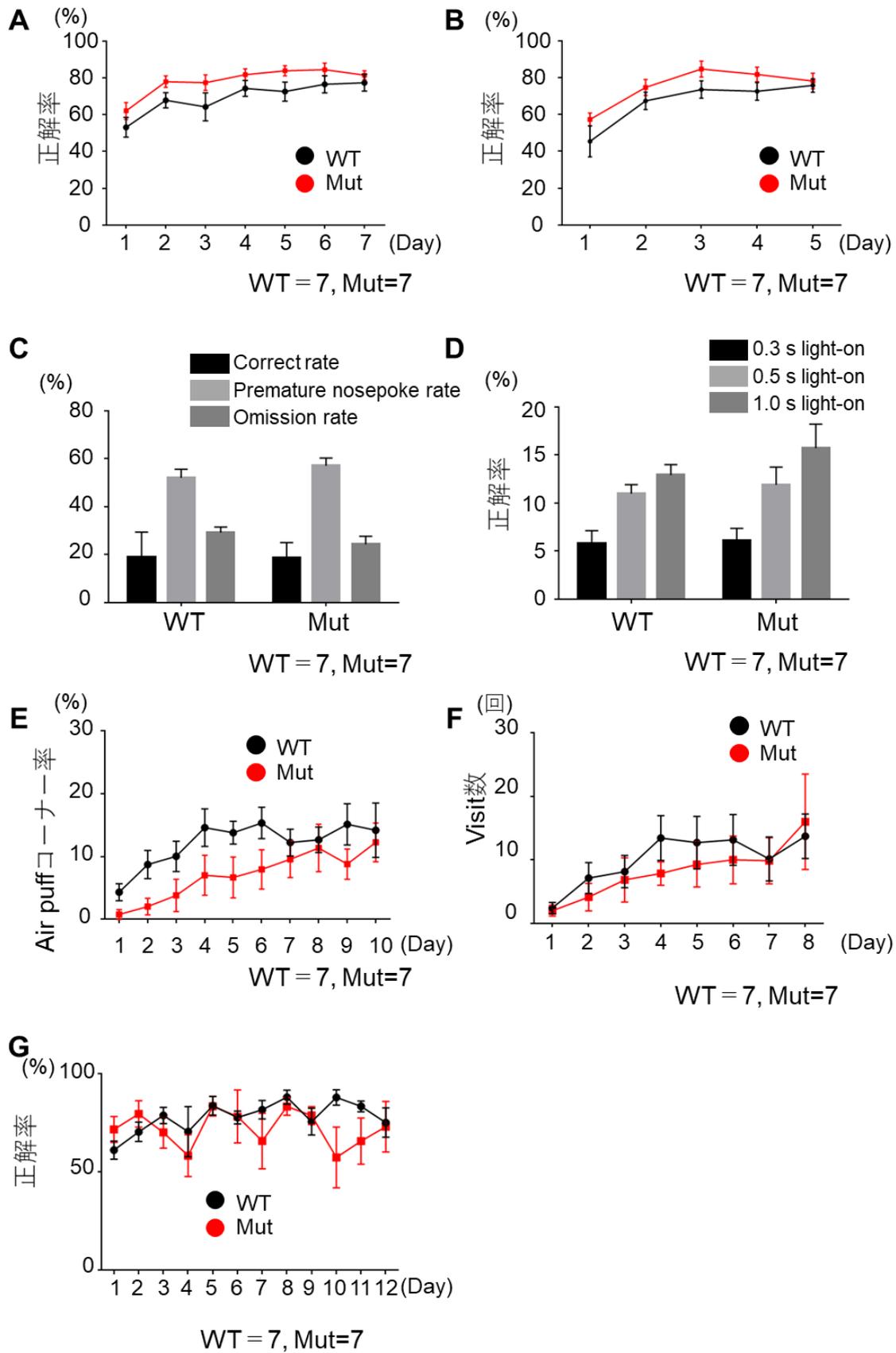


図 22 *Macf1* 変異メスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.88$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.074$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.80$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.078$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.23$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.66$, Stimulation; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.25$.
- E. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.44$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.12$.
- F. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.84$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.63$.
- G. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.21$, Time; $p = 0.20$, Genotype; $p = 0.40$.

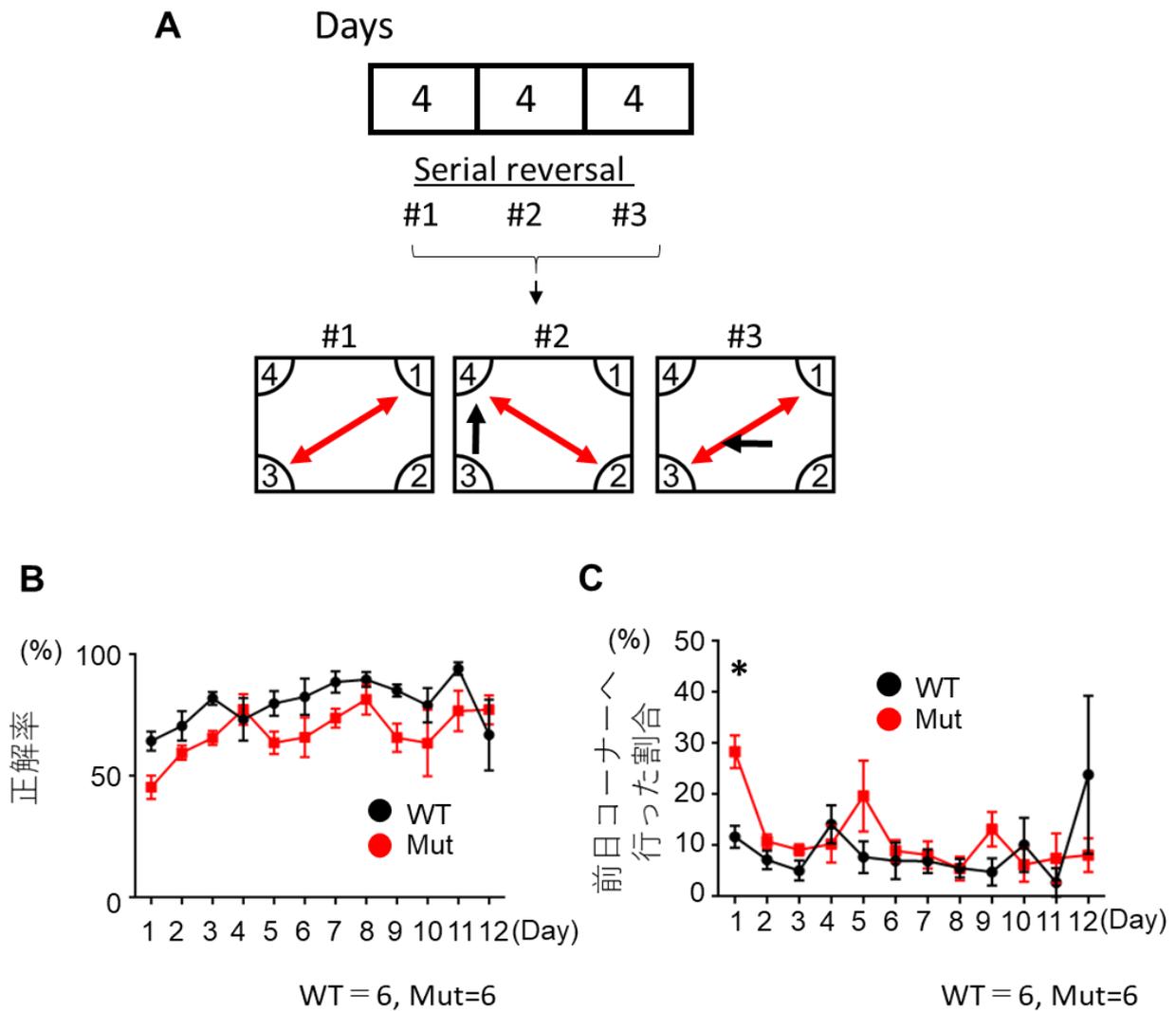


図 23 *Kmt2c* 変異オスマウスの serial reversal test の結果

- A. Serial reversal test の模式図。
- B. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 6. Interaction; $p = 0.27$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.033$.
- C. 前日のコーナーへ行った割合。Mean \pm SEM. 初日について、Welch の t 検定。WT; N = 6, Mut; N = 6. $p = 0.0018$

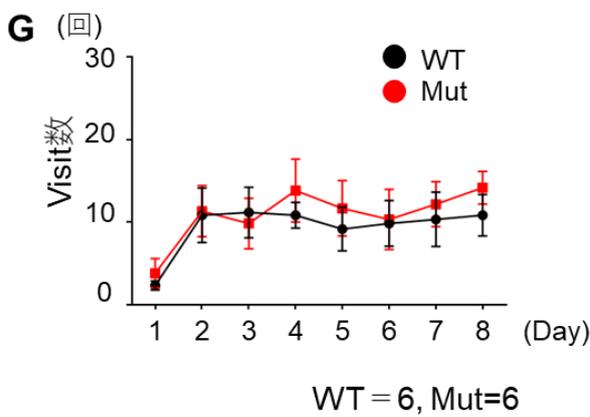
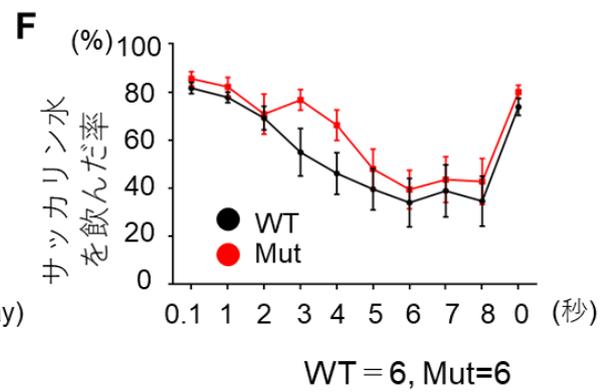
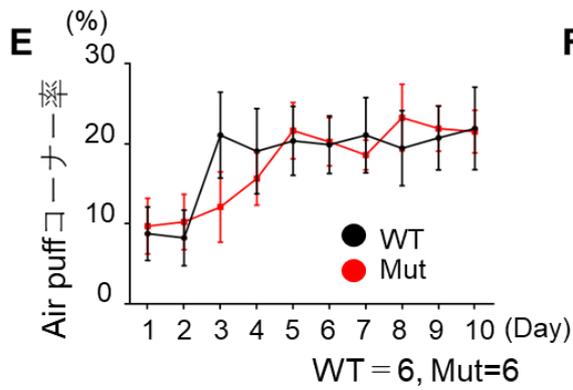
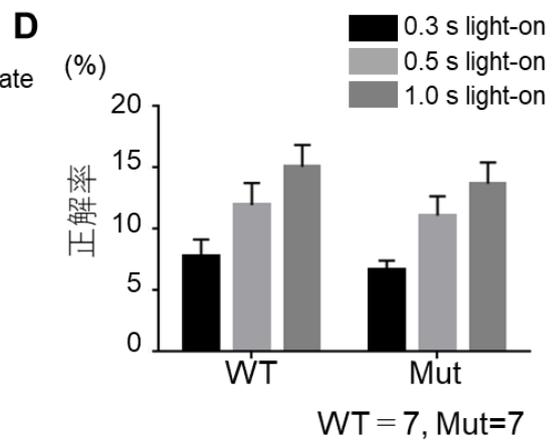
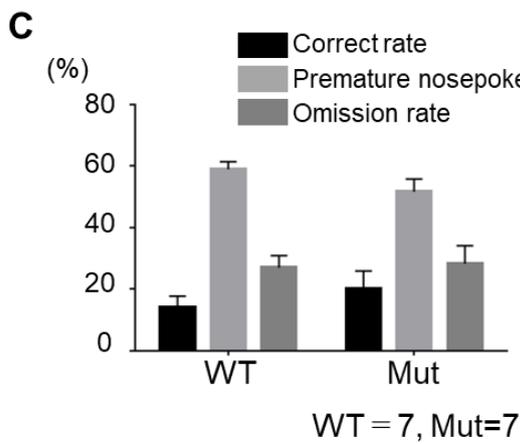
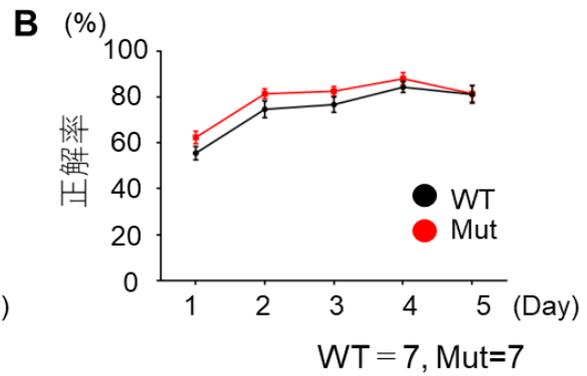
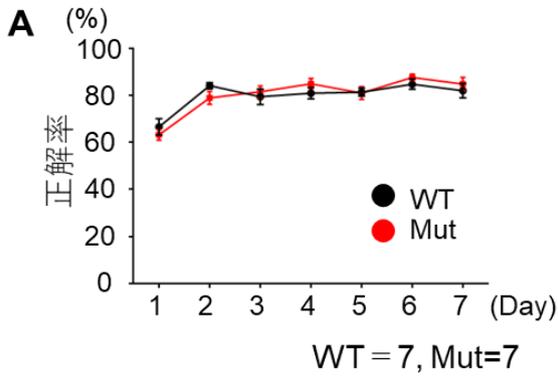


図 24 *Kmt2c* 変異オスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.26$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.85$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.50$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.18$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.0342$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.98$, Stimulation; $p = 0.0002$, Genotype; $p = 0.39$.
- E. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 6. Interaction; $p = 0.56$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.89$.
- F. Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 6. Interaction; $p = 0.71$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.25$.
- G. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 6. Interaction; $p = 0.98$, Time; $p = 0.0031$, Genotype; $p = 0.58$.

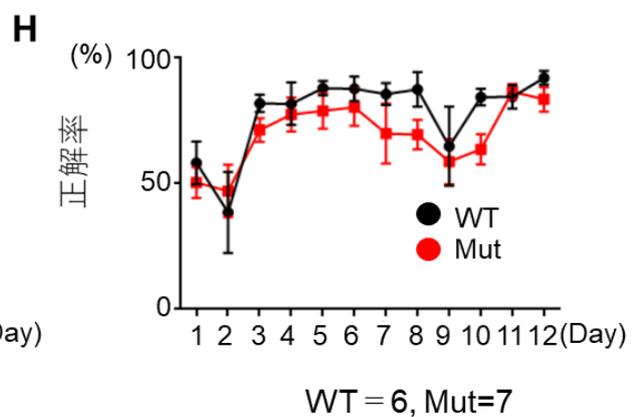
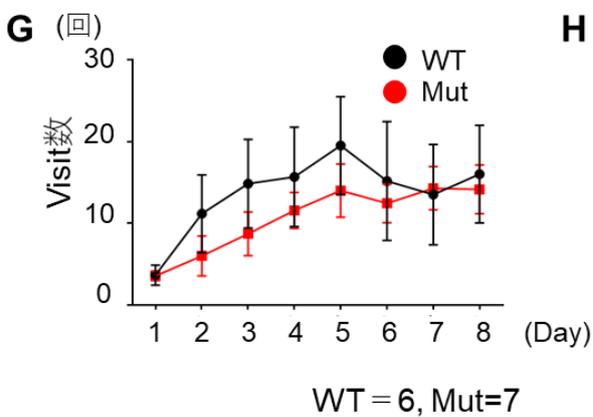
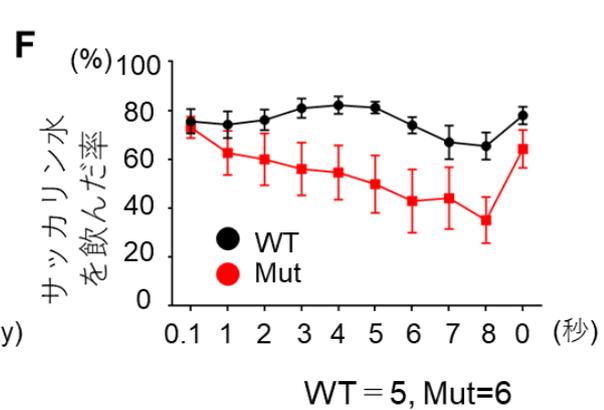
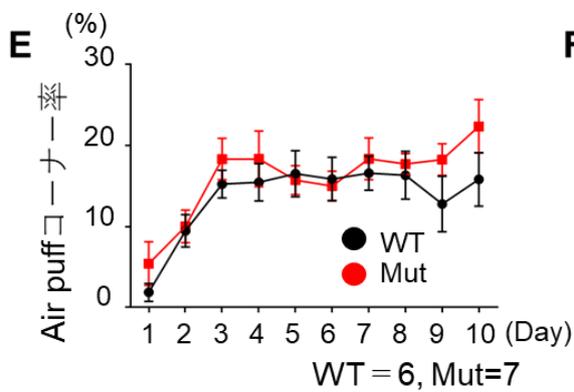
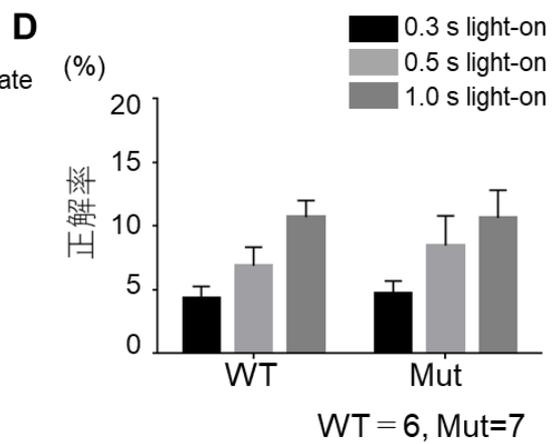
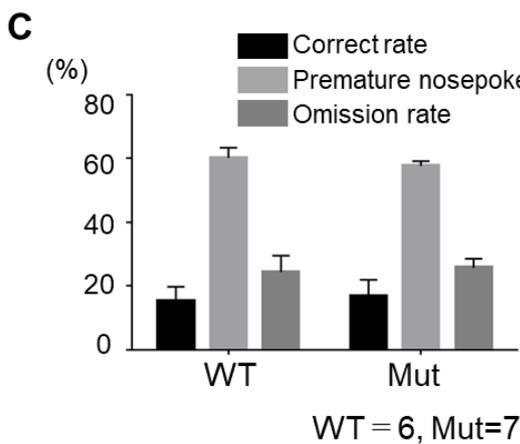
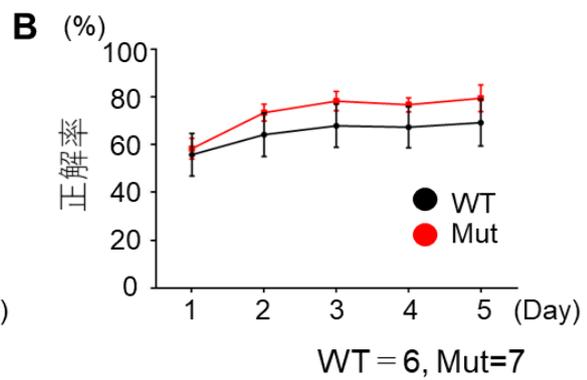
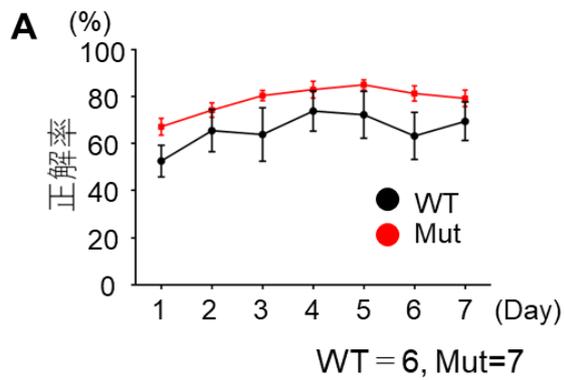


図 25 *Kmt2c* 変異メスマウスのインテリケージ解析結果

- A. Place learning test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.30$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.16$.
- B. Place learning reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.64$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.36$.
- C. Impulsivity test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.56$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.99$.
- D. Attention test. Mean \pm SEM. 2way ANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.88$, Stimulation; $p = 0.0039$, Genotype; $p = 0.64$.
- E. Place avoidance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.42$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.42$.
- F. Delay discounting test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 5. Interaction; $p = 0.044$, Time; $p = 0.0001$, Genotype; $p = 0.069$.
- G. Social dominance test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 7, Mut; N = 7. Interaction; $p = 0.76$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.54$.
- H. Serial reversal test. Mean \pm SEM. 2way rmANOVA, WT; N = 6, Mut; N = 5. Interaction; $p = 0.82$, Time; $p < 0.0001$, Genotype; $p = 0.10$.

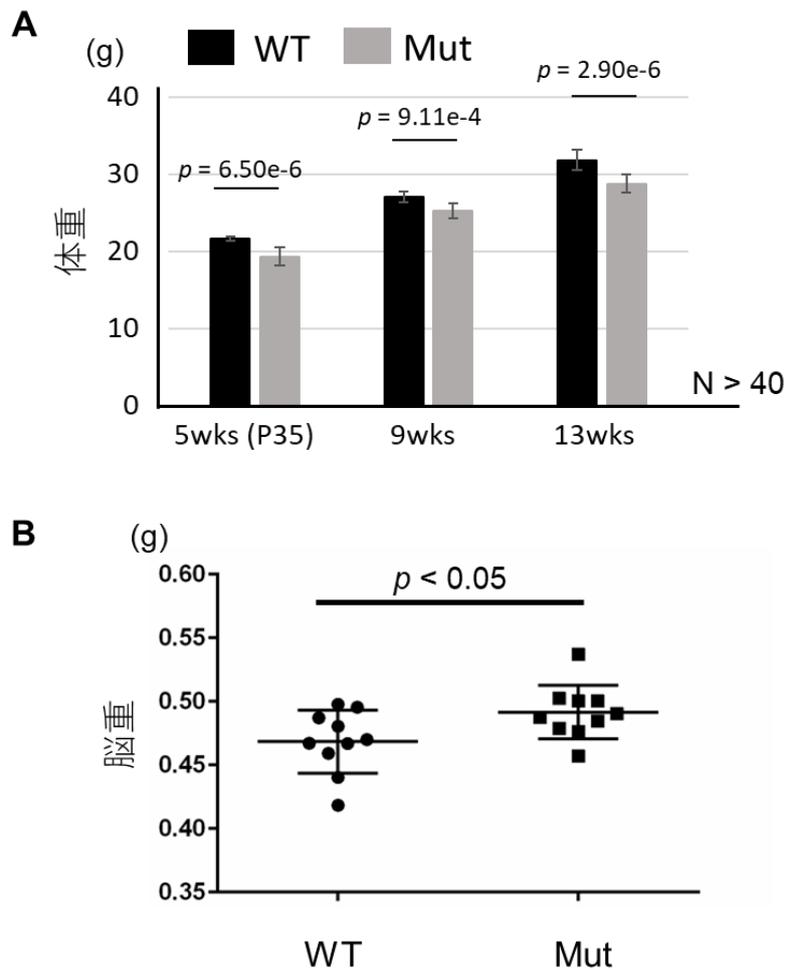


図 26 *Kmt2c* 変異オスマウスの体重および脳重

- A. *Kmt2c* 変異マウスは有意な体重の低下を示した。N>40。Mean±SEM。Mann-Whitney の検定。5wks: $p = 6.50 \times 10^{-6}$, 9wks: $p = 9.11 \times 10^{-4}$, 13wks: $p = 2.90 \times 10^{-6}$ 。
- B. *Kmt2c* 変異マウスは有意な脳重の増加を示した。N=10。Mean±SEM。Mann-Whitney の検定。16 週齢。 $p < 0.05$ 。

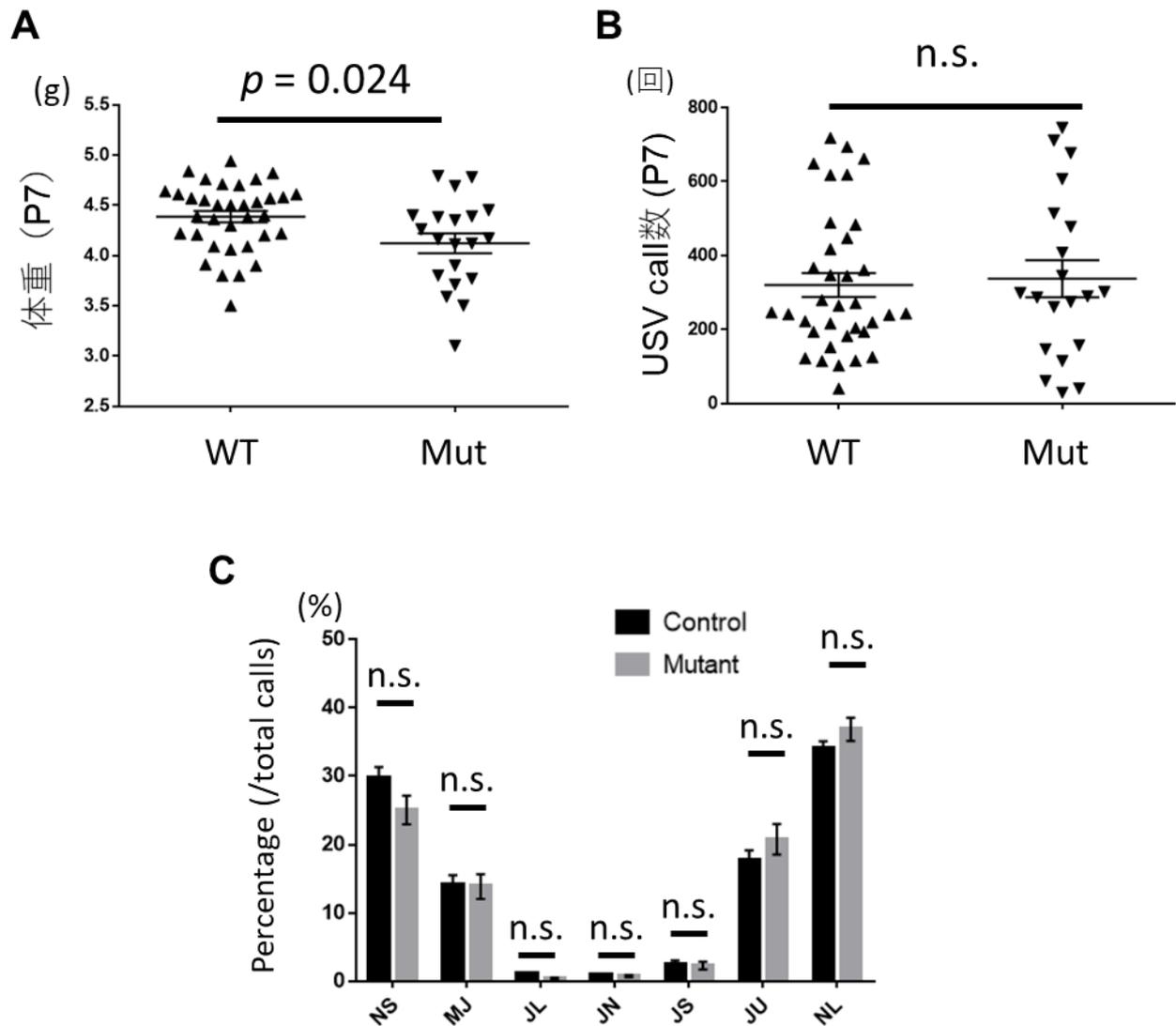


図 27 *Kmt2c* 変異マウスの超音波発声測定 (USV)

- A. P7 時の *Kmt2c* 変異マウスの体重。有意な体重低下を確認した。WT; N = 35, Mut; N = 20。 Mean \pm SEM。 Mann-Whitney の検定。 $p = 0.024$ 。
- B. *Kmt2c* 変異マウスにおいて、USV の数に有意な差はなかった。WT; N = 35, Mut; N = 20。 Mean \pm SEM。 Mann-Whitney の検定。 $p = 0.70$ 。
- C. USV の発声パターン。*Kmt2c* 変異マウスにおいて、有意な違いは見られなかった。 NS: No jump short call. MJ: Multiple jump call. JL: One downward jump long call, JN: One downward jump normal call, JS: One downward jump short call, JU: One upward jump, NL: No jump long call。 2way rmANOVA, WT; N = 35, Mut; N = 20。 Interaction; $p = 0.0647$, Pattern; $p < 0.0001$, Genotype; $p > 0.999$ 。

GO Term (Up-regulated)	corrected p-value
G-protein coupled receptor activity	4.42E-13
G-protein coupled receptor signaling pathway	5.57E-13
transmembrane signaling receptor activity	8.92E-12
signaling receptor activity	1.92E-10
molecular transducer activity	1.92E-10
sensory perception of chemical stimulus	1.92E-10
signal transducer activity	3.93E-10
sensory perception	3.93E-10
haptoglobin binding	1.25E-09
haptoglobin-hemoglobin complex	7.81E-09
nervous system process	2.97E-08
oxygen carrier activity	4.79E-08
oxygen transport	7.81E-08
detection of chemical stimulus involved in sensory perception	2.64E-07
detection of stimulus involved in sensory perception	2.75E-07
olfactory receptor activity	3.06E-07
detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell	3.06E-07
system process	3.06E-07
detection of chemical stimulus	3.84E-07
detection of stimulus	4.81E-07
sensory perception of smell	4.81E-07
hemoglobin complex	4.81E-07
signal transduction	1.10E-06
gas transport	1.21E-06
molecular carrier activity	1.60E-06
cellular response to stimulus	3.56E-06
signaling	4.15E-06
cell communication	4.92E-06
hemoglobin beta binding	5.35E-06
erythrocyte development	2.13E-05
hemoglobin alpha binding	7.18E-05
regulation of eIF2 alpha phosphorylation by heme	7.18E-05
peroxidase activity	8.38E-05
oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	1.12E-04
response to chemical	1.75E-04
response to stimulus	2.59E-04
hemoglobin binding	5.11E-04
myeloid cell development	8.19E-04
integral component of membrane	9.92E-04
intrinsic component of membrane	0.001131

図 28 *Kmt2c* 変異マウス海馬において発現量が増加した Gene ontology term (top 30)

Fold-change > 1.1 かつ $p < 0.05$ の遺伝子群について、*Kmt2c* 変異により増加した GO term。濃赤で示したカラムは、造血系に関わる term であった。

GO Term (Down-regulated)	corrected p-value
cytoplasm	3.47E-10
cytoplasmic part	4.21E-10
organelle	5.56E-09
membrane-bounded organelle	2.71E-08
intracellular part	1.52E-07
intracellular organelle	2.54E-06
intracellular	3.03E-06
positive regulation of Golgi to plasma membrane protein transport	1.40E-04
intracellular organelle part	4.45E-04
organelle part	5.70E-04
regulation of cyclic nucleotide catabolic process	6.68E-04
catalytic activity	6.68E-04
regulation of purine nucleotide catabolic process	6.68E-04
regulation of cAMP catabolic process	6.68E-04
organonitrogen compound metabolic process	8.41E-04
extracellular vesicle	0.002151
vesicle	0.002151
Arp2/3 protein complex	0.002204
metabolic process	0.002204
extracellular organelle	0.002204
intracellular membrane-bounded organelle	0.002495
extracellular exosome	0.002523
cytosol	0.002814
regulation of Golgi to plasma membrane protein transport	0.00331
cellular metabolic process	0.003393
axon ensheathment	0.005283
primary metabolic process	0.005283
ensheathment of neurons	0.005283
organic substance metabolic process	0.005604
transferase complex	0.006865
ribonucleoprotein complex	0.007237
transferase activity	0.011589
positive regulation of cyclic nucleotide catabolic process	0.013109
positive regulation of cAMP catabolic process	0.013109
positive regulation of purine nucleotide catabolic process	0.013109
Arp2/3 complex-mediated actin nucleation	0.013401
nitrogen compound metabolic process	0.015266
myelination	0.016392
endoplasmic reticulum	0.027373

図29 *Kmt2c*変異マウス海馬において発現量が減少した Gene ontology term (top 30)

Fold-change > 1.1 かつ $p < 0.05$ の遺伝子群について、*Kmt2c* 変異により減少した GO term。黄で示したカラムは、神経のミエリン化に関わる term であった。

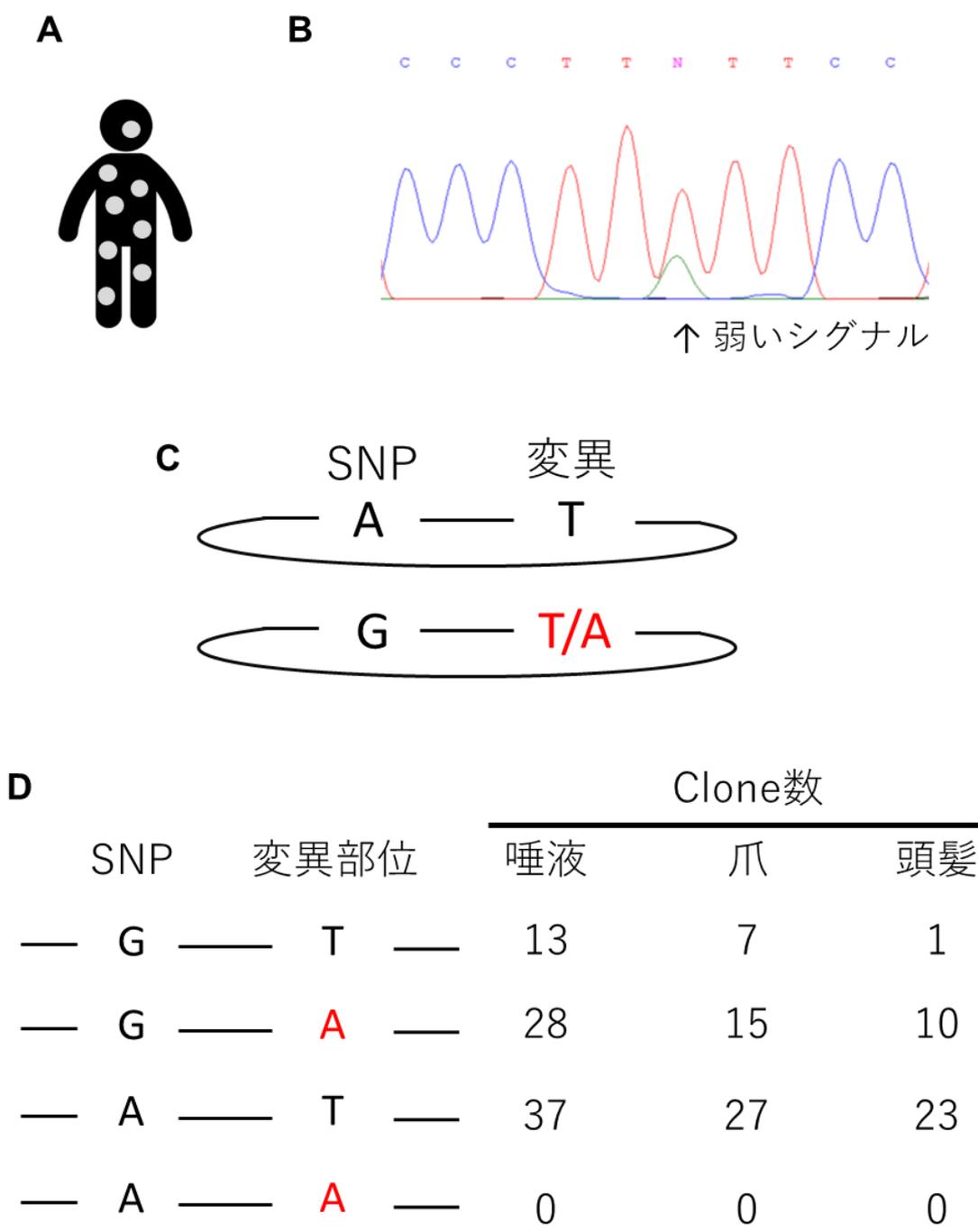


図 30 患者 *KMT2C* 変異の再検証

- A. 体細胞モザイク変異の概念図。
- B. 患者変異近傍のシーケンス波形。
- C. 患者 DNA の PCR 産物サブクローニング。
- D. 患者変異と SNP 組み合わせパターン各クロン数。

3.4 考察

3.4.1 結果のまとめ

本章では、双極性障害患者で機能喪失型変異が同定された遺伝子の中から、ふたつの遺伝学的指標である RVIS および pLi により絞り込んだ、*EHD1*, *MACF1*, *KMT2C* の 3 遺伝子に着目し遺伝子改変マウスを作製し、行動解析および生理学的解析を行った。*Ehd1* 変異マウスでは、患者変異による短いタンパク質が発現していることと、明期において活動量が有意に増加していることを見いだした。*Macf1* 変異マウスでは、一部のアイソフォームにのみ異常を生じる患者変異を再現し、attention test と delay discounting test で顕著な行動を見いだした。*Kmt2c* 変異マウスでは、フレームシフトを引き起こす変異を導入し、異常アリルからの *KMT2C* 発現が完全に喪失することを明らかにし、体重低下と脳重増加という身体的な発達異常を見いだした。行動解析では、serial reversal test でルール変更に柔軟な対応ができないことを見いだした。海馬サンプルを用いたマイクロアレイ解析では、*Kmt2c* 変異マウスにおいて、ミエリン化に関する遺伝子群の発現が有意に低下していることを見いだした。また、*KMT2C* 変異を有していた患者の DNA サンプルを再解析したところ、*KMT2C* デノボ変異は、全身性ではなく、体内の一部に存在する体細胞モザイク変異であったことを見いだした。

3.4.2 RVIS と pLi について

本研究では、疾患遺伝学領域で開発された RVIS と pLi に着目することにより、着目すべき遺伝子を絞り込んだ。これら指標は、一般人口において、タンパク質のアミノ酸配列変化変異または機能喪失型変異の起きやすさの目安と考えられている。そのため、これら指標により変異が生じにくいとされる遺伝子は、遺伝子変異に不寛容、すなわち、変異が生じるとその変異が次世代に伝わりにくいと予測され、そのような遺伝子は生命維持や種の維持に重要な遺伝子であると考えられる。また、pLi と RVIS については、算出の根拠となるデータベースが異なるため、両指標に着目することで、より厳密に生体にとって重要な遺伝子を絞り込むことが出来ると考えられる。pLi および RVIS 両方も小さい遺伝子の変異マウスは作製しなかったため、厳密な比較をすることはできないものの、両値により絞り込んだ *Ehd1*, *Macf1*, *Kmt2c* の各変異マウスは、実際にそれぞれ顕著な行動を示しており、本手法の有用性を示唆する結果であると考えられる。

3.4.3 CRISPR/Cas9 によるオフターゲット変異について

本研究で CRISPR/Cas9 により作製した遺伝子改変マウスは、オフターゲット機能喪失変異を有していなかった。CRISPR/Cas9 で作製した遺伝子改変マウスのエクソーム解

析については、中島らにより報告があり、作製した3系統のうち1系統で、1か所のオフターゲット機能喪失変異が同定されている(105)。通常の近交系マウスコロニーでは、1世代経るごとに、3~4個の塩基挿入/欠失変異が全ゲノム中に生じるという報告をもとに考えると、全エクソーム中では1世代経るごとに0.1個の塩基挿入/欠失変異が生じると予測される(106)。本研究では、3系統中1系統も機能喪失変異を生じなかったことから、中島らの論文と合わせて、1マウス当たり $1/6 = 0.16$ 個の塩基挿入/欠失変異が生じる計算となり、通常の世代交代により生じる機能喪失デノボ変異の数と、CRISPR/Cas9のオフターゲットにより生じる機能喪失変異の数に顕著な差は存在しない(フィッシャーの正確確率検定, $p > 0.99$)。また、Akcakayaらは、オフターゲット予測を行いオフターゲット変異が生じる可能性が低いものを適切に選べば、全ゲノムレベルでもオフターゲット変異が生じないことを報告している(107)。

以上のことから、少なくとも上記の実験で生じたCRISPR/Cas9によるオフターゲット機能喪失変異は、自然交配で生じる変異と大差なく、無視できるレベルであったと考えられる。

3.4.4 各変異マウスで見いだした表現型について

1. *Ehd1* 変異マウスについて

Ehd1 変異マウスは、夜行性であるマウスで本来活動が低下する明期において、有意な活動量増加を見いだした。この結果は、*Ehd1* 変異マウスにおいて、睡眠機能に何らかの異常が生じている可能性を示唆している。双極性障害の診断基準のひとつに睡眠量の低下または増加の有無があるが、それだけではなく、双極性障害と睡眠障害との関係については、これまで多数の報告がある。Geoffroyらは、睡眠低下が双極性障害に頻度高く存在することを報告している(108)。またNgらは、躁もうつも示さない interepisode 期に、双極性障害患者で睡眠異常を示すことを報告している(109)。さらに、Henschらは、睡眠の異常が、双極性障害の素因となる可能性を報告している(110)。以上のように、双極性障害と睡眠には深いかわりがある。今回の *Ehd1* 変異マウスでは、双極性障害様行動を示さなかったが、睡眠の異常が双極性障害の素因となる可能性があることから、患者における EHD1 の異常が睡眠異常を引き起こし、双極性障害に対する脆弱性を引き起こしている可能性が考えられる。

2. *Macf1* 変異マウスについて

Macf1 変異マウスは、Attention test と Delay discounting test で異常行動を見いだした。Attention test では、正解率が有意に低下しており、変異マウスの注意力が低下していることを示唆している。双極性障害患者では、注意力が低下しているなどの報告もあるこ

とから(111)、双極性障害患者の特徴の一部を反映した結果であると考えられる。また、Delay discounting test においては、待ち時間が長くなっても、報酬であるサッカリン水を飲み続けるという特徴を見いだした。この結果は、変異マウスが報酬にこだわり続けると解釈することが可能であり、双極性障害様行動のひとつと考えられる。また、光遺伝学的操作によってセロトニン神経を活性化させたマウスにおいても、Delay discounting test で同様の行動を示すことが知られている(112)。さらに、双極性障害関連遺伝子 *Ant1* ヘテロノックアウトマウスにおいても、同様のフェノタイプが報告されており、このマウスにおいても縫線核のセロトニン神経が過活動していることが明らかにされている(99)。以上のことから、*Macf1* 変異マウスでも、セロトニン神経に何らかの異常が生じている可能性が考えられる。

今回着目した *MACF1* デノボ変異は、神経系に発現する *MACF1* のひとつのアイソフォームにのみ影響を与えることが予測される。行動異常が見られていることから、このアイソフォームには重要な機能が存在していると予測されるが、このアイソフォームについてはこれまで研究が全くなされていない。そこで、上記の行動異常の原因となる脳領域を同定するためには、*in situ* hybridization などにより、このアイソフォームの発現領域を同定することが必要であると考えられる。また、このアイソフォームの細胞内における機能を、過剰発現実験や、同定した脳領域細胞を用いた解析などにより、今後明らかにすることが必要であると考えられる。

3. *Kmt2c* 変異マウスについて

Kmt2c 変異マウスは、serial reversal test において、飲水可能コーナーの移動ルールが変更された日において、前日飲水可能だったコーナーに有意に多く訪れるという表現型を示した。この結果は、*Kmt2c* 変異マウスが、ルール変更に対応できなかった結果を示唆している。また、体重が有意に低下している一方で、脳の重さが有意に増加していることを見いだした。

上記の、ルール変更への柔軟さの欠如や脳重の増加などは、自閉症患者でたびたび見られる特徴である(113,114)。*KMT2C* では、自閉症などの神経発達障害患者において多くの機能喪失型変異が報告されており、その関連が示唆されていたが、近年の研究により、*KMT2C* の機能喪失型変異と自閉症との間に有意な関係があることが明らかにされた(93)。そのため、上記の *Kmt2c* 変異マウスの表現型とも合わせると、*Kmt2c* のハプロ不全は、双極性障害ではなく神経発達障害の発症を引き起こす可能性が高く、今回作成した *Kmt2c* 変異マウスは、自閉症を含む神経発達障害のモデルマウスであった可能性が高い。自閉症との関係を明らかにするためには、自閉症の大きな特徴である社会性の異常を調べる必要があり、今後の課題である。その他、認知機能や記憶機能などの機能

についても、網羅的な行動テストバッテリーを行い、更なる解析が必要である。

また、今回作製したマウスは神経発達障害モデルマウスの可能性が高いことを考えると、マイクロレイ解析で得られたミエリン化の異常が、その発症に関与している可能性があると考えられる。ミエリン化と自閉症については近年その関係が示唆されており、自閉症関連遺伝子として知られる *Mecp2*, *Pten*, *Tcm4* の各遺伝子改変マウスでは、ミエリン化に関わる遺伝子群の発現が共通して変化していることが報告されている(115)。そこで今後は、*Kmt2c* 変異マウスの神経形態や、神経伝達速度などを調べる必要があると考える。

KMT2C のハプロ不全が神経発達障害を引き起こす可能性が高い一方で、特徴の全く異なる双極性障害患者でも、なぜ同様の変異が同定されたのかについては、双極性障害患者の変異は実はモザイク変異であったことが原因であると考えられる。全身性変異では、体や脳の全体に異常が生じ重篤な症状が見られる一方で、モザイク変異では、体や脳の一部に異常が生じる。そのため、例えば神経回路を形成している二つの脳領域について、正常領域と異常領域が生じることで、両領域間の相互作用に不平衡が起り、双極性障害を引き起こす可能性が考えられる。実際に近年、精神疾患における体細胞モザイク変異の解析は注目を浴びており、統合失調症の死後脳研究において体細胞モザイク変異が複数報告されている。ただし、体細胞モザイク変異による双極性障害発症というコンセプトは全く新しいものであり、行動生理学レベルでの研究は全く報告がないことから、この仮説を検証するための更なる研究が必要であると考えられる。

3.4.5 各遺伝子改変マウスの行動の雌雄差について

本章では、各遺伝子改変マウスの行動に雌雄差が大きく出た。*Macfl* 変異マウスについては、オスマウスが Attention test に異常を示した一方で、メスマウスが Delay discounting test に異常を示していた。*Kmt2c* 変異マウスについては、オスマウスにおいて serial reversal test の異常を見いだした。これまでのマウスの行動研究では、発情周期の影響のせいで結果が安定しないため、メスマウスを使用することが避けられてきた。しかし近年は、アメリカ国立衛生研究所 (National Institutes of Health, NIH) が両性の解析を推奨していることもあって(116)、メスマウスも用いた研究報告がたびたび見られ、自閉症モデル *Chd8* 変異マウスなどでは、雌雄間で示す異常行動が異なることなども報告されている(115)。そのため、今回同定した各遺伝子改変マウスの雌雄差は、その遺伝子の機能の実態を表している可能性も当然ある。しかし一方で、多重比較などによる偽陽性の可能性も残っており、別のパラダイムを用いた独立実験により、同様の行動が見られるかを検討する必要がある。*Macfl* 変異マウスが異常を示した Attention test や Delay discounting test については、5-選択反応時間課題(5-choice serial reaction time task, 5-CSRTT)

により、同様の行動評価が可能である(117)。一方、*Kmt2c* 変異マウスが異常を示したルール変更への柔軟さについては、T 迷路を使用して計測している例が報告されており、再現実験が可能である(17)。

上記のように、得られた異常行動についても独立実験を行い、同様の結果が再現されるのかを検討することが必要である。

3.4.6 本研究の課題

本研究では、作製した各遺伝子改変マウスにおいて、顕著な行動変化を見いだした。*Ehd1* および *Macf1* 変異マウスは、双極性障害症状の特徴の一部を示したが、躁やうつ様行動は示さないなど、双極性障害のすべての特徴を反映する結果を示さなかった。この結果は、双極性障害は、ひとつの遺伝子変異によって発症するのではなく、複数遺伝子の異常により発症する疾患であることを補強している。今後は、デノボ変異患者に特徴的な他の SNP などを再現し、より患者のゲノムを再現した遺伝子改変マウスを作製し、解析することが必要であると考ええる。

また、*Kmt2c* 変異マウスは、全身性の変異を有しているため、双極性障害患者のモザイク変異を再現しておらず、双極性障害モデルマウスとしては不十分であることも明らかとなった。そのため、双極性障害の発症機序を明らかにするためには、*Kmt2c* モザイク変異を再現したマウスの解析が、今後は必要であると考ええる。

最後に、本研究で見いだした各遺伝子改変マウスの行動変化の原因については、細胞・神経回路レベルでの解析はほとんどできておらず、初代培養神経細胞を用いた変異の機能解析や、各遺伝子改変マウスの異常脳部位の同定など、更なる解析が必要である。

総括

本研究では、双極性障害患者で同定された機能喪失型デノボ変異に着目し、*UNC13B*、*EHD1*、*MACF1*、*KMT2C*の4遺伝子について、細胞レベルおよびマウスレベルでの解析を行った。細胞を用いた *UNC13B* および *EHD1* の変異機能解析では、*UNC13B* 変異がスプライシング異常を引き起こすことや、*EHD1* 変異により生じた異常 EHD1 タンパク質が神経突起伸長能の機能喪失やエンドサイトーシスに対するドミナントネガティブ効果を示す可能性を示した。マウスを用いた解析では、*Ehd1* 変異マウスにおいて明期の活動量が有意に増加すること、*Macf1* 変異マウスにおいて注意力の低下や報酬にこだわることを示唆する結果を取得し、*Kmt2c* 変異マウスにおいて脳重の増加やルール変更に対する柔軟性の欠如といった神経発達障害様表現型を見いだした。双極性障害患者における *KMT2C* 変異については再解析を行い、体細胞モザイク変異であったことを見いだした。以上のように、患者で同定されたデノボ変異が、実際に患者の行動に影響を与えている可能性を示唆する結果を得た。

ただし、今回作製した各遺伝子改変マウスは、いずれも双極性障害の病態を完全に再現したマウスであるとは言えず、睡眠異常や注意力低下といった双極性障害患者で見られる一部の特徴を示す結果であり、今回着目した遺伝子は双極性障害の症状の一部の原因となる可能性を示した。近年、双極性障害は、ひとつの遺伝子の異常で生じる疾患ではなく、複数の遺伝子変異によって生じるポリジェニックな疾患であることが示唆されており、本研究もその考え方を示唆する結果となった。ただし、デノボ機能喪失変異に着目することで、一部とはいえ双極性障害の特徴を示したのは明らかであり、デノボ変異解析の有用性を示唆する結果を得たとともに、今後の詳細な研究により、各特徴の機序を明らかにできるモデルマウスを取得することが出来た。

今回の研究は、ひとつの遺伝子に着目して解析を続ける双極性障害研究の現状に一石を投じるものであり、複数の遺伝子に着目した遺伝子改変マウスを作製することにより、より双極性障害の病態を再現したモデルマウスを取得し、今後の双極性障害研究の発展につながる研究が可能となると考える。

参考文献

1. Kato, T. (2019) Current understanding of bipolar disorder: Toward integration of biological basis and treatment strategies. *Psychiatry and clinical neurosciences* **73**, 526-540
2. Yatham, L. M. M. (2010) Bipolar Disorder: Clinical and Neurobiological Foundations.
3. Craddock, N., and Sklar, P. (2013) Genetics of bipolar disorder. *Lancet* **381**, 1654-1662
4. Hou, L., Heilbronner, U., Degenhardt, F., Adli, M., Akiyama, K., Akula, N., Arda, R., Arias, B., Backlund, L., Banzato, C. E. M., Benabarre, A., Bengesser, S., Bhattacharjee, A. K., Biernacka, J. M., Birner, A., Brichant-Petitjean, C., Bui, E. T., Cervantes, P., Chen, G. B., Chen, H. C., Chillotti, C., Cichon, S., Clark, S. R., Colom, F., Cousins, D. A., Cruceanu, C., Czerski, P. M., Dantas, C. R., Dayer, A., Etain, B., Falkai, P., Forstner, A. J., Frisen, L., Fullerton, J. M., Gard, S., Garnham, J. S., Goes, F. S., Grof, P., Gruber, O., Hashimoto, R., Hauser, J., Herms, S., Hoffmann, P., Hofmann, A., Jamain, S., Jimenez, E., Kahn, J. P., Kassem, L., Kittel-Schneider, S., Kliwicky, S., Konig, B., Kusumi, I., Lackner, N., Laje, G., Landen, M., Lavebratt, C., Leboyer, M., Leckband, S. G., Jaramillo, C. A. L., MacQueen, G., Manchia, M., Martinsson, L., Mattheisen, M., McCarthy, M. J., McElroy, S. L., Mitjans, M., Mondimore, F. M., Monteleone, P., Nievergelt, C. M., Nothen, M. M., Osby, U., Ozaki, N., Perlis, R. H., Pfennig, A., Reich-Erkelenz, D., Rouleau, G. A., Schofield, P. R., Schubert, K. O., Schweizer, B. W., Seemuller, F., Severino, G., Shekhtman, T., Shilling, P. D., Shimoda, K., Simhandl, C., Slaney, C. M., Smoller, J. W., Squassina, A., Stamm, T., Stopkova, P., Tighe, S. K., Tortorella, A., Turecki, G., Volkert, J., Witt, S., Wright, A., Young, L. T., Zandi, P. P., Potash, J. B., DePaulo, J. R., Bauer, M., Reininghaus, E. Z., Novak, T., Aubry, J. M., Maj, M., Baune, B. T., Mitchell, P. B., Vieta, E., Frye, M. A., Rybakowski, J. K., Kuo, P. H., Kato, T., Grigoriou-Serbanescu, M., Reif, A., Del Zompo, M., Bellivier, F., Schalling, M., Wray, N. R., Kelsoe, J. R., Alda, M., Rietschel, M., McMahon, F. J., and Schulze, T. G. (2016) Genetic variants associated with response to lithium treatment in bipolar disorder: a genome-wide association study. *Lancet* **387**, 1085-1093
5. Craddock, N., and Sklar, P. (2009) Genetics of bipolar disorder: successful start to a long journey. *Trends Genet* **25**, 99-105
6. Siciliano, G., Tessa, A., Petrini, S., Mancuso, M., Bruno, C., Grieco, G. S., Malandrini, A., DeFlorio, L., Martini, B., Federico, A., Nappi, G., Santorelli, F. M., and Murri, L. (2003) Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder

- associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscular disorders : NMD* **13**, 162-165
7. Kasahara, T., Ishiwata, M., Kakiuchi, C., Fuke, S., Iwata, N., Ozaki, N., Kunugi, H., Minabe, Y., Nakamura, K., Iwata, Y., Fujii, K., Kanba, S., Ujike, H., Kusumi, I., Kataoka, M., Matoba, N., Takata, A., Iwamoto, K., Yoshikawa, T., and Kato, T. (2017) Enrichment of deleterious variants of mitochondrial DNA polymerase gene (POLG1) in bipolar disorder. *Psychiatry and clinical neurosciences* **71**, 518-529
 8. Kasahara, T., Takata, A., Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Sawada, T., Kakita, A., Mizukami, H., Kaneda, D., Ozawa, K., and Kato, T. (2016) Depression-like episodes in mice harboring mtDNA deletions in paraventricular thalamus. *Molecular psychiatry* **21**, 39-48
 9. Nanko, S., Yokoyama, H., Hoshino, Y., Kumashiro, H., and Mikuni, M. (1992) Organic mood syndrome in two siblings with Wolfram syndrome. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* **161**, 282
 10. Jacobsen, N. J., Lyons, I., Hoogendoorn, B., Burge, S., Kwok, P. Y., O'Donovan, M. C., Craddock, N., and Owen, M. J. (1999) ATP2A2 mutations in Darier's disease and their relationship to neuropsychiatric phenotypes. *Hum Mol Genet* **8**, 1631-1636
 11. Nakamura, T., Kazuno, A. A., Nakajima, K., Kusumi, I., Tsuboi, T., and Kato, T. (2016) Loss of function mutations in ATP2A2 and psychoses: A case report and literature survey. *Psychiatry and clinical neurosciences* **70**, 342-350
 12. Ozaki, K., Ohnishi, Y., Iida, A., Sekine, A., Yamada, R., Tsunoda, T., Sato, H., Sato, H., Hori, M., Nakamura, Y., and Tanaka, T. (2002) Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nature genetics* **32**, 650-654
 13. Consortium., S. W. G. o. t. P. G. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **511**, 421-427
 14. Pardiñas, A. F., Holmans, P., Pocklington, A. J., Escott-Price, V., Ripke, S., Carrera, N., Legge, S. E., Bishop, S., Cameron, D., Hamshere, M. L., Han, J., Hubbard, L., Lynham, A., Mantripragada, K., Rees, E., MacCabe, J. H., McCarroll, S. A., Baune, B. T., Breen, G., Byrne, E. M., Dannlowski, U., Eley, T. C., Hayward, C., Martin, N. G., McIntosh, A. M., Plomin, R., Porteous, D. J., Wray, N. R., Caballero, A., Geschwind, D. H., Huckins, L. M., Ruderfer, D. M., Santiago, E., Sklar, P., Stahl, E. A., Won, H., Agerbo, E., Als, T. D., Andreassen, O. A., Baekvad-Hansen, M., Mortensen, P. B., Pedersen, C. B., Borglum, A. D., Bybjerg-Grauholm, J., Djurovic, S., Durmishi, N., Pedersen, M. G., Golimbet, V.,

- Grove, J., Hougaard, D. M., Mattheisen, M., Molden, E., Mors, O., Nordentoft, M., Pejovic-Milovancevic, M., Sigurdsson, E., Silagadze, T., Hansen, C. S., Stefansson, K., Stefansson, H., Steinberg, S., Tosato, S., Werge, T., Collier, D. A., Rujescu, D., Kirov, G., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., and Walters, J. T. R. (2018) Common schizophrenia alleles are enriched in mutation-intolerant genes and in regions under strong background selection. *Nature genetics* **50**, 381-389
15. De Rubeis, S., He, X., Goldberg, A. P., Poultney, C. S., Samocha, K., Cicek, A. E., Kou, Y., Liu, L., Fromer, M., Walker, S., Singh, T., Klei, L., Kosmicki, J., Shih-Chen, F., Aleksic, B., Biscaldi, M., Bolton, P. F., Brownfeld, J. M., Cai, J., Campbell, N. G., Carracedo, A., Chahrour, M. H., Chiacchetti, A. G., Coon, H., Crawford, E. L., Curran, S. R., Dawson, G., Duketis, E., Fernandez, B. A., Gallagher, L., Geller, E., Guter, S. J., Hill, R. S., Ionita-Laza, J., Jimenez Gonzalez, P., Kilpinen, H., Klauck, S. M., Klevzon, A., Lee, I., Lei, I., Lei, J., Lehtimaki, T., Lin, C. F., Ma'ayan, A., Marshall, C. R., McInnes, A. L., Neale, B., Owen, M. J., Ozaki, N., Parellada, M., Parr, J. R., Purcell, S., Puura, K., Rajagopalan, D., Rehnstrom, K., Reichenberg, A., Sabo, A., Sachse, M., Sanders, S. J., Schafer, C., Schulte-Ruther, M., Skuse, D., Stevens, C., Szatmari, P., Tammimies, K., Valladares, O., Voran, A., Li-San, W., Weiss, L. A., Willsey, A. J., Yu, T. W., Yuen, R. K., Cook, E. H., Freitag, C. M., Gill, M., Hultman, C. M., Lehner, T., Palotie, A., Schellenberg, G. D., Sklar, P., State, M. W., Sutcliffe, J. S., Walsh, C. A., Scherer, S. W., Zwick, M. E., Barrett, J. C., Cutler, D. J., Roeder, K., Devlin, B., Daly, M. J., and Buxbaum, J. D. (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**, 209-215
16. Iossifov, I., O'Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepker, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E., Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., Sullivan, C. A., Walker, M. F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A. J., Yamrom, B., Lee, Y. H., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M. C., Ye, K., McCombie, W. R., Shendure, J., Eichler, E. E., State, M. W., and Wigler, M. (2014) The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216-221
17. Katayama, Y., Nishiyama, M., Shoji, H., Ohkawa, Y., Kawamura, A., Sato, T., Suyama, M., Takumi, T., Miyakawa, T., and Nakayama, K. I. (2016) CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature* **537**, 675-679

18. Takata, A., Miyake, N., Tsurusaki, Y., Fukai, R., Miyatake, S., Koshimizu, E., Kushima, I., Okada, T., Morikawa, M., Uno, Y., Ishizuka, K., Nakamura, K., Tsujii, M., Yoshikawa, T., Toyota, T., Okamoto, N., Hiraki, Y., Hashimoto, R., Yasuda, Y., Saitoh, S., Ohashi, K., Sakai, Y., Ohga, S., Hara, T., Kato, M., Nakamura, K., Ito, A., Seiwa, C., Shirahata, E., Osaka, H., Matsumoto, A., Takeshita, S., Tohyama, J., Saikusa, T., Matsuishi, T., Nakamura, T., Tsuboi, T., Kato, T., Suzuki, T., Saito, H., Nakashima, M., Mizuguchi, T., Tanaka, F., Mori, N., Ozaki, N., and Matsumoto, N. (2018) Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Rep* **22**, 734-747
19. Takata, A., Xu, B., Ionita-Laza, I., Roos, J. L., Gogos, J. A., and Karayiorgou, M. (2014) Loss-of-function variants in schizophrenia risk and SETD1A as a candidate susceptibility gene. *Neuron* **82**, 773-780
20. Singh, T., Kurki, M. I., Curtis, D., Purcell, S. M., Crooks, L., McRae, J., Suvisaari, J., Chheda, H., Blackwood, D., Breen, G., Pietilainen, O., Gerety, S. S., Ayub, M., Blyth, M., Cole, T., Collier, D., Coomber, E. L., Craddock, N., Daly, M. J., Danesh, J., DiForti, M., Foster, A., Freimer, N. B., Geschwind, D., Johnstone, M., Joss, S., Kirov, G., Korkko, J., Kuismin, O., Holmans, P., Hultman, C. M., Iyegbe, C., Lonnqvist, J., Mannikko, M., McCarroll, S. A., McGuffin, P., McIntosh, A. M., McQuillin, A., Moilanen, J. S., Moore, C., Murray, R. M., Newbury-Ecob, R., Ouwehand, W., Paunio, T., Prigmore, E., Rees, E., Roberts, D., Sambrook, J., Sklar, P., St Clair, D., Veijola, J., Walters, J. T., Williams, H., Sullivan, P. F., Hurler, M. E., O'Donovan, M. C., Palotie, A., Owen, M. J., and Barrett, J. C. (2016) Rare loss-of-function variants in SETD1A are associated with schizophrenia and developmental disorders. *Nature neuroscience* **19**, 571-577
21. Mukai, J., Cannavo, E., Crabtree, G. W., Sun, Z., Diamantopoulou, A., Thakur, P., Chang, C. Y., Cai, Y., Lomvardas, S., Takata, A., Xu, B., and Gogos, J. A. (2019) Recapitulation and Reversal of Schizophrenia-Related Phenotypes in Setd1a-Deficient Mice. *Neuron* **104**, 471-487.e412
22. Sklar, P., Smoller, J. W., Fan, J., Ferreira, M. A., Perlis, R. H., Chambert, K., Nimgaonkar, V. L., McQueen, M. B., Faraone, S. V., Kirby, A., de Bakker, P. I., Ogdie, M. N., Thase, M. E., Sachs, G. S., Todd-Brown, K., Gabriel, S. B., Sougnez, C., Gates, C., Blumenstiel, B., Defelice, M., Ardlie, K. G., Franklin, J., Muir, W. J., McGhee, K. A., MacIntyre, D. J., McLean, A., VanBeck, M., McQuillin, A., Bass, N. J., Robinson, M., Lawrence, J., Anjorin, A., Curtis, D., Scolnick, E. M., Daly, M. J., Blackwood, D. H., Gurling, H. M., and Purcell, S. M. (2008) Whole-genome association study of bipolar disorder. *Molecular*

psychiatry **13**, 558-569

23. Group, P. G. C. B. D. W. (2011) Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nature genetics* **43**, 977-983
24. Hou, L., Bergen, S. E., Akula, N., Song, J., Hultman, C. M., Landen, M., Adli, M., Alda, M., Ardu, R., Arias, B., Aubry, J. M., Backlund, L., Badner, J. A., Barrett, T. B., Bauer, M., Baune, B. T., Bellivier, F., Benabarre, A., Bengesser, S., Berrettini, W. H., Bhattacharjee, A. K., Biernacka, J. M., Birner, A., Bloss, C. S., Brichant-Petitjean, C., Bui, E. T., Byerley, W., Cervantes, P., Chillotti, C., Cichon, S., Colom, F., Coryell, W., Craig, D. W., Cruceanu, C., Czerski, P. M., Davis, T., Dayer, A., Degenhardt, F., Del Zompo, M., DePaulo, J. R., Edenberg, H. J., Etain, B., Falkai, P., Foroud, T., Forstner, A. J., Frisen, L., Frye, M. A., Fullerton, J. M., Gard, S., Garnham, J. S., Gershon, E. S., Goes, F. S., Greenwood, T. A., Grigoriou-Serbanescu, M., Hauser, J., Heilbronner, U., Heilmann-Heimbach, S., Herms, S., Hipolito, M., Hitturlingappa, S., Hoffmann, P., Hofmann, A., Jamain, S., Jimenez, E., Kahn, J. P., Kassem, L., Kelsoe, J. R., Kittel-Schneider, S., Kliwicky, S., Koller, D. L., Konig, B., Lackner, N., Laje, G., Lang, M., Lavebratt, C., Lawson, W. B., Leboyer, M., Leckband, S. G., Liu, C., Maaser, A., Mahon, P. B., Maier, W., Maj, M., Manchia, M., Martinsson, L., McCarthy, M. J., McElroy, S. L., McInnis, M. G., McKinney, R., Mitchell, P. B., Mitjans, M., Mondimore, F. M., Monteleone, P., Muhleisen, T. W., Nievergelt, C. M., Nothen, M. M., Novak, T., Nurnberger, J. I., Jr., Nwulia, E. A., Osby, U., Pfennig, A., Potash, J. B., Propping, P., Reif, A., Reininghaus, E., Rice, J., Rietschel, M., Rouleau, G. A., Rybakowski, J. K., Schalling, M., Scheftner, W. A., Schofield, P. R., Schork, N. J., Schulze, T. G., Schumacher, J., Schweizer, B. W., Severino, G., Shekhtman, T., Shilling, P. D., Simhandl, C., Slaney, C. M., Smith, E. N., Squassina, A., Stamm, T., Stopkova, P., Streit, F., Strohmaier, J., Szeling, S., Tighe, S. K., Tortorella, A., Turecki, G., Vieta, E., Volkert, J., Witt, S. H., Wright, A., Zandi, P. P., Zhang, P., Zollner, S., and McMahon, F. J. (2016) Genome-wide association study of 40,000 individuals identifies two novel loci associated with bipolar disorder. *Hum Mol Genet* **25**, 3383-3394
25. Stahl, E. A., Breen, G., Forstner, A. J., McQuillin, A., Ripke, S., Trubetskoy, V., Mattheisen, M., Wang, Y., Coleman, J. R. I., Gaspar, H. A., de Leeuw, C. A., Steinberg, S., Pavlides, J. M. W., Trzaskowski, M., Byrne, E. M., Pers, T. H., Holmans, P. A., Richards, A. L., Abbott, L., Agerbo, E., Akil, H., Albani, D., Alliey-Rodriguez, N., Als, T. D., Anjorin, A., Antilla, V., Awasthi, S., Badner, J. A., Bækvad-Hansen, M., Barchas, J. D., Bass, N., Bauer, M., Belliveau, R., Bergen, S. E., Pedersen, C. B., Bøen, E., Boks,

M. P., Boocock, J., Budde, M., Bunney, W., Burmeister, M., Bybjerg-Grauholm, J., Byerley, W., Casas, M., Cerrato, F., Cervantes, P., Chambert, K., Charney, A. W., Chen, D., Churchhouse, C., Clarke, T.-K., Coryell, W., Craig, D. W., Cruceanu, C., Curtis, D., Czerski, P. M., Dale, A. M., de Jong, S., Degenhardt, F., Del-Favero, J., DePaulo, J. R., Djurovic, S., Dobbyn, A. L., Dumont, A., Elvsåshagen, T., Escott-Price, V., Fan, C. C., Fischer, S. B., Flickinger, M., Foroud, T. M., Forty, L., Frank, J., Fraser, C., Freimer, N. B., Frisén, L., Gade, K., Gage, D., Garnham, J., Giambartolomei, C., Pedersen, M. G., Goldstein, J., Gordon, S. D., Gordon-Smith, K., Green, E. K., Green, M. J., Greenwood, T. A., Grove, J., Guan, W., Guzman-Parra, J., Hamshere, M. L., Hautzinger, M., Heilbronner, U., Herms, S., Hipolito, M., Hoffmann, P., Holland, D., Huckins, L., Jamain, S., Johnson, J. S., Juréus, A., Kandaswamy, R., Karlsson, R., Kennedy, J. L., Kittel-Schneider, S., Knowles, J. A., Kogevinas, M., Koller, A. C., Kupka, R., Lavebratt, C., Lawrence, J., Lawson, W. B., Leber, M., Lee, P. H., Levy, S. E., Li, J. Z., Liu, C., Lucae, S., Maaser, A., MacIntyre, D. J., Mahon, P. B., Maier, W., Martinsson, L., McCarroll, S., McGuffin, P., McInnis, M. G., McKay, J. D., Medeiros, H., Medland, S. E., Meng, F., Milani, L., Montgomery, G. W., Morris, D. W., Mühleisen, T. W., Mullins, N., Nguyen, H., Nievergelt, C. M., Adolfsson, A. N., Nwulia, E. A., O'Donovan, C., Loohuis, L. M. O., Ori, A. P. S., Oruc, L., Ösby, U., Perlis, R. H., Perry, A., Pfennig, A., Potash, J. B., Purcell, S. M., Regeer, E. J., Reif, A., Reinbold, C. S., Rice, J. P., Rivas, F., Rivera, M., Roussos, P., Ruderfer, D. M., Ryu, E., Sánchez-Mora, C., Schatzberg, A. F., Scheftner, W. A., Schork, N. J., Shannon Weickert, C., Shekhtman, T., Shilling, P. D., Sigurdsson, E., Slaney, C., Smeland, O. B., Sobell, J. L., Søholm Hansen, C., Spijker, A. T., St Clair, D., Steffens, M., Strauss, J. S., Streit, F., Strohmaier, J., Szelinger, S., Thompson, R. C., Thorgeirsson, T. E., Treutlein, J., Vedder, H., Wang, W., Watson, S. J., Weickert, T. W., Witt, S. H., Xi, S., Xu, W., Young, A. H., Zandi, P., Zhang, P., Zöllner, S., Adolfsson, R., Agartz, I., Alda, M., Backlund, L., Baune, B. T., Bellivier, F., Berrettini, W. H., Biernacka, J. M., Blackwood, D. H. R., Boehnke, M., Børglum, A. D., Corvin, A., Craddock, N., Daly, M. J., Dannlowski, U., Esko, T., Etain, B., Frye, M., Fullerton, J. M., Gershon, E. S., Gill, M., Goes, F., Grigoriou-Serbanescu, M., Hauser, J., Hougaard, D. M., Hultman, C. M., Jones, I., Jones, L. A., Kahn, R. S., Kirov, G., Landén, M., Leboyer, M., Lewis, C. M., Li, Q. S., Lissowska, J., Martin, N. G., Mayoral, F., McElroy, S. L., McIntosh, A. M., McMahon, F. J., Melle, I., Metspalu, A., Mitchell, P. B., Morken, G., Mors, O., Mortensen, P. B., Müller-Myhsok, B., Myers, R. M., Neale, B. M., Nimgaonkar, V., Nordentoft, M., Nöthen, M. M., O'Donovan, M. C., Oedegaard, K. J., Owen, M. J., Paciga, S. A., Pato,

- C., Pato, M. T., Posthuma, D., Ramos-Quiroga, J. A., Ribasés, M., Rietschel, M., Rouleau, G. A., Schalling, M., Schofield, P. R., Schulze, T. G., Serretti, A., Smoller, J. W., Stefansson, H., Stefansson, K., Stordal, E., Sullivan, P. F., Turecki, G., Vaaler, A. E., Vieta, E., Vincent, J. B., Werge, T., Nurnberger, J. I., Wray, N. R., Di Florio, A., Edenberg, H. J., Cichon, S., Ophoff, R. A., Scott, L. J., Andreassen, O. A., Kelsoe, J., Sklar, P., e, Q. C., Consortium, B., and the Bipolar Disorder Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2019) Genome-wide association study identifies 30 loci associated with bipolar disorder. *Nature genetics* **51**, 793-803
26. Ikeda, M., Takahashi, A., Kamatani, Y., Okahisa, Y., Kunugi, H., Mori, N., Sasaki, T., Ohmori, T., Okamoto, Y., Kawasaki, H., Shimodera, S., Kato, T., Yoneda, H., Yoshimura, R., Iyo, M., Matsuda, K., Akiyama, M., Ashikawa, K., Kashiwase, K., Tokunaga, K., Kondo, K., Saito, T., Shimasaki, A., Kawase, K., Kitajima, T., Matsuo, K., Itokawa, M., Someya, T., Inada, T., Hashimoto, R., Inoue, T., Akiyama, K., Tanii, H., Arai, H., Kanba, S., Ozaki, N., Kusumi, I., Yoshikawa, T., Kubo, M., and Iwata, N. (2018) A genome-wide association study identifies two novel susceptibility loci and trans population polygenicity associated with bipolar disorder. *Molecular psychiatry* **23**, 639-647
27. Kataoka, M., Matoba, N., Sawada, T., Kazuno, A. A., Ishiwata, M., Fujii, K., Matsuo, K., Takata, A., and Kato, T. (2016) Exome sequencing for bipolar disorder points to roles of de novo loss-of-function and protein-altering mutations. *Molecular psychiatry* **21**, 885-893
28. Hebsgaard, S. M., Korning, P. G., Tolstrup, N., Engelbrecht, J., Rouze, P., and Brunak, S. (1996) Splice site prediction in Arabidopsis thaliana pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic acids research* **24**, 3439-3452
29. Xiong, H. Y., Alipanahi, B., Lee, L. J., Bretschneider, H., Merico, D., Yuen, R. K., Hua, Y., Gueroussov, S., Najafabadi, H. S., Hughes, T. R., Morris, Q., Barash, Y., Krainer, A. R., Jovic, N., Scherer, S. W., Blencowe, B. J., and Frey, B. J. (2015) RNA splicing. The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. *Science (New York, N.Y.)* **347**, 1254806
30. Nakamura, T., Jimbo, K., Nakajima, K., Tsuboi, T., and Kato, T. (2018) De novo UNC13B mutation identified in a bipolar disorder patient increases a rare exon-skipping variant. *Neuropsychopharmacology reports* **38**, 210-213
31. Nakamura, T., Ohsawa-Yoshida, N., Zhao, Y., Koebis, M., Oana, K., Mitsuhashi, H., and Ishiura, S. (2016) Splicing of human chloride channel 1. *Biochemistry and biophysics reports* **5**, 63-69

32. Michelassi, F., Liu, H., Hu, Z., and Dittman, J. S. (2017) A C1-C2 Module in Munc13 Inhibits Calcium-Dependent Neurotransmitter Release. *Neuron* **95**, 577-590.e575
33. Lai, Y., Choi, U. B., Leitz, J., Rhee, H. J., Lee, C., Altas, B., Zhao, M., Pfuetzner, R. A., Wang, A. L., Brose, N., Rhee, J., and Brunger, A. T. (2017) Molecular Mechanisms of Synaptic Vesicle Priming by Munc13 and Munc18. *Neuron* **95**, 591-607.e510
34. Warsh, J. J., Andreopoulos, S., and Li, P. P. (2004) Role of intracellular calcium signaling in the pathophysiology and pharmacotherapy of bipolar disorder: current status. *Clinical Neuroscience Research* **4**, 201-213
35. Egawa, J., Hoya, S., Watanabe, Y., Nunokawa, A., Shibuya, M., Ikeda, M., Inoue, E., Okuda, S., Kondo, K., Saito, T., Kaneko, N., Muratake, T., Igeta, H., Iwata, N., and Someya, T. (2016) Rare UNC13B variations and risk of schizophrenia: Whole-exome sequencing in a multiplex family and follow-up resequencing and a case-control study. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* **171**, 797-805
36. Mertens, J., Wang, Q. W., Kim, Y., Yu, D. X., Pham, S., Yang, B., Zheng, Y., Diffenderfer, K. E., Zhang, J., Soltani, S., Eames, T., Schafer, S. T., Boyer, L., Marchetto, M. C., Nurnberger, J. I., Calabrese, J. R., Odegaard, K. J., McCarthy, M. J., Zandi, P. P., Alda, M., Nievergelt, C. M., Mi, S., Brennand, K. J., Kelsoe, J. R., Gage, F. H., and Yao, J. (2015) Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature* **527**, 95-99
37. Tobe, B. T. D., Crain, A. M., Winkquist, A. M., Calabrese, B., Makihara, H., Zhao, W. N., Lalonde, J., Nakamura, H., Konopaske, G., Sidor, M., Pernia, C. D., Yamashita, N., Wada, M., Inoue, Y., Nakamura, F., Sheridan, S. D., Logan, R. W., Brandel, M., Wu, D., Hunsberger, J., Dorsett, L., Duerr, C., Basa, R. C. B., McCarthy, M. J., Udeshi, N. D., Mertins, P., Carr, S. A., Rouleau, G. A., Mastrangelo, L., Li, J., Gutierrez, G. J., Brill, L. M., Venizelos, N., Chen, G., Nye, J. S., Manji, H., Price, J. H., McClung, C. A., Akiskal, H. S., Alda, M., Chuang, D. M., Coyle, J. T., Liu, Y., Teng, Y. D., Ohshima, T., Mikoshiba, K., Sidman, R. L., Halpain, S., Haggarty, S. J., Goshima, Y., and Snyder, E. Y. (2017) Probing the lithium-response pathway in hiPSCs implicates the phosphoregulatory set-point for a cytoskeletal modulator in bipolar pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E4462-e4471
38. Lin, S. X., Grant, B., Hirsh, D., and Maxfield, F. R. (2001) Rme-1 regulates the distribution and function of the endocytic recycling compartment in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **3**, 567-572

39. George, M., Ying, G., Rainey, M. A., Solomon, A., Parikh, P. T., Gao, Q., Band, V., and Band, H. (2007) Shared as well as distinct roles of EHD proteins revealed by biochemical and functional comparisons in mammalian cells and *C. elegans*. *BMC Cell Biol* **8**, 3
40. Naslavsky, N., and Caplan, S. (2011) EHD proteins: key conductors of endocytic transport. *Trends Cell Biol* **21**, 122-131
41. Kieken, F., Jovic, M., Naslavsky, N., Caplan, S., and Sorgen, P. L. (2007) EH domain of EHD1. *J Biomol NMR* **39**, 323-329
42. Bahl, K., Xie, S., Spagnol, G., Sorgen, P., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2016) EHD3 Protein Is Required for Tubular Recycling Endosome Stabilization, and an Asparagine-Glutamic Acid Residue Pair within Its Eps15 Homology (EH) Domain Dictates Its Selective Binding to NPF Peptides. *J Biol Chem* **291**, 13465-13478
43. Kobayashi, H., and Fukuda, M. (2013) Rab35 establishes the EHD1-association site by coordinating two distinct effectors during neurite outgrowth. *J Cell Sci* **126**, 2424-2435
44. Rotem-Yehudar, R., Galperin, E., and Horowitz, M. (2001) Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29. *J Biol Chem* **276**, 33054-33060
45. Yap, C. C., Lasiecka, Z. M., Caplan, S., and Winckler, B. (2010) Alterations of EHD1/EHD4 protein levels interfere with L1/NgCAM endocytosis in neurons and disrupt axonal targeting. *J Neurosci* **30**, 6646-6657
46. Zhang, J., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2012) Rabs and EHDs: alternate modes for traffic control. *Biosci Rep* **32**, 17-23
47. Zhang, J., Naslavsky, N., and Caplan, S. (2012) EHDs meet the retromer: Complex regulation of retrograde transport. *Cell Logist* **2**, 161-165
48. Caplan, S., Naslavsky, N., Hartnell, L. M., Lodge, R., Polishchuk, R. S., Donaldson, J. G., and Bonifacino, J. S. (2002) A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *Embo j* **21**, 2557-2567
49. Jovic, M., Naslavsky, N., Rapaport, D., Horowitz, M., and Caplan, S. (2007) EHD1 regulates beta1 integrin endosomal transport: effects on focal adhesions, cell spreading and migration. *J Cell Sci* **120**, 802-814
50. Guilherme, A., Soriano, N. A., Furcinitti, P. S., and Czech, M. P. (2004) Role of EHD1 and EHBP1 in perinuclear sorting and insulin-regulated GLUT4 recycling in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**, 40062-40075
51. Park, M., Penick, E. C., Edwards, J. G., Kauer, J. A., and Ehlers, M. D. (2004) Recycling endosomes supply AMPA receptors for LTP. *Science (New York, N.Y.)* **305**, 1972-1975

52. Naslavsky, N., Rahajeng, J., Rapaport, D., Horowitz, M., and Caplan, S. (2007) EHD1 regulates cholesterol homeostasis and lipid droplet storage. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 792-799
53. Wei, S., Xu, Y., Shi, H., Wong, S. H., Han, W., Talbot, K., Hong, W., and Ong, W. Y. (2010) EHD1 is a synaptic protein that modulates exocytosis through binding to snapin. *Mol Cell Neurosci* **45**, 418-429
54. Kobayashi, H., Etoh, K., and Fukuda, M. (2014) Rab35 is translocated from Arf6-positive perinuclear recycling endosomes to neurite tips during neurite outgrowth. *Small GTPases* **5**, e29290
55. Nakamura, T., Nakajima, K., Ohnishi, T., Yoshikawa, T., Nakanishi, M., Takumi, T., Tsuboi, T., and Kato, T. (2018) Quantitative evaluation of incomplete preweaning lethality in mice by using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* **8**, 16025
56. Bhattacharyya, S., Rainey, M. A., Arya, P., Dutta, S., George, M., Storck, M. D., McComb, R. D., Muirhead, D., Todd, G. L., Gould, K., Datta, K., Gelineau-van Waes, J., Band, V., and Band, H. (2016) Endocytic recycling protein EHD1 regulates primary cilia morphogenesis and SHH signaling during neural tube development. *Sci Rep* **6**, 20727
57. Demonbreun, A. R., Swanson, K. E., Rossi, A. E., Deveaux, H. K., Earley, J. U., Allen, M. V., Arya, P., Bhattacharyya, S., Band, H., Pytel, P., and McNally, E. M. (2015) Eps 15 Homology Domain (EHD)-1 Remodels Transverse Tubules in Skeletal Muscle. *PLoS One* **10**, e0136679
58. Buggia-Prevot, V., Fernandez, C. G., Udayar, V., Vetrivel, K. S., Elie, A., Roseman, J., Sasse, V. A., Lefkow, M., Meckler, X., Bhattacharyya, S., George, M., Kar, S., Bindokas, V. P., Parent, A. T., Rajendran, L., Band, H., Vassar, R., and Thinakaran, G. (2013) A function for EHD family proteins in unidirectional retrograde dendritic transport of BACE1 and Alzheimer's disease Abeta production. *Cell Rep* **5**, 1552-1563
59. Wu, C., Cui, Z., Liu, Y., Zhang, J., Ding, W., Wang, S., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., and Chen, J. (2016) The importance of EHD1 in neurite outgrowth contributing to the functional recovery after spinal cord injury. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **52**, 24-32
60. Kamiya, A., Kubo, K., Tomoda, T., Takaki, M., Youn, R., Ozeki, Y., Sawamura, N., Park, U., Kudo, C., Okawa, M., Ross, C. A., Hatten, M. E., Nakajima, K., and Sawa, A. (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* **7**, 1167-1178

61. Brandon, N. J., Millar, J. K., Korth, C., Sive, H., Singh, K. K., and Sawa, A. (2009) Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. *J Neurosci* **29**, 12768-12775
62. Scotter, E. L., Chen, H. J., and Shaw, C. E. (2015) TDP-43 Proteinopathy and ALS: Insights into Disease Mechanisms and Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **12**, 352-363
63. Lek, M., Karczewski, K. J., Minikel, E. V., Samocha, K. E., Banks, E., Fennell, T., O'Donnell-Luria, A. H., Ware, J. S., Hill, A. J., Cummings, B. B., Tukiainen, T., Birnbaum, D. P., Kosmicki, J. A., Duncan, L. E., Estrada, K., Zhao, F., Zou, J., Pierce-Hoffman, E., Berghout, J., Cooper, D. N., Deflaux, N., DePristo, M., Do, R., Flannick, J., Fromer, M., Gauthier, L., Goldstein, J., Gupta, N., Howrigan, D., Kiezun, A., Kurki, M. I., Moonshine, A. L., Natarajan, P., Orozco, L., Peloso, G. M., Poplin, R., Rivas, M. A., Ruano-Rubio, V., Rose, S. A., Ruderfer, D. M., Shakir, K., Stenson, P. D., Stevens, C., Thomas, B. P., Tiao, G., Tusie-Luna, M. T., Weisburd, B., Won, H. H., Yu, D., Altshuler, D. M., Ardissino, D., Boehnke, M., Danesh, J., Donnelly, S., Elosua, R., Florez, J. C., Gabriel, S. B., Getz, G., Glatt, S. J., Hultman, C. M., Kathiresan, S., Laakso, M., McCarroll, S., McCarthy, M. I., McGovern, D., McPherson, R., Neale, B. M., Palotie, A., Purcell, S. M., Saleheen, D., Scharf, J. M., Sklar, P., Sullivan, P. F., Tuomilehto, J., Tsuang, M. T., Watkins, H. C., Wilson, J. G., Daly, M. J., and MacArthur, D. G. (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285-291
64. Petrovski, S., Wang, Q., Heinzen, E. L., Allen, A. S., and Goldstein, D. B. (2013) Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS genetics* **9**, e1003709
65. Hu, L., Su, P., Li, R., Yin, C., Zhang, Y., Shang, P., Yang, T., and Qian, A. (2016) Isoforms, structures, and functions of versatile spectraplakins MACF1. *BMB reports* **49**, 37-44
66. Miao, Z., Ali, A., Hu, L., Zhao, F., Yin, C., Chen, C., Yang, T., and Qian, A. (2017) Microtubule actin cross-linking factor 1, a novel potential target in cancer. *Cancer Science* **108**, 1953-1958
67. Goryunov, D., He, C.-Z., Lin, C.-S., Leung, C. L., and Liem, R. K. H. (2010) Nervous-tissue-specific elimination of microtubule-actin crosslinking factor 1a results in multiple developmental defects in the mouse brain. *Molecular and cellular neurosciences* **44**, 1-14
68. Ka, M., and Kim, W. Y. (2016) Microtubule-Actin Crosslinking Factor 1 Is Required for Dendritic Arborization and Axon Outgrowth in the Developing Brain. *Molecular*

- neurobiology* **53**, 6018-6032
69. Moffat, J. J., Ka, M., Jung, E. M., Smith, A. L., and Kim, W. Y. (2017) The role of MACF1 in nervous system development and maintenance. *Seminars in cell & developmental biology* **69**, 9-17
 70. Chen, H. J., Lin, C. M., Lin, C. S., Perez-Olle, R., Leung, C. L., and Liem, R. K. (2006) The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes & development* **20**, 1933-1945
 71. Ka, M., Jung, E. M., Mueller, U., and Kim, W. Y. (2014) MACF1 regulates the migration of pyramidal neurons via microtubule dynamics and GSK-3 signaling. *Developmental biology* **395**, 4-18
 72. Hu, L., Su, P., Yin, C., Zhang, Y., Li, R., Yan, K., Chen, Z., Li, D., Zhang, G., Wang, L., Miao, Z., Qian, A., and Xian, C. J. (2018) Microtubule actin crosslinking factor 1 promotes osteoblast differentiation by promoting beta-catenin/TCF1/Runx2 signaling axis. *Journal of cellular physiology* **233**, 1574-1584
 73. Kodama, A., Karakesisoglou, I., Wong, E., Vaezi, A., and Fuchs, E. (2003) ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* **115**, 343-354
 74. Fassett, J. T., Xu, X., Kwak, D., Wang, H., Liu, X., Hu, X., Bache, R. J., and Chen, Y. (2013) Microtubule Actin Cross-linking Factor 1 regulates cardiomyocyte microtubule distribution and adaptation to hemodynamic overload. *PloS one* **8**, e73887-e73887
 75. Ma, Y., Yue, J., Zhang, Y., Shi, C., Odenwald, M., Liang, W. G., Wei, Q., Goel, A., Gou, X., Zhang, J., Chen, S.-Y., Tang, W.-J., Turner, J. R., Yang, F., Liang, H., Qin, H., and Wu, X. (2017) ACF7 regulates inflammatory colitis and intestinal wound response by orchestrating tight junction dynamics. *Nature Communications* **8**, 15375
 76. Dobyns, W. B., Aldinger, K. A., Ishak, G. E., Mirzaa, G. M., Timms, A. E., Grout, M. E., Dremmen, M. H. G., Schot, R., Vandervore, L., van Slegtenhorst, M. A., Wilke, M., Kasteleijn, E., Lee, A. S., Barry, B. J., Chao, K. R., Szczaluba, K., Kobori, J., Hanson-Kahn, A., Bernstein, J. A., Carr, L., D'Arco, F., Miyana, K., Okazaki, T., Saito, Y., Sasaki, M., Das, S., Wheeler, M. M., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Engle, E. C., Verheijen, F. W., Doherty, D., and Mancini, G. M. S. (2018) MACF1 Mutations Encoding Highly Conserved Zinc-Binding Residues of the GAR Domain Cause Defects in Neuronal Migration and Axon Guidance. *American journal of human genetics* **103**, 1009-1021
 77. Lee, S., Lee, D. K., Dou, Y., Lee, J., Lee, B., Kwak, E., Kong, Y. Y., Lee, S. K., Roeder, R. G., and Lee, J. W. (2006) Coactivator as a target gene specificity determinant for histone H3 lysine 4 methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15392-15397

78. Nagase, T., Kikuno, R., Ishikawa, K., Hirosawa, M., and Ohara, O. (2000) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **7**, 143-150
79. Cheng, J., Blum, R., Bowman, C., Hu, D., Shilatifard, A., Shen, S., and Dynlacht, B. D. (2014) A role for H3K4 monomethylation in gene repression and partitioning of chromatin readers. *Molecular cell* **53**, 979-992
80. Dorigi, K. M., Swigut, T., Henriques, T., Bhanu, N. V., Scruggs, B. S., Nady, N., Still, C. D., 2nd, Garcia, B. A., Adelman, K., and Wysocka, J. (2017) Mll3 and Mll4 Facilitate Enhancer RNA Synthesis and Transcription from Promoters Independently of H3K4 Monomethylation. *Molecular cell* **66**, 568-576.e564
81. Lee, J., Saha, P. K., Yang, Q. H., Lee, S., Park, J. Y., Suh, Y., Lee, S. K., Chan, L., Roeder, R. G., and Lee, J. W. (2008) Targeted inactivation of MLL3 histone H3-Lys-4 methyltransferase activity in the mouse reveals vital roles for MLL3 in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19229-19234
82. Kim, D. H., Rhee, J. C., Yeo, S., Shen, R., Lee, S. K., Lee, J. W., and Lee, S. (2015) Crucial roles of mixed-lineage leukemia 3 and 4 as epigenetic switches of the hepatic circadian clock controlling bile acid homeostasis in mice. *Hepatology* **61**, 1012-1023
83. Valekunja, U. K., Edgar, R. S., Oklejewicz, M., van der Horst, G. T., O'Neill, J. S., Tamanini, F., Turner, D. J., and Reddy, A. B. (2013) Histone methyltransferase MLL3 contributes to genome-scale circadian transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1554-1559
84. Arcipowski, K. M., Bulic, M., Gurbuxani, S., and Licht, J. D. (2016) Loss of Mll3 Catalytic Function Promotes Aberrant Myelopoiesis. *PLoS One* **11**, e0162515
85. Chen, C., Liu, Y., Rappaport, A. R., Kitzing, T., Schultz, N., Zhao, Z., Shroff, A. S., Dickins, R. A., Vakoc, C. R., Bradner, J. E., Stock, W., LeBeau, M. M., Shannon, K. M., Kogan, S., Zuber, J., and Lowe, S. W. (2014) MLL3 is a haploinsufficient 7q tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Cancer cell* **25**, 652-665
86. Rampias, T., Karagiannis, D., Avgeris, M., Polyzos, A., Kokkalis, A., Kanaki, Z., Kousidou, E., Tzetis, M., Kanavakis, E., Stravodimos, K., Manola, K. N., Pantelias, G. E., Scorilas, A., and Klinakis, A. (2019) The lysine-specific methyltransferase KMT2C/MLL3 regulates DNA repair components in cancer. *EMBO Rep* **20**, e46821
87. Faundes, V., Newman, W. G., Bernardini, L., Canham, N., Clayton-Smith, J., Dallapiccola, B., Davies, S. J., Demos, M. K., Goldman, A., Gill, H., Horton, R., Kerr,

- B., Kumar, D., Lehman, A., McKee, S., Morton, J., Parker, M. J., Rankin, J., Robertson, L., Temple, I. K., and Banka, S. (2018) Histone Lysine Methylases and Demethylases in the Landscape of Human Developmental Disorders. *American journal of human genetics* **102**, 175-187
88. Willemsen, M. H., Vulto-van Silfhout, A. T., Nillesen, W. M., Wissink-Lindhout, W. M., van Bokhoven, H., Philip, N., Berry-Kravis, E. M., Kini, U., van Ravenswaaij-Arts, C. M., Delle Chiaie, B., Innes, A. M., Houge, G., Kosonen, T., Cremer, K., Fannemel, M., Stray-Pedersen, A., Reardon, W., Ignatius, J., Lachlan, K., Mircher, C., Helderma van den Enden, P. T., Mastebroek, M., Cohn-Hokke, P. E., Yntema, H. G., Drunat, S., and Kleefstra, T. (2012) Update on Kleefstra Syndrome. *Molecular syndromology* **2**, 202-212
89. Koemans, T. S., Kleefstra, T., Chubak, M. C., Stone, M. H., Reijnders, M. R. F., de Munnik, S., Willemsen, M. H., Fencikova, M., Stumpel, C., Bok, L. A., Sifuentes Saenz, M., Byerly, K. A., Baughn, L. B., Stegmann, A. P. A., Pfundt, R., Zhou, H., van Bokhoven, H., Schenck, A., and Kramer, J. M. (2017) Functional convergence of histone methyltransferases EHMT1 and KMT2C involved in intellectual disability and autism spectrum disorder. *PLoS genetics* **13**, e1006864
90. Kleefstra, T., Kramer, J. M., Neveling, K., Willemsen, M. H., Koemans, T. S., Vissers, L. E., Wissink-Lindhout, W., Fencikova, M., van den Akker, W. M., Kasri, N. N., Nillesen, W. M., Prescott, T., Clark, R. D., Devriendt, K., van Reeuwijk, J., de Brouwer, A. P., Gilissen, C., Zhou, H., Brunner, H. G., Veltman, J. A., Schenck, A., and van Bokhoven, H. (2012) Disruption of an EHMT1-associated chromatin-modification module causes intellectual disability. *American journal of human genetics* **91**, 73-82
91. Vallianatos, C. N., and Iwase, S. (2015) Disrupted intricacy of histone H3K4 methylation in neurodevelopmental disorders. *Epigenomics* **7**, 503-519
92. Ruzzo, E. K., Perez-Cano, L., Jung, J. Y., Wang, L. K., Kashef-Haghighi, D., Hartl, C., Singh, C., Xu, J., Hoekstra, J. N., Leventhal, O., Leppa, V. M., Gandal, M. J., Paskov, K., Stockham, N., Polioudakis, D., Lowe, J. K., Prober, D. A., Geschwind, D. H., and Wall, D. P. (2019) Inherited and De Novo Genetic Risk for Autism Impacts Shared Networks. *Cell* **178**, 850-866.e826
93. Howrigan, D. P., Rose, S. A., Samocha, K. E., Fromer, M., Cerrato, F., Chen, W. J., Churchhouse, C., Chambert, K., Chandler, S. D., Daly, M. J., Dumont, A., Genovese, G., Hwu, H.-G., Laird, N., Kosmicki, J. A., Moran, J. L., Roe, C., Singh, T., Wang, S.-H., Faraone, S. V., Glatt, S. J., McCarroll, S. A., Tsuang, M., and Neale, B. M. (2018) Schizophrenia risk conferred by protein-coding *de novo* mutations. *bioRxiv*,

495036

94. Moon, A. L., Haan, N., Wilkinson, L. S., Thomas, K. L., and Hall, J. (2018) CACNA1C: Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis. *Schizophrenia Bulletin* **44**, 958-965
95. Dao, D. T., Mahon, P. B., Cai, X., Kovacsics, C. E., Blackwell, R. A., Arad, M., Shi, J., Zandi, P. P., O'Donnell, P., Knowles, J. A., Weissman, M. M., Coryell, W., Scheftner, W. A., Lawson, W. B., Levinson, D. F., Thompson, S. M., Potash, J. B., and Gould, T. D. (2010) Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans. *Biological psychiatry* **68**, 801-810
96. Bavley, C. C., Fischer, D. K., Rizzo, B. K., and Rajadhyaksha, A. M. (2017) Cav1.2 channels mediate persistent chronic stress-induced behavioral deficits that are associated with prefrontal cortex activation of the p25/Cdk5-glucocorticoid receptor pathway. *Neurobiology of Stress* **7**, 27-37
97. Zhu, S., Corder, Z. A., Xiong, J., Chiu, C.-T., Artola, A., Zuo, Y., Nelson, A. D., Kim, T.-Y., Zaika, N., Woolums, B. M., Hess, E. J., Wang, X., Chuang, D.-M., Pletnikov, M. M., Jenkins, P. M., Tamashiro, K. L., and Ross, C. A. (2017) Genetic disruption of ankyrin-G in adult mouse forebrain causes cortical synapse alteration and behavior reminiscent of bipolar disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 10479-10484
98. Kato, T. M., Kubota-Sakashita, M., Fujimori-Tonou, N., Saitow, F., Fuke, S., Masuda, A., Itohara, S., Suzuki, H., and Kato, T. (2018) Ant1 mutant mice bridge the mitochondrial and serotonergic dysfunctions in bipolar disorder. *Molecular psychiatry* **23**, 2039-2049
99. Galsworthy, M. J., Amrein, I., Kuptsov, P. A., Poletaeva, I., Zinn, P., Rau, A., Vyssotski, A., and Lipp, H. P. (2005) A comparison of wild-caught wood mice and bank voles in the Intellicage: assessing exploration, daily activity patterns and place learning paradigms. *Behavioural brain research* **157**, 211-217
100. Masuda, A., Kobayashi, Y., Kogo, N., Saito, T., Saido, T. C., and Itohara, S. (2016) Cognitive deficits in single App knock-in mouse models. *Neurobiology of learning and memory* **135**, 73-82
101. Nakanishi, M., Nomura, J., Ji, X., Tamada, K., Arai, T., Takahashi, E., Bućan, M., and Takumi, T. (2017) Functional significance of rare neuroligin 1 variants found in autism. *PLoS genetics* **13**, e1006940
102. Hart, T., Chandrashekar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K. R., MacLeod, G.,

- Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., Mero, P., Dirks, P., Sidhu, S., Roth, F. P., Rissland, O. S., Durocher, D., Angers, S., and Moffat, J. (2015) High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* **163**, 1515-1526
103. Grosbellet, E., Dumont, S., Schuster-Klein, C., Guardiola-Lemaitre, B., Pevet, P., Criscuolo, F., and Challet, E. (2016) Circadian phenotyping of obese and diabetic db/db mice. *Biochimie* **124**, 198-206
104. Nakajima, K., Kazuno, A. A., Kelsoe, J., Nakanishi, M., Takumi, T., and Kato, T. (2016) Exome sequencing in the knockin mice generated using the CRISPR/Cas system. *Sci Rep* **6**, 34703
105. Uchimura, A., Higuchi, M., Minakuchi, Y., Ohno, M., Toyoda, A., Fujiyama, A., Miura, I., Wakana, S., Nishino, J., and Yagi, T. (2015) Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. *Genome research* **25**, 1125-1134
106. Akcakaya, P., Bobbin, M. L., Guo, J. A., Malagon-Lopez, J., Clement, K., Garcia, S. P., Fellows, M. D., Porritt, M. J., Firth, M. A., Carreras, A., Baccega, T., Seeliger, F., Bjursell, M., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Nitsch, R., Mayr, L. M., Pinello, L., Bohlooly-Y, M., Aryee, M. J., Maresca, M., and Joung, J. K. (2018) In vivo CRISPR editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *Nature* **561**, 416-419
107. Geoffroy, P. A., Scott, J., Boudebese, C., Lajnef, M., Henry, C., Leboyer, M., Bellivier, F., and Etain, B. (2015) Sleep in patients with remitted bipolar disorders: a meta-analysis of actigraphy studies. *Acta psychiatrica Scandinavica* **131**, 89-99
108. Ng, T. H., Chung, K. F., Ho, F. Y., Yeung, W. F., Yung, K. P., and Lam, T. H. (2015) Sleep-wake disturbance in interepisode bipolar disorder and high-risk individuals: a systematic review and meta-analysis. *Sleep medicine reviews* **20**, 46-58
109. Hensch, T., Wozniak, D., Spada, J., Sander, C., Ulke, C., Wittekind, D. A., Thiery, J., Loffler, M., Jawinski, P., and Hegerl, U. (2019) Vulnerability to bipolar disorder is linked to sleep and sleepiness. *Translational psychiatry* **9**, 294
110. Camelo, E. V. M., Velasques, B., Ribeiro, P., Netto, T., and Cheniaux, E. (2013) Attention impairment in bipolar disorder: A systematic review. *Psychology & Neuroscience* **6**, 299-309
111. Miyazaki, Kayoko W., Miyazaki, K., Tanaka, Kenji F., Yamanaka, A., Takahashi, A., Tabuchi, S., and Doya, K. (2014) Optogenetic Activation of Dorsal Raphe Serotonin Neurons Enhances Patience for Future Rewards. *Current Biology* **24**, 2033-2040

112. 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., and Takumi, T. (2009) Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* **137**, 1235-1246
113. Hazlett, H. C., Gu, H., Munsell, B. C., Kim, S. H., Styner, M., Wolff, J. J., Elison, J. T., Swanson, M. R., Zhu, H., Botteron, K. N., Collins, D. L., Constantino, J. N., Dager, S. R., Estes, A. M., Evans, A. C., Fonov, V. S., Gerig, G., Kostopoulos, P., McKinstry, R. C., Pandey, J., Paterson, S., Pruett, J. R., Schultz, R. T., Shaw, D. W., Zwaigenbaum, L., Piven, J., Piven, J., Hazlett, H. C., Chappell, C., Dager, S. R., Estes, A. M., Shaw, D. W., Botteron, K. N., McKinstry, R. C., Constantino, J. N., Pruett Jr, J. R., Schultz, R. T., Paterson, S., Zwaigenbaum, L., Elison, J. T., Wolff, J. J., Evans, A. C., Collins, D. L., Pike, G. B., Fonov, V. S., Kostopoulos, P., Das, S., Gerig, G., Styner, M., Gu, C. H., The, I. N., Clinical, S., Data Coordinating, C., Image Processing, C., and Statistical, A. (2017) Early brain development in infants at high risk for autism spectrum disorder. *Nature* **542**, 348-351
114. Phan, B. N., Page, S. C., Campbell, M. N., Bohlen, J. F., Thaxton, C. L., Simon, J. M., Burke, E. E., Shin, J. H., Kennedy, A. J., Sweatt, J. D., Philpot, B. D., Jaffe, A. E., and Maher, B. J. (2017) Defects of myelination are common pathophysiology in syndromic and idiopathic autism spectrum disorder. *bioRxiv*, 128124
115. Clayton, J. A. (2016) Studying both sexes: a guiding principle for biomedicine. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **30**, 519-524
116. Kobayashi, Y., Sano, Y., Vannoni, E., Goto, H., Suzuki, H., Oba, A., Kawasaki, H., Kanba, S., Lipp, H. P., Murphy, N. P., Wolfer, D. P., and Itohara, S. (2013) Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience* **7**, 17

謝辞

本研究は、数多くの方々のご協力やご助言により実現されました。

共同研究者である、理化学研究所脳神経科学研究センター精神疾患動態研究チーム 加藤忠史 チームリーダーには、双極性障害研究の基礎からすべてをご指導頂きました。同チーム 中島一夫 研究員(当時)には、基本的な実験手技をご指導頂きました。また、笠原和起 副チームリーダー、高田篤 客員主幹研究員をはじめとする、理化学研究所脳神経科学研究センター精神疾患動態研究チームの皆様には、本研究に関しまして、様々なご助言を頂きました。この場を借りて、厚く御礼申し上げます。

また、理化学研究所脳神経科学研究センター行動遺伝学研究チーム(当時) 小林祐樹 研究員(当時)には、インテリケージの使用法およびデータ解析方法をご指導頂きました。理化学研究所脳神経科学研究センター精神生物学研究チーム 仲西萌絵 基礎科学特別研究員には、超音波発声測定の方法をお教え頂きました。また、理化学研究所脳神経科学研究センター研究基盤開発部門の皆様にも、様々な技術支援を頂きました。心より感謝申し上げます。

指導教員である東京大学総合文化研究科 坪井貴司 教授には、修士課程から計5年間、実験の進め方や論文の書き方など、研究者として必要な様々な能力をお教え頂きました。心より御礼申し上げます。また、原田一貴 助教をはじめとする坪井研究室の皆様には、これまでの研究生活の様々な場面で有意義な議論や貴重なご助言をしていただきました。御礼申し上げます。

最後に、大学院生活を支えてくださった、家族や周りのすべての方への感謝とともに、本論文を締めくくらせて頂きます。

どうもありがとうございました。