The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	自閉症スペクトラム障害関連遺伝子の神経系発達における機能解析
Author(s)	松村, 憲佑
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76501
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

自閉症スペクトラム障害関連遺伝子の神経系発達における機能解析

2020 年

大阪大学大学院　薬学研究科　医療薬学専攻

神経薬理学分野

松村　憲佑

目次

緒論 …… 1

本論 …… 4

第一章　自閉症スペクトラム障害関連遺伝子 POGZ の患者特異的 *de novo* 変異の大脳皮質神経発達における表現型解析 …… 4

実験結果 …… 5

考察 …… 30

第二章　自閉症スペクトラム障害関連タンパク protein kinase D2 の胎生期大脳皮質神経発達における機能解析 …… 36

実験結果 …… 37

考察 …… 41

総括 …… 44

実験方法 …… 46

謝辞 …… 63

参考文献 …… 65

緒論

自閉症スペクトラム障害 (ASD) や知的障害をはじめとする神経発達障害は、発達期の脳発達の異常によって発症すると考えられる疾患群である[1]。神経発達障害は、社会的相互作用やコミュニケーションの障害、反復的行動、興味の限局、IQ の低下、運動機能の低下など、多岐にわたる症状を示す非常に多様な疾患群である[2, 3]。近年、神経発達障害の発症割合は増加しており、神経発達障害克服の医療ニーズおよび社会的ニーズが高まっている。神経発達障害の中でも特に ASD の発症割合は 40 人に 1 人であり、世界的に増加傾向にある[4, 5]。ASD は一卵性双生児の発症一致率が約 90%であることから、その発症には遺伝的要因の寄与が大きいと考えられており[6]、遺伝子解析に基づいた ASD の原因解明が試みられてきた[6-8]。しかし、ASD は遺伝的に非常に多様な疾患であり、発症の分子基盤や病態メカニズムは不明な点が多く残されており、ASD の約 90% について、その発症の原因は不明である[9, 10]。また、根本的な治療法や中核症状に対する薬物療法は存在せず、ASD の病因や病態の分子メカニズムの解明と分子メカニズムに基づく創薬が求められている。

近年、健常者両親には存在せず、患者に突然変異として生じる *de novo* 変異と ASD や知的障害をはじめとする神経発達障害のリスクとの関連性が指摘されている[11-19]。特に、ASD は孤発例の患者が多いことや[20, 21]、受精時の父親の年齢の増加による ASD 発症率の増加と *de novo* 変異発生率の増加に相関があること[13, 14]、および約 3 - 10%の孤発性 ASD は遺伝子のエキソンに生じた *de novo* 変異が原因である可能性などが報告され[7, 17, 22]、*de novo* 変異は孤発性 ASD 発症に大きく寄与すると考えられる。そこで、近年大規模に全エキソンシーケンスが実施され、65 遺伝子について、その *de novo* 変異による機能異常が ASD 発症のリスクになる可能性があることが報告された[23]。実際に、この 65 遺伝子のうち、*ARID1B* と *CHD8* のハプロ不全モデルマウスが ASD 関連の表現型を示すことが報告されており、生物学的実験によって ASD 発症のリスクになる遺伝子が裏付けられつつある[24-30]。一方で、個々の *de novo* 変異による当該タンパクの機能異常やその変異の個体レベルの表現型を解析した例は少なく、*de novo* 変異と ASD の発症との関連性を明らかにするためには、個々の *de novo* 変異に着目した生物学的な実験が必要であると考えられる。

これまでに、私たちは大阪大学医学部精神科を含む多くの研究室との共同研究で、ASD 患者と健常者両親から成る日本人の 30 家系から 37 遺伝子のエキソンまたはスプライス部位に 38 個の *de novo* 変異を同定した[16]。そのうち 31 遺伝子の神経系における機能が不明であったことから、神経系の細胞株であるマウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞の神経発達における機能解析を行った結果、8 遺伝子が Neuro2a 細胞の神経発達を制御することを見出した[16]。そこで本研究では Neuro2a 細胞の神経発達の制御に関わる 8 遺伝子のうち、私たちが同定した *de novo* 変異を含めて複数の ASD 患者から *de novo* 変異が同定されている Pogo transposable element derived with ZNF domain (*POGZ*) および Protein kinase D2 (*PKD2*) に着目し、これらの遺伝子座の *de novo* 変異と ASD 発症

のリスクとの関連性について検討した。

POGZ は ASD、知的障害、White-Sutton 症候群などの神経発達障害患者から同定された *de novo* 変異が最も多い遺伝子の 1 つであり (Fig. 1a)、POGZ の機能異常が神経発達障害のリスクになる可能性が強く示唆される[13, 15-17, 23, 31-37]。しかし、POGZ の脳発達における機能および *POGZ* 遺伝子座上の *de novo* 変異が POGZ の機能に与える影響は未解明である。そこでまず、*de novo* 変異が POGZ の機能に与える影響を解析した結果、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ は、野生型の POGZ に比べ、その核局在率が減少することが明らかになった。一方で、健常者由来の *POGZ* の *de novo* 変異は POGZ の核局在率に影響を与えなかった。また、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ は DNA 結合能も減少していた[38]。次に、POGZ の脳発達における機能を解析した結果、POGZ がマウス大脳皮質神経細胞の発達を制御することを見出した。興味深いことに、健常者由来の *POGZ* の *de novo* 変異はマウス大脳皮質神経細胞の発達に影響を与えない一方で、ASD 患者由来の *de novo* 変異により、マウス大脳皮質神経細胞の発達が障害されることが示唆された。また、マウスを用いた検討と同様に、ASD 患者人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来の神経幹細胞も神経分化能の低下を示した (岡田翔太氏修士論文)。*POGZ* 遺伝子座上の *de novo* 変異の個体レベルの表現型を明らかにすることを目的として、ASD 患者由来のヒト *POGZ* の *de novo* Q1042R 変異に相当するマウス Q1038R 変異を導入した *de novo* 変異ヘテロノックインマウスを作出して表現型解析を行った結果、Q1038R ヘテロノックインマウスにおいて、大脳皮質神経細胞の発達の異常、成体期の大脳皮質の神経細胞の活動の過活性化、社会性行動の低下など、ASD 関連の表現型を見出した。また、AMPA 受容体阻害薬によって薬理学的に Q1038R ヘテロノックインマウスの神経細胞の過剰な活動を抑制した結果、Q1038R ヘテロノックインマウスの社会性行動の低下が回復した。これらの結果から、患者由来の *de novo* 変異による POGZ の機能異常が ASD と関連すること、および AMPA 受容体阻害薬が新たな ASD 治療薬になる可能性が示された[39]（第一章）。

PKD2 遺伝子産物は Protein kinase D ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである[40, 41]。私たちのこれまでの研究を含め、*PKD2* に ASD 患者から 2 つの *de novo* 変異が同定され、PKD2 の機能異常と ASD との関連性が示唆されるが[15, 16]、PKD2 の脳発達における機能、およびその *de novo* 変異が PKD2 の機能に与える影響は不明である。そこでマウス脳発達における PKD2 の機能解析を行った結果、PKD2 が大脳皮質神経幹細胞において高発現すること、および大脳皮質における神経幹細胞の神経分化と神経細胞の大脳皮質表層への移動を制御することを見出した。さらに、ASD 患者由来の *de novo* 変異が PKD2 のキナーゼ活性に与える影響を解析した結果、ASD 患者由来の *de novo* 変異によって PKD2 の自己リン酸化レベル、および PKD2 の下流シグナルである ERK のリン酸化レベルが低下することが明らかになった。以上の結果から、*PKD2* の *de novo* 変異による PKD2 の機能低下が ASD 発症のリスクファクターである可能性が示唆された[42]（第二章）。

ASD 発症の原因として脳発達の異常が示唆されているが[3]、その分子基盤は不明な点が多く残

されている。本研究は、これまでに解析例の少ない ASD 関連遺伝子の個々の *de novo* 変異に着目し、*de novo* 変異が当該遺伝子の機能に影響を与えることを示唆した点で、ASD の分子病態解明のために重要な知見であると考えられる。特に第一章は、ASD 患者由来の *de novo* 変異および健常者由来の *de novo* 変異の意義の *in vivo* での解析に加えて、*de novo* 変異を導入したヘテロノックインマウスを用いた、これまでに例のない研究手法によって、ASD 関連遺伝子の *de novo* 変異の疾患発症に関与する分子病態、および ASD の中核症状である社会性行動の低下を標的とした新たな治療戦略を示した点で社会的需要の高い研究であると考えている。

本論

第一章　自閉症スペクトラム障害関連遺伝子 ***POGZ*** の患者特異的 ***de novo*** 変異の大脳皮質神経発達における表現型解析

Pogo transposable element derived with ZNF domain (*POGZ*) は ASD や知的障害をはじめとする神経発達障害患者から同定された *de novo* 変異が最も多い遺伝子の 1 つであり、その遺伝子座に同定される *de novo* 変異は年々増加している[13, 15-17, 23, 31-37] (Fig. 1a)。また、*POGZ* の *de novo* 変異は ASD や知的障害、顔面形成異常を示す White-Sutton 症候群の原因であると考えられている[33, 34]。POGZ は転写調節因子である SP1、ヘテロクロマチンタンパクである HP1、およびクロマチンリモデリングに関与する CHD4 と相互作用することが報告されており[43-45]、POGZ は転写調節やクロマチンリモデリングに関わる可能性が考えられる。しかし、POGZ の脳発達における機能および神経発達障害患者由来の *de novo* 変異が POGZ に与える影響は不明であり、*POGZ* の *de novo* 変異と神経発達障害、特に ASD の病態との関連性は未解明である。

そこで本研究では、世界で初めて ASD 患者由来の *de novo* 変異 (Q1042R 変異) を導入したマウスモデルを作出した。*De novo* 変異ヘテロノックインマウスと、これまでに私たちが作出した *POGZ* に *de novo* 変異 (Q1042R 変異) を持つ ASD 患者由来の iPS 細胞を用いた検討 (岡田翔太氏修士論文) から、*POGZ* の *de novo* 変異によって大脳皮質神経細胞の発達が低下することを見出した。また、*de novo* 変異ヘテロノックインマウスは ASD に関連する行動異常を示し、その行動異常は成体期において薬理学的に回復させることが可能であることを示した。興味深いことに、健常者から同定された *POGZ* の *de novo* 変異は大脳皮質神経細胞の発達に影響を与えなかった。本研究によって、*POGZ* の *de novo* 変異による POGZ の機能異常が脳発達の異常および ASD 発症に寄与する可能性を初めて *in vivo* で示すことができた。

実験結果

De novo 変異が POGZ の核局在に与える影響の解析

POGZ は神経発達障害患者から数多くの *de novo* 変異が同定されている (Fig. 1a, c)。神経発達障害患者から同定された *de novo* 変異の 84.4%はタンパク切断型のナンセンス変異およびフレームシフト変異であり、特に C2H2 Zn finger domain と centromere protein-B-like DNA-binding (CENP-DB) domain の間または CENP-DB domain 上に集中している (Fig. 1a, c)。一方で、健常者から *POGZ* に同定された *de novo* 変異 (control *de novo* mutations) は全て 1 アミノ酸が置換するミスセンス変異であった (Fig. 1b, c)。健常者由来の *de novo* 変異は POGZ の領域に一様に存在しているのに対し、神経発達障害患者由来のナンセンス変異およびフレームシフト変異の多くは CENP-DB domain 近傍の N 末端側に存在していたことから、CENP-DB domain の機能異常が ASD をはじめとする神経発達障害の発症のリスクになる可能性が考えられた (Fig. 1d)。そこで本検討では ASD 患者由来の、CENP-DB domain 上のミスセンス変異および CENP-DB domain が切断または欠失するナンセンス変異に着目した。なお、ヒトとマウスの POGZ のアミノ酸は 93.9%が保存されており、以降の検討でマウスにおける *in vivo* 解析を行うため、本検討では野生型マウス POGZ (mPOGZ)、およびヒト *de novo* 変異に相当するマウス *de novo* 変異を導入した POGZ を用いた (Fig. 2)。

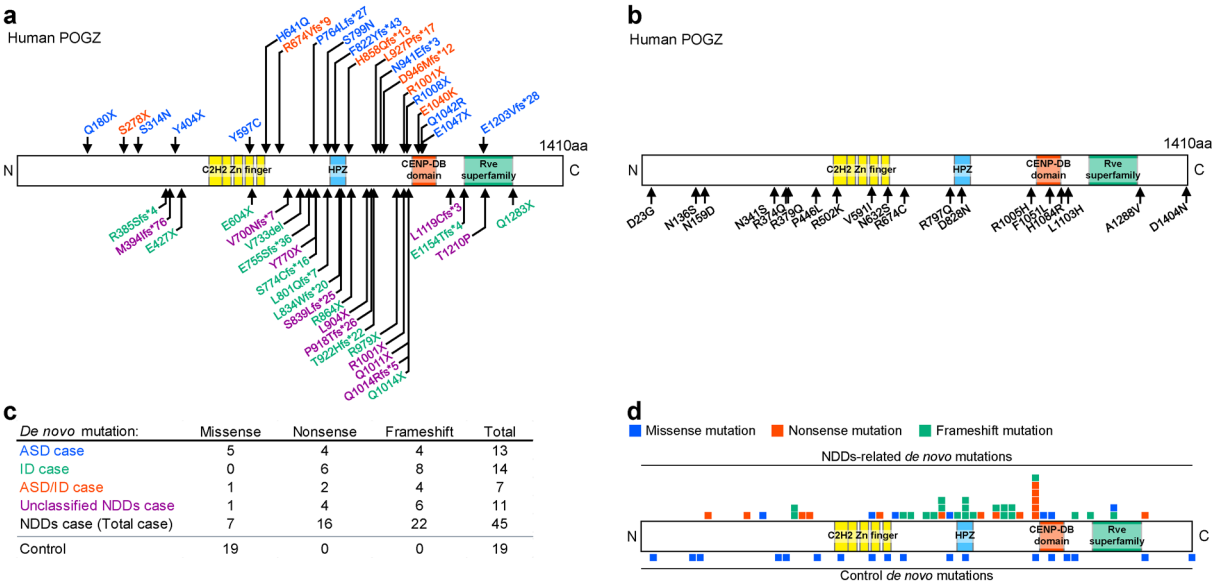


Fig. 1 | **ASD variants found in sporadic cases of Neurodevelopmental disorders (NDDs) and unaffected controls. a**, *De novo* mutations in POGZ identified in patients with Neurodevelopmental disorders (NDDs) (blue, ASD; green, Intellectual disability (ID); red, both ASD and ID; purple, unclassified NDDs). **b**, *De novo* mutations in POGZ identified in unaffected controls. **c**, The number of missense, nonsense and frameshift mutations identified in patients with NDDs and unaffected controls. **d**, Distribution of POGZ mutations identified in patients with NDDs and unaffected controls (blue, missense mutations; red, nonsense mutations; green, frameshift mutations). Note that the amino acid numbers are based on the human protein (NP_055915.2). This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

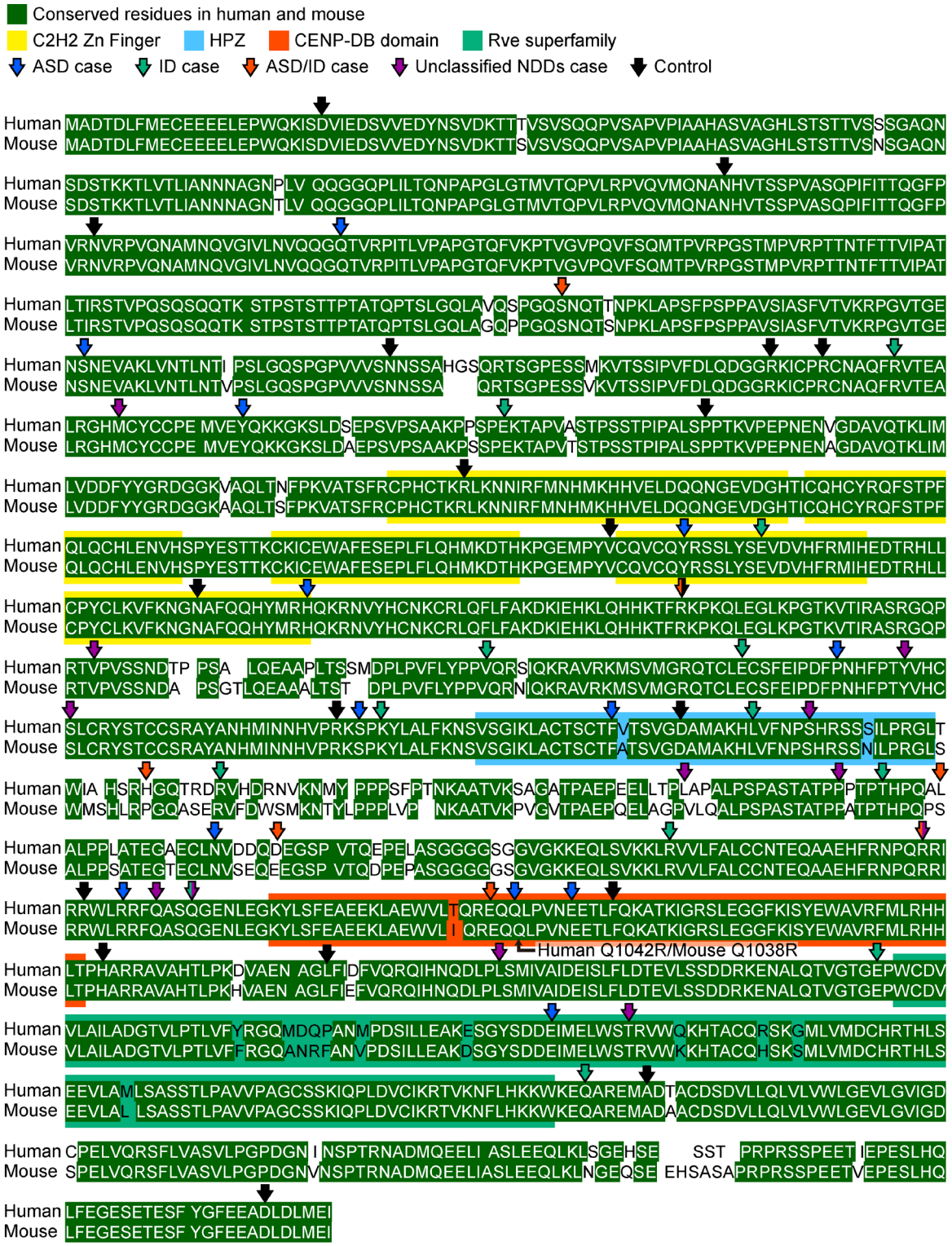


Fig. 2 | Amino acids sequence alignment of human and mouse POGZ. Conserved residues between human POGZ (NP_055915.2) and mouse POGZ (NP_766271.2) are highlighted in green. Yellow boxes indicate C2H2 Zn Finger domains. The blue box indicates HPZ domain. The red box indicates CENP-DB domain. The green box indicates Rve-superfamily. Blue arrows indicate residues mutated in sporadic ASD cases. Green arrows indicate residues mutated in sporadic ID cases. Red arrows indicate residues mutated in sporadic ASD/ID cases. Purple arrows indicate residues mutated in sporadic unclassified NDDs cases. Black arrows indicate residues mutated in unaffected controls. Note that the mouse Q1038R mutation is corresponding to the human Q1042R mutation (indicated by an arrow in the CENP-DB domain). This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

POGZ は DNA 結合ドメインを持ち、SP1、HP1、CHD4 などの核タンパクとの相互作用が報告されている[43-45]。神経細胞における POGZ の細胞内局在を解析した結果、POGZ は核に局在していた (Fig. 3a, b)。そこで、*de novo* 変異が POGZ の細胞内局在に与える影響を解析するため、myc タグを付加した野生型または *de novo* 変異を導入した *de novo* 変異型 POGZ を Neuro2a 細胞に一過性に過剰発現させ、myc タグによる免疫染色を行った。その結果、野生型 POGZ は核に局在していたのに対し、*de novo* 変異型 POGZ は細胞質に漏れ出している可能性が示された (Fig. 3c)。次に、myc タグを付加した野生型または *de novo* 変異型 POGZ を発現させた Neuro2a 細胞の細胞質と核を分画して、western blot によって各画分における POGZ の発現量を解析した。野生型のマウス由来 POGZ (WT-mPOGZ) は核に局在した一方で、CENP-B DB domain を欠失する ASD 患者由来の *de novo* ナンセンス変異体である R997X-mPOGZ (ヒト R1001X 変異に相当)、R1004X-mPOGZ (ヒト R1008X 変異に相当)、および E1043X-mPOGZ (ヒト E1047X 変異に相当) の核局在率は低下していた (Fig. 3d, e)。さらに興味深いことに、CENP-DB domain 上の ASD 患者由来の *de novo* ミスセンス変異体である E1036K-mPOGZ (ヒト E1040X 変異に相当) および Q1038R-mPOGZ (ヒト Q1042R 変異に相当) の核局在率も低下していた (Fig. 3f, g)。一方で、CENP-DB domain 上またはその近傍に存在する、健常者由来の *de novo* ミスセンス変異体である R1001H-mPOGZ (ヒト R1004H 変異に相当)、F1047L-mPOGZ (ヒト F1051L 変異に相当)、および H1080R-mPOGZ (ヒト H1084R 変異に相当) は WT-mPOGZ と同程度の核局在率を示した (Fig. 3h, i)。以上の結果から、*POGZ* の ASD 患者由来の *de novo* 変異によって POGZ の核局在率が低下することが明らかになった。さらに、ASD 患者由来の *de novo* ミスセンス変異については、ヒト神経芽細胞腫 SHSY-5Y 細胞に myc タグを付加したヒト由来の POGZ を一過性に強制発現させ、マウス POGZ を用いた実験と同様に核局在率を解析した。SHSY-5Y 細胞において野生型ヒト POGZ (WT-hPOGZ) は核に局在した一方で、ASD 患者由来の *de novo* ミスセンス変異を導入した E1040K-hPOGZ および Q1042R-hPOGZ の核局在率は低下していた (Fig. 3j, k)。これらの結果は、CENP-DB domain 上の *de novo* 変異による POGZ の核局在率の低下が、ASD 患者においても起きている可能性を示唆している。

ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ の核局在率は野生型 POGZ のそれに比べて低下していたが、*de novo* 変異型 POGZ の約 40%は核に存在していた。そこで、私たちが同定したミスセンス変異である *de novo* Q1042R 変異、および CENP-DB domain が欠失するナンセンス変異である *de novo* R1008X 変異に着目し、*de novo* 変異型 POGZ の DNA 結合能を評価した。野生型または *de novo* 変異型ヒト POGZ を過剰発現させた HEK293T 細胞の細胞抽出液と、CENPB が結合することが報告されている CENP-B Box 配列を含む 3'ビオチン付加 2 本鎖オリゴ DNA、およびストレプトアビジンビーズを混合し、オリゴ DNA と共沈降したタンパクを western blot によって解析した。野生型 POGZ は CENP-B Box 配列に結合すること、および *de novo* 変異型 POGZ の CENP-B Box 配列への結合能が低下していることが明らかになった (Fig. 4)。この結果から、ASD 患者由来の *de novo* 変異型 POGZ は核内においても正常に機能することができない可能性が考えられた。

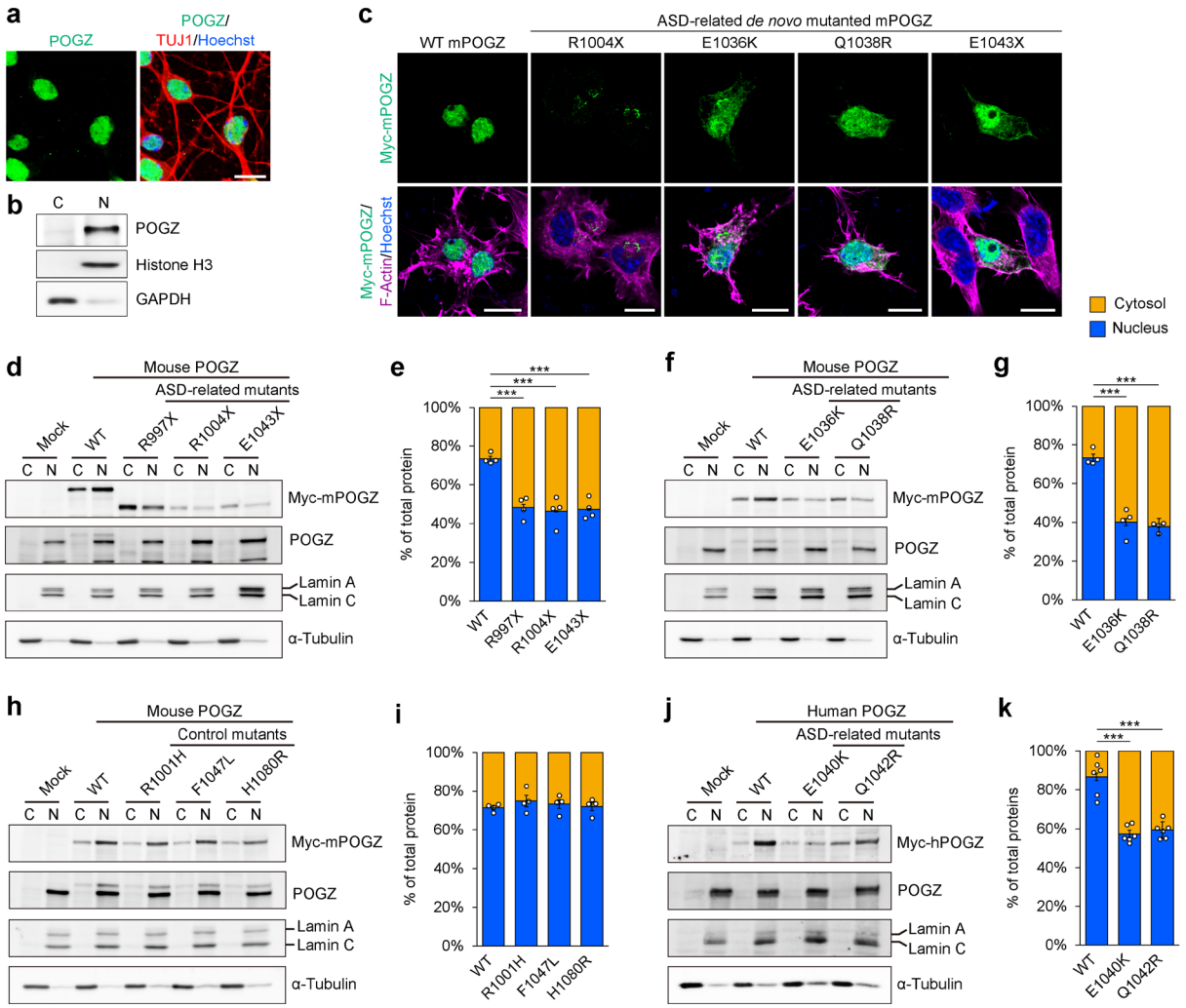


Fig. 3 | **ASD-related *de novo* mutations in POGZ impair the nuclear localization of the POGZ protein. a**, Double immunostaining for POGZ and a neuron marker, TUJ1 in dissociated embryonic cortical neurons (7 days *in vitro*). **b**, Western blots of the cytosolic and nuclear fractions from dissociated neurons for POGZ, GAPDH (a cytosolic marker), and Histone H3 (a nuclear marker). **c**, Myc-immunostaining and F-actin staining by Alexa Fluor 546-phalloidin showing nuclear localization of Myc-tagged overexpressed mouse (m) WT POGZ and disrupted cellular localization of Myc-tagged ASD-related *de novo* mutated mPOGZ variants in Neuro2a cells. **d**, **f**, **h**, Western blots of the cytosolic and nuclear fractions from Neuro2a cells transfected with Myc-tagged mPOGZ variants. **d**, **f**, ASD-related nonsense (**d**) or missense (**f**) mutations disrupted the nuclear localization of Myc-mPOGZ. **h**, Control mutations identified in unaffected healthy controls did not affect the nuclear localization of Myc-mPOGZ. **e**, **g**, **i**, Quantification of Myc-mPOGZ in cytosolic and nuclear fractions (each n = 4). **j**, Western blots of the cytosolic and nuclear fractions from SHSY-5Y cells transfected with Myc-tagged human (h) POGZ variants. ASD-related missense mutations disrupted the nuclear localization of Myc-hPOGZ. **k**, Quantification of Myc-hPOGZ in cytosolic and nuclear fractions (each n = 6). C, cytosolic fraction; N, nuclear fraction; WT, wild-type. Note that the amino acid numbers are based on the mouse protein (NP_766271.2) (**c-i**) and the human protein (NP_055915.2) (**j, k**). Scale bars, 10 μm. One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests, **e**, $F_{3, 12} = 23.12$; **g**, $F_{2, 9} = 67.45$; **i**, $F_{3, 12} = 0.491$; **k**, $F_{2, 15} = 38.98$. ***$P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the references [38, 39].

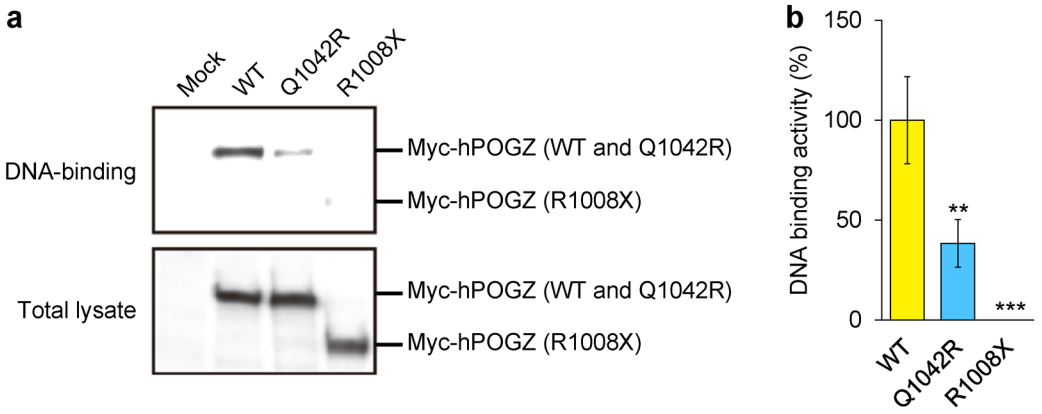


Fig. 4 | **ASD-associated *de novo* R1008X and Q1042R mutations disrupt the DNA-binding activity of POGZ. a**, Western blots of the precipitated proteins by DNA fragment carrying the CENP-B box sequence and total lysate from HEK293T cells transfected with myc-hPOGZ variants. **b**, Quantification of DNA-binding activity. WT but not R1008X POGZ binds a CENP-B box sequence. Notably, the Q1042R mutation led to a reduction of approximately 60 % in DNA binding (each n = 6). WT, wild-type. Note that the amino acid numbers are based on the the human protein (NP_055915.2). One-way ANOVA with Tukey-Kramer *post hoc* tests, $F_{2, 15} = 12.34$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs WT. The averaged WT value was set to 100 %. Data are expressed as the means ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [38].

マウスの脳発達における POGZ の機能解析

脳発達過程における *Pogz* の発現パターンを解析するため、胚齢 10 日から 8 週齢におけるマウス脳内の *Pogz* の発現量を定量的 RT-PCR によって解析した。その結果、*Pogz* は神経細胞の産生が盛んに起こる胚齢 14 日から 18 日の間に高発現することが明らかになった (Fig. 5a)。次に、*Pogz* の発現がピークになる胚齢 16 日マウス胚の各脳領域における *Pogz* の発現量を定量的 RT-PCR によって解析したところ、*Pogz* は神経幹細胞が多く存在する大脳皮質の脳室帯/脳室下帯 (VZ/SVZ) において高発現していることが明らかになった (Fig. 5b)。さらに、*Pogz* の Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) と神経幹細胞のマーカーである PAX6、SOX2、および神経前駆細胞のマーカーである TBR2 の免疫染色による共染色を行った結果、*Pogz* が神経細胞産生期の神経幹細胞および神経前駆細胞において発現していることが明らかになった (Fig. 5c)。これらの結果から、POGZ は大脳皮質において神経細胞の発達に関与している可能性が考えられた。

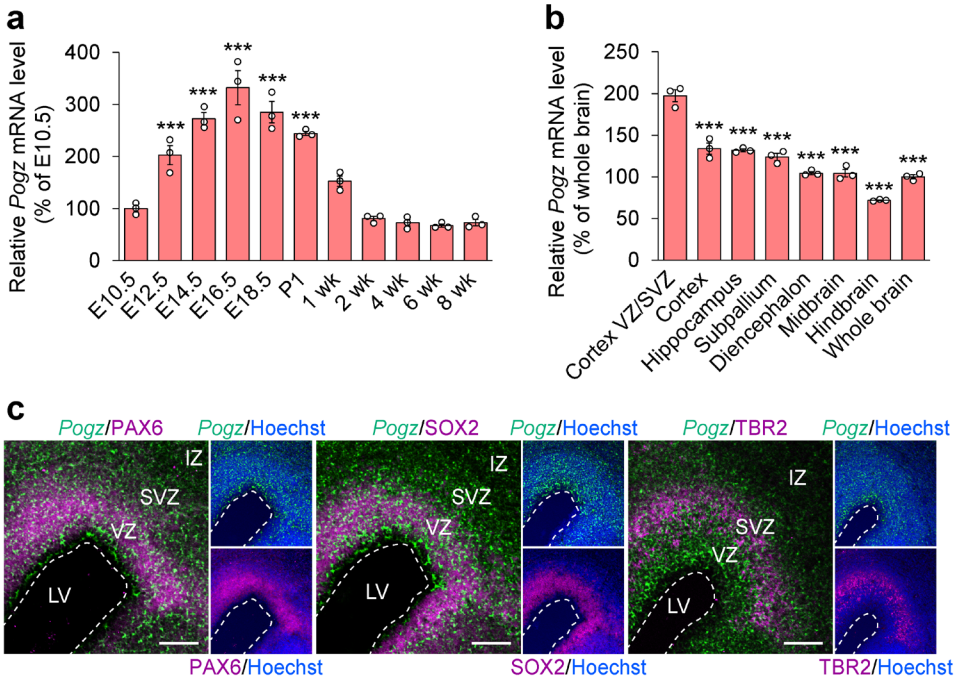


Fig. 5 | ***Pogz* is highly expressed in neural stem cells in the mouse developing cortex. a**, Temporal expression patterns of *Pogz* mRNA in the brain (each n = 3). E, embryonic day; wk, week-old. **b**, Regional expression pattern of *Pogz* mRNA in the brain at E16.5 (each n = 3). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. **c**, Fluorescence *in situ* hybridization of coronal sections of the E16.5 brain for *Pogz* and immunostaining with antibodies against PAX6, SOX2 and TBR2. Scale bars, 100 μm. LV, lateral ventricle; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; IZ, intermediate zone. **a**, **b**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **a**, $F_{10, 22} = 48.52$; **b**, $F_{7, 16} = 73.23$. ***$P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

大脳皮質神経細胞の発達における POGZ の機能を解明するため、*Pogz* を標的とする 4 種類の shRNA (MISSION TRC shRNA library SP1, SIGMA-Aldrich) と miR30-based shRNA (shRNA^{miR30}) を用いてノックダウン実験を行った。*In utero* electroporation 法によって胚齢 14 日マウス胚の大脳皮質 VZ の細胞に shRNA と GFP をそれぞれコードするプラスミドベクターを導入した。胚齢 18 日における大脳皮質を皮質板上層 (upper CP)、皮質板下層 (lower CP)、および中間層/脳室下帯 (IZ/SVZ) に分け、各層の GFP 陽性細胞数の割合を解析した。その結果、Control shRNA 導入群では GFP 陽性細胞が皮質板上層に移動し、正常な興奮性神経細胞の発達が観察された。*Pogz* ノックダウン群では GFP 陽性細胞の多くは IZ/SVZ に留まり、大脳皮質表層への移動が抑制されることが明らかになった。この大脳皮質上層への移動の抑制の程度は、shRNA のノックダウン効率との相関性が見られた (Fig. 6)。*Pogz* ノックダウンによる GFP 陽性細胞の移動の抑制は WT mPOGZ の強制発現によって回復した (Fig. 7a, b)。さらに、*Pogz* ノックダウンによって移動が抑制された GFP 陽性細胞の神経細胞種を同定するため、胚齢 18 日脳切片において大脳皮質 II/III 層の神経細胞のマーカーである SATB2、大脳皮質 V 層の神経細胞のマーカーである CTIP2、および大脳皮質 VI 層の神経細胞のマーカーである TBR1 の免疫染色を行い、各マーカー陽性の GFP 陽性細胞の割合を解析した。その結果、*Pogz* のノックダウンによって移動が抑制された GFP 陽性細胞のほとんどが SATB2 陽性であり、大脳皮質 II/III 層に移動するはずであった神経細胞の移動が抑制されていることが示唆された (Fig. 7c-h)。

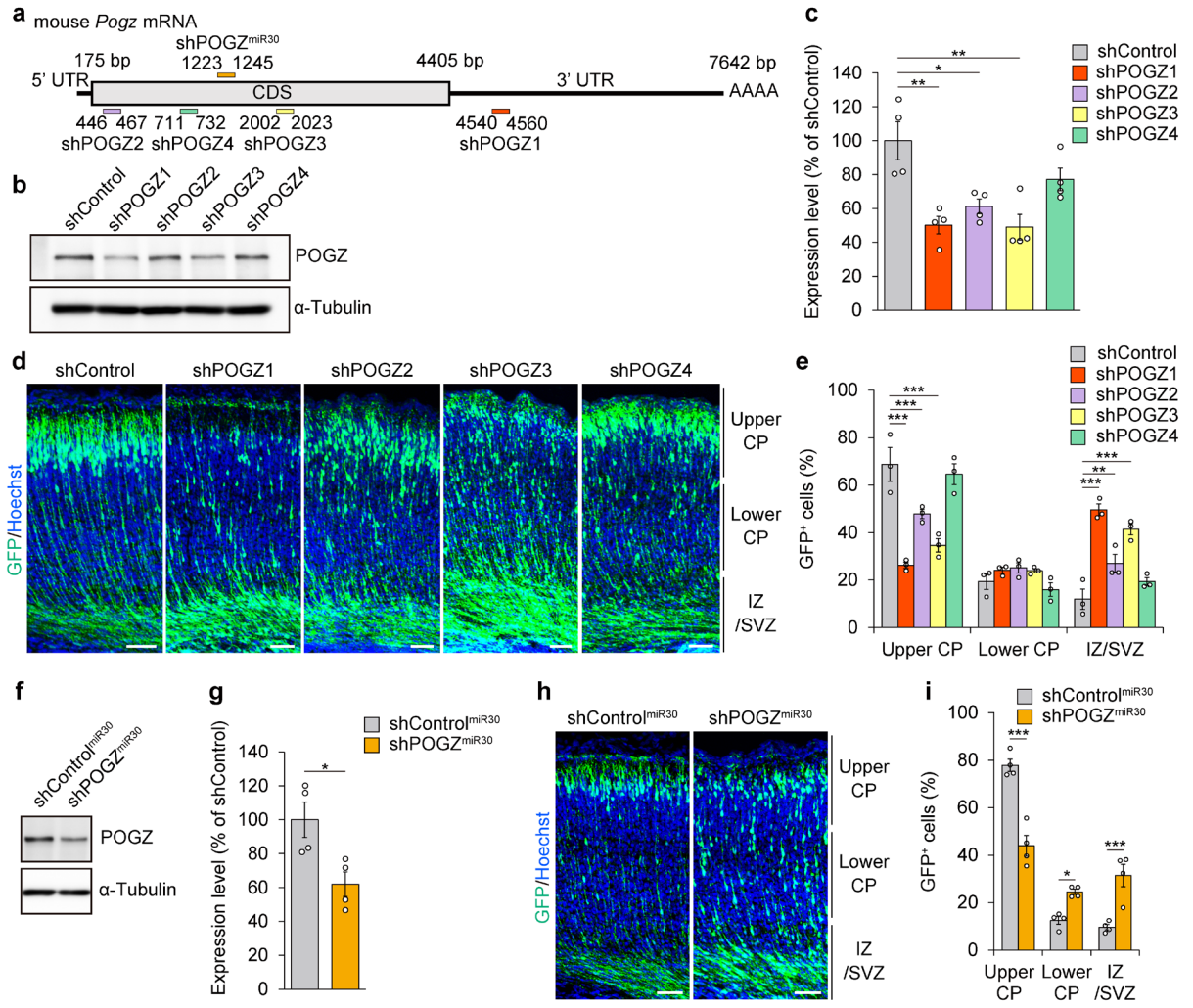


Fig. 6 | **ShRNA- and shRNA^{miR30}- mediated knockdown of *Pogz*.** **a**, Schematic diagram of shRNAs and a miR30-based shRNA against mouse *Pogz* (NM_172683.3). **b**, Representative western blots for endogenous POGZ in Neuro2a cells transfected with plasmids expressing the indicated shRNA constructs against *Pogz*. **c**, Quantification of the expression levels of endogenous POGZ in Neuro2a cells transfected with plasmids expressing indicated shRNA constructs against *Pogz* (each n = 4). **d**, Migration defects caused by shRNA-mediated knockdown of *Pogz* in E18.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **e**, Quantification of GFP$^+$ cells in each layer (each n = 3). **f**, Representative western blots for endogenous POGZ in Neuro2a cells transfected with the plasmids expressing the miR30-based shRNA construct against *Pogz*. **g**, Quantification of expression levels of endogenous POGZ in Neuro2a cells transfected with the plasmids expressing the miR30-based shRNA construct against *Pogz* (each n = 4). **h**, Migration defects caused by miR30-based shRNA-mediated knockdown of *Pogz* in E18.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **i**, Quantification of GFP$^+$ cells in each layer (each n = 4). WT, wild-type; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone. Scale bars, 50 µm. **c**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; $F_{4, 15} = 8.371$. **e**, **i**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn tests; **e**, $F_{8, 30} = 28.52$; i, $F_{2, 18} = 49.72$. **g**, Student's *t*-test. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

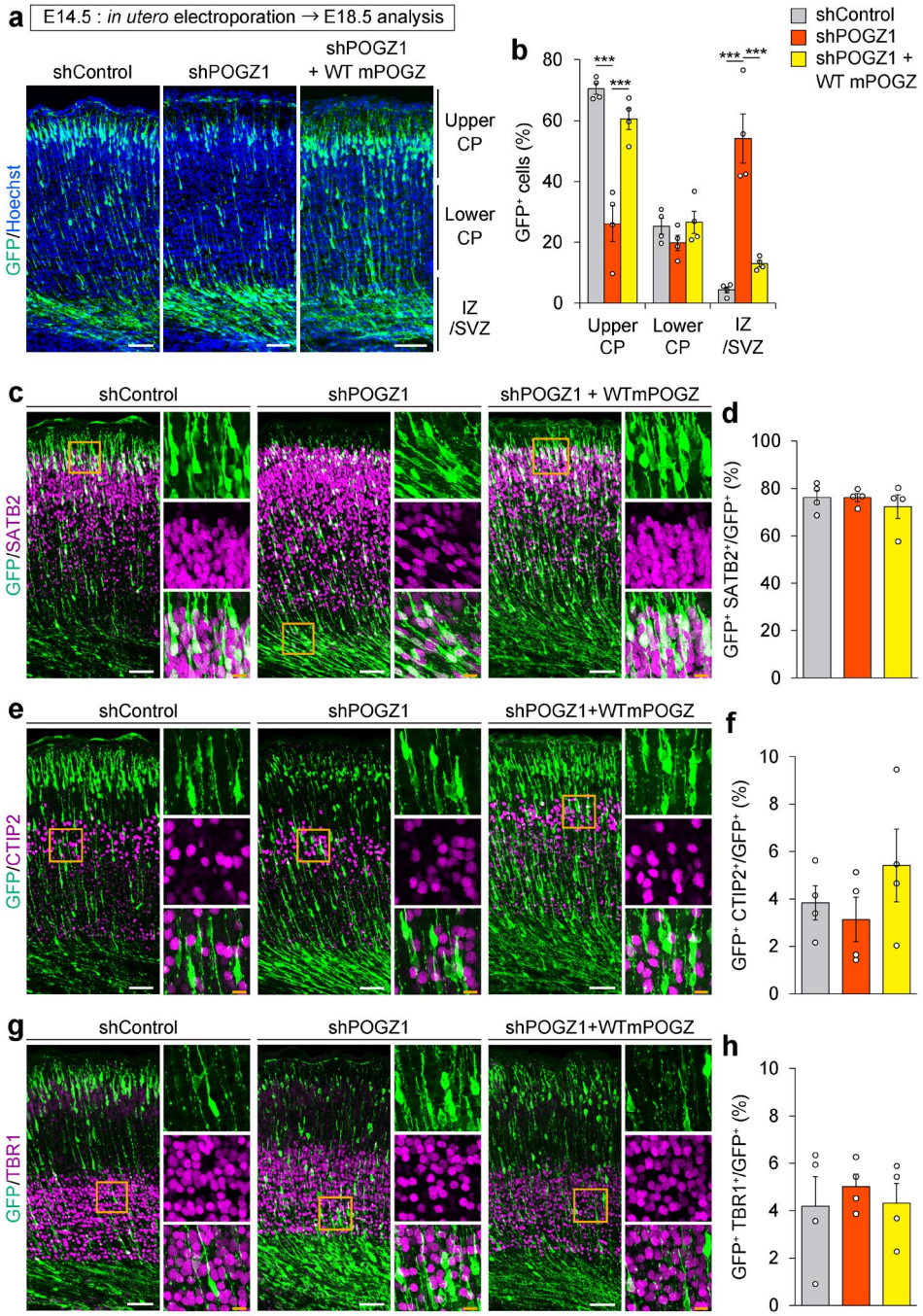


Fig. 7 | **POGZ regulates the mouse cortical neuronal development. a**, Overexpression of WT mPOGZ rescued impairment of neuronal migration by shRNA-mediated knockdown of *Pogz* in E18.5 mouse cortices electroporated at E14.5 (CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone). Scale bars, 50 µm. **b**, Quantification of GFP+ cells in each layer (each n = 4). **c**, GFP$^+$ neurons were co-labelled for SATB2 (a layer II/III marker). **d**, Quantification of GFP$^+$ SATB2$^+$ neurons (n = 4). **e**, GFP$^+$ neurons were co-labelled for CTIP2 (a layer V marker). **f**, Quantification of GFP$^+$ CTIP2$^+$ neurons (n = 4). **g**, GFP$^+$ neurons were co-labelled for TBR1 (a layer VI marker). **h**, Quantification of GFP$^+$ TBR1$^+$ neurons (n = 4). Note that *Pogz* knockdown had little effect on the proportion of SATB2$^+$ GFP$^+$, CTIP2$^+$ GFP$^+$ or TBR1$^+$ GFP$^+$ neurons and that the GFP$^+$ cells with delayed migration were mostly SATB2$^+$ neurons. **e**, Same slice as in **c**. **c**, **e**, **g**, Right panels, magnifications of the areas outlined with orange boxes. WT, wild-type; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone. White scale bars, 50 µm; orange scale bars, 10 µm. **b**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; $F_{4, 27}$ = 39.28. **d**, **f**, **h**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **d**, $F_{2, 9}$ = 0.393; **f**, $F_{2, 9}$ = 1.079; **h**, $F_{2, 9}$ = 0.239. ***P < 0.001. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

Pogz が大脳皮質の神経幹細胞において高発現していたことから、*Pogz* ノックダウンによる神経細胞の移動の遅れは神経幹細胞の神経分化の低下による可能性が考えられた。そこで大脳皮質神経幹細胞の神経分化における POGZ の機能を解析するため、胚齢 14 日において *in utero* electroporation を行い、胚齢 16 日において神経幹細胞のマーカーである PAX6、神経前駆細胞のマーカーである TBR2、および神経細胞のマーカーである SATB2 の免疫染色を行い、各マーカー陽性の GFP 陽性細胞の割合を解析した。その結果、*Pogz* ノックダウンによって PAX6 陽性神経幹細胞の割合が増加し、TBR2 陽性の神経前駆細胞および SATB2 陽性の神経細胞の割合が低下することが明らかになった (Fig. 8)。*Pogz* ノックダウンによる各マーカー陽性細胞の割合の変化は、WT mPOGZ の強制発現によって回復した (Fig. 8)。以上の結果から、POGZ は胎生期の大脳皮質神経幹細胞の神経分化を促進することによって大脳皮質神経細胞の発達を制御していることが示唆された。

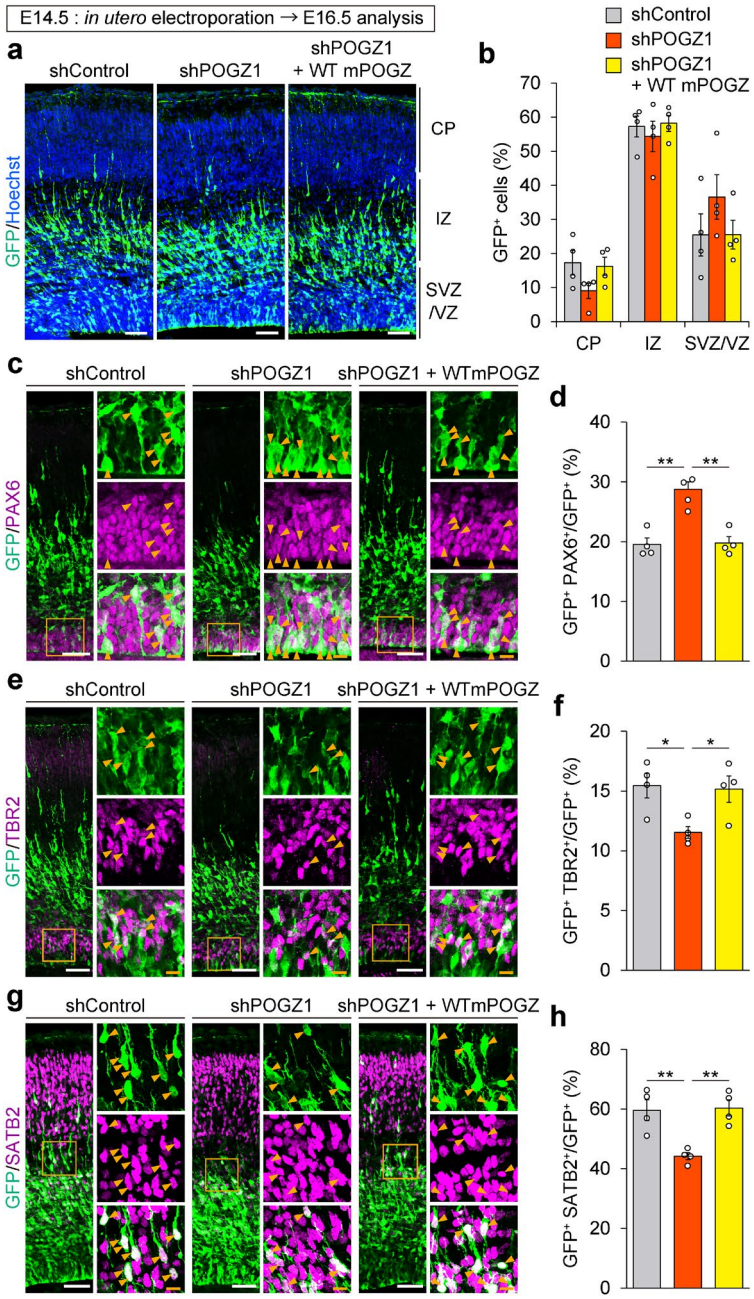


Fig. 8 | **POGZ regulates the neuronal differentiation of mouse cortical neural stem cells (NSCs). a**, Slight, non-significant migration defects caused by shRNA-mediated knockdown of *Pogz* in E16.5 mouse cortices electroporated at E14.5. Scale bars, 50 μm. **b**, Quantification of GFP^+ cells in each layer (each n = 4). **c**, Increased abundance of $PAX6^+$ NSCs caused by *Pogz* knockdown in E16.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **d**, Quantification of $PAX6^+$ cells (each n = 4). **e**, Decreased abundance of $TBR2^+$ differentiated intermediate progenitor cells caused by *Pogz* knockdown in E16.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **f,** Quantification of $TBR2^+$ cells (each n = 4). **g**, Decreased abundance of $SATB2^+$ differentiated neurons caused by *Pogz* knockdown in E16.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **h**, Quantification of $SATB2^+$ cells (each n = 4). **c**, **e**, **g**, Right panels, magnifications of the areas outlined with orange boxes. Arrowheads indicate co-labelled cells. WT, wild-type; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone. White scale bars, 50 μm; orange scale bars, 10 μm. **b**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; $F_{4, 27} = 1.861$. **d**, **f**, **h**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **d**, $F_{2, 9} = 18.37$; **f**, $F_{2, 9} = 5.710$; **h**, $F_{2, 9} = 11.91$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

De novo POGZ 変異が大脳皮質神経細胞の発達に与える影響の解析

ASD 患者由来の *de novo POGZ* 変異が大脳皮質神経細胞の発達に与える影響を解析するため、胚齢 14 日における *in utero* electroporation 法によって、*Pogz* をノックダウンすると同時に野生型または *de novo* 変異型マウス POGZ を強制発現した。胚齢 18 日において GFP 陽性細胞の移動を解析した結果、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ はいずれも *Pogz* のノックダウンによる神経細胞の移動の抑制を回復しなかった (Fig. 9a, b)。一方で、健常者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ は *Pogz* のノックダウンによる神経細胞の移動の抑制を回復した (Fig. 9c, d)。従って、*POGZ* の ASD 患者由来の *de novo* 変異によって、POGZ の大脳皮質神経細胞の発達を制御する機能に異常が生じる可能性が示された。*POGZ* の ASD 患者由来の *de novo* 変異は loss of function 変異または doinant negative 変異である可能性が考えられる。そこで胚齢 14 日における *in utero* electroporation 法によって、野生型または *de novo* 変異型マウス POGZ を過剰発現した。POGZ の過剰発現によって神経細胞の移動が促進する可能性を考慮して、GFP 陽性細胞の大脳皮質上層への移動が途中である胚齢 17 日において GFP 陽性細胞の移動を解析した。野生型の mPOGZ の過剰発現は GFP 陽性細胞の移動に影響を与えなかったことから、POGZ が過剰に存在していても神経細胞の発達は促進されない可能性が示唆された。興味深いことに、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ の過剰発現により、GFP 陽性細胞の移動が抑制された (Fig. 9e, f)。従って、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した POGZ の発現は野生型 POGZ の機能に対して dominant negative な効果を示すことが明らかになった。

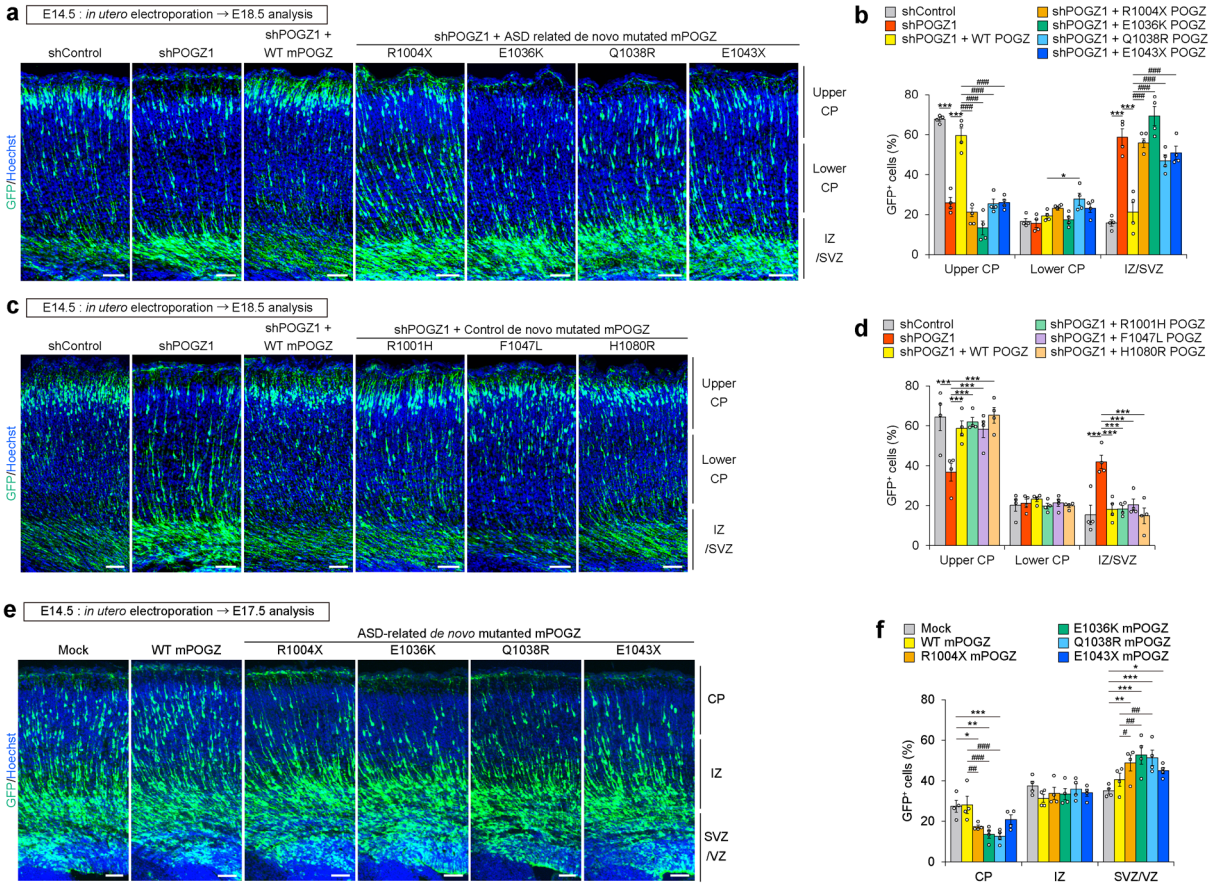


Fig. 9 | **ASD-related POGZ mutations impair cortical neuronal development. a**, Forced expression of the ASD-related mPOGZ mutants failed to rescue the *Pogz*-knockdown-mediated migration defect in E18.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **c**, Forced expression of the control mPOGZ mutants rescued the *Pogz*-knockdown-mediated migration defect in E18.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **b**, **d**, Quantification of GFP^+ cells in each layer (each n = 4). **e**, Forced expression of the ASD-related mPOGZ mutants impaired the neuronal migration in E17.5 mouse cortices electroporated at E14.5. **f**, Quantification of GFP^+ cells in each layer (each n = 4). WT, wild type; CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone; VZ, ventricular zone. Scale bars, 50 μm. **b**, **d**, **f**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **b**, $F_{12, 63} = 54.55$; **d**, $F_{10, 54} = 9.426$; **f**, $F_{10, 54} = 6.099$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ (vs shPOGZ1 + WT mPOGZ in **b;** vs WT mPOGZ in **f**). Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

ASD 患者 iPS 細胞由来神経幹細胞の機能解析

次に、*POGZ* に *de novo* 変異を持つ ASD 患者の神経幹細胞の機能を解析した。これまでに私たちは ASD 患者と健常者両親からなる日本人家系から、*POGZ* に *de novo* Q1042R 変異を同定した [16]。そこで、ASD 患者と健常者両親の不死化 B 細胞から iPS 細胞を樹立し、神経幹細胞に分化させた。まず、神経幹細胞の神経分化能を評価するため、細胞を播種した day 0 から神経分化誘導を行い、神経分化初期の day 2 において神経細胞のマーカーである MAP2 の免疫染色を行い、MAP2 陽性細胞の割合を解析した。ASD 患者由来の細胞は健常者由来の細胞に比べて、MAP2 陽性細胞の割合が低下しており、神経分化能が低下している可能性が示された (Fig. 10a, b)。次に、神経幹細胞の自己増殖能を評価した。増殖性の神経幹細胞を BrdU によって標識し、anti-BrdU 抗

体を用いた ELISA によって吸光度を測定した結果、患者由来神経幹細胞は健常者由来神経幹細胞に比べて高い吸光度を示した (Fig. 10c)。また神経幹細胞を浮遊培養してニューロスフィアを形成させた結果、患者由来神経幹細胞は健常者由来神経幹細胞よりも大きなニューロスフィアを形成した (Fig. 10d, e)。これらの結果から、患者由来神経幹細胞は自己増殖能が増加している可能性が示された。さらに、浮遊培養によって形成されたニューロスフィアを接着培養し、ニューロスフィアの縁から放射状に移動する新生神経細胞の移動距離を測定することで、新生神経細胞の移動能を評価した。健常者由来の新生神経細胞に比べて、患者由来神経幹細胞から産生された新生神経細胞の移動能は低下していた (Fig. 10f, g)。これらの結果はマウスの大脳皮質神経幹細胞における *Pogz* のノックダウンの表現型に類似しており (Fig. 6-9)、患者由来神経幹細胞も *de novo* 変異による POGZ の機能異常によって、神経分化および神経細胞の発達が低下している可能性が示された (岡田氏修士論文)。

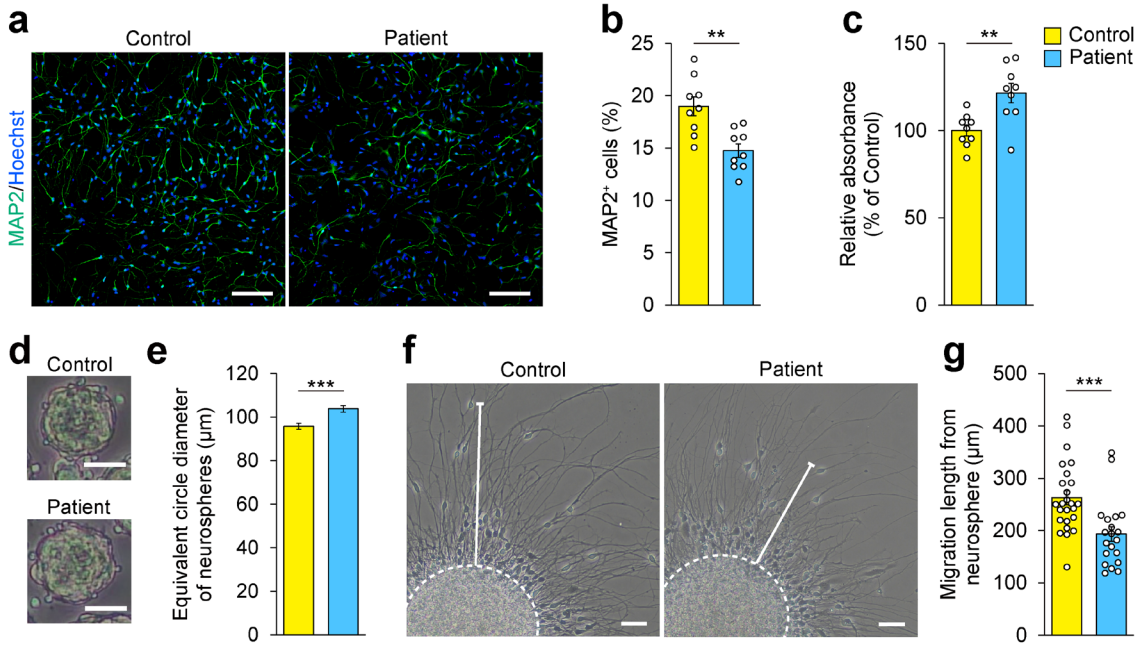


Fig. 10 | **The neuronal differentiation and development is impaired in neural stem cells (NSCs) derived from the ASD patient carrying the *de novo* Q1042R mutation. a**, Low number of MAP2$^+$ differentiated neurons in the patient-derived NSCs harbouring the Q1042R POGZ mutation. Scale bars, 100 μm. **b**, Quantification of MAP2$^+$ neurons (each n = 9). **c**, Increased BrdU incorporation in the patient-derived NSCs (each n = 9). **d**, Representative images of neurospheres derived from the patient and the unaffected healthy control. Scale bars, 50 μm. **e**, Quantification of the size of neurospheres derived from the patient and the unaffected healthy control (control, n = 681; patient, n = 537). **f**, Impaired radial migration of the patient-derived neurons. Scale bars, 50 μm. **g**, Quantification of the migration distance (control, n = 25; patient, n = 20). **b**, **c**, **e**, **g**, Student's *t*-test. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

CRISPR-Cas9 システムによる *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの作製

私たちが ASD 患者から同定した *POGZ* の *de novo* Q1042R 変異が脳発達、脳機能、および行動に与える影響を個体レベルで解析するため、CRISPR-Cas9 システムを利用したゲノム編集によって、ヒト Q1042R 変異に相当するマウス Q1038R 変異を患者と同様に片方のアリールのみに導入した *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスを理化学研究所との共同研究により作出した (Fig. 11a, b)。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスはメンデル則に従って誕生し、体のサイズ、体重、脳重量、および脳サイズの低下を示した (Fig. 11b-h)。また、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの脳切片をヘマトキシリン・エオシン (H・E) 染色によって染色し、大脳皮質および大脳皮質の 6 層構造の厚さを測定した。その結果、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質および大脳皮質 II-IV 層がわずかに薄く、V 層が厚くなっていることが明らかになり、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質神経細胞の発達に異常が生じている可能性が示された (Fig. 11i-n)。なお、末梢臓器の H・E 染色による解析、および頭蓋骨の CT 解析 (理化学研究所との共同研究) の結果、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの末梢臓器（眼球、内耳の蝸牛殻、気管、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、坐骨神経、大腿骨）、および頭蓋骨には異常は見られなかった (Fig. 12, 13)。

ヘテロ変異 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスがメンデル側に従って誕生したのに対し、ホモ変異マウスである *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウスは誕生しなかったため、胎生致死を示す可能性が考えられた (*POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウスの割合: 186 匹中 0 匹; Fig. 14a)。そこで胚齢 15 日マウス胚を理化学研究所との共同研究により、CT 解析した結果、明確な心室中隔欠損が観察されたため、心臓の形成異常が *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウスの胎生致死の原因であると考えられた (心室中隔欠損を示した *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウスの割合: 4 匹中 4 匹; Fig. 14b)。

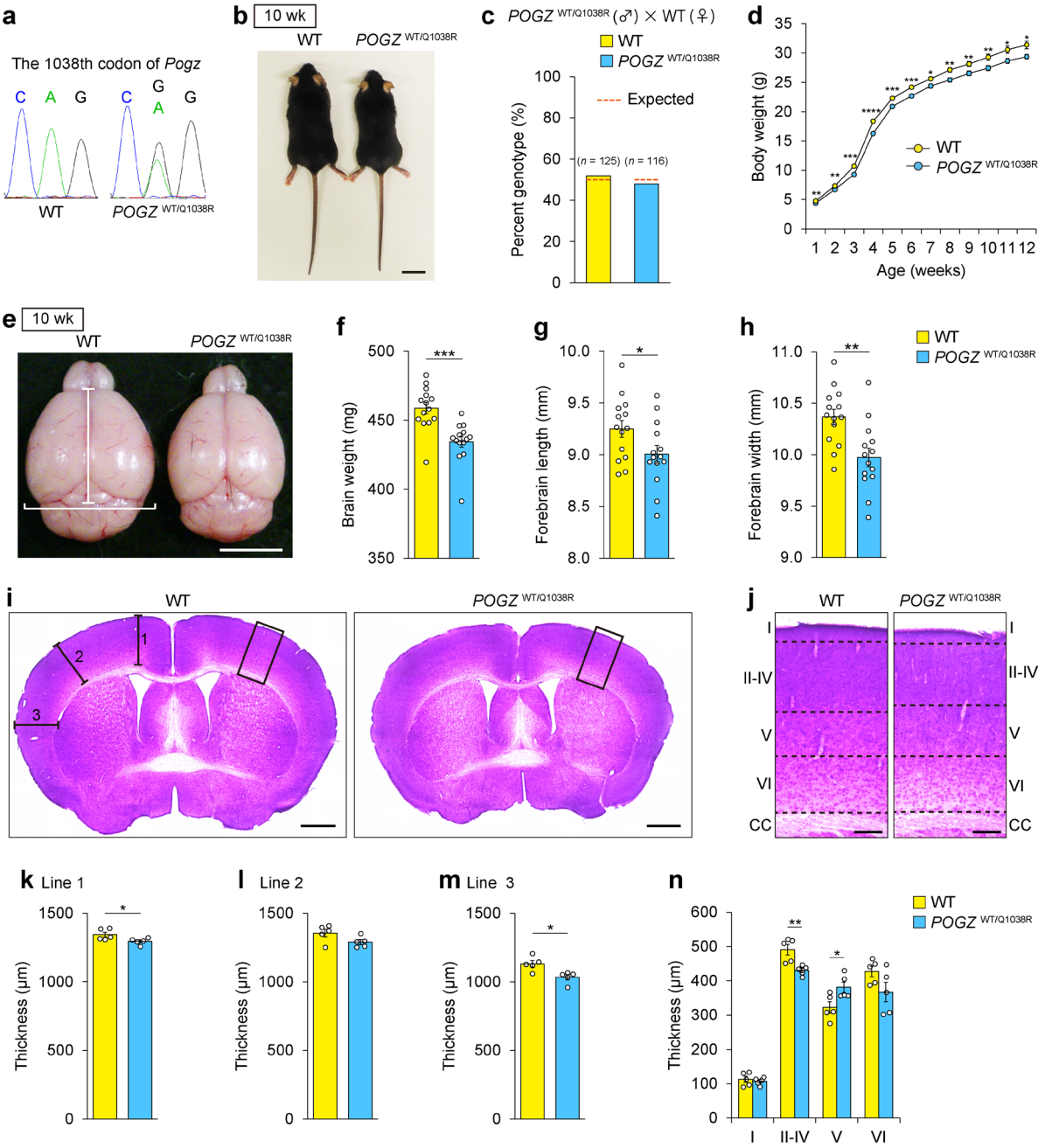


Fig. 11 | **Generation of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, The A is substituted with G in codon 1038 of the mouse *Pogz* gene. **b**, Decreased body size in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice at 10 wk. Scale bar, 2 cm. **c**, Genotyping of 1 wk offspring from crosses between male *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice and female WT mice yielded the expected Mendelian ratio of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (n = 30 pairs). **d**, Quantification of body weight in WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (WT, n = 20; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 21). **e**, Decreased brain size in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice at 10 wk. Scale bar, 5 mm. **f**, Quantification of brain weight (each n = 14). **g**, Quantification of forebrain length (each n = 14). **h**, Quantification of forebrain width (each n = 14). **i**, Representative coronal sections of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ brains at 10 wk visualized with hematoxylin and eosin (HE) staining at Bregma 0 mm. The length of line 1, line 2, and line 3 were measured as thickness of the cortex. Scale bars, 1 mm. **j**, Magnifications of the areas outlined with black boxes in **i**. Scale bars, 200 μm. **k**-**m**, Quantification of thickness of the cortex at line 1 (**k**), line 2 (**l**), and line 3 (**m**) shown in **i** (each n = 5). **n**, Quantification of thickness of each cortical layer in **j** (each n = 5). WT, wild-type; wk, week-old. **d**, **n**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **d**, $F_{11, 468} = 1.089$; **n**, $F_{3, 32} = 6.717$. **f**, **g**, **h**, **k**, **l**, **m**, Student's *t*-test. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

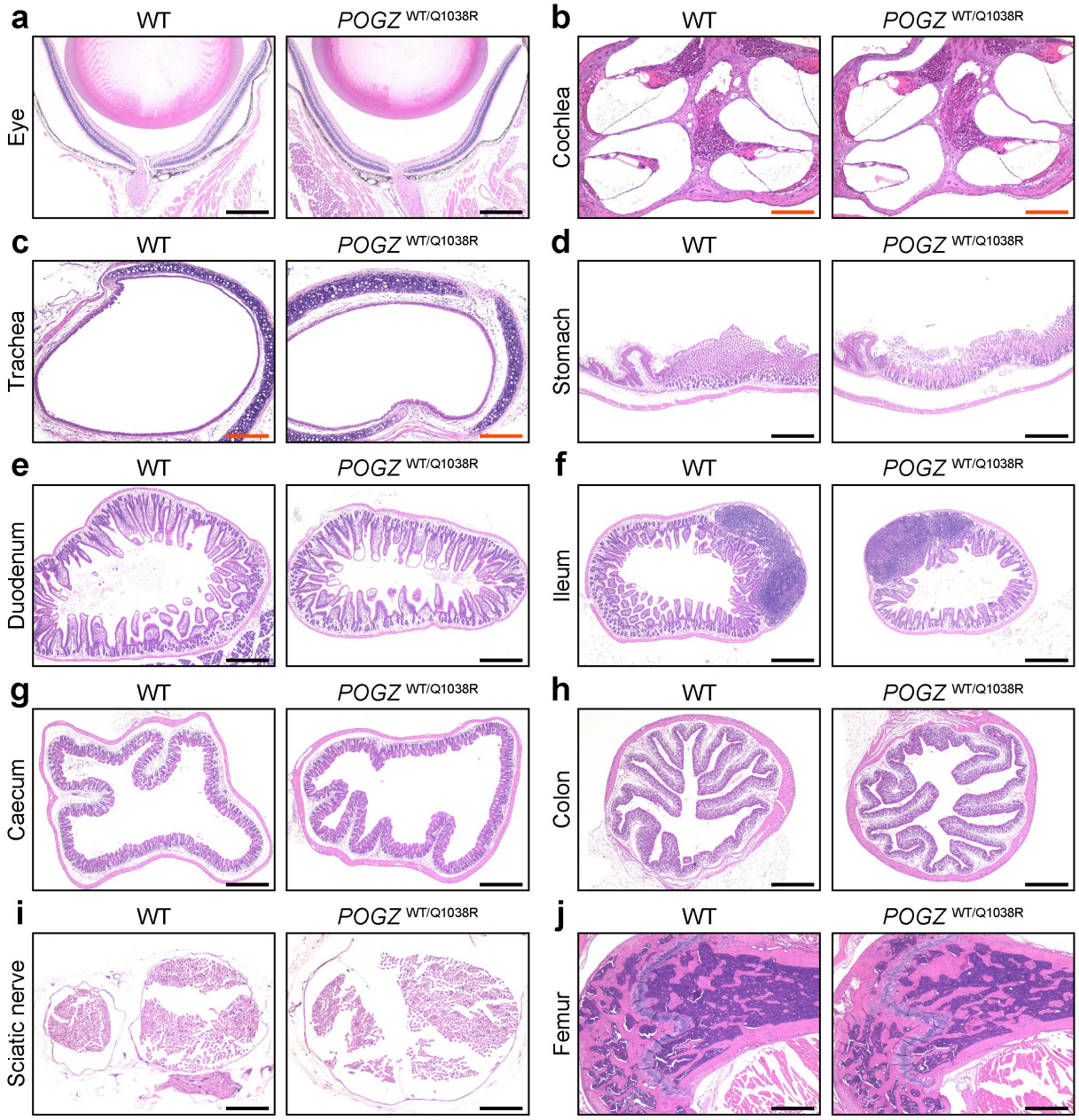
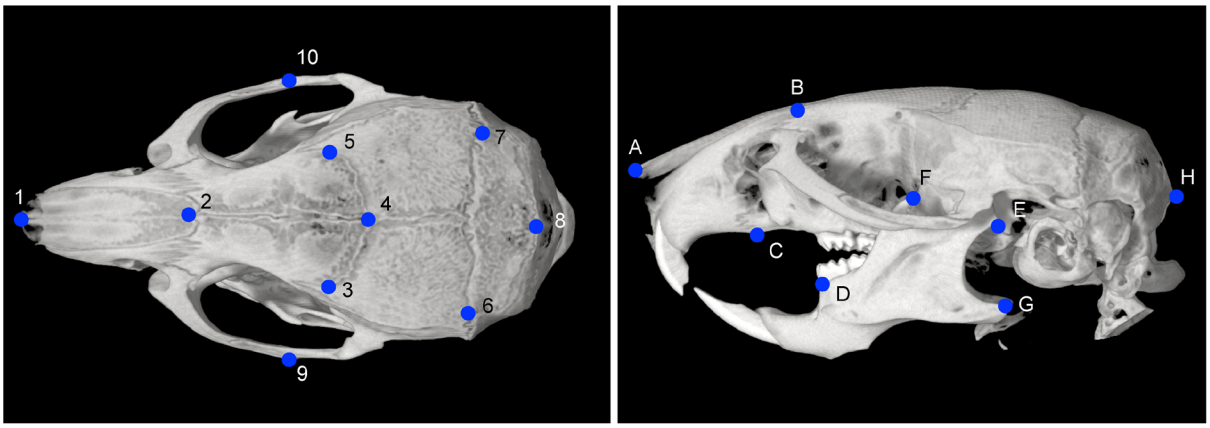


Fig. 12 | **Hematoxylin and eosin (HE) staining of peripheral organs of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a-j**, *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice did not exhibit any significant changes in peripheral organs, including eye (**a**), cochlea (**b**), trachea (**c**), stomach (**d**), duodenum (**e**), ileum (**f**), caecum (**g**), colon (**h**), sciatic nerve (**i**), and femur (**j**), compared to WT mice. WT, wild-type. Black scale bars, 500 μm; red scale bars, 200 μm. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

a



b

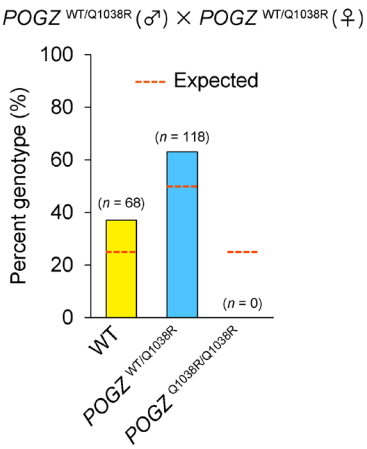
landmark	WT	*POGZ*$^{WT/Q1038R}$	*P* value
1 and 2	7.42 ± 0.07	7.12 ± 0.16	NS
1 and 4	15.42 ± 0.05	14.69 ± 0.30	NS
1 and 8	22.57 ± 0.08	21.45 ± 0.28	NS
3 and 5	6.11 ± 0.13	5.97 ± 0.09	NS
6 and 7	8.39 ± 0.13	7.86 ± 0.09	NS
9 and 10	12.28 ± 0.12	11.77 ± 0.21	NS
A and H	23.41 ± 0.26	23.27 ±0.32	NS
B and C	5.84 ± 0.13	5.73 ± 0.08	NS
D and E	8.25 ± 0.08	8.10 ± 0.12	NS
F and G	6.47 ± 0.12	6.56 ± 0.05	NS

c

	WT	*POGZ*$^{WT/Q1038R}$	*P* value
1 and 2 / 1 and 8	0.33	0.33	NS
1 and 4 /1 and 8	0.68	0.68	NS
3 and 5 / 1 and 8	0.27	0.28	NS
6 and 7 / 1 and 8	0.37	0.37	NS
9 and 10 / 1 and 8	0.54	0.55	NS
B and C / A and H	0.25	0.25	NS
F and G / D and E	0.78	0.81	NS

Fig. 13 | **CT analysis of the skull of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, a schematic of landmarks in the mouse skull. The top view of the CT image (*left*); temporal side view of the CT image (*right*). Numerals and letters indicate the anatomical landmarks in **b**. **b**, Linear distances (mm) between landmarks in WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (WT, n = 6; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n =5). **c**, Linear distance ratios between landmarks of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (WT, n = 6; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n =5). WT, wild type; NS, not significant. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

a



b

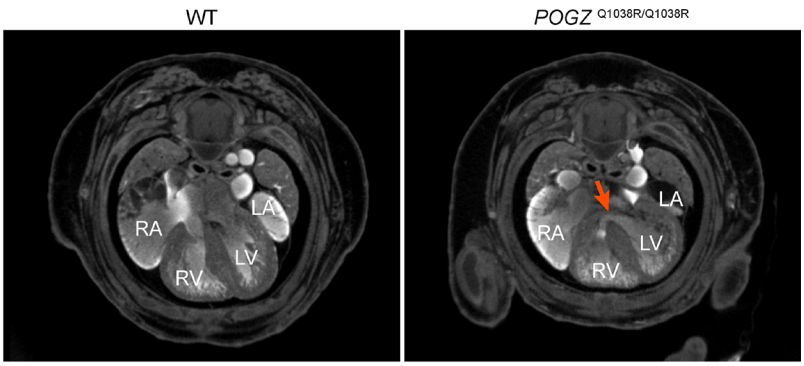


Fig. 14 | **Embryonic lethality of homozygous *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ mice. a**, Genotyping of 1-week-old offspring from intercrosses of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice yielded no homozygous *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ mice (n = 25 pairs). **b**, CT analysis of WT and *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ mice at E15.5 (each n = 4). The red arrow indicates ventricular septal defects. WT, wild-type; LA, Left atrium; LV, left ventricle; RA, right atrium; RV, right ventricle. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質神経細胞発達の解析**

H・E 染色の結果から、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは大脳皮質神経細胞の発達異常を示す可能性が示されたため、胎生期における神経細胞発達の解析を行った。胚齢 18 日マウス胚の脳切片において、大脳皮質 II/III 層興奮性神経細胞のマーカーである SATB2 の免疫染色を行い、大脳皮質を 10 分割して各区画の SATB2 陽性細胞密度を測定した。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚は大脳皮質上層 (区画 1 - 2) における SATB2 陽性細胞密度の低下および大脳皮質下層 (区画 4 - 9) における SATB2 陽性細胞密度の増加を示した (Fig. 15a, b)。さらに、胚齢 14 日において母マウスに BrdU を腹腔内投与することで新生神経細胞を BrdU 標識し、胚齢 18 日において SATB2 陽性かつ BrdU 陽性の新生興奮性神経細胞の移動を解析した。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚は、大脳皮質上層 (区画 1 - 2) において SATB2 および BrdU 陽性細胞の割合の低下を示した (Fig. 15c, d)。これらの結果から、*POGZ* に *de novo* Q1042R 変異をもつ ASD 患者由来の iPS 神経幹細胞と同様に、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは胎生期において大脳皮質興奮性神経細胞の発達低下を示すことが明らかになった。さらに、成体期 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの脳切片において、大脳皮質 II/III 層興奮性神経細胞のマーカーである CUX1 の免疫染色を行い、胎生期の神経細胞の発達の遅れが成体期の大脳皮質神経細胞の配置に与える影響を解析した。野生型マウスと *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質の CUX1 陽性細胞密度の平均に差は見られなかった一方で、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスでは、大脳皮質上層 (区画 1 - 3) において CUX1 陽性の興奮性神経細胞の密度の低下、及び大脳皮質中間層 (区画 5) において密度の増加が観察され、興奮性神経細胞の配置は成体期においても乱れたままであることが明らかになった (Fig. 15e, f; CUX1 陽性興奮性神経細胞の密度の平均, WT, 1,126 ± 36.86 cells/mm^2; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, 1,105 ± 52.64 cells/mm^2)。一方で、GABA に対する免疫染色によって、GABA 陽性の抑制性神経細胞について、同様の検討を行った結果、大脳皮質 GABA 陽性細胞密度の平均および各区画における細胞密度に差は見られなかった(Fig. 15g, h; GABA 陽性抑制性神経細胞の密度の平均, WT, 121.6 ± 3.710 cells/mm^2; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, 120.9 ± 2.527 cells/mm^2)。

また、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの脳切片の大脳皮質上層 (区画 1 - 4) における興奮性神経細胞の CUX1 の免疫染色のシグナル強度が増加しており、興奮性神経細胞の CUX1 発現量が増加している可能性が示唆された (Fig. 16a, b)。POGZ が CUX1 の発現を調節している可能性について検討するため、*Pogz* をノックダウンしたマウス初代培養神経細胞において *Cux1* の発現量を解析した。*Pogz* のノックダウンは *Cux1* の発現量に大きな影響を与えなかったため、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質興奮性神経細胞における CUX1 の発現上昇は興奮性神経細胞密度の低下に対する代償機構である可能性が考えられた (Fig. 16c)。

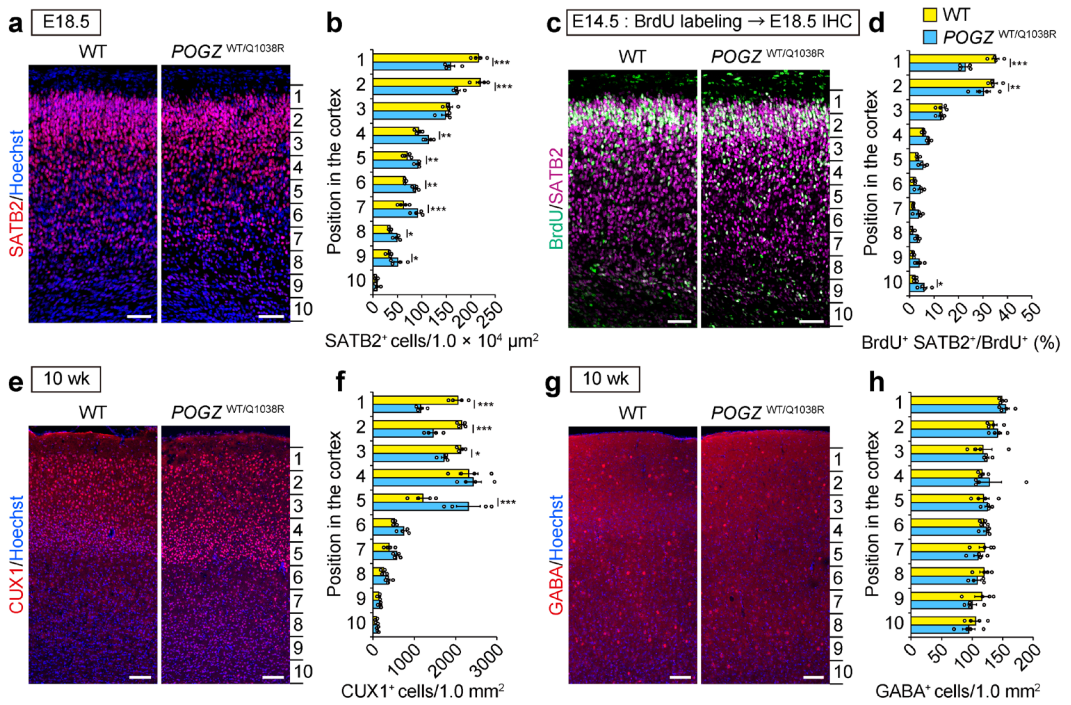


Fig. 15 | **Impaired cortical neuronal development in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, SATB2 immunostaining showing the abnormal distribution of SATB2$^+$ cortical excitatory neurons in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice at E18.5. Scale bars, 50 μm. **b**, Distribution of SATB2$^+$ neurons in ten equal bins (CP 1 to IZ/SVZ 10) within the developing cortex (each n = 4). **c**, BrdU and SATB2 immunostaining in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice at E18.5. Scale bars, 50 μm. **d**, Distribution of SATB2$^+$ BrdU$^+$ neurons in ten equal bins (CP 1 to IZ/SVZ 10) within the developing cortex (each n = 4). **e**, CUX1 immunostaining showing the abnormal distribution of CUX1$^+$ cortical excitatory neurons in the adult *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (10 weeks old). Scale bars, 100 μm. **f**, Distribution of CUX1$^+$ neurons in ten equal bins (CP 1 to IZ/SVZ 10) of the adult cortex (each n = 4). **g**, GABA immunostaining showing the normal distribution of GABA$^+$ inhibitory neurons in the adult *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (10 weeks old). Scale bars, 100 μm. **h**, Distribution of GABA$^+$ neurons in ten equal bins (CP 1 to IZ/SVZ 10) of the adult cortex (each n = 4). **b**, **d**, **f**, **h**, The cortex was divided into 10 layers to form the bins. WT, wild-type. **b**, **d**, **f**, **h**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **b**, $F_{9, 60} = 17.03$; **d**, $F_{9, 60} = 12.17$; **f**, $F_{9, 60} = 12.62$; **h**, $F_{9, 60} = 0.706$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

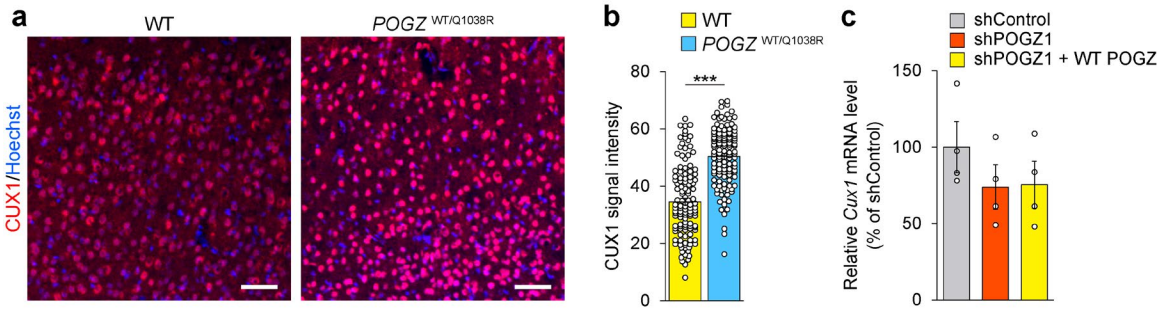


Fig. 16 | **Increased signal intensity of CUX1 in adult *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, CUX1 immunostaining showing increased signal intensity of CUX1 of cortical excitatory neurons in the adult *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (10 weeks old). Scale bars, 50 μm. **b**, Quantification of signal intensity of CUX1 (each n = 120). **c**, Relative expression levels of *Cux1* in dissociated embryonic cortical neurons (7 days in vitro) infected lentivirus vectors expressing shControl, shPOGZ1, or mPOGZ. WT, wild-type. **b**, Student's *t*-test. **c**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests, $F_{2, 9} = 1.183$. $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m.

***De novo* Q1042R *POGZ* 変異を持つ ASD 患者由来神経幹細胞および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚の大脳皮質由来神経幹細胞における遺伝子発現解析**

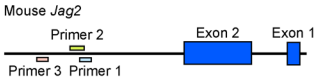
POGZ は転写調節因子である Sp1、クロマチンリモデリングタンパクである HP1 および CHD4 と相互作用することや[43-45]、DNA に結合することから (Fig. 4)、遺伝子発現の調節を介して神経幹細胞の神経分化を制御している可能性が考えられる。そこで、*de novo* Q1042R *POGZ* 変異を持つ ASD 患者 iPS 細胞由来の神経幹細胞および胚齢 16 日 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚の大脳皮質由来神経幹細胞を用いて、網羅的 RNA 発現解析を行った。発現変動していた遺伝子のネットワークを同定するため、健常者と ASD 患者、および野生型と *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの間で発現変動のあった遺伝子群について gene ontology (GO) annotation の解析を行った。その結果、細胞や組織の発達に関与する遺伝子群、特に神経発達に関与する遺伝子群の発現がヒトとマウスで共通して変動していることが明らかになった (Fig. 17a)。POGZ は造血細胞において遺伝子発現を抑制することが報告されているため[45, 46]、ASD 患者由来神経幹細胞および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス由来神経幹細胞において発現上昇している遺伝子に着目した。神経分化に関与する Notch シグナルのリガンドである Jagged canonical Notch ligand 2 (*JAG2*) [47, 48] の発現量が ASD 患者由来神経幹細胞および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚由来神経幹細胞において、それぞれコントロールとする神経幹細胞に比べて約 2 倍増加していた (ASD 患者由来神経幹細胞: fold change = 1.970; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚由来神経幹細胞: fold change = 2.175)。そこで、野生型マウス胚大脳皮質由来の神経幹細胞におけるクロマチン免疫沈降法によって、神経幹細胞において POGZ が *Jag2* プロモーターに結合する可能性について検討した。その結果、POGZ 抗体による免疫沈降サンプルにおいて *Jag2* プロモーター領域付近の DNA 断片が濃縮されていることが明らかになり、POGZ が *Jag2* プロモーターに結合する可能性が示唆された (Fig. 17b, c)。Notch シグナルは神経分化を負に制御することを踏まえると[49, 50]、POGZ は *JAG2* をはじめとする神経分化を制御するタンパク質をコードする遺伝子の発現を抑制することによって神経分化を促進している可能性が示唆された。

a

Enriched transcriptional networks in NSCs derived from the Patient and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice

ID	Name	Patient		*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice	
		p value	FDR q value	p value	FDR q value
GO:0007399	nervous system development	8.82E-11	2.48E-08	1.32E-05	2.19E-04
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	4.93E-09	6.93E-07	9.06E-10	5.09E-08
GO:0048856	anatomical structure development	1.19E-08	9.43E-07	2.13E-07	6.66E-06
GO:0022008	neurogenesis	1.34E-08	9.43E-07	1.20E-03	8.88E-03
GO:0055085	transmembrane transport	1.99E-08	1.12E-06	2.48E-06	4.98E-05
GO:0048699	generation of neurons	6.25E-08	2.93E-06	1.69E-03	1.06E-02
GO:0007275	multicellular organism development	8.15E-08	2.97E-06	4.04E-08	1.42E-06
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	8.47E-08	2.97E-06	1.05E-03	7.93E-03
GO:0048731	system development	1.05E-07	3.28E-06	2.74E-08	1.10E-06
GO:0034220	ion transmembrane transport	1.98E-07	5.57E-06	3.49E-07	9.80E-06
GO:0032502	developmental process	2.69E-07	6.88E-06	1.48E-06	3.20E-05
GO:0007267	cell-cell signaling	4.64E-07	1.08E-05	2.40E-15	6.74E-13
GO:0030182	neuron differentiation	5.02E-07	1.08E-05	1.48E-03	1.03E-02
GO:0051240	positive regulation of multicellular organismal process	6.12E-07	1.23E-05	1.96E-08	9.17E-07
GO:0006811	ion transport	1.00E-06	1.88E-05	6.49E-10	4.56E-08
GO:0048869	cellular developmental process	3.04E-06	5.34E-05	3.01E-04	2.73E-03
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	5.10E-06	8.21E-05	2.19E-05	3.07E-04
GO:0007166	cell surface receptor signaling pathway	5.26E-06	8.21E-05	6.70E-04	5.71E-03
GO:0007155	cell adhesion	5.93E-06	8.76E-05	1.08E-11	1.01E-09
GO:0050793	regulation of developmental process	6.75E-06	9.48E-05	2.10E-04	2.03E-03
GO:0006812	cation transport	7.08E-06	9.48E-05	6.37E-07	1.63E-05
GO:0022610	biological adhesion	8.63E-06	1.10E-04	5.46E-12	7.66E-10
GO:0030154	cell differentiation	9.85E-06	1.20E-04	1.06E-04	1.14E-03
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	1.24E-05	1.44E-04	1.24E-03	8.96E-03
GO:0048468	cell development	1.28E-05	1.44E-04	1.17E-04	1.22E-03
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	3.49E-05	3.77E-04	3.04E-03	1.74E-02
GO:0048513	animal organ development	4.93E-05	4.77E-04	6.97E-04	5.76E-03
GO:0045595	regulation of cell differentiation	5.50E-05	5.15E-04	1.95E-03	1.17E-02
GO:0051094	positive regulation of developmental process	6.97E-05	6.32E-04	2.02E-05	2.99E-04
GO:0065008	regulation of biological quality	9.70E-05	8.26E-04	1.21E-06	2.83E-05
GO:0023051	regulation of signaling	1.66E-04	1.30E-03	1.53E-03	1.03E-02

b



c

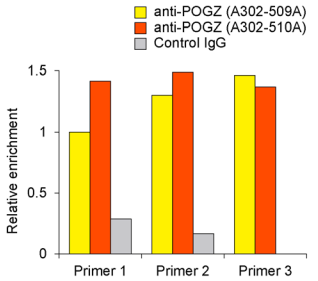


Fig. 17 | **GO Annotation analysis and ChIP assay in NSCs. a.** Common gene ontology (GO) annotations (molecular function) for the differentially expressed genes between NSCs derived from the unaffected healthy control and the patient carrying the Q1042R mutation of POGZ, and E16.5 embryonic cortex of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice by the ToppGene Suite (https://toppgene.cchmc.org/). **b.** Schematic diagram of qPCR amplicons of the primers for the mouse *Jag2* (NC_000078.6) promoter. **c.** ChIP-qPCR assay for the quantification of relative enrichment of the genomic region in the mouse *Jag2* promoter. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスの行動解析

POGZ の *de novo* 変異がマウスの行動に与える影響を解析するため、成体期 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスについて home-cage activity test、light/dark transition test、fear conditioning test、novel object recognition test、Y-maze test および prepulse inhibition (PPI) test を行った (home-cage activity test、light/dark transition test、fear conditioning test、Y-maze test および prepulse inhibition (PPI) test は理化学研究所との共同研究によって実施した)。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは、明条件における home-cage activity がわずかに増加傾向にあり、contextual fear conditioning test と novel object recognition test において認知機能の低下を示したが、その他の行動試験においては野生型マウスとの間に大きな差は見られなかった (Fig. 18)。また、open field test を実施した結果、中央滞在時間の増加が見られたため、不安レベルに異常が生じている可能性が示唆されたが、運動量に変化は見られなかった (Fig. 19a, b)。次に、ASD の中核症状に関連すると考えられる社会性行動と繰り返し行動を評価するため、reciprocal social interaction test と self-grooming test を行った。成体期 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは、reciprocal social interaction test において、マウスの社会性行動として考えられている新奇侵入マウスに対する匂い嗅ぎ行動の低下を (Fig. 19c)、self-grooming test において、固執やこだわり行動と考えられている繰り返しの毛づくろい行動を示した (Fig. 19d)。これらの結果から、成体期 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは神経発達障害、特に ASD に関連した行動表現型を示すことが明らかになった。次に、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスが神経発達障害患者と同様に幼若期から行動異常を示す可能性について検討した。Juvenile playing test によって 3 週齢幼若期 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動を解析した結果、幼若期においても新奇侵入マウスに対する匂い嗅ぎ行動や毛づくろい行動、追いかけ行動、遊び様行動などの幼若期マウスに見られる社会的相互作用が低下していた (Fig. 19e)。最後に、生後 4 日の *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ 仔マウスのコミュニケーション能力を解析するため、母マウスから隔離した際に母マウスを呼ぶために仔マウスが発する ultrasonic-vocalization (USV) を測定した。生後 4 日 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの USV call の数および時間は増加していた (Fig. 19f, g)。さらに、USV call の波形を 10 種類に分類し、各 call の割合を解析した結果、two-syllable call と flat call が増加し、composite call と frequency step call が低下しており、USV call のパターンが変化していた (Fig. 19h)。以上の結果から、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは ASD をはじめとする神経発達障害と同様に幼若期から社会的相互作用およびコミュニケーションの異常を示すことが明らかになった。

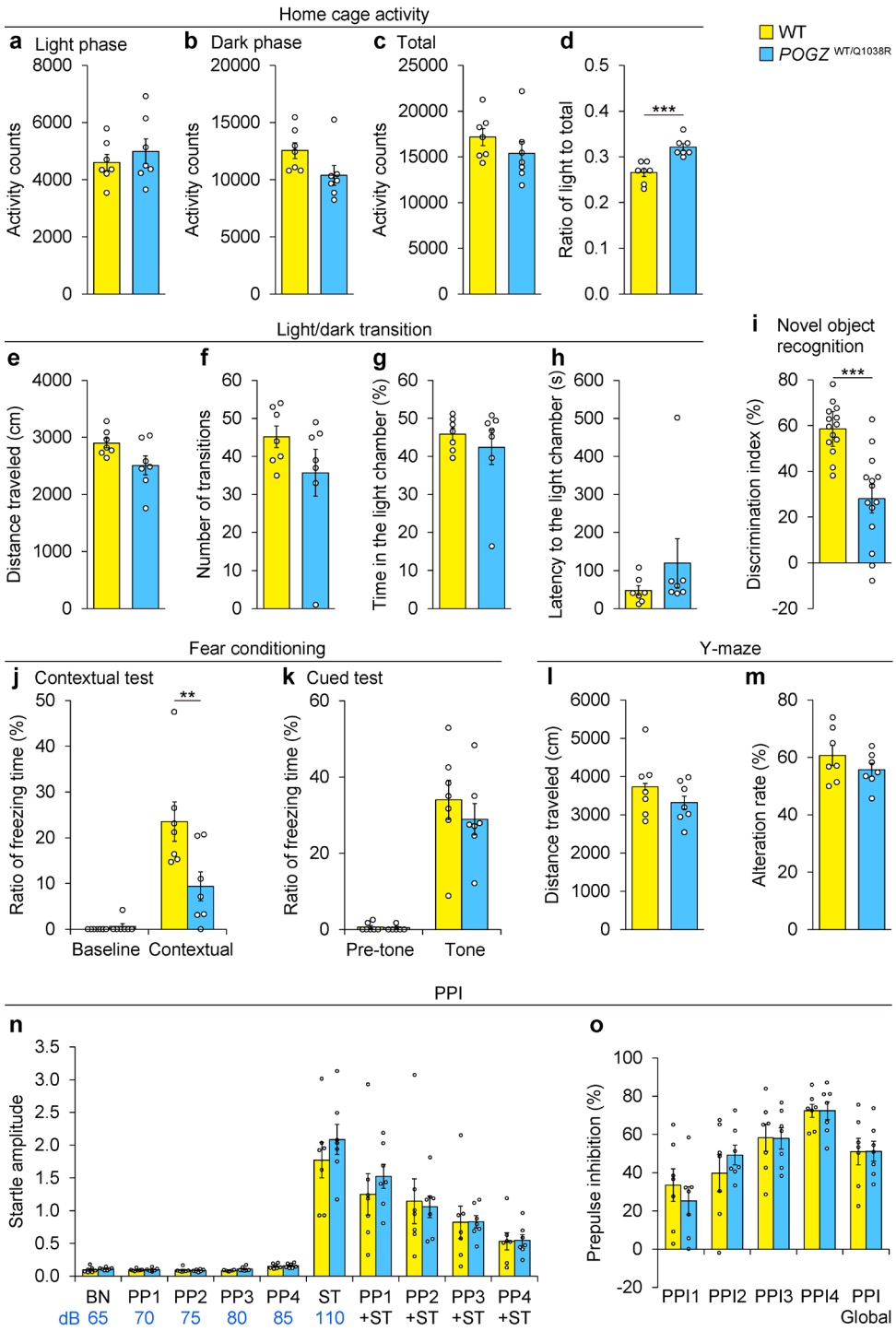


Fig. 18 | **Behavioral abnormalities of heterozygous *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a-d**, Home-cage activity of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 7). **e-h**, Light/dark transition of WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 7). **i**, Impaired novel object recognition in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 14). **j**, Impaired contextual fear memory in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 7). **k**, Normal auditory fear memory in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 7). **l**, **m**, Normal locomotion (**l**) and alteration ratio (**m**) in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice in Y-maze test (each n = 7). **n**, **o**, Normal PPI in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (each n = 7). WT, wild-type; PPI, prepulse inhibition. **a-i**, **l**, **m**, One-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **a**, $F_{1, 12} = 0.558$; **b**, $F_{1, 12} = 3.821$; **c**, $F_{1, 12} = 1.282$; **d**, $F_{1, 12} = 23.05$; **e**, $F_{1, 12} = 4.427$; **f**, $F_{1, 12} = 1.928$; **g**, $F_{1, 12} = 0.502$; **h**, $F_{1, 12} = 1.218$; **i**, $F_{1, 26} = 24.76$; **l**, $F_{1, 12} = 1.272$; **m**, $F_{1, 12} = 1.428$. **j**, **k**, **o**, Two-way ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **j**, $F_{1, 24} = 7.482$; **k**, $F_{1, 24} = 0.558$; **o**, $F_{4, 60} = 0.448$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

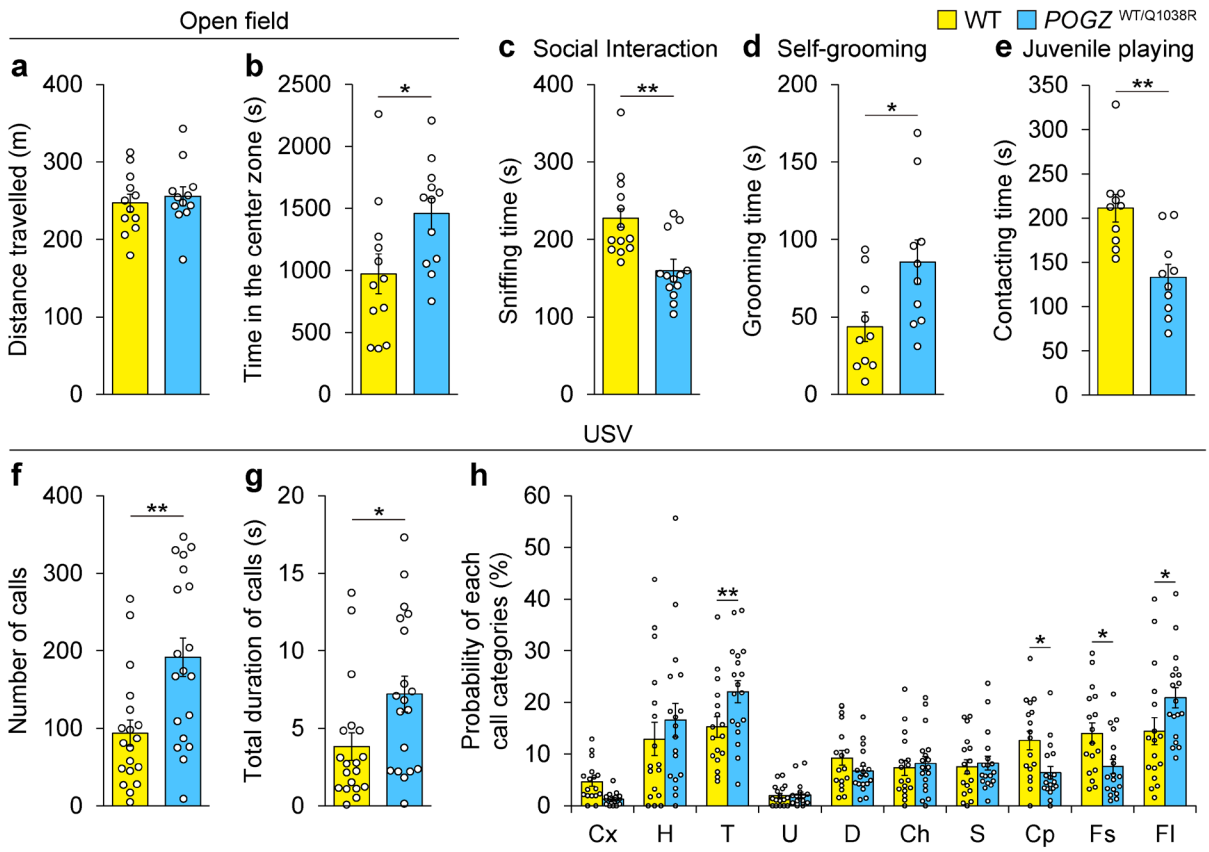


Fig. 19 | **NDDs-related behavioral abnormalities in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, Distance travelled in the open-field test (each n = 12). **b**, Time spent in the center zone in the open-field test (each n = 12). **c**, Time spent sniffing in the reciprocal social interaction test (each n = 13). **d**, Time spent grooming in the self-grooming test (each n = 10). **e**, Time spent contacting in the juvenile playing test (each n = 10). **f**, Numbers of ultrasonic calls made by WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice at postnatal day 4 (each n = 19). **g**, Total duration of ultrasonic calls (each n = 19). **h**, Altered ultrasonic call patterns in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (WT, n = 17; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 18) (Cx, complex; H, harmonics; T, two-syllable; U, upward; D, downward; Ch, chevron; S, shorts; Cp, composite; Fs, frequency steps; Fl, flat). WT, wild-type; NDDs, Neurodevelopmental disorders. **a-g**, One-way ANOVA; **a**, $F_{1, 22} = 0.277$; **b**, $F_{1, 22} = 5.771$; **c**, $F_{1, 24} = 13.02$; **d**, $F_{1, 18} = 5.914$; **e**, $F_{1, 18} = 13.62$; **f**, $F_{1, 36} = 10.64$; **g**, $F_{1, 36} = 5.465$. **h**, Two-way repeated-measures ANOVA with Bonferroni-Dunn *post hoc* tests, $F_{9, 330} = 3.376$. *$P < 0.05$, **$P < 0.01$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質興奮性神経細胞の神経活動解析**

ASD 患者に見られる社会性行動や認知機能の低下は脳内神経回路の興奮性シグナルと抑制性シグナルのバランス (E/I バランス) の異常が原因である可能性が報告されている[51, 52]。そこで、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの全脳の神経活動パターンを解析するため、神経活動の最初期遺伝子である Arc プロモーター制御下で蛍光タンパク dVenus を発現する Arc dVenus レポーターマウス[53]と *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスを掛け合わせた。当研究室が開発した全脳イメージシステムである FAST (block-FAce Serial microscopy Tomography) [54, 55]を用い、10 週齢の野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの dVenus 陽性細胞の分布を解析した。社会性行動時の全脳神経活動パターンを評価するため、reciprocal social interaction test 実施後の dVenus 陽性細胞の分布を解析した結果、ASD との関連性が報告されている前帯状皮質[56]の神経活動が増加していた (Fig. 20a, b)。野生型マウスと *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの各脳領域の dVenus 陽性細胞について主成分分析を行った結果、野生型マウスと *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの神経活動パターンは主成分 2 (PC2) で分離することができ、また特に前帯状皮質の PC2 への寄与が大きかった (Fig. 20c, d)。前帯状皮質の神経活動が増加していたため、前帯状皮質の II/III 層興奮性神経細胞である錐体細胞において、神経細胞の興奮性シグナルを受容する樹状突起スパインの密度を測定したところ、10 週齢 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの前帯状皮質 II/III 層錐体細胞の樹状突起スパイン密度は野生型マウスに比べて増加していた (Fig. 20e, f)。さらに、東京慈恵会医科大学との共同研究により、ホールセルパッチクランプ法によって 10 週齢 *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの興奮性の神経伝達を評価した。前帯状皮質 II/III 層錐体細胞において微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を測定した結果、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの前帯状皮質 II/III 層錐体細胞の mEPSC の振幅は野生型マウスと比べて差が見られない一方で、頻度は増加していた (Fig. 20g-k)。以上の結果から、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質上層の興奮性錐体細胞の密度は低下しているにもかかわらず (Fig. 15e, f)、社会性行動時において *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質の興奮性神経細胞は過剰に活性化する可能性が示された。

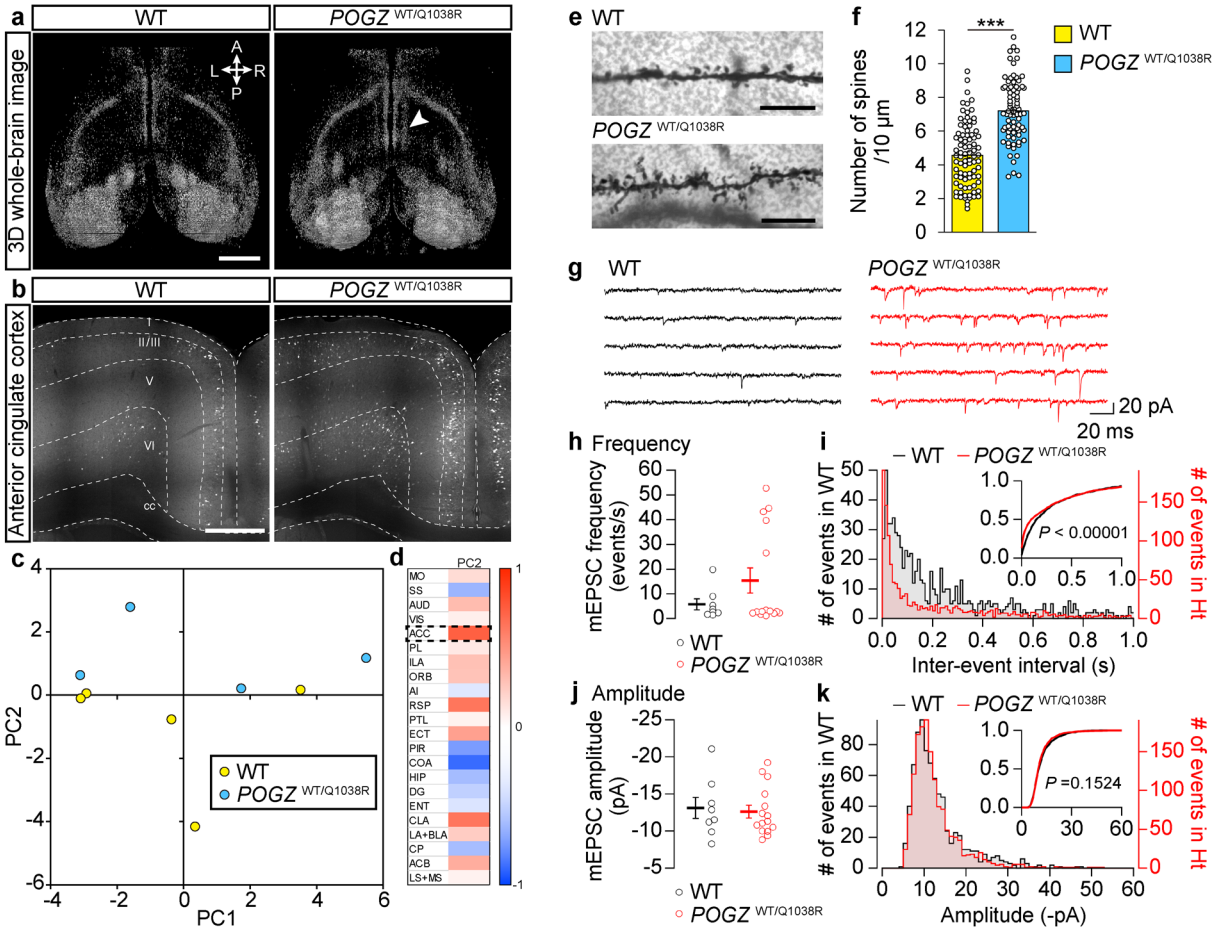


Fig. 20 | **Increased cortical neuronal activity in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, Representative brain regions showing social-interaction-induced activation of Arc-dVenus fluorescence in adult WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. Scale bar, 2 mm. **b**, Representative images of social-interaction-induced activation of Arc-dVenus fluorescence in the anterior cingulate cortex in adult WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. Scale bar, 500 µm. **c**, Locations of individual WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice projected in principal component (PC) space defined by the first two PCs (in arbitrary PC units). **d**, Loadings for PC2 (in arbitrary PC weight units). Note the especially large contribution of the anterior cingulate cortex (ACC) to PC2 (dashed box). MO, motor cortex; SS, somatosensory cortex; AUD, auditory cortex; VIS, visual cortex; PL, prelimbic cortex; ILA, infralimbic cortex; ORB, orbitofrontal cortex; Al, agranular insular cortex; RSP, retrosplenial cortex; PTL, posterior parietal association cortex; ECT, ectorhinal cortex; PIR, piriform cortex; COA, cortical amygdala; HIP, hippocampus excluding the dentate gyrus; DG, dentate gyrus; ENT, entorhinal cortex; CLA, claustrum; LA+BLA, lateral amygdala + basolateral amygdala; CP, caudoputamen; ACB, nucleus accumbens; LS+MS, lateral septum + medial septum. **e**, Golgi-staining showing increased spine density in the ACC in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. Scale bars, 10 µm. **f**, Quantification of the spine density in the ACC (WT, n = 81 dendrites; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 80 dendrites). **g**, Representative traces of mEPSCs obtained from the ACC of adult WT and *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. **h**, **j**, Summary of mEPSC frequency (**h**) and amplitude (**j**) recorded in each neuron (WT, n = 8 neurons; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 15 neurons). Note that averaged mEPSC frequency in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice tended to be higher than that in WT mice. **i**, **k**, The distribution of the inter-event interval (**i**, WT, n = 792 events; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 1,485 events) and the amplitude (**k**, WT, n = 800 events; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$, n = 1,500 events) of mEPSCs. The cumulative probability plots described in the inset show a significant shift of the distribution of inter-event interval toward shorter intervals in *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. WT, wild-type. **f**, Student's *t*-test. **h**, **j**, Mann-Whitney *U* test. **i**, **k**, Kolmogorov-Smirnov test. ***P < 0.001. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動に対する抗てんかん薬 perampanel の薬理学的検討**

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスが社会的相互作用における興奮性神経細胞の過剰な活性化や興奮性シナプス伝達の増加を示したことから、興奮性シグナルを担う AMPA 受容体の薬理学的な阻害によって *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動の低下を回復することができる可能性が考えられた。そこで、競合的 AMPA 受容体阻害薬である NBQX （10 mg/kg）の腹腔内投与 30 分後に、open field test または reciprocal social interaction test を行った。NBQX は運動量および野生型マウスの新奇侵入マウスに対する匂い嗅ぎ行動時間に影響を与えない一方で、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの匂い嗅ぎ行動の低下を回復した (Fig. 21a, b)。さらに、AMPA 受容体のネガティブ・アロステリック・モジュレーターであり、抗てんかん薬として The European Medicines Agency (EMA)、The US Food and Drug Administration (FDA)、および Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) に承認されている perampanel についても同様の検討を行った。Perampanel （3mg/kg）の経口投与 30 分後に open field test または reciprocal social interaction test を行った結果、3mg/kg の perampanel は *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの運動量をわずかに低下させる一方で（有意差はなし）、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動を回復させることが明らかになった (Fig. 21c, d)。これらの結果から、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動の低下は興奮性シナプス伝達の過剰な活性化が原因である可能性が示された。

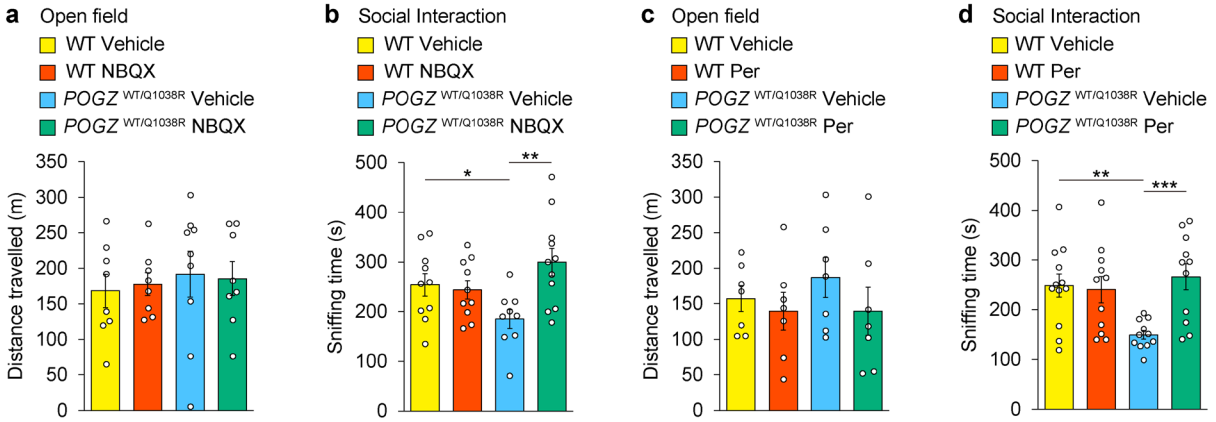


Fig. 21 | **NBQX and perampanel treatment restore the impaired social interaction of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice. a**, Distance travelled in the open-field test 30 min after NBQX treatment (10 mg/kg) (WT Vehicle, n = 8; WT NBQX, n = 8; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ Vehicle, n = 9; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ NBQX, n = 8). b, Time spent sniffing in the reciprocal social interaction test 30 min after NBQX treatment (10 mg/kg) (WT Vehicle, n = 10; WT NBQX, n = 10; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ Vehicle, n = 9; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ NBQX, n = 11). **c**, Distance travelled in the open-field test 30 min after perampanel treatment (3 mg/kg) (WT Vehicle, n = 7; WT perampanel, n = 7; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ Vehicle, n = 7; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ perampanel, n = 7) **d**, Perampanel treatment (3 mg/kg) restores the impaired social interaction of *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ mice (WT Vehicle, n = 12; WT perampanel, n = 11; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ Vehicle, n = 11; *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ perampanel, n = 11). WT, wild-type; Per, perampanel. Two-way ANOVA followed by Bonferroni-Dunn *post hoc* tests; **a**, $F_{1, 29} = 0.09312$; **b**, $F_{1, 36} = 7.410$; **c**, $F_{1, 24} = 0.3024$; **d**, $F_{1, 41} = 7.658$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as the mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [39].

考察

遺伝統計学的に神経発達障害発症のリスクになり得るとされる遺伝子について、変異の意義を生物学的に解析した知見を蓄積することは、病態の分子メカニズムの解明や新たな治療戦略の構築のために重要であると考えられる。近年、遺伝統計学的に *de novo* 変異による POGZ の機能異常と神経発達障害との関連性が示唆されているが[13, 15-17, 23, 31-37]、*POGZ* の *de novo* 変異と神経発達障害発症との生物学的な関連性については不明であった。本研究では、神経発達障害の 1 つである ASD 患者由来の *POGZ* 遺伝子座の *de novo* 変異の病原性について *in vitro* および *in vivo* 実験系において評価し、ASD 患者由来の *POGZ* の *de novo* 変異により POGZ の核局在および大脳皮質の神経発達を低下させる一方で、健常者由来の *POGZ* の *de novo* 変異は、それらに影響を与えないことを見出した (Fig. 3, 9)。また、*POGZ* の *de novo* 変異を導入したモデルマウスを作出し、そのマウスが ASD に関連する表現型を示すことを明らかにした (Fig. 18-20)。さらに、POGZ に *de novo* 変異を持つ ASD 患者 iPS 細胞由来の神経幹細胞と、*de novo* 変異導入マウスの大脳皮質や *in utero* electroporation 法による *Pogz* ノックダウン細胞が類似の表現型を示すことを見出すことができた (Fig. 6-10, 15, 17)。このように、ヒトとマウスのサンプルを用いた包括的な研究によって、私たちは初めて ASD 患者由来の *de novo* 変異が ASD の表現型に寄与していることを *in vitro* および *in vivo* で示すことができた。

POGZ に着目した神経発達障害研究の重要性

多岐にわたる症状を示す非常に多様な疾患群である神経発達障害は、ASD と知的障害の併発といった併発例が多いことや、ASD と知的障害に共通して *de novo* 変異が同定される遺伝子が数多く報告されていることから、神経発達障害の各疾患の病態や病因の分子メカニズムには共通点があると考えられる[1, 14]。*POGZ* 遺伝子には ASD 患者のみならず、知的障害などの ASD 以外の神経発達障害患者からも *de novo* 変異が同定されており (Fig. 1a)、POGZ の機能異常は ASD のみならず、広範な神経発達障害発症のリスクになる可能性がある。また、ASD を DSM-IV に基づいた中分類である自閉性障害、アスペルガー症候群、および特定不能の広汎性発達障害に分類した場合、全ての中分類の疾患に共通して *de novo* 変異が同定されている遺伝子は *POGZ* を含めて 4 遺伝子のみであることが報告されている[19]。このように、POGZ の機能異常はヘテロな疾患群である神経発達障害に共通した分子メカニズムの 1 つである可能性がある。興味深いことに、CENP-DB domain 上またはその近傍に存在する ASD 患者由来の *de novo* 変異は dominant negative な効果を示した (Fig. 9e, f)。一方で、POGZ の全てのタンパクドメインを欠失するため、loss of function 変異と考えられるナンセンス変異も神経発達障害患者から同定されている (Fig. 1a)。これらのことから、*POGZ* の *de novo* 変異が示す効果の違いによって、ASD や知的障害といった神経発達障害の表現型が変わる可能性がある。また、神経発達障害は *de novo* 変異、家族性の遺伝的バックグラウンド、環境的要因などが複雑に絡み合って発症する疾患群であると考えられ[57-60]、POGZ の機能異常は大脳皮質神経細胞の発達異常による神経発達障害の共通の分子メカニズムの 1 つになる一方で、症状や脳構造の異常などの神経発達障害の表現型は、POGZ の機能異常と遺伝的バックグラウンドや環境的要因との組み合わせによって変わる可能性が考えられる。神経発達障害の根本的な治療戦略構築を妨げる課題の 1 つとして、病態が非常に多様であることが挙げられる

が、*POGZ* の *de novo* 変異に着目することで、神経発達障害のヘテロな病態が発現するメカニズムの解明に近付くことができると期待される。

生物学的実験によって *de novo* 変異の影響を解析する意義

PROVEAN、SIFT、PolyPhen2、MutationTaster、CADD score を用いて *in silico* でミスセンス変異の影響を予測した結果、神経発達障害患者由来の 7 つのミスセンス変異中 6 つの変異および健常者由来の 19 のミスセンス変異中 17 の変異が、少なくとも 1 つの予測ツールにおいて病原性またはタンパク機能への影響があるという結果になった (Table 1)。また、ガイドラインに従ってミスセンス変異の病原性を評価する The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) classification[61]については、本研究結果を反映させないで分類した場合、神経発達障害患者および健常者由来の変異はともに、その病原性を断定できなかった。本研究では、生物学的に *POGZ* の *de novo* 変異が POGZ の機能や大脳皮質の神経発達に与える影響の解析を行い、ASD 患者由来の *POGZ* の *de novo* 変異は POGZ の核局在および大脳皮質の神経発達を低下させる一方で、健常者由来の *POGZ* の *de novo* 変異は影響を与えないことを見出した (Fig. 3, 9)。そこで、これらの結果を ACMG classification に反映させたところ、E1040K 変異 (マウス E1036K 変異に相当) と Q1042R 変異 (マウス Q1038R 変異に相当) は pathogenic に、R1005H 変異 (マウス R1001H 変異に相当)、F1051L 変異 (マウス F1047L 変異に相当)、および H1084R 変異 (マウス H1080R 変異に相当) は likely benign に評価を更新することができた。これらの結果は、ミスセンス変異の病原性について *in silico* で評価することは未だ困難であることを端的に示しており、ASD の病態の理解のためには生物学的な実験によって *de novo* 変異の病原性を評価することが重要であると考えられる。

Table 1 *In silico* prediction of the effect of *de novo POGZ* missense mutations identified in patients with NDDs and unaffected controls

Amino-acid change	PROVEAN	SIFT	PolyPhen2	MutationTaster	CADD score	ACMG classification	ACMG classification including this study	Case
S314N	-0.70 (Neutral)	0.211 (Tolerated)	0.000 (BENIGN)	0.853 (polymorphism)	17.25	Likely Pathogenic	Likely Pathogenic	ASD
Y597C	-7.01 (Deleterious)	0.000 (Damaging)	0.999 (PROBABLY DAMAGING)	0.997 (disease causing)	26.60	Likely Pathogenic	Likely Pathogenic	ASD
H641Q	-7.66 (Deleterious)	0.001 (Damaging)	0.989 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	25.30	Likely Pathogenic	Likely Pathogenic	ASD
S799N	-1.81 (Neutral)	0.014 (Damaging)	0.985 (PROBABLY DAMAGING)	0.999 (disease causing)	26.10	Likely Pathogenic	Likely Pathogenic	ASD
E1040K	-0.94 (Neutral)	0.003 (Damaging)	0.999 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	31.00	Likely Pathogenic	Pathogenic	ASD/ID
Q1042R	-0.92 (Neutral)	0.004 (Damaging)	0.991 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	27.20	Likely Pathogenic	Pathogenic	ASD
T1210P	-0.85 (Neutral)	0.038 (Damaging)	0.077 (BENIGN)	1.000 (polymorphism)	13.48	Likely Pathogenic	Likely Pathogenic	Unclassified NDDs
D23G	-1.75 (Neutral)	0.001 (Damaging)	0.997 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	26.90	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
N136S	-0.17 (Neutral)	0.009 (Damaging)	0.118 (BENIGN)	0.899 (disease causing)	21.00	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
N159D	-1.39 (Neutral)	0.004 (Damaging)	0.993 (PROBABLY DAMAGING)	0.994 (disease causing)	26.30	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
N341S	-0.47 (Neutral)	0.054 (Tolerated)	0.384 (BENIGN)	0.923 (polymorphism)	16.72	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R374Q	-0.70 (Neutral)	0.01 (Damaging)	0.993 (PROBABLY DAMAGING)	0.989 (disease causing)	27.20	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R379Q	-1.40 (Neutral)	0.031 (Damaging)	0.997 (PROBABLY DAMAGING)	0.955 (disease causing)	26.20	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
P446L	-1.25 (Neutral)	0.204 (Tolerated)	1.000 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	24.40	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R502K	-0.17 (Neutral)	0.641 (Tolerated)	0.064 (BENIGN)	0.866 (disease causing)	22.00	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
V591I	-6.15 (Deleterious)	0.003 (Damaging)	0.994 (PROBABLY DAMAGING)	0.999 (disease causing)	24.20	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
N632S	0.21 (Neutral)	0.137 (Tolerated)	0.882 (POSSIBLY DAMAGING)	0.897 (polymorphism)	22.10	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R674C	-2.53 (Deleterious)	0.03 (Damaging)	1.000 (PROBABLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	32.00	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R797Q	-1.70 (Neutral)	0.04 (Damaging)	0.997 (PROBABLY DAMAGING)	0.996 (disease causing)	26.40	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
D828N	-3.68 (Deleterious)	0.247 (Tolerated)	0.835 (POSSIBLY DAMAGING)	1.000 (disease causing)	23.80	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
R1005H	-0.75 (Neutral)	0.018 (Damaging)	0.998 (PROBABLY DAMAGING)	0.921 (disease causing)	28.20	Uncertain significance	Likely Benign	Control
F1051L	-0.62 (Neutral)	0.452 (Tolerated)	0.573 (POSSIBLY DAMAGING)	0.998 (disease causing)	18.31	Uncertain significance	Likely Benign	Control
H1084R	-1.05 (Neutral)	0.319 (Tolerated)	0.666 (POSSIBLY DAMAGING)	0.999 (disease causing)	24.90	Uncertain significance	Likely Benign	Control
L1103H	-0.46 (Neutral)	0.024 (Damaging)	0.875 (POSSIBLY DAMAGING)	0.573 (polymorphism)	22.30	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
A1288V	-0.45 (Neutral)	0.013 (Damaging)	0.261 (BENIGN)	0.967 (disease causing)	23.10	Uncertain significance	Uncertain significance	Control
D1404N	-0.38 (Neutral)	0.001 (Damaging)	0.990 (PROBABLY DAMAGING)	0.582 (disease causing)	27.60	Uncertain significance	Uncertain significance	Control

This table is quoted from the reference [39].

POGZ が神経幹細胞の神経分化および神経細胞の発達を制御するメカニズム

本研究では、遺伝子ノックダウン法を利用したアプローチによって、POGZ が胎生期の大脳皮質において神経幹細胞の神経分化および興奮性神経細胞の発達を制御することを *in vivo* で見出した (Fig. 6 - 8)。また、POGZ によって *JAG2* をはじめとした神経発達に関与する遺伝子の発現が制御されている可能性を示すことができた (Fig. 17)。POGZ はクロマチンリモデリングに関与する HP1、および知的障害関連遺伝子の CHAMP1 と相互作用して、遺伝子発現が抑制されている遺伝子座のマーカーとして知られるヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) サイトに結合することが報告されている[43, 45, 62]。従って、POGZ は HP1 や CHAMP1 などのタンパクと複合体を形成して、H3K9me3 サイトにおいて遺伝子発現を抑制している可能性が考えられる。また、POGZ は転写調節因子の SP1 やクロマチンリモデリングに関与する CHD4 と相互作用することも報告されており[43, 44]、複数のタンパクと複合体を形成し、転写調節やクロマチンリモデリングを介して遺伝子ネットワークの発現を調節し、神経発達を制御している可能性が考えられる (Fig. 22)。

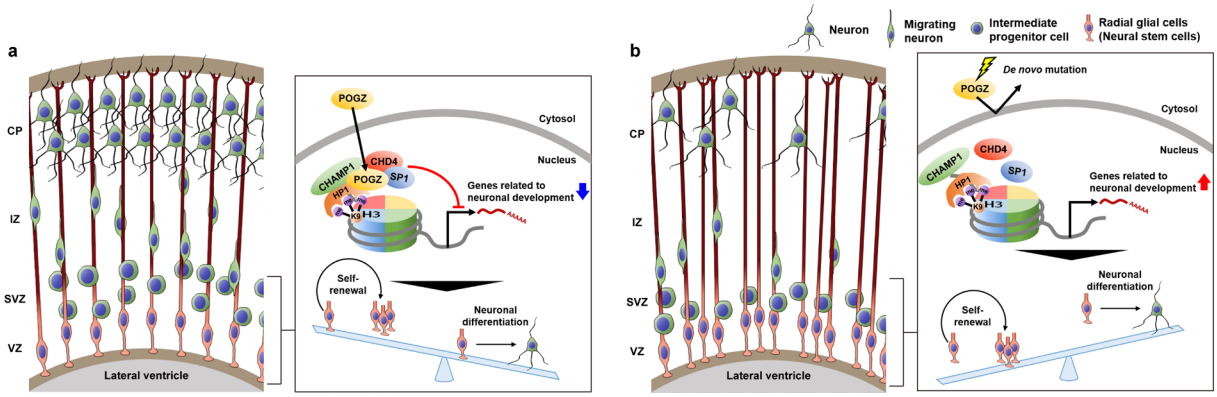


Fig. 22 | **Schmatic diagram of possible molecular mechanism for the impaired cortical neuronal development caused by NDDs-related *de novo* mutations in POGZ. a**, POGZ forms chromatin remodeling complex and promotes embryonic cortical neuronnal development via regulating transcriptional networks. **b**, Disrupted function of POGZ caused by NDDs-related *de novo* mutations in POGZ leads to impaired cortical neuronal development. CP, cortica plate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone; NDDs, neurodevelopmental disorders.

クロマチンリモデリング関連遺伝子の機能異常による大脳皮質神経細胞発達の異常と神経発達障害との関連性

本研究では、POGZ が *JAG2* をはじめとする神経分化や神経発達に関与する遺伝子ネットワークの発現を調節することによって神経発達を正に制御している可能性を見出した (Fig. 17)。POGZ と同様に、クロマチンリモデリング機能を持つ MECP2、CHD8、ARID1B、ADNP、CHD4、CHAMP1 などの多くの遺伝子に神経発達障害患者から *de novo* 変異が同定されており、クロマチンリモデリングに関与する遺伝子の機能異常による遺伝子ネットワークの発現異常が一部の神経発達障害の共通の分子メカニズムであると考えられる[13, 15, 22, 23]。例えば、ASD の症状を示すレット症候群の原因遺伝子である MECP2 は、POGZ と同様に HP1 と相互作用して H3K9me3 サイトに結合すること[63]、および神経発達を正に制御していることが報告されており[64]、POGZ

の機能異常による神経発達障害と MECP2 の機能異常によるレット症候群には共通の遺伝子ネットワークの発現変化が存在する可能性が考えられる。一方で、CHD8 は WNT シグナルなどの遺伝子ネットワークの発現を調節することによって神経発達を負に制御していることが報告されている[26]。このように、クロマチンリモデリングの機能を持つ神経発達障害関連遺伝子の機能異常による神経発達の異常は神経発達障害発症のリスクになると考えられる。興味深いことに、クロマチンリモデリングの機能を持つ遺伝子の機能異常は神経発達を遅延する場合と促進する場合があり、類似の症状を示す神経発達障害であっても、その根底にある病因や病態の分子メカニズムは全く異なる可能性がある。今後、このようなクロマチンリモデリングの機能を持つ神経発達障害関連遺伝子の機能解析や神経発達障害との関連性を見出すことで、共通の遺伝子ネットワークの同定や、分子メカニズムに基づく神経発達障害の亜分類の提案と患者選択的な治療戦略の構築に繋がることが期待される。

ASD 患者由来の *de novo* 変異が dominant negative な効果を示すメカニズム

In utero electroporation 法によって、胚齢 14 日マウス胚の大脳皮質 VZ の細胞に ASD 患者由来の *de novo* 変異型 POGZ を過剰発現した結果、GFP 陽性細胞の大脳皮質上層への移動が抑制されたことから、dominant negative な効果を示す変異である可能性が示された (Fig. 9e, f)。ASD 患者由来の *de novo* 変異型 POGZ の核局在率は低いことから、野生型 POGZ の核移行を阻害することによって dominant negative な効果を示す可能性が考えられる。しかし、ASD 患者由来の *de novo* 変異型 myc-POGZ を過剰発現した Neuro2a 細胞および SHSY-5Y 細胞において内在性の POGZ が正常に核局在していたことから、ASD 患者由来の *de novo* 変異型 POGZ は野生型 POGZ の核移行に影響を与えないことが示唆された (Fig. 3d-g, j, k)。ASD 患者由来の *de novo* 変異型 POGZ が dominant negative な効果を示す詳細なメカニズムは未解明であるが、SP1、HP1、及び CHD4 などの POGZ の相互作用因子と細胞質で結合することで、相互作用因子の核移行を阻害する可能性が考えられる。また、*de novo* 変異型 POGZ の DNA 結合能が低かったことから (Fig. 4)、POGZ によってクロマチンにリクルートされるべき相互作用因子と *de novo* 変異型 POGZ が結合することによって、野生型 POGZ による相互作用因子のクロマチンへのリクルートを競合的に阻害する可能性が考えられる。

一方で、POGZ の全てのタンパクドメインを欠失することから loss of function 変異であると考えられる *de novo* ナンセンス変異 Q180X、S278X、Y404X、および E427X が神経発達障害患者から同定されていることや (Fig. 1a)、POGZ をノックダウンすることによって、大脳皮質興奮性神経細胞の発達が抑制されたことから (Fig. 6-8)、dominant negative な効果を示す変異のみならず、POGZ の loss of function 変異も神経発達障害発症のリスクになる可能性が考えられる。

変異による機能異常が神経発達障害発症のリスクになる可能性が示唆されている遺伝子と神経発達障害との関連性の解明を目指した生物学的実験においては、ハプロ不全モデルマウスを用いた研究が多く、患者と同様の *de novo* 変異を導入したマウスを用いた研究の例は未だ報告がない。本研究によって、CENNP-DB domain 上またはその近傍に存在する ASD 患者由来の *de novo* 変異は dominant negative な効果を示すことが示されたため、*de novo* 変異に着目した神経発達障害研究においては、神経発達障害関連遺伝子のハプロ不全モデルマウスのみならず、個々の *de novo* 変異に着目した生物学的な実験が有用であると考えられる。

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質興奮性神経細胞が過活性化するメカニズム**

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスは成体期において、大脳皮質上層の興奮性神経細胞の密度が低下しているにもかかわらず (Fig. 15e, f)、社会性行動時に大脳皮質の興奮性神経細胞の過剰な活性化を示した (Fig. 20)。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの興奮性神経細胞は、細胞密度の低下に対する代償機構として CUX1 の発現を増加させる可能性が示唆された (Fig. 16)。CUX1 は興奮性神経細胞において発現する転写調節因子であり、シナプスや樹状突起の形成を調節するなど、興奮性神経細胞の成熟や神経活動を制御することが報告されていることから[65]、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質興奮性神経細胞の過剰な活性化は代償的な CUX1 発現上昇を介している可能性が考えられる。

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスと神経発達障害患者に共通した表現型**

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスは神経発達障害に関連する脳発達、神経活動、および ASD や知的障害と関連する行動の異常を示した (Fig. 11, 14, 18-20)。*POGZ* に *de novo* 変異を持ち、頭囲データを保持する神経発達障害患者 34 人のうち、13 人は小頭症の併発が報告されており[17, 31, 33-37]、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの脳サイズが小さいことに一致する (Fig. 11)。また、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは成体期において社会性行動時の大脳皮質神経細胞の過剰な活性化、すなわち E/I バランスの乱れを示した (Fig. 20)。胎生期の脳における POGZ の発現上昇はヒト (http://hbatlas.org/hbtd/images/wholeBrain/POGZ.pdf; http://hbatlas.org/hbtd/images/nctxBrain/POGZ.pdf) とマウス (Fig. 5) で共通していること、および *POGZ* に *de novo* Q1042R 変異を持つ孤発性 ASD 患者 iPS 細胞由来の神経幹細胞が胎生期の *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質神経細胞の発達の低下に類似した表現型を示すことから、大脳皮質神経細胞の発達の低下とそれに引き続く大脳皮質の神経細胞の過剰な活性化や社会性行動の低下は、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスのみならず、*POGZ* に *de novo* 変異を持つ孤発性 ASD 患者においても起きている可能性がある[66]。このように、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは神経発達障害患者と共通した表現型を示し、大脳皮質神経細胞の発達異常のモデルマウスになり得ると考えられる。今後、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスを用いた更なる研究によって、大脳皮質神経細胞の発達異常と ASD などの神経発達障害に関連する行動表現型を結び付ける分子メカニズムの解明に繋げることができると期待される。

E/I バランスの調節が ASD の治療戦略になる可能性

選択的 AMPA 受容体阻害薬による興奮性シグナルの阻害により、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動の低下が回復したことから、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの大脳皮質における興奮性神経細胞の過剰な活性化が社会性行動異常と関連することが示唆される (Fig. 21)。さらに、ASD とてんかんは併発例が多いことや、その分子メカニズムに共通点がある可能性が示唆されている[67, 68]。臨床現場において、抗てんかん薬として用いられる AMPA 受容体のネガティブ・アロステリック・モジュレーターである perampanel も *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動を回復させたことからも、ASD とてんかんの分子病態に共通点があることが支持され、perampanel のみならず他の抗てんかん薬も、未だ治療薬のない ASD の中核症状である社会的相互作用の低下の治療薬へのドラッグリポジショニングの候補となる可能性が考えられる。

本研究で用いた *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスを含めて、ASD 関連遺伝子の遺伝子改変マウスに共通して認められる生物学的異常の一例として、E/I バランスの乱れが挙げられる。脳内では E/I バラ

ンスが厳密に調節されることによって正常な脳機能が保たれ、E/I バランスの乱れは社会性行動や認知機能の低下に繋がると考えられている [69, 70]。例えば、ASD から数多くの *de novo* 変異が同定されている *CHD8* ヘテロノックアウトマウスは線条体における mEPSC の振幅の増加を示し[25]、*ARID1B* ヘテロノックアウトマウスは大脳皮質における mIPSC の頻度の低下を示す[28]。すなわち、*CHD8* および *ARID1B* ヘテロノックアウトマウスは *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスと同様に E/I バランスの興奮性シグナルへの偏りを示す。一方で、同じく ASD 関連遺伝子である *TAOK2* ヘテロノックアウトマウスは大脳皮質における mEPSC の頻度の低下、すなわち E/I バランスの抑制性シグナルへの偏りを示す[71]。従って、ASD 関連遺伝子の遺伝子改変マウスには E/I バランスの乱れという共通点がある一方で、E/I バランスの乱れる方向性は共通していないと考えられる。今後 ASD や神経発達障害に関連する遺伝子に着目した生物学的研究を進めることによって、E/I バランスの乱れに基づく神経発達障害の新たな亜分類の提案と、E/I バランスの乱れ方に応じたグルタミン酸シグナルの調節などの患者選択的な治療戦略の構築を実現できることが期待される。

第二章　自閉症スペクトラム障害関連タンパク **protein kinase D2** の胎生期大脳皮質神経発達における機能解析

Protein kinase D (PKD) は catalytic domain と 2 つの protein kinase C (PKC) に類似した cysteine-rich phorbol ester binding domain を持つセリン・スレオニンキナーゼである[39, 40]。PKD1、PKD2、および PKD3 から成る PKD ファミリーは細胞種や細胞外からの刺激に応じて異なる発現パターンを示すことで知られている[72, 73]。例えば、PKD2 は末梢の増殖性細胞において細胞増殖と分化に関与している[74, 75]。さらに、PKD2 は脳においても高発現し、神経の多極性を制御することが報告されている[76. 77]。

これまでに私たちを含めた 2 グループが孤発性 ASD 患者から *PKD2* に *de novo* 変異を同定しており[15, 16]、*de novo* 変異による PKD2 の機能異常が ASD 発症のリスクになる可能性が考えられる。大脳皮質の神経細胞の発達異常は ASD の原因の 1 つであることが示唆されているが[78-81]、脳発達における PKD2 の機能は不明である。

本研究では、大脳皮質神経細胞の発達における PKD2 の機能解析を *in vivo* で実施した。*Pkd2* は胎生期大脳皮質の神経幹細胞において高発現し、*Pkd2* のノックダウンによってマウス胚の大脳皮質神経細胞の発達が抑制された。さらに、ASD 患者由来の *de novo* 変異を導入した PKD2 の自己リン酸化レベル、および PKD2 の下流シグナルである ERK1/2 のリン酸化レベルが低下していたため、PKD2 の ASD 患者由来の *de novo* 変異によって PKD2 のキナーゼ活性が低下する可能性が示唆された。以上の結果から、PKD2 が胎生期の大脳皮質神経細胞の発達を制御すること、および ASD 患者由来の *de novo* 変異は PKD2 の機能に異常を与えることで ASD の発症のリスクになる可能性が示唆された。

実験結果

マウス脳における *Pkd2* の発現パターン解析

PKD2 の脳発達における機能を明らかにするため、まずマウス発達過程の脳内 *Pkd2* の発現解析を行った。胚齢 10 日から 8 週齢の間の脳内における *Pkd2* の発現量を定量的 RT-PCR によって解析した結果、*Pkd2* は胎生期の神経発生の時期である胚齢 10 日から 16 日の間に発現が高く、生後は発現量が徐々に低下することが明らかになった (Fig. 23a)。そこで、胚齢 16 日マウス胚における *Pkd2* の脳内発現分布を調べるため、マウス胚の各脳領域における *Pkd2* の発現量を解析した。*Pkd2* は特に大脳皮質の神経幹細胞である放射状グリア細胞が多く存在し、胎生期の神経細胞産生の場である脳室帯/脳室下帯 (VZ/SVZ) において高発現していた (Fig. 23b)。そこで、*in vitro* で培養したマウス初代培養神経細胞とマウス神経幹細胞における *Pkd2* の発現量を解析した結果、*Pkd2* は神経細胞よりも神経幹細胞において高発現することが明らかになった (Fig, 23c)。本研究で明らかになった *Pkd2* の発現パターンは、PKD2 が胎生期の大脳皮質神経細胞の発達に関与していることを示唆している。

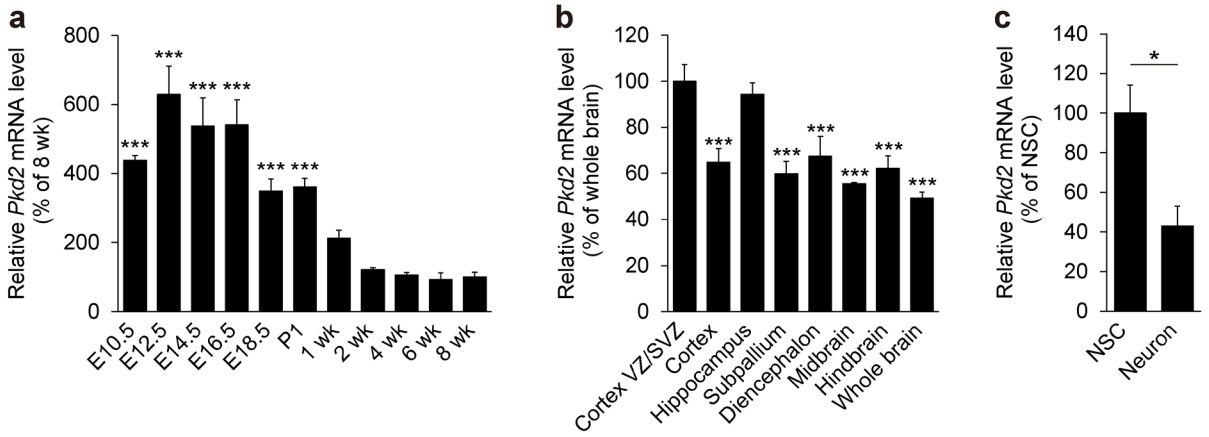


Fig. 23 | ***Pkd2* is highly expressed in NSCs of the mouse embryonic cerebral cortex.** **a**, qRT-PCR analysis of temporal expression patterns of *Pkd2* mRNA in the mouse brain (each n = 3). E, embryonic day; wk, week-old. **b**, qRT-PCR analysis of regional expression patterns of *Pkd2* mRNA in the mouse brain at E16.5 (each n = 3). VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. **c**, qRT-PCR analysis of the expression levels of *Pkd2* mRNA in NSCs and neurons (each $n = 3$). **a**, **b**, one-way ANOVA with *Bonferroni-Dunn* post hoc tests; **a**, $F_{10, 22} = 20.24$; **b**, $F_{7, 16} = 12.12$. **c**, Student's *t* test. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [42].

***Pkd2* のノックダウンがマウス大脳皮質神経細胞発達に与える影響の解析**

胎生期の神経発達における PKD2 の機能を明らかにするため、*Pkd2* をターゲットにする shRNA (MISSION TRC shRNA library SP1, SIGMA-Aldrich) と miR30-based shRNA (shRNA^{miR30}) の 2 種類の遺伝子ノックダウン法を用いた。shPKD2 もしくは shPKD2^{miR30}、及び PKD2 をコードするプラスミドベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションによって導入し、*Pkd2* の発現量を解析した結果、*Pkd2* の発現低下を確認することができた (Fig. 24a, d)。そこで、胚齢 14 日マウス胚の大脳皮質 VZ の細胞に GFP、shRNA、および PKD2 をそれぞれコードするプラスミドベクターを *in utero* electroporation 法によって導入し、胚齢 18 日において GFP 陽性細胞を観察した。大脳皮質を皮質板上層 (Upper CP)、皮質板下層 (Lower CP)、および中間層/脳室下帯 (IZ/SVZ) の 3 層に分けて、各層の GFP 陽性細胞の割合を測定することで、GFP 陽性細胞の移動を評価した。MISSION shPKD2 の導入によって GFP 陽性細胞の大脳皮質上層への移動は抑制された (Fig. 23b, c)。野生型 PKD2 の強制発現は *Pkd2* ノックダウンによる GFP 陽性細胞の移動の抑制を回復しなかった一方で、PKD2 の活性型変異体である PKD2$^{S706/710E}$ の強制発現によって、移動の抑制は回復した(Fig. 24b, c)。また、shPKD2^{miR30} による *Pkd2* のノックダウンによっても GFP 陽性細胞の移動は抑制された (Fig. 24e, f)。以上の結果から、PKD2 が胎生期の大脳皮質において神経発達を制御していることが明らかになった。

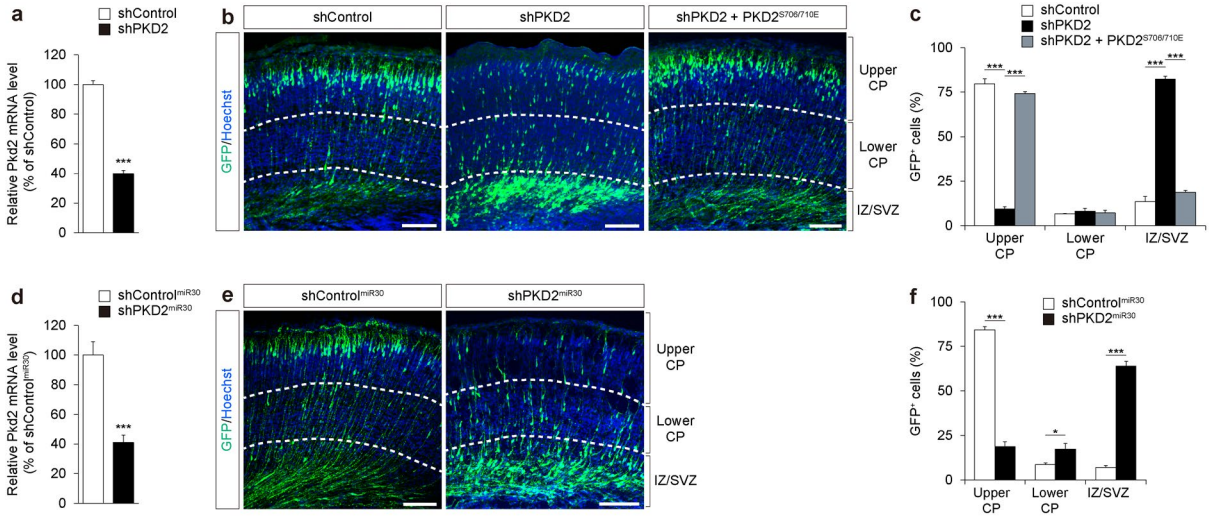


Fig. 24 | **The neuronal migration is impaired by *Pkd2* knockdown in the mouse developing cerebral cortex**. **a**, **d**, The knockdown efficacy of shPKD2 measured in HEK293T cells transfected with pcDNA3 expression constructs encoding WT mouse PKD2 and MISSION shRNA vectors (**a**) or shRNA^{miR30} vectors (**d**) (each n = 4). **b**, **e**, The representative images of embryonic cortical sections at E18.5, 4 days after *in utero* electroporation. Scale bars, 100 μm. **c**, **f**, Quantification of GFP^{+} cell position in indicated zone of developing cortex as a percentage of total GFP^{+} cells (each n = 4). CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; SVZ, subventricular zone. **a**, **d**, Student's *t* test. **c**, **f**, two-way ANOVA with *Bonferroni-Dunn* post hoc tests; **c**, $F_{4, 27} = 493.8$; **f**, $F_{2, 18} = 400.3$. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [42].

PKD2 の神経分化における機能をさらに解析するため、胚齢 14 日に *in utero* electroporation 法により、大脳皮質脳室帯 (VZ) の細胞へ GFP、shRNA、および PKD2 をそれぞれコードするプラスミドベクターの導入を行い、大脳皮質上層への細胞の移動が途中である胚齢 16 日においてマウス胚の脳切片を作製した。胚齢 16 日マウス胚の脳切片において神経幹細胞のマーカーである PAX6、神経前駆細胞のマーカーである TBR2、および神経細胞のマーカーである SATB2 の免疫染色を行い、各マーカー陽性の GFP 陽性細胞の割合を測定し、*Pkd2* のノックダウンが神経分化に与える影響を解析した。*Pkd2* のノックダウンによって PAX6 陽性の GFP 陽性神経幹細胞の割合が増加した (Fig. 25a, b)。神経幹細胞の増加に伴い、*Pkd2* ノックダウン群では TBR2 陽性の神経前駆細胞および SATB2 陽性の神経細胞の割合が低下した (Fig. 25c-f)。これらの *Pkd2* のノックダウンによる各神経細胞種の割合の変化は、PKD2$^{S706/710E}$ の強制発現によって回復した。従って、PKD2 が胎生期の神経発達において、神経幹細胞の神経分化を制御していることが明らかになった。

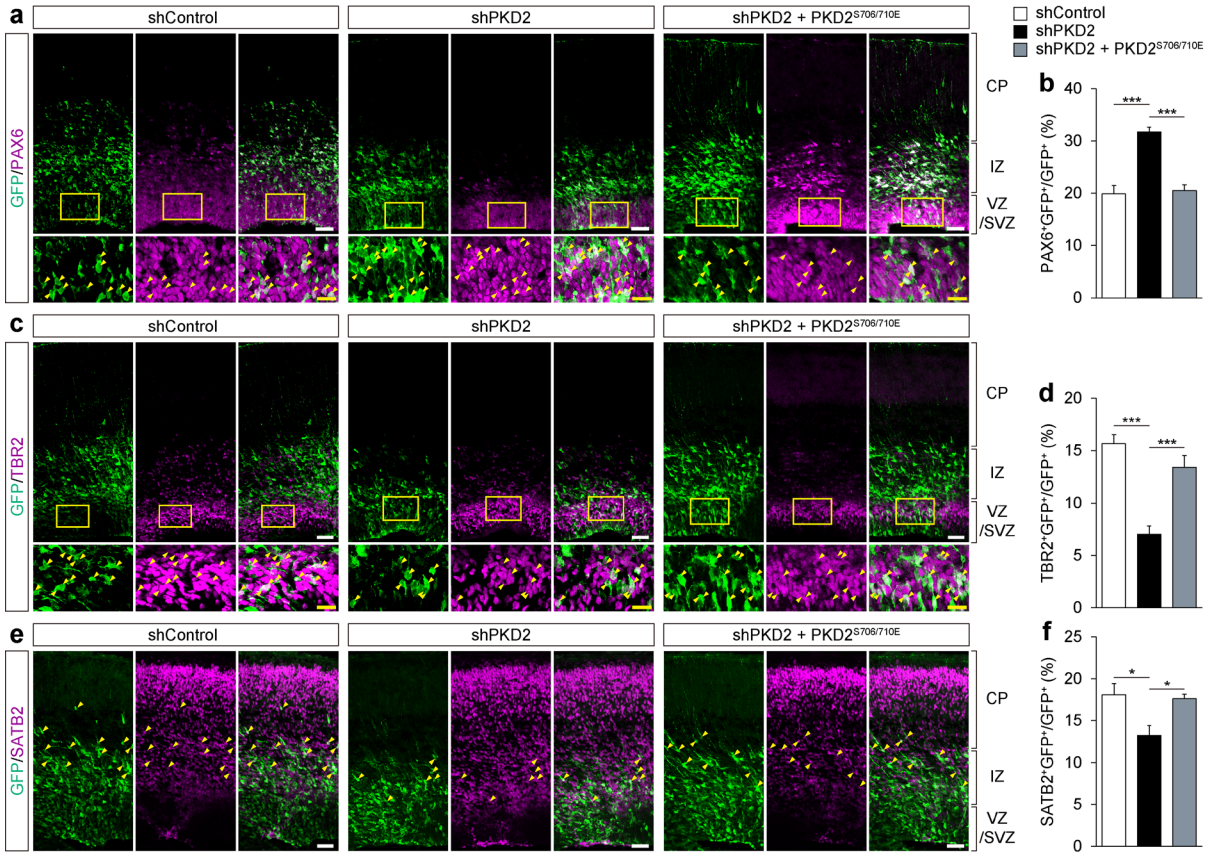


Fig. 25 | **The neuronal differentiation of NSCs is impaired by *Pkd2* knockdown in the mouse developing cerebral cortex.** **a**, **c**, **e**, The representative images of embryonic cortical sections at E16.5, 2 days after *in utero* electroporation. Immunohistochemistry for GFP and PAX6 (**a**), TBR2 (**c**), or SATB2 (**e**) is shown. Yellow boxes indicate area enlarged in the lower panels. Arrowheads indicate co-labelled cells. White scale bars, 50 µm; yellow scale bars, 20µm. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone, VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone. **b**, **d**, **f**, Quantification of each cell marker$^+$ GFP$^+$ cells as a percentage of total GFP$^+$ cells (each n = 4). One-way ANOVA with *Bonferroni-Dunn* post hoc tests; **b**, $F_{2, 9} = 29.32$; **d**, $F_{2, 9} = 23.69$; **f**, $F_{2, 9} = 6.105$. $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$. Data are presented as mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [42].

ASD 患者由来の *de novo* 変異が PKD2 のキナーゼ活性に与える影響の解析

以前の共同研究によって私たちは、ASD 患者から PKD2 の C1a モチーフ上に *de novo* 変異 S183N を同定している [16] (Fig. 26a)。また、他の研究グループは ASD 患者から C1a モチーフと C1b モチーフの間に *de novo* 変異 R232C を同定している[15] (Fig. 26a)。これらの *Pkd2* 上の *de novo* 変異が PKD2 のキナーゼ活性に与える影響を解析するため、まず PKD2 のキナーゼ活性に関与していることが報告されている PKD2 の 876 番目のセリン (S876) の自己リン酸化レベルを解析した[82]。myc タグ付加した野生型、S183N 変異型、または R232C 変異型 PKD2 を HEK293T 細胞に強制発現させ、western blot によって S876 の自己リン酸化レベルを解析した結果、野生型 PKD2 に比べて *de novo* 変異型 PKD2 の自己リン酸化レベルは低下していた (Fig. 26b, c)。次に、PKD2 は ERK の上流因子であるため[83, 84]、myc タグ付加した野生型、S183N 変異型、または R232C 変異型 PKD2 を強制発現した HEK293T 細胞において、ERK のリン酸化レベルを解析した。野生型 PKD2 強制発現群に比べて、*de novo* 変異を導入した PKD2 強制発現細胞では ERK のリン酸化レベルが低下していた (Fig. 26d, e)。以上の結果から、ASD 患者由来の *de novo* 変異によって PKD2 のキナーゼ活性が減弱する可能性が示された。

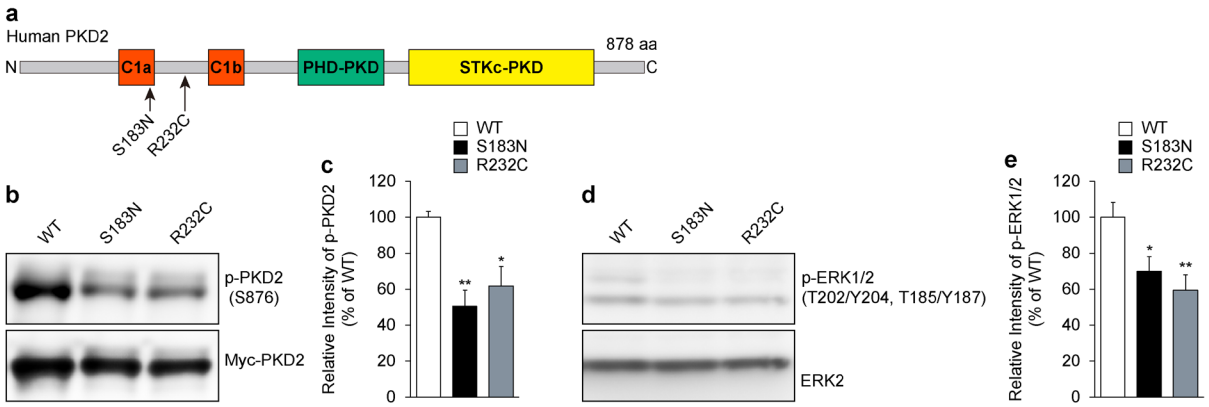


Fig. 26 | **The kinase activities of ASD-associated *de novo* mutated PKD2 variants is attenuated. a**, Schematic image of human PKD2 protein (NP_057541.2) and *de novo* mutations. C1a and C1b, Protein kinase C conserved phorbol esters/diacylglycerol binding domain; PH-PKD, Protein kinase D pleckstrin homology (PH) domain, STKc-PKD, Catalytic domain of the Serine/Threonine kinase, Protein kinase D. **b**, Representative western blots for phosphorylated PKD2 (p-PKD2) (S876) and myc. **c**, Quantification of relative band intensity of p-PKD2 (S876) normalized by each myc-tagged PKD2 level (each n = 4). **d**, Representative western blots for p-ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187) and ERK2. **e**, Quantification of relative band intensity of p-ERK1/2 normalized by each ERK2 level (each n = 4). One-way ANOVA with *Bonferroni-Dunn* post hoc tests; **c**, $F_{2, 9} = 9.594$; **e**, $F_{2, 9} = 6.362$. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. Data are presented as mean ± s.e.m. This figure and figure legend are quoted from the reference [42].

考察

これまでの私たちの研究によって、PKD2 がレチノイン酸によって誘導される Neuro2a 細胞の神経発達を正に制御することが見出されている[16]。また、PKD2 が神経細胞の多極性を制御することも報告されていたが[76, 77]、脳発達期の神経細胞発達における PKD2 の機能は不明であった。本研究によって、*Pkd2* が胎生期の神経産生が盛んに起こるの時期に、大脳皮質 VZ/SVZ の神経幹細胞において高発現することが明らかになった (Fig. 23)。また、PKD2 が脳発達期の神経幹細胞の神経分化および新生神経細胞の大脳皮質上層への移動を制御していることを *in vivo* ではじめて明らかにした (Fig. 24, 25)。さらに、*PKD2* の ASD 患者由来の *de novo* 変異によって、PKD2 のキナーゼ活性が低下することが明らかになった (Fig. 26)。ASD と大脳皮質の発達の異常との関連性が報告されていることを踏まえると[78-81]、*PKD2* の *de novo* 変異による大脳皮質神経細胞の発達の低下が ASD 発症の分子メカニズムの一端である可能性が考えられる[42]。

PKD2 が大脳皮質神経細胞の発達を制御するメカニズム

ERK の活性化は神経分化[85, 86]や細胞移動[87, 88]をはじめとする神経発達において重要な役割を担っている。ERK の活性化は STAT3 経路の活性化を介して神経分化を促進する一方で[86, 89]、ERK の活性低下は Akt 経路を活性化して、神経幹細胞を神経分化から自己増殖の方向へと調節する[90]。このように、ERK シグナルは神経幹細胞の神経分化と自己増殖のバランスを制御していることが報告されている。PKD2 は下流の ERK の活性を調節することによって、神経幹細胞の自己増殖と神経分化のバランス、すなわち脳発達期の大脳皮質神経細胞の発達を制御している可能性がある (Fig. 27)。

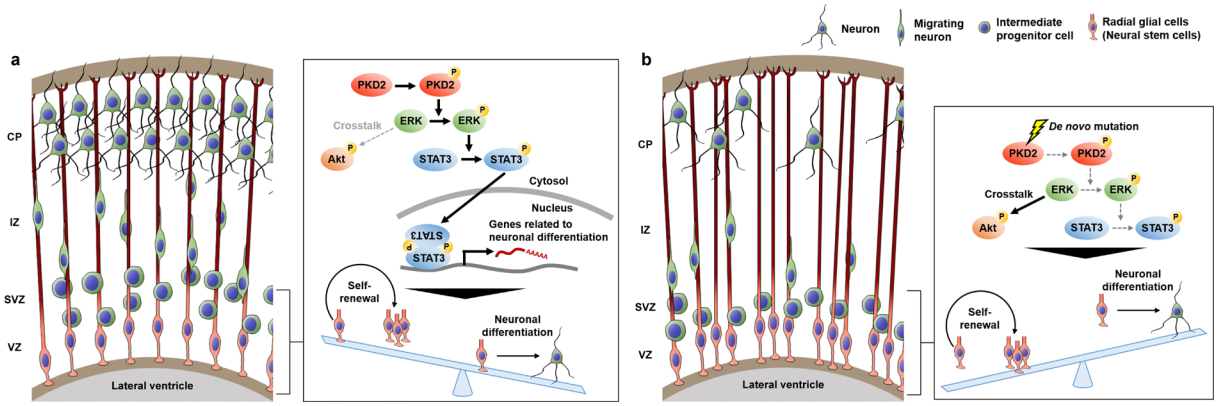


Fig. 27 | **Schematic diagram of possible molecular mechanism for the cortical neuronal development regulated by PKD2.** **a**, PKD2 regulates the balance between neuronal differentiation and self-renewal of neural stem cells via phosphorylation of ERK in developing cerebral cortex. **b**, Impaired kinase activity of PKD2 caused by ASD-related *de novo* mutations in PKD2 shift the balance between neuronal differentiation and self-renewal of neural stem cells towards the self-renewal. CP, cortical plate; IZ, intermediate zone; VZ, ventricular zone; SVZ, subventricular zone.

***In utero* electroporation 法による検討において野生型 PKD2 の強制発現が *Pkd2* ノックダウンの表現型を回復しなかったメカニズム**

PKD2 の活性型変異体である PKD2$^{S706/710E}$ の強制発現は *Pkd2* ノックダウンによる大脳皮質神経細胞の発達の抑制を回復したのに対し (Fig. 24, 25)、野生型 PKD2 の強制発現では回復することができなかった (data not shown)。野生型 PKD2 の強制発現が *Pkd2* ノックダウンの表現型を回復しない詳細なメカニズムは不明であるが、強制発現した PKD2 の発現量が内在性の PKD2 に比べて不十分であった可能性、強制発現した *Pkd2* が内在性 *Pkd2* と同様の細胞内局在を示すことができない可能性、および細胞内での正常な PKD2 の機能には内在性のものと同様な mRNA のスプライシングが必要である可能性などが考えられる。PKD2 の活性型変異体の PKD2$^{S706/710E}$ の強制発現によって *Pkd2* のノックダウンの表現型が回復したことから、より発現量の多い強制発現システムによって野生型 PKD2 を発現させることで、*Pkd2* ノックダウンの表現型が回復する可能性がある。

ASD 患者由来の *de novo* 変異によって PKD2 のキナーゼ活性が低下するメカニズム

以前の共同研究によって私たちが ASD 患者から PKD2 の C1a モチーフ上に同定した *de novo* 変異 S183N [16]、および他の研究グループが ASD 患者から C1a モチーフと C1b モチーフの間に同定した *de novo* 変異 R232C [15] は PKD2 のキナーゼ活性を低下させた (Fig. 26)。PKD2 は、C1a モチーフと C1b モチーフからなる C1 ドメインのジアシルグリセロール (DAG) または phorbol ester への結合を介して活性化することが知られている[40, 73]。ASD 患者から同定された *PKD2* の *de novo* 変異は C1a モチーフ上または C1a モチーフと C1b モチーフの間に存在するため、PKD2 の DAG や phorbol ester への結合能を低下させる可能性が考えられる。DAG は細胞膜に存在するため、PKD2 は活性化の際に細胞膜に移行する可能性がある。そこで今後、myc タグ付加した野生型または ASD 患者由来の *de novo* 変異型 PKD2 を細胞に過剰発現させ、*de novo* 変異型 PKD2 の細胞膜移行能や、phorbol ester を添加した際の自己リン酸化レベルなどの phorbol ester に対する応答性を解析することによって、ASD 患者由来の *PKD2* の *de novo* 変異が PKD2 のキナーゼ活性を低下させるメカニズムの解明に繋げることができると考えている。

PKD ファミリーおよび PKC ファミリーの ASD 患者由来 *de novo* 変異

ASD 患者由来の *de novo* 変異は PKD2 のみならず、他の PKD ファミリーメンバーである *PKD1* および *PKD3*、PKD ファミリーに近いキナーゼファミリーである PKC ファミリーの *PKCA*、*PKCB*、*PKCE*、*PKCQ*、および *PKC2* にも同定されている[13, 15, 17, 23, 91-94] (Table 2)。また、遺伝学研究や生物学的研究から PKC シグナルの異常と ASD との関連性が示唆されている[95-97]。今後、PKD ファミリーや PKC ファミリーの *de novo* 変異に着目した更なる研究によって、ASD の病因や病態の一端の解明に近付き、PKD および PKC シグナルの異常が発症に寄与する ASD という新たな疾患の亜分類の提案に繋がることが期待される。

Table 2 *De novo* mutations in other PKD family members and distantly related PKC family members.

Gene	Chromosome	Position	Reference allele	Alternate allele	Type	Reference
PKD1	14	30095782	g	ga	Intron	Sanders S. J. et al., Neuron, 2015
		30102082	t	c	Missense	De S. Rubeis et al., Nature, 2014
		30102146	g	a	Missense	Iossifov I. et al., Nature, 2014
		30107763	a	t	Missense	Lelieveld S. H. et al., Nat. Neurosci., 2016
		30107911	a	c	Missense	D. D. D. Study, Nature, 2015*
PKD3	2	37486740	c	t	Missense	D. D. D. Study, Nature, 2017*
PKCA	17	64683232	g	a	Missense	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
		64684446	g	a	Missense	O'Roak B. J. et al., Nature, 2012
		64685129	c	t	Synonymous	Iossifov I. et al., Nature, 2014
		64770121	c	t	Missense	Iossifov I. et al., Nature, 2014
PKCB	16	24105500	g	a	Missense	Iossifov I. et al., Nature, 2014
PKCE	2	45856344	c	g	Intron	Kong A. et al., Nature, 2012
PKCQ	10	6470365	t	c	Intron	Sanders S. J. et al., Neuron, 2015
PKC2	1	1998705	t	g	Intron	Kong A. et al., Nature, 2012

*D. D. D. : Deciphering Developmental Disorders

This table is quoted from the reference [42].

総括

本研究では、*POGZ* および *PKD2* の *de novo* 変異と ASD 発症との関連性を解明する目的で、それぞれの遺伝子産物の脳発達における機能解析および個々の遺伝子の *de novo* 変異がその遺伝子産物の機能に与える影響の解析を行った。その結果、以下の知見を得ることができた。

第一章

1. POGZ が *JAG2* などの遺伝子ネットワークの発現調節を介して大脳皮質神経細胞の発達を制御する可能性を示唆することができた (Fig. 5-8, 17)。
2. POGZ の ASD 患者由来の *de novo* 変異は POGZ の核局在、および大脳皮質神経細胞の発達における機能を低下させる一方で、健常者由来の *de novo* 変異はそれらに影響を与えなかった (Fig. 3, 9)。
3. *POGZ* に *de novo* Q1042R 変異を持つ ASD 患者 iPS 細胞由来の神経幹細胞は神経分化能の低下および自己増殖能の増加を示した (Fig. 10)。
4. *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは大脳皮質興奮性神経細胞の発達の低下、大脳皮質興奮性神経細胞の過剰な活性化、および ASD をはじめとする神経発達障害と関連する行動異常の表現型を示した (Fig. 11-16, 18-20)。
5. *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの社会性行動の低下は、競合的 AMPA 受容体阻害薬である NBQX、および AMPA 受容体のネガティブ・アロステリック・モジュレーターである抗てんかん薬 perampanel によって回復した (Fig. 21)。

第二章

1. PKD2 は神経産生期の大脳皮質神経幹細胞において高発現し、神経分化および神経発達を制御していた (Fig. 23-25)。
2. *PKD2* の ASD 患者由来の *de novo* 変異によって PKD2 のキナーゼ活性は低下していた (Fig. 26)。

本研究では、*in vivo* で初めて ASD 関連遺伝子である POGZ と PKD2 の脳発達における機能を明らかにした。特に第一章では、*de novo* 変異を持つ ASD 患者由来 iPS 細胞とその変異に対応する変異を導入したマウスを融合的に解析するという、世界でも極めて稀な手法を用いて研究を実施した点に新規性がある。本研究によって、*POGZ* の *de novo* 変異により大脳皮質興奮性神経細胞の発達が低下し、成体期における興奮性神経細胞の過剰な活性化と社会性行動の低下に繋がるという新たな仮説を提案することができた。今後は、ASD 患者由来 iPS 細胞を脳に類似した 3 次元構造体であるオルガノイドに分化させた実験や、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスが大脳皮質の神経細胞の過剰な活性化を示す詳細なメカニズムの解明を目指した実験を行うことで、ASD の病因や病態のさらに詳細な分子メカニズムや新たな治療戦略の提案に貢献することができると期待される。また第二章では、PKD2 の患者由来の *de novo* 変異が、PKD2 のキナーゼ活性に影響を与えるという、PKD および PKC ファミリーの研究では初めての知見を得ることができた。今後 PKD2 のみならず、他の PKD ファミリーおよび PKC ファミリーの *de novo* 変異に着目した分子細胞生物学的研

究を進めることで、PKD および PKC 関連シグナルの異常に注目した ASD の新たな亜分類を提示するとともに、PKD および PKC 関連シグナルに着目した治療戦略の構築に繋げることができると期待される。第一章および第二章の研究成果は、ASD 関連遺伝子の個々の *de novo* 変異に着目した生物学的研究の手法や重要性を示すものであり、*de novo* 変異に着目した ASD 研究において重要な知見であると考えられる。

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に基づき、大阪大学研究倫理審査委員会の承認のもとで遂行した。全ての組み換え DNA 実験は大阪大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認と監査のもとで遂行した。全ての動物実験は大阪大学、東京慈恵会医科大学、および理化学研究所筑波研究所の動物実験委員会の承認のもとで、ガイドラインに従って遂行した。全てのヒト研究試料を用いた実験は大阪大学研究倫理審査委員会のヒト組織研究審査の承認のもとで、大阪大学におけるヒトゲノム研究に関する規定に従って遂行した。

POGZ の *de novo* 変異の情報

参考文献から変異と疾患情報を収集した (Table 3)。

Table 3 *De novo* mutations in *POGZ*

Subject ID	Position (GRCh37)	Mutation (NM_015100.4)	Amino-acid change	Case	Reference
EE6	151402109	c.538C>T	Q180X	ASD	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
3	151400625	c.833C>G	S278X	ASD/ID	White J. et al., Genome Med., 2016
14483.p1	151400436	c.941G>A	S314N	ASD	Iossifov I. et al., Nature, 2014
UMCN5	151397464	c.1152dup	R385Sfs*4	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
DDD4K.00380	151397434	c.1181_1182insAT	M394Ifs*76	Unclassified NDDs	DDD Study, Nature, 2017*
EE5	151396736	c.1212C>A	Y404X	ASD	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
-	151396670_151396671	c.1277_1278insC	E427X	ID	Tan B. et al., J Hum Genet., 2016
14551.p1	151384237	c.1790A>G	Y597C	ASD	Iossifov I. et al., Nature, 2014
FR5	151384217	c.1810G>T	E604X	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
2-1402-003	151384104	c.1923C>G	H641Q	ASD	Yuen R. et al., Nat. Neurosci., 2017
UMCN7	151381211	c.2020delC	R674Vfs*9	ASD/ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
EE4	151381211	c.2020delC	R674Vfs*9	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
1	151381022_151381025	c.2094_2097dupAACT	V700Nfs*7	Unclassified NDDs	Ye Y. et al., Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015
EE3	151380920_151380922	c.2197_2199delGTC	V733del	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
UMCN4	151380688	c.2263delG	E755Sfs*36	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
EE8	151380660	c.2291delC	P764Lfs*27	ASD	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
DDD4K.03076	151380641	c.2310C>G	Y770X	Unclassified NDDs	DDD Study, Nature, 2017*
1	151380630_151380627	c.2321_2324delCTCT	S774Cfs*16	ID	White J. et al., Genome Med., 2016
EE10	151379747	c.2396G>A	S799N	ASD	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
FR2	151379743	c.2400dupC	K801Qfs*7	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
10C102646	151379469	c.2459_2462dupGTAC	F822Yfs*43	ASD	Neale B.M. et al., Nature, 2012
EE9Ψ	151379431	c.2501delT	L834Wfs*20	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
7	151379418	c.2514dupC	S839Lfs*25	Unclassified NDDs	Ye Y. et al., Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015
FR4	151378937	c.2574delT	H858Qfs*13	ASD/ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
UMCN1	151378921	c.2590C>T	R864X	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
DDD4K.02675	151378800	c.2711T>A	L904X	Unclassified NDDs	DDD study, Nature, 2015*
3	151378761	c.2750dupC	P918Tfs*26	Unclassified NDDs	Ye Y. et al., Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015
2	151378748	c.2763dupC	T922Hfs*22	ID	White J. et al., Genome Med., 2016
5	151378731	c.2780dupT	L927Pfs*17	ASD/ID	White J. et al., Genome Med., 2016
-	151378691	c.2820insG	N941Efs*3	ASD/ID	Dentici M.L. et al., Am J Med Genet A., 2017
FR3	151378675	c.2836delG	D946Mfs*12	ASD/ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
4	151378576	c.2935C > T	R979X	ID	White J. et al., Genome Med., 2016
FR6	151378510	c.3001C>T	R1001X	ASD/ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
DDD4K.00566	151378510	c.3001C>T	R1001X	Unclassified NDDs	DDD Study, Nature, 2017*
13627.p1	151378489	c.3022C>T	R1008X	ASD	Iossifov I. et al., Nature, 2014
2	151378480	c.3031C > T	Q1011X	Unclassified NDDs	Ye Y. et al., Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015
UMCN10	151378471	c.3040C>T	Q1014X	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
4	151378470	c.3041delA	Q1014Rfs*5	Unclassified NDDs	Ye Y. et al., Cold Spring Harb Mol Case Stud., 2015
-	151378393	c.3118G>A	E1040K	ASD	Fukai R. et al., J Hum Genet., 2015
P1381	151378386	c.3125A>G	Q1042R	ASD	Hashimoto R. et al., J Hum Genet., 2016
EE7	151378372	c.3139G>T	E1047X	ASD	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
DDD4K.01196	151378156	c.3354delC	L1119Cfs*3	Unclassified NDDs	DDD study, Nature, 2015*
UMCN3	151378055_151378054	c.3456_3457delAG	E1154Tfs*4	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
UMCN9	151378055_151378054	c.3456_3457delAG	E1154Tfs*4	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
13398	151377904	c.3600_3607dupTGATGACG	E1203Vfs*28	ASD	DDD Study, Nature, 2017*
DDD4K.03715	151377883	c.3628A>C	T1210P	Unclassified NDDs	DDD Study, Nature, 2017*
UMCN8	151377664	c.3847C>T	Q1283X	ID	Stessman, H.A.F. et al., Am J Hum Genet., 2016
181481	151414613	c. 68A>G	D23G	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
304150	151403194	c. 407A>G	N136S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
04C37021A	151402172	c. 475A>G	N159D	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
373385	151400355	c. 1022A>G	N341S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
11999.s1	151397495	c.1121G>A	R374Q	Control	Sanders S. et al., Neuron, 2015
339733	151397480	c. 1136G>A	R379Q	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
DDD_MAIN5354965	151396611	c. 1377C>T	P446L	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
94124	151396443	c. 1505G>A	R502K	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
185197	151396443	c. 1505G>A	R502K	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
05C43449A	151384780	c. 2086G>A	V591I	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
252240	151384132	c. 1895A>G	N632S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
328789	151384132	c. 1895A>G	N632S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
347306	151384132	c. 1895A>G	N632S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
572608	151384132	c. 1895A>G	N632S	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
514341	151381211	c. 2020C>T	R674C	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
UK10K_GS5336859	151379753	c. 2390G>A	R797Q	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
05C39335A	151379450	c. 2482G>A	D828N	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
476929	151378497	c. 3014G>A	R1005H	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
UK10K_SKUSE5080294	151378497	c. 3014G>A	R1005H	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
DDD_MAIN5318548	151378358	c. 3153C>G	F1051L	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
451927	151378260	c. 3251A>G	H1084R	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
04C27862A	151378203	c. 3308T>A	L1103H	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
200098	151377648	c. 3863C>T	A1288V	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
DDD_MAIN5247205	151377648	c. 3863C>T	A1288V	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014
373775	151377301	c. 4210G>A	D1404N	Control	De Rubeis S. et al., Nature, 2014

*DDD : Deciphering Developmental Disorders

This table is quoted from the reference [39].

MISSION shRNA ベクター、miR30-based shRNA ベクター、POGZ 発現ベクター、および PKD2 発現ベクター

MISSION shRNA TRC1 ベクターは SIGMA-Aldrich (MO, USA) から購入した (Table 4)。

shPOGZ^{miR30} および shPKD2^{miR30} のヘアピン構造の塩基配列はオンラインツール (http://cancan.cshl.edu/RNAi_central/RNAi.cgi?type=shRNA) でデザインした (Table 5)。shRNA^{miR30}配列を持つ鋳型のオリゴ DNA はユーロフィン (Tokyo, Japan) から購入し、PCR によって増幅して pCAG-miR30 ベクターにサブクローニングした。

mPOGZ cDNA (DNAFORM, Kanagawa, Japan, clone ID: 30745658)、hPOGZ cDNA (DNAFORM, clone ID: 100066397)、および PKD2 cDNA (Kazusa DNA Res. Inst., Chiba, Japan, clone ID: cp93316) は PCR によって増幅して pcDNA3-6Myc ベクターにサブクローニングした。変異型 POGZ および変異型 PKD2 は KOD mutagenesis kit (Toyobo, Osaka, Japan) のプロトコルに従って作製した。

Table 4 MISSION shRNA TRC1 vectors

shRNA	TRC number	Hairpin Sequence (5' flanking-Sense Strand-Loop-Antisense Strand-3' flanking)
shPOGZ 1	TRCN0000098925	CCGG-CCTGTGAATTTGTGGGTTATT-CTCGAG-AATAACCCACAAATTCACAGG-TTTTTG
shPOGZ2	TRCN0000098926	CCGG-GCCAACAACAATGCTGGTAAT-CTCGAG-ATTACCAGCATTGTTGTTGGC-TTTTTG
shPOGZ3	TRCN0000098927	CCGG-CCATGAAGATACTCGGCATTT-CTCGAG-AAATGCCGAGTATCTTCATGG-TTTTTG
shPOGZ4	TRCN0000098929	CCGG-GCCAAACAGTTAGACCAATTA-CTCGAG-TAATTGGTCTAACTGTTTGGC-TTTTTG
shPKD2	TRCN0000024328	CCGG-GTACGACAAGATCCTGCTCTT-CTCGAG-AAGAGCAGGATCTTGTCGTAC-TTTTT

Table 5 miR30-based shRNA vector

shRNA^{miR30}	Hairpin Sequence (5' flanking-Sense Strand-Loop-Antisense Strand-3' flanking)
shPOGZ^{miR30}	TGCTGTTGACAGTGAGCG-AGGCCCGAATCTTCAGTGAAAG-TAGTGAAGCCACAGATGTA-CTTTCACTGAAGATTCGGGCCC-TGCCTACTGCCTCGGA
shPKD2^{miR30}	TGCTGTTGACAGTGAGCG-CGCAGTAAAGGTCATTGACAAA-TAGTGAAGCCACAGATGTA-TTTGTCAATGACCTTTACTGCA-TGCCTACTGCCTCGGA

These tables are quoted from the reference [39].

抗体

Immunoblotting 法に用いた一次抗体 rabbit anti-POGZ (SIGMA-Aldrich, #AV39172, 1:1000)、mouse anti-TUJ1 (Covance, CA, USA), mouse anti-Myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, #sc-40, 1:400)、rabbit anti-Lamin A/C (Cell Signaling Technology, MD, USA, #2032, 1:1000)、mouse anti-α-Tubulin (DM1A) (SIGMA-Aldrich, #T9026, 1:5000)、rabbit anti-PKD2 (phospho-S876) (Abcam, Cambridge, UK, #ab51251, 1:1000)、mouse anti-ERK2 (D-2) (#sc-1647, 1:500, Santa Cruz Biotechnology)、および rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (T202/Y204, T185/Y187) (#9101, 1:500, Cell Signaling Technology, MD, USA) である。

Immunoblotting 法に用いた二次抗体は horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2004, 1:1000)、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2005, 1:1000)、alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2007, 1:1000)、および AP-conjugated goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2008, 1:1000) である。

免疫染色に用いた一次抗体は rabbit anti-GFP (MBL, Aichi, Japan, #598, 1:200)、chicken anti-GFP (Abcam, #ab13970, 1:500)、rabbit anti-PAX6 (BioLegend, CA, USA, #901301, 1:50)、rat anti-SOX2 (Molecular Probe, OA, USA, #A-24339, 1:50)、rabbit anti-TBR2 (Abcam, #ab23345, 1:50)、mouse anti-SATB2 (Abcam, #ab51502, 1:50)、rabbit anti-CUX1 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-13024, 1:50)、rat anti-CTIP2 (Abcam, #ab18465, 1:50)、rabbit anti-TBR1 (Proteintech, IL, USA, #20932-1-AP, 1:50)、rat anti-BrdU (Abcam, #ab6326, 1:40)、rabbit anti-MAP2 (Merck Millipore, MA, USA, #AB5622, 1:200)、および

mouse anti-NESTIN (Merck Millipore, #MAB5326, 1:1000) である。

免疫染色に用いた二次抗体は biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Labs, CA, USA, #BA-1000, 1:200)、biotinylated goat anti-mouse IgG (Vector Labs, #BA-9200, 1:200)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, CA, USA, #A-11008, 1:200)、Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-chicken IgY (Life Technologies, #A-11039, 1:500)、Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rat IgG (Life Technologies, #A-21247, 1:200)、および Alexa Fluor 594-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, PA, USA, #715-585-150, 1:250) である。

Fluorescence in situ hybridization (FISH)に用いた抗体は peroxidase (POD)-conjugated sheep anti-Digoxigenin (DIG; Fab fragments; Roche Life Sciences, Basel, Switzerland, #11207733910, 1:250) である。

ChIP に用いた抗体は rabbit anti-POGZ (Bethyl Laboratories, TX, USA, A302-509A)、rabbit anti-POGZ (Bethyl Laboratories, A302-510A)、および normal rabbit IgG (Merck Millipore, 12-370) である。

マウス初代培養大脳皮質神経細胞の調製

マウス初代培養大脳皮質神経細胞は、胚齢 16.5 日の ICR マウスの大脳皮質より調製した。培養に使用する plate に PLL 水溶液 200μg/mL を入れ、37 ℃で一晩インキュベートしてコーティングした。神経細胞は 24 well plate (BD Biosciences, CA, USA) に 3×10^5 cells /well、6 well plate (BD Biosciences) に 1.5×10^6 cells /well の濃度で播種して実験に用いた。細胞は 2% B-27 supplement (Life Technologies)、15 mM Hepes (Life Technologies)、100 U/mL penicillin、100 μg/mL streptomycin (Life Technologies)、5% Fetal bovine serum (FBS) (HyClone, IL, USA)、0.5 mM L-Glutamine (Life Technologies) を含む MEM (Life Technologies) 培地を用いて、5% CO2 / 95% air、37 ℃のインキュベーター内で培養した。培養 2 日目に増殖性細胞の増加を抑制するため、終濃度 5 μM の Ara-C (SIGMA-Aldrich) を添加した。免疫染色のために培養 7 日目において、4% paraformaldehyde (PFA) PBS で室温、10 分間固定した。また培養 7 日目において、Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio, CA, USA) でタンパクを抽出し、PureLink RNA Micro Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で total RNA を抽出した。レンチウイルスによるノックダウン実験においては、細胞播種の際にレンチウイルスに MOI = 20 で感染させて、培養 7 日目に細胞を回収した。

免疫細胞染色

まず細胞を PBS で 2 回洗浄した後、4% PFA PBS を用い、室温 10 分間固定を行った。その後、PBST (PBS with 0.1% Triton-X) / 1% BSA で可溶化およびブロッキング処理を室温 1 時間行った。一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、4 ℃で 16 – 18 時間反応させた。一次抗体反応後は、PBST で室温、5 分、2 回洗浄した。二次抗体をブロッキング溶液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。その後、PBST で室温、5 分間、3 回洗浄、PBS で室温、5 分間、1 回洗浄し、Fluoromount (Diagnostic BioSystems, CA, USA) を用いてスライドガラス上にマウントした。二次抗体によって染色する際に、Alexa Fluor 546-phalloidin (Molecular Probe) によって細胞骨格を、Hoechst 33258 dye (Calbiochem, CA, USA) によって核を染色した。免疫染色した細胞は Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan) および BZ-9000 microscope (Keyence, Osaka, Japan) で撮影した。

免疫染色画像は ImageJ software (NIH, MD, USA) および Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, CA, USA) を用いて解析した。

マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞の培養およびトランスフェクション

Neuro2a 細胞は大阪大学医学系研究科神経機能形態学講座 (第二解剖) に提供して頂いた。Neuro2a 細胞は 10% FBS (Nichirei, Tokyo, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with high glucose, GlutaMAX (Life Technologies) で、5% CO2 / 95% air、37 ℃のインキュベーター内で培養した。Neuro2a 細胞播種の翌日に、GenJet In Vitro Transfection Reagent for Neuro-2A Cells (Ver. II) (SignaGen Laboratories, MD, USA) を用いてトランスフェクションした。免疫染色のため、トランスフェクションの 3 日後に 4% PFA PBS で細胞を固定した。また immunoblotting のため、トランスフェクションの 3 日後に細胞を回収し、radio-immunoprecipitation assay (RIPA) buffer または Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio) でタンパクを抽出した。

ヒト神経芽細胞腫 SHSY-5Y 細胞の培養およびトランスフェクション

SHSY-5Y 細胞は 10% FBS (Nichirei) を含む DMEM with low glucose (ニッスイ)で、5% CO2 / 95% air、37 ℃のインキュベーター内で培養した。SHSY-5Y 細胞播種の翌日に、Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの 2 日後に細胞を回収し、Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio) でタンパクを抽出した。

HEK293T 細胞および Lenti-X 293T 細胞の培養およびトランスフェクション

HEK293T 細胞および Lenti-X 293T 細胞 (Clontech, CA, USA) は 10% FBS (Nichirei) を含む DMEM supplemented with high glucose, GlutaMAX (Life Technologies) で、5% CO2 / 95% air、37 ℃のインキュベーター内で培養した。HEK293T 細胞播種の翌日に、TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio LLC., WI, USA) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションの 2 日または 3 日後に細胞を回収し、TNE buffer または RIPA buffer でタンパクを抽出し、PureLink RNA Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) で total RNA を抽出した。

Immunoblotting

サンプルのタンパク質量を BCA Protein Assay Reagent kit (Thermo Fisher Scientific) で定量した後、Sample Buffer Solution (2ME+) (wako, Tokyo, Japan) をサンプルの 3 分の 1 量添加し、95 ℃、5 分間の変性処理をした。サンプルを 30(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution(29:1) (nacalai tesque, Kyoto, Japan) 、 APS (ammonium persulfate) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 、 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (wako)、濃縮ゲル調製用緩衝液 (nacalai tesque)、分離ゲル調製用緩衝液 (nacalai tesque) によって調整した polyacrylamide-SDS gel を用いて電気泳動した。PVDF メンブレン (Bio-Rad Laboratories) にウェット法でトランスファー後、メンブレンを TBST (TBS with 0.1% Triton-X) / 3% BSA で室温、10 分間ブロッキング処理した。一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、4 ℃で 16 – 18 時間反応させた。一次抗体反応後は TBST で 5 回洗浄した。二次抗体をブロッキング溶液で希釈し、室温で 1 時間反応させた。その後、TBST で室温 5 分間の洗浄を 10-15 回行った。Alkaline phosphatase-conjugated IgG 抗体は CDP star (SIGMA-Aldrich) を用い、peroxidase-

conjugated IgG 抗体は Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer, MA, USA) を用いて発光させた。各発色反応は Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) によって検出し、撮影した。

***De novo* 変異型 POGZ の核局在解析**

Myc タグを付加した野生型または変異型 POGZ を発現させた Neuro2a 細胞および SHSY-5Y 細胞から、Cytoplasmic & Nuclear Protein Extraction Kit (101Bio) を用いて細胞質画分と核画分を抽出し、anti-Myc 抗体、anti-POGZ 抗体、anti-Lamin A/C 抗体 (核画分マーカー)、および anti-α-Tubulin 抗体 (細胞質マーカー)を用いて immunoblotting を行った。細胞質と核画分の Myc タグのバンドのシグナル強度の合計に対する核画分の Myc タグのバンドのシグナル強度の割合を核局在率として算出した。

***De novo* 変異型 POGZ の CENP-B DNA binding domain の DNA 結合能解析**

HEK293T 細胞を 6 cm dish (BD Biosciences) に $1.5x10^6$ cells/dish の濃度で播種し、24 時間後に TransIT-LT1 Transfection Reagent (Mirus Bio LLC.) を用いて、myc タグ付加した野生型または *de novo* 変異型ヒト POGZ を発現するプラスミドベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション 2 日後の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、PBS で細胞を剥離し、遠心分離によって回収した。回収した細胞を TNE buffer で溶解し、タンパク抽出を行った。

CENP-B DNA binding domain が結合することが報告されている CENP-B box 配列を含む 70 bp の 3'末端にビオチンを付加した 2 本鎖オリゴ DNA (5'-TTCAGACCTCTTTGAGGCCTTCGTTGGAAACGGGATTTCTTCATATTATGCTAGACAGAATAATTCTCAG_Biotin-3')[98]を NeutrAvidin Agarose Resins (Thermo Fisher Scientific) と混合し、DNA-NeutrAvidin 複合体を作製した。この複合体とタンパク抽出液を混合し、4 ℃、4 - 5 時間、転倒混和した。DNA-NeutrAvidin 複合体を遠心分離した後、上清を除去し、DNA-NeutrAvidin 複合体を TNE buffer with NP40 で洗浄した。この操作を 4 回繰り返した後、DNA-NeutrAvidin 複合体に Sample Buffer Solution (2ME+) (wako) を添加し、95 ℃、5 分の変性処理をし、western blot によって解析した。

逆転写および定量的 RT-PCR

PureLink RNA Micro Kit (Thermo Fisher Scientific) および PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、添付のプロトコルに従って培養細胞と組織から total RNA を抽出した。Total RNA は Superscript III (Life Technologies) を用いて逆転写した。逆転写で得られた cDNA プールを鋳型として、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) と各遺伝子のプライマー (Table 6) を用いて CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories) によって定量的 RT-PCR を行った。リアルタイム PCR 反応条件 95 ℃ 5 秒、60 ℃ 30 秒を 1 サイクルとして行った。*Pogz*、*Cux1*、および *Pkd2* の発現量は *Gapdh* の発現量によって標準化し、$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法によって相対発現量を算出した。

Table 6 Primers used for quantitative real-time RT-PCR

Gene	Primer	Secuence	Amplicon (nt)
m*Pogz*	Forward	CCCTACCTATGTGCATTGTTCTC	92
	Riverse	TCCGTGGAACATGATTGTTG	
m*Cux1*	Forward	CAGATGTCCACCACCTCAAA	94
	Riverse	GGTCAAATAATTCTGTTCGAGTTTT	
m*Pkd2*	Forward	CTGTTCTATCGTGGACCAGAAGT	91
	Riverse	GGCTGATGTTGGGTCATGTT	
m*Gapdh*	Forward	GTGTTCCTACCCCCAATGTG	241
	Riverse	TACCAGGAAATGAGCTTGAC	

免疫組織染色

胚齢 16 日、胚齢 17 日、および胚齢 18 日マウス胚の脳は 4% PFA PBS を用いて、4 ℃で一晩固定し、クライオスタット (Leica, Wetzlar, Germany, CM1520) で厚さ 20 µm 凍結脳切片を作製した。10 週齢成体期マウスの脳は 4% PFA PBS で還流固定した後に 4% PFA PBS で 4 ℃、16 – 18 時間で固定した。CUX1 の免疫染色にはクライオスタット (Leica) で作製した厚さ 20 µm 凍結脳切片を用い、GABA の免疫染色には LinearSlicer PRO7N (DOSAKA EM CO.,LTD., Kyoto, Japan) で作製した厚さ 50 µm 浮遊切片を用いた。凍結脳切片は Matsunami Adhesive Silane (MAS)-coated glass slides (Matsunami Glass Ind., Ltd, Osaka, Japan) に接着させて免疫染色を行い、浮遊切片は浮遊条件下で免疫染色を行った。切片を PBS で室温、5 分間、3 回洗浄した。PAX6、SOX2、および TBR2 の免疫染色では抗原賦活化処理として、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) で沸騰直前の状態を維持した電子レンズ加熱を 5 分間行った。SATB2 の免疫染色では抗原賦活化処理として 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) で沸騰直前の状態を維持した電子レンズ加熱を 20 分間行い、Histo VT one (nacalai tesque) で 70 ℃、20 分間加熱した。BrdU の免疫染色では抗原賦活化処理として、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 7.0) で沸騰直前の状態を維持した電子レンズ加熱を 20 分行った。抗原賦活化処理した際は、PBS で室温、5 分間、3 回洗浄した。PBST (PBS with 0.1% Triton-X) / 1% Normal goat serum (Thermo Fisher Scientific)/1% BSA (SIGMA-Aldrich) で可溶化およびブロッキング処理を室温、1 時間行い、一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、4 ℃で 16 – 18 時間反応させた。

一次抗体反応後は、PBST で室温、5 分間、3 回洗浄した。二次抗体をブロッキング溶液で希釈し、室温、1 時間反応させた。その後、PBST で室温、5 分間、3 回洗浄した。ビオチン標識二次抗体は、Texas Red-conjugated streptavidin (Vector Labs, #SA-5006) で 30 分間標識した。また、二次抗体または Texas Red-conjugated streptavidin による染色の際に、Hoechst 33258 dye (Calbiochem) によって核を染色した。染色の後に PBST で室温、5 分間、3 回洗浄し、PBS で室温、5 分間、1 回洗浄した。Fluoromount (Diagnostic BioSystems; Fremont, CA) を用いてスライドガラス上にマウントした。免疫染色した脳切片は Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus) および BZ-9000 microscope (Keyence) で撮影した。免疫染色画像は ImageJ software (NIH) および Adobe Photoshop CS (Adobe Systems) を用いて解析した。マウス 1 匹につき 3 枚の脳切片画像を撮影して定量化に用いた。胚齢 18 日マウス胚脳切片における SATB2、および 10 週齢マウス脳切片における CUX1 と GABA 陽性細胞の大脳皮質における分布の解析では、大脳皮質を均等に 10 区画に分割して (cortical plate (CP) 1 to intermediate zone (IZ)/SVZ 10)、各区画における陽性細胞密度を測定した。

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

FISH に用いた *Pogz* mRNA (NCBI Reference Sequence: NM_172683.3) をターゲットにする cRNA プローブは mPOGZ cDNA (DNAFORM; clone ID: 30745658) の 1062 - 1563 番目の塩基を PCR によって増幅し、pBluescript II KS (+/-) ベクターにサブクローニングした。ベクターを *Bam*HI で直鎖状プラスミドベクターに切断し、T3 RNA polymerase (Roche Life Sciences) を用いて 5′末端を digoxigenin (DIG) ラベルしたプローブを作製した。

母体から摘出した胚齢 16 日マウス胚を速やかに O.C.T. Compound (SFJ, Osaka, Japan) によって包埋し、ドライアイスを用いて新鮮凍結した。クライオスタット (Leica) を用いて厚さ 20 μm の凍結胎仔切片を作製し、Matsunami Adhesive Silane (MAS)-coated glass slides (Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) に貼り付けた。スライド上で 4% PFA を用いて室温で 30 分間固定化を行った。その後、0.25%無水酢酸を含む 0.1 M トリエタノールアミン (TEA) を用いて、室温で 10 分間アセチル化を行った。ハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 2×SSC, 10 mM Tris-HCl, 1 mg/mL tRNA; Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 10% Dextran Sulfate; nacalai tesque, 1×Denhardt's solution; Nacalai Tesque, 0.02% SDS) でスライドを 48 ℃、30 分間インキュベートし、続いて DIG ラベルされたプローブを含むハイブリダイゼーションバッファーで 48 ℃、一晩ハイブリダイゼーションを行った。翌日、1×SSC / 50% formamide を用いて 48 ℃で 10 分間、2 回洗浄を行い、さらに 0.1×SSC を用いて 48 ℃で 10 分間洗浄を行った後、1% Blocking reagent (Roche Life Sciences, Basel, Switzerland) を含む TN バッファーで 1 時間インキュベートした。その後、anti-DIG-POD antibody を 4 ℃で一晩処置した。anti-DIG-POD antibody を TSA Plus Fluorescein System (PerkinElmer, MA, USA) を用いて蛍光標識した。FISH によって *Pogz* を染色した後に、上述の方法に従って PAX6、SOX2、および TBR2 の免疫染色を行った。染色した胎仔切片は Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus) および BZ-9000 microscope (Keyence) によって撮影した。染色画像は ImageJ software (NIH) および Adobe Photoshop CS (Adobe Systems) を用いて解析した。

***In utero* electroporation**

In utero electroporation には野生型 ICR マウス (SLC, Shizuoka, Japan) の胚齢 14 日マウス胚を用いた。MISSION shRNA 発現コンストラクト (1 μg/μL)、発現遺伝子を挿入していない pcDNA3 コンストラクト、または POGZ もしくは PKD2 を挿入した pcDNA3 コンストラクト (1 μg/μL)、pCAG-GFP コンストラクト (0.5 μg/μL) の 3 種類のコンストラクトと、Fast Green FCF (0.01(w/v)%) の混合液を調製した。妊娠 14 日目メスマウスに、メデトミジン 30 μg/mL、ミダゾラム 400 μg/mL、ブトルファール 500 μg/mL を混合した 3 種混合麻酔を、マウス 50 g あたり 500 μL 腹腔内投与した。ホットマット上で開腹し、胎仔を取り出した。ガラス針 (Narishige, Tokyo, Japan, GD-1.5) によって、マウス胚側脳室にプラスミドベクター混合液を注入し、大脳皮質側にプラス電極が当たるように胎仔の頭を電極 (Nepa Gene, Chiba, Japan, CUY650P5, 5 mm 径) で挟み、Squere Wave Electroporator (Nepa Gene, Chiba, Japan, CUY21SC) によって、35 V、4 cycle、on time 50 msec、off time 950 msec で electroporation を実施した。その後、胎仔を母体の腹腔内に戻し、母体の腹部を縫合した。手術後の母体はホットマット上で 1 - 2 時間温めて回復させた。手術後 2 - 4 日間母マウスを飼育し、妊娠 16 日目、17 日目、または 18 日目に再び開腹し、胎仔の脳を摘出した。

***POGZ* に Q1042R 変異を持つ ASD 患者及びその健常者両親**

大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室との共同研究によって見出した日本人家系である。なお、患者本人および患者の健常者両親に研究への同意を得ている。

P1381

16 歳の日本人女性の患者である。臨床症状として、社会的反応性の障害、および言語の遅延が観察されている[16]。患者の自閉スペクトラム指数 (AQ) は 33、全検査知能指数 (IQ) は 65、言語性知能指数 (VIQ) は 70、動作性知能指数 (PIQ) は 65 である[16]。また、脳形態の異常、てんかん症状、脳波の異常、および血液検査の異常は存在しない[16]。加えて、患者にその他の精神医学的および身体的な疾患は存在しない[16]。

P1399

患者の父親は 49 歳の日本人男性である。

iPS 細胞の樹立

iPS 細胞の樹立は、患者および健常者の血球から作成した不死化リンパ芽球に、初期化因子を導入することによって実施した[99]。初期化因子の導入は、初期化因子を発現するプラスミドベクター (pCE-hOCT3/4 0.63 µg, pCE-hSK 0.63 µg, pCE-hUL 0.63 µg, pCE-mp53DD 0.63 µg, pCXB-EBNA1 0.50 µg (Addgene, MA, USA)) を Amaxa Human T-cell Nucleofector Kit (Lonza, Basel, Switzerland) 付属の Nucleofector 2b Device (Lonza) を用いてエレクトロポレーションすることによって実施した。初期化因子を導入した不死化リンパ芽球は、10% FBS (Nichirei) を含む Roswell Park memorial Institute (RPMI) medium (wako) を用い、一週間培養した。その後、マイトマイシン C 処理した SL10 feeder 細胞 (ReproCell Inc., Kanagawa, Japan) 上に播種した。

培地は、20% KnockOut Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific)、1% Non-essential Amino Acid Solution (SIGMA-Aldrich)、2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (wako)、4 ng/mL bFGF (PeproTech, NJ, USA) を含む DMEM/F12 medium (wako) を用い、iPS 様細胞コロニーが出現するまで 20 - 30 日間培養を続けた。培地は毎日交換した。出現したコロニーを、ES 細胞様の形態を指標として、患者および健常者あたりおよそ 40 クローンピックアップした。Feeder 細胞上にて、10 回程度継代し、培養した細胞からゲノム DNA を調製し、エピソーマルベクターの存在を検出するプライマーを用いた PCR を行い、エピソーマルベクター由来のバンドがないコロニーを選別し、樹立 iPS 細胞とした。また、樹立した iPS 細胞の多能性を TRA-1-60、TRA-1-81、SOX2 および OCT-4A の発現を調べることにより確認した。

Feeder free iPS 細胞の培養

SL10 feeder 細胞上で培養していた iPS 様細胞コロニーを剥離し、DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) を用いて希釈した 1% BD Matrigel hESC-qualified Matrix (Corning, NY, USA) を用いてコーティングした 6 well plate (Corning) に 10 µM Y-27632 (wako) を含む Essential 8 medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて播種し、5% CO_2/ 95% air、37 °C のインキュベーター内で培養した。継代は PBS で 1000 倍希釈した 0.5 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific) を用いて 3 日または 4 日おきに行った。

Feeder free iPS 細胞の神経幹細胞への分化誘導

患者および健常者父親由来の iPS 細胞から神経幹細胞への分化誘導は、PSC Neural Induction Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて、添付のプロトコルに従って行った。細胞は accutase (Innovative Cell Technologies Inc., CA, USA) を用いて剥離し、継代は 5 日または 6 日おきに行った。各種解析には、神経幹細胞としての性質が安定したと考えられた 6 継代目以降の細胞を使用した。

iPS 細胞由来神経幹細胞の神経分化能の解析

24 well plate (Corning) に PLO (SIGMA-Aldrich) を添加し、5% CO_2/ 95% air、37 ℃のインキュベーター内で一晩コーティングした。翌日、PBS で各ウェルを 2 回洗浄した後、PBS を添加し、5% CO_2/ 95% air、37 ℃のインキュベーター内で放置した。翌日、6.67 µg/mL human fibronectin (Thermo Fisher Scientific) 、6.67 µg/mL mouse laminin (Thermo Fisher Scientific) を含む PBS を添加し、5% CO_2/ 95% air、37 ℃のインキュベーター内で 3 時間以上コーティングした。その後、患者および健常者父親由来の分化神経幹細胞を accutase (Innovative Cell Technologies Inc.) を用いてプレートから剥離させ、1% N2 supplement (wako)、2% B27 Supplement (Thermo Fisher Scientific)、200 µM L-Ascorbic acid (SIGMA)、1 mM dBcAMP (wako)、20 ng/mL human BDNF (R&D Systems, MN, USA)、20 ng/mL human GDNF (R&D Systems)、500 ng/mL mouse laminin (Thermo Fisher Scientific)、1 µM (3,5-Difluorophenylacetyl) -L-alanyl-L-2-phenylglycine tert-Butyl Ester (wako) を含む Brain Phys Basal Medium (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) に懸濁し、コーティングした 24 well plate に 3.0×10^5 cells/1 mL/well で播種した。終末分化 2 日後の患者および健常者父親由来の分化神経細胞を用意し、MAP2 及び NESTIN に対する免疫染色を行った。陽性細胞の割合の算出には、ToxInsight automated microscope (Thermo Fisher Scientific) を使用し、神経細胞の全自動の画像取得を行った。撮影時の各パラメーターを適切に設定することによって、細胞の核および細胞質の自動認識を行った。また、Average Intensity Ch3 が 750 以上の細胞を MAP2 陽性細胞とした。

BrdU ELISA による神経幹細胞の増殖能の解析

5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の細胞内への取り込みを指標とした神経幹細胞の増殖能の測定は、Cell Proliferation ELISA BrdU キット (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて、添付のプロトコルに従って行った。患者および健常者父親由来の分化神経幹細胞を 96 well plate (AGC Techno Glass, Shizuoka, Japan) に 1.0×10^4 cells/ 200 µL/ well で播種し、1 日間培養した。翌日、10 µM BrdU を含む培地を添加し、5% CO_2/ 95% air、37 ℃のインキュベーター内で 3 時間培養した。その後、FixDenat を添加して室温で 30 分間インキュベートした。FixDenat を除去して POD 標識抗 BrdU 抗体反応液を添加し、室温で 90 分間インキュベートした。PBS で各ウェルを 3 回洗浄した後、基質液を添加し、適当な発色が得られることを目視で確認しながら約 15 分間室温で反応させた。反応後、溶液の吸光度 (測定波長 415 nm) を iMarkTM Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories) を用いて測定した。

ニューロスフェアを用いた神経幹細胞の増殖能および新生神経細胞の移動能の解析

患者および健常者父親由来の分化神経幹細胞を accutase (Innovative Cell Technologies Inc.) を用いてプレートから剥離させ、V bottom 96 well plate (Sumitimo Bakelite, Tokyo, Japan) に播種した。

培地は、15 mM HEPES Buffer (SIGMA-Aldrich)、1% Antibiotic-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific)、2% B27 Supplement (Thermo Fisher Scientific)、20 ng/mL human EGF (PeproTech)、20 ng/mL human bFGF (PeproTech)、10 ng/mL human LIF (Millipore)、0.1%ヘパリンナトリウム注 N5 千単位/5mL (Nippon Zenyaku Kogyo, Fukushima, Japan) を含む DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) を用い、0.3×10^4 cells/150μL/ well の濃度で播種し、浮遊培養によってニューロスフィアを形成させた。

神経幹細胞の増殖能の評価として、培養 5 日目のニューロスフィアのサイズを測定した。

In vitro における細胞移動能の解析では、培養 3 日目のニューロスフィアを poly-L-ornithine (SIGMA-Aldrich)、6.67 μg/mL human fibronectin (Thermo Fisher Scientific)、および 6.67 μg/mL mouse laminin (Thermo Fisher Scientific) でコーティングした 6 well plate に播種して、接着培養で 2 日間神経分化誘導した。ニューロスフィアの縁から細胞の核の距離が最も離れている細胞について、ニューロスフィアの縁から細胞の核までの距離をニューロスフィアごとに測定し、移動能として評価した。

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスの作製

POGZ$^{WT/Q1038R}$ マウスは CRISPR-CAS9 ゲノム編集システムによって C57BL/6NJcl マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) から作出した。Single guide RNA (sgRNA) の配列として 5′-GCAGCAGCTCCCTGTAAATG-3′を選択した。Cas9 mRNA と sgRNA の作製には直鎖状にした T7-NLS hCas9-pA (RIKEN BioResource Research Center (BRC) #RDB13130, a gift from Tomoji Mashimo) と DR274 (Addgene #42250, a gift from Keith Joung) をそれぞれ用いた。POGZ の Q1038R 変異をコードした 117 塩基の single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) donor は Ultramer DNA oligos として Integrated DNA Technologies (Skokie, IL, USA) から購入した。Cas9 mRNA、sgRNA、および ssODN を精製水に溶解し、C57BL/6NJcl マウス (CLEA) 由来の前核期受精卵に注入した。*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスは BRC マウスコレクションの RBRC09544 として委託予定である。

ヘマトキシリン・エオシン (H・E) 染色による大脳皮質および大脳皮質層構造の厚さの解析

10 週齢の野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの厚さ 50 μm の Bregma 0 mm に相当する脳切片を、Merck Millipore のプロトコルに従って H・E 染色した。MAS-coated glass slides (Matsunami Glass Ind., Ltd.) に貼り付けた脳切片を水道水と精製水で洗浄し、4 倍希釈したマイヤーヘマトキシリン染色液 (Merck Millipore) による核染色を 5 分行った。10 分間の水洗による色出しの後に蒸留水に通した。0.5% エオシン Y 水溶液を 4 倍希釈し、酢酸を 6 滴加えた溶液によって 3 分間染色し、水洗と蒸留水による洗浄を 1 分間行った。その後、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、および 100%エタノール 3 回による脱水処理を行い、キシレンに 5 回通すことで透徹した。Mount Quick (DAI, Tokyo, Japan) によって封入した。染色した脳切片は BZ-9000 microscope (Keyence) によって撮影した。染色画像は ImageJ software (NIH) および Adobe Photoshop CS (Adobe Systems) を用いて解析した。

大脳皮質の厚さは、Figure の画像中に示すように、脳梁を目印に設定した、縦 (1)、斜め (2)、横 (3) の 3 点で測定した。また大脳皮質の各層の厚さは、大脳皮質の厚さの測定で設定した斜め (2) 方向の直線に沿って測定した。

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの末梢臓器の組織学的解析**

10 週齢の野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスをホルマリンで還流固定によってホルマリン固定した。開腹してホルマリンに浸して固定し、新組織科学研究所に眼球、内耳の蝸牛殻、気管、胃、十二指腸、回腸、盲腸、結腸、坐骨神経、大腿骨の H・E 染色と解析を行って頂いた。

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの頭蓋骨の CT 解析**

22 週例オスの野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの頭部を、micro-CT scanner (ScanXmate-E090S, Comscantecno Co., Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて、tube voltage 80 kV、tube current 50 μA で CT スキャンした。TRI/3D-BON (RATOC Systems, Osaka, Japan) および Image J software (NIH) を用いて頭蓋骨の 3 次元画像を再構築した。頭蓋骨のサイズの測定は既報の研究に従って行った[100]。

***POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウス胚の CT 解析**

胚齢 15 日の野生型および *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウス胚を、臍帯を傷つけずに摘出し、ブアン液 (wako) に 5 日間浸して固定した。その後 70%エタノールに浸して保存した。固定した胎児サンプルは理化学研究所に CT 解析して頂いた。胎児は 1% phosphotungstic acid 処理した後に、micro-CT scanner (ScanXmate-E090S, Comscantechno Co., Ltd.) を用いて、tube voltage 40 kV、tube current 100 μA で CT スキャンした。画像は OsiriX (www.osirix-viewer.com) software を用いて解析した。胎仔のジェノタイプの確認は、羊膜からゲノム DNA を抽出して行った。

***POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス胚における新生神経細胞の BrdU 標識による神経細胞移動の解析**

胚齢 14 日マウス胚の新生神経細胞を BrdU で標識するため、母マウスに 50 mg/kg の BrdU を腹腔内投与した。新生神経細胞の大脳皮質上層への移動を解析するため、胚齢 18 日において胎仔を摘出し、上述の方法によって BrdU と SATB2 の免疫染色を行った。免疫染色した脳切片は Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus) で撮影した。免疫染色画像は ImageJ software (NIH) および Adobe Photoshop CS (Adobe Systems) を用いて解析した。マウス 1 匹につき 3 枚の脳切片画像を撮影して定量化に用いた。胚齢 18 日マウス胚脳切片の大脳皮質を均等に 10 区画に分割して (cortical plate (CP) 1 to intermediate zone (IZ)/SVZ 10)、各区画における BrdU 陽性かつ SATB2 陽性の新生興奮性神経細胞数の割合を測定した。

レンチウイルスベクター作製

Lenti-X 293T 細胞に pNHP 5.2 μg、pVSV-G 2.1 μg、pCEP4-tat 0.43 μg、Puromycin 耐性遺伝子またはレスキューする遺伝子の CDS 領域を挿入した MISSION shRNA construct (Table 4; SIGMA-Aldrich) 2.6 μg を polyethylenimine (Polyethylenimine “Max”, Mw 40,000; Polysciences, FL, USA) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 16 - 18 時間培養した後に培養上清を除去し、10% FBS (Nichirei) を含む DMEM supplemented with high glucose, GlutaMAX (Life Technologies) 10 mL に置換した。さらに 30 時間培養した後、Lenti-X 293T 細胞により産生されたレンチウイルスベクターを含む培養上清を回収し、PVDF membrane (0.45-μm pore size, Millex-HV, Merck Millipore) でろ過したのちに、超遠心によって濃縮して PBS に溶解した。Lenti-X qRT-PCR Titration

Kit (Takara Bio Inc.) を用い、添付のプロトコルに従ってレンチウイルスベクターのタイトレーションを行った。

マウス大脳皮質神経幹細胞の培養

マウス大脳皮質神経幹細胞は、胚齢 16.5 日の野生型 C57BL/6NJcl マウス、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウス、および ICR マウスの大脳皮質より調製した。DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) に 1% N2 supplement (Thermo Fisher Scientific)、20 ng/mL epidermal growth factor (EGF; PeproTech, NJ, USA)、20 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; PeproTech)を添加した NSCs expansion medium によって、大脳皮質から調整した細胞を 1 週間浮遊培養し、初代培養ニューロスフィアを形成させた。ニューロスフィアの細胞を trypsin (Thermo Fisher Scientific) によって剥離し、1% BD Matrigel hESC-qualified Matrix (Corning, NY, USA) を用いてコーティングした 6 well plate (BD Biosciences) に 7.5×10^5 cells/well、および 15 cm dish (BD Biosciences) に 9.0×10^6 cells/dish で播種し、二次培養神経幹細胞として接着培養した。播種 2 日後に約 80%コンフルエントに達したところで、細胞を回収した。また、二次培養のほぼ全ての細胞が神経幹細胞であることを、神経幹細胞のマーカーである NESTIN と PAX6 の免疫染色によって確認した。また、細胞は 5% CO2 / 95% air、37 ℃のインキュベーター内で培養した。

RNA シーケンス

iPS 細胞由来の神経幹細胞およびマウスの大脳皮質由来の二次培養神経幹細胞から total RNA を抽出し、それぞれ Illumina HiSeq2000 system (BGI, Beijing, China) と Illumina HiSeq2500 system (Genome Information Research Center, Osaka University, Osaka, Japan) によって RNA シーケンスを行った。遺伝子発現レベルは Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped (FPKM) に基づいて解析した。

Gene ontology (GO) annotation の解析

ToppGene Suite (https://toppgene.cchmc.org/) を用いて発現量が変化していた遺伝子群を GO annotation に基づいて機能的に分類した。|Fold Change| ≥ 1.2 の遺伝子を Biological Process (gene in annotation: 1,000 ≤ n ≤ 100,000) の機能で解析した。ヒットした GO annotation のうち、$P < 0.05$ かつ FDR < 0.05 の GO annotation を濃縮された遺伝子ネットワークとした。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

ChIP-IT Express Enzymatic Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit & Enzymatic Shearing Kit (Active Motif, CA, USA) に添付されたプロトコルに従って、胚齢 16 日野生型 ICR マウス胚の大脳皮質由来二次培養神経幹細胞からクロマチンを抽出し、ChIP を実施した。まず、15 cm dish (BD Biosciences) で培養していたおよそ 80%コンフルエントの神経幹細胞を 1% formaldehyde の入った DMEM/F12 でクロスリンク反応させた。核を分離し、37 ℃30 分の酵素反応によってクロマチンを切断した。切断したクロマチンは抗体および protein-G magnetic beads と混合して、4 ℃で一晩転倒混和した。免疫沈降したクロマチンをビーズから溶出し、ゲノム DNA とタンパクのクロスリンクを解いて ChIP の DNA サンプルを得た。DNA サンプルは Chromatin IP DNA Purification Kit

(Active Motif) によって精製し、GenoMatrix Whole Genome Amplification Kit (Active Motif) を用いて PCR 法によって増幅した。精製および増幅を行った DNA を用いて、マウス *Jag2* プロモーター領域に結合するプライマー (Table 7) [47, 48]で定量的 RT-PCR を行った。ChIP による *Jag2* プロモーター領域の濃縮レベルは、各抗体による ChIP で得られた DNA 断片の量で標準化した。

Table 7 Primers used for quantitative ChIP-PCR

Primer		Secuence	Amplicon (nt)
m*Jag2* promoter primer1	Forward	GGATGGCCTGATTGTGTGT	61
	Riverse	TTCGGAGGAGGGGTCTTC	
m*Jag2* promoter primer2	Forward	AGATGGGAAGACCCCTCCT	73
	Riverse	CAGTGCCACAGAGGGTTACA	
m*Jag2* promoter primer3	Forward	GTCATGGGGATCCAGCTTT	60
	Riverse	TCCCAGGCCTTTATACCACA	

行動試験

Juvenile playing test と Ultrasonic vocalization test を除く全ての行動試験は 1.5 - 4 ヵ月齢の C57BL/6NJcl オスマウスを用いた。全ての行動試験は動物飼育室の点灯時間 (8 - 20 時) において実施した。全ての行動試験はジェノタイプおよび投与薬物を盲検化して解析した。

Home cage activity

12 時間おきに明条件と暗条件が切り替わる (点灯時間: 8:00) テストケージにマウスを入れた。馴化を 1 日行った後に、infrared activity sensor (O'Hara & Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて明条件および暗条件における自発活動量、明条件と暗条件の合計自発活動量、および合計自発活動量に対する明条件における活動量の比率を測定した。なお、本実験は理化学研究所との共同研究によって実施した。

Light/dark transition test

同じサイズの区画に分かれた試験ボックス (20 × 20 × 25 cm, O'Hara & Co., Ltd.) を用いて Light/dark transition test を実施した。Light chamber は照度 353 lx、dark chamber は照度 0.1 lx に調節した。マウスを light chamber の中央に入れて、自由に行動させた。総移動距離、dark chamber から light chamnber に入るまでの時間、light chamber 滞在時間、および 2 区画を移動した回数を Image FZ4 (O'Hara & Co., Ltd.) を用いて 10 分間測定した。なお、本実験は理化学研究所との共同研究によって実施した。

Novel object recognition test

試験室の照度は 10 – 20 lx に調節した。各セッションを実施する前に、マウスを 30 分以上試験室に馴化した。10 分間の試験ボックスへのマウスの馴化を 3 日行い、4 日目のトレーニングセッションにおいてマウスに新奇物体 (物体 A および物体 B) を探索させた。トレーニングの 24 時間後にテストを行った。テストセッションでは、物体 B を新奇物体 C に変え、マウスに 10 分間探索させた。各物体への探索時間を測定し、既知物体 A の探索時間に対する新奇物体 C の探索時間の割合を discrimination index (%) として算出した。本試験は 10:00 から 14:00 の間に実施した。

Fear conditioning test

Day 1 のトレーニングでは、マウスを試験ボックス (Box A; 10 × 10 × 10 cm, white polyvinyl chloride boards, stainless steel rod floor, O'Hara & Co., Ltd.) に 120 秒入れた後に、90 秒間隔で 4 回の音刺激と電気刺激を与えた。70 dB、10 kHz の音刺激 30 秒と、音刺激の最後の 0.5 秒の間の 0.5 mA の電気刺激を組み合わせて与えた。Day 2 ではマウスを box A に 6 分間入れて、文脈刺激による freezing を解析した。Day 3 ではマウスを透明な箱 (Box B) に 120 秒入れた後に、30 秒の音刺激を 90 秒間隔で 4 回与えた。音刺激を与える前の最初の 120 秒間で示した freezing を pre-tone freezing として測定し、音刺激を与えている間に示した freezing を cued freezing として測定した。Freezing 時間は Image FZ4 (O'Hara & Co., Ltd.) を用いて解析した。なお、本実験は理化学研究所との共同研究によって実施した。

Y-maze test

3 本のアームからなる装置 (arm length: 40 cm, arm bottom width: 3 cm, arm upper width: 10 cm, height of wall: 12 cm, O'Hara & Co., Ltd.) の中央にマウスを置き、移動距離と異なるアームに入った割合を測定した。なお、本実験は理化学研究所との共同研究によって実施した。

PPI test

マウスを防音ボックス (33 × 43 × 33 cm, O'Hara & Co., Ltd.) に入れ、65 dB のバックグラウンドノイズに 5 分間馴化させた。5 分間の馴化の間に、110dB、40 ミリ秒の startle sound を与えて、startle sound に馴化させた。馴化の際の startle sound に対する驚愕反応は試験時の驚愕反応の統計解析における標準化のために差し引いた。試験では 70 dB、75 dB、80 dB および 80 dB の prepulse sound を 20 ミリ秒与え、各 prepulse sound の 50 ミリ秒後に 110 dB の startle sound を 50 ミリ秒与えた。Prepulse inhibition (PPI) の割合は、[(startle amplitude without prepulse) - (startle amplitude of trial with prepulse)]/(startle amplitude without prepulse) × 100 として算出した。なお、本実験は理化学研究所との共同研究によって実施した。

Open field test

マウスを open field test の装置 (45 × 45 × 30 cm) の中央に置き、総移動距離および中央滞在時間 (25 × 25 cm) を 90 分間計測した。なお、薬物投与の実験では試験 30 分前に薬物を投与した。

Reciprocal social interaction test

試験マウスをテストケージに入れて 60 分間馴化した。馴化の後に、7 週齢オス新奇侵入マウスをテストケージに入れ、試験マウスが新奇侵入マウスに対して示す匂い嗅ぎ行動の時間を 20 分間測定した。なお、薬物投与の実験では馴化開始 30 分後に薬物を投与した。本試験は 10:00 から 14:00 の間に実施した。

Self-grooming test

マウスを試験室に 60 分間馴化した後に、床敷きを入れていないテストケージに入れて、10 分間馴化した。その後、10 分間毛づくろい行動時間を測定した。

Juvenile playing test

本試験には親離れ前の 3 週齢オスマウスを使用した。試験マウスはテストケージに 1 匹ずつ入れて、60 分間馴化した。馴化後、試験マウスとの体重差が 1.0 g 以下の、同腹ではない 3 週齢オス新奇侵入マウスをテストケージに入れ、試験マウスが新奇侵入マウスに示す匂い嗅ぎ行動、毛づくろい行動、追いかけ行動、および遊び行動の時間を測定した。本試験は 10:00 から 14:00 の間に実施した。

Ultrasonic vocalization (USV) test

本試験には、野生型 ICR メスマウスに体外受精した生後 4 日オス仔マウスを使用した。仔マウスと母マウスをホームケージに入れたまま、試験室に 30 分以上馴化させた。仔マウスをは母マウスの入ったホームケージから 500 mL Pyrex ガラスビーカーに入れ、照度 90 lx に調節した消音ボックスにおいて、母マウスから隔離された際に発する USV call を UltraSoundGateCM16/CMPA microphone (Avisoft Bioacoustics, Glienicke, Germany) を用いて、Avisoft-SASLab Pro software (Avisoft Bioacoustics) によって記録した。マイクは消音ボックスにおいて、仔マウスの約 20 cm 上に設置し、40 – 150 kHz の USV call を測定した。USV call は、既報の論文に従って 10 種類の波形に分類し、各波形の割合を算出した[101]。

FAST whole-brain imaging

10 週齢オス野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$-Arc-dVenus マウスの Reciprocal social interaction test を行い、神経活動の最初期遺伝子である Arc プロモーター下流の dVenus の発現量がピークになる試験 5 時間後に 4% PFA PBS で灌流固定した。当研究室のこれまでの報告に従って、FAST システムによって全脳イメージングを実施した[54, 55]。

主成分分析 (PCA)

全脳イメージングによって得られた各脳領域の dVenus 陽性細胞数を主成分分析した。主成分分析は R (https://www.r-project.org/) を用いて、prcomp 関数を利用して行った。各脳領域の dVenus 陽性細胞数を脳全体における dVenus 陽性細胞数で標準化して主成分分析した。

ゴルジ染色による樹状突起スパインの解析

FD Rapid GolgiStain Kit (FD Neuro Technologies, MD, USA) を用いて、添付のプロトコルに従って 10 週齢オス野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスのゴルジ染色を実施した。前帯状皮質 II/III 層錐体細胞の樹状突起は BZ-9000 microscope (Keyence) によって撮影し、ImageJ software (NIH) を用いて解析した。

電気生理学的解析

イソフルラン麻酔 (5% in 100% O_2) 下の 10 – 11 週齢オス野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスを断頭し、速やかに脳を摘出した。Vibrating blade slicer (VT1200S, Leica) を用いて、95% O_2 + 5% CO_2 (pH ~7.4; osmolality, approximately 280 mOsm/kg) で平衡化した cutting solution (2.5 mM KCl, 0.5 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 1.25 mM NaH_2PO_4, 2 mM thiourea, 3 mM sodium pyruvate, 92 mM N-Methyl-D-

glucamine, 20 mM HEPES, 12 mM N-acetyl-L-cysteine, 25 mM D-glucose, 5 mM L-ascorbic acid and 30 mM $NaHCO_3$) 中で、厚さ 300 µm の前帯状皮質を含む冠状脳切片を作製し、脳切片を cutting solution で 34 ℃、15 – 20 分インキュベートした。脳切片はパッチクランプを行うまで、室温の standard artificial cerebrospinal fluid (ACSF) (125 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.3 mM $MgCl_2$, 1.25 mM NaH_2PO_4, 10 mM D-glucose, 0.4 mM L-ascorbic acid and 25 mM $NaHCO_3$ (pH 7.4 bubbled with 95% O2 + 5% CO_2; osmolality, approximately 310 mOsm/kg)) に入れておいた。脳切片を recording chamber (approximately 0.4 mL volume) に入れた。脳切片は standard ACSF に浸し、1.5 – 2.5 mL/分の速度で灌流した。前帯状皮質 II/III 層錐体細胞からホールセル膜電流を記録した。パッチクランプ電極 (4-6 MΩ) は borosilicate glass pipettes (1B150F-4, World Precision Instruments, FL, USA) から作製し、internal solution (122.5 mM potassium gluconate, 10 mM HEPES, 17.5 mM KCl, 0.2 mM EGTA, 8 mM NaCl, 2 mM MgATP and 0.3 mM NaGTP (pH, 7.2; osmolarity, 290-300 mOsm))で充填した。膜電位は -60 mV に固定した。MultiClamp 700B amplifier (Molecular Devices) によって膜電流を記録し、PowerLab interface (AD Instruments) を用いて 2 kHz のフィルターをかけ、10 kHz で 16 bit の解像度でデジタル化した。微少興奮性シナプス後電流 (mEPSC) は 100 µM picrotoxin と 1 µM tetrodotoxin を添加して記録し、Igor Pro 7 (WaveMetrics) によって解析した。1 つの神経細胞につき 100 回のイベントを定量化した。なお、本実験は東京慈恵会医科大学との共同研究で実施した。

薬物投与

NBQX disodium salt hydrate (Abcam) は生理食塩水に溶解し、10 mg/kg の投与量で 10 週齢オスマウスに、open field test および reciprocal social interaction test の 30 分前に腹腔内投与した。Perampanel (Toronto Research Chemicals, ON, Canada) は 0.5% w/v methyl cellulose solution (400 cP, wako) に懸濁して[102]、3 mg/kg の投与量で 10 週齢オスマウスに、open field test および reciprocal social interaction test の 30 分前に経口投与した。

ミスセンス変異の影響の *in silico* での予測

神経発達障害および健常者由来の POGZ の *de novo* ミスセンス変異は PROVEAN, SIFT (http://provean.jcvi.org/protein_batch_submit.php?species=human)、PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)、MutationTaster (http://www.mutationtaster.org/)、CADD (https://cadd.gs.washington.edu/snv) を用いて実施した。また、The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Standards and Guidelines[61]に従って、本研究の実験結果を反映していない ACMG classification と本研究の実験結果を反映した ACMG classification を決定した。

shPKD2 および shPKD2^{miR30} のノックダウン効率の測定

pCAG-GFP ベクター、MISSION shRNA または shRNA^{miR30} ベクター、および WT mouse PKD2 を発現する pcDNA3 ベクターを HEK293T 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 3 日後に total RNA を回収し、定量的 RT-PCR によってマウス Pkd2 mRNA 発現量を解析した。ノックダウン効率はトランスフェクション効率によって補正した。

統計解析

Western blot、定量的 RT-PCR の定量データは one-way ANOVA followed by Bonferroni/Dunn *post hoc* tests または Student's *t*-test によって統計解析した。*In utero* electroporation の定量データは one-way ANOVA または two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni-Dunn *post hoc* tests によって統計解析した。iPS 細胞由来神経幹細胞の神経分化能、BrdU ELISA、ニューロスフィアを用いた増殖能と移動能の解析、野生型と *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの脳重量および脳サイズ、および野生型と *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの樹状突起スパイン密度の定量データは Student's *t*-test によって統計解析した。野生型および *POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの体重は two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni-Dunn *post hoc* tests によって統計解析した。免疫組織学的解析、および H・E 染色の定量データは two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni-Dunn *post hoc* tests または Student's *t*-test によって統計解析した。行動試験の定量データは one-way ANOVA または two-way ANOVA followed by Bonferroni/Dunn *post hoc* tests を用いて統計解析した。電気生理学的解析の定量データは Mann-Whitney *U* test および Kolmogorov-Smirnov test を用いて統計解析した。各データの統計解析の詳細は figure legend に記載した。$P < 0.05$ を有意水準とした。統計解析は Stat-View (SAS Institute, NC, USA) および R (version 3.4.1) を用いて実施した。

謝　辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導と御教鞭を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、橋本均先生に心より厚く御礼申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、直接に御指導を賜りました、大阪大学大学院歯学研究科准教授、中澤敬信先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、ASD 患者のリクルートメントおよび臨床試料の提供をして頂きました国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神疾患病態研究部部長、橋本亮太先生、生きる・育む・輝くメンタルクリニック院長、安田由華先生、地域医療機能推進機構大阪病院部長、山森英長先生、大阪大学大学院医学系研究科助教、藤本美智子先生、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの全脳イメージングを遂行して頂きました大阪大学大学院薬学研究科助教、笠井淳司先生、大阪大学国際共創大学院学位プログラム推進機構特任助教、勢力薫先生、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの作製、一部行動試験、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの頭蓋骨の CT 解析、および *POGZ*$^{Q1038R/Q1038R}$ マウス胚の CT 解析を遂行して頂きました先端医療研究センター老化機構研究部上席研究員、若菜茂晴先生、理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室室長、吉木淳先生、同専任研究員、綾部信哉先生、理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析開発チームチームリーダー、田村勝先生、同開発技師、山田郁子先生、同開発研究員、古瀬民生先生、電気生理学的実験を遂行して頂きました東京慈恵会医科大学総合医学研究センター臨床医学研究所教授、渡部文子先生、同助教、永瀬将志先生、*in utero* electroporation 法の技術の御指導賜りました大阪大学大学院医学系研究科教授、佐藤真先生、同助教、猪口徳一先生、*POGZ*$^{WT/Q1038R}$ マウスの行動試験の御指導賜りました大阪大学薬学研究科准教授、吾郷由希夫先生、iPS 細胞技術の御指導賜りました慶応義塾大学医学部教授、岡野栄之先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、種々の御示唆、御指導を頂きました、大阪大学大学院薬学研究科准教授、新谷紀人先生、大阪大学・金沢大学・浜松医科大学連合小児発達学研究科附属子どものこころの分子統御機構研究センター助教、早田敦子先生、大阪大学大学院歯学系研究科教授、田熊一敞先生に厚く御礼申し上げます。

学際的な研究および語学教育等に関わる御指導と御鞭撻を賜るとともに、奨励金 (博士課程 1 年次) および学生研究サポート費を通して御支援頂きました、大阪大学国際共創大学院学位プログラム推進機構、博士課程教育リーディングプログラム、生体統御ネットワーク医学教育プログラム、および本プログラム担当教員、岡村康司先生、同担当教員、竹田潔先生、同特任教授、宮坂昌之先生を初めとするプログラム担当教員、特任教員の皆様に深謝いたします。

研究奨励金 (博士課程 1 年次) をご支援頂きました、公益社団法人日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援事業、特別研究員奨励費および研究奨励金 (博士課程 2 - 4 年次) を通して御支援頂きました、日本学術振興会に深謝いたします。

最後に、本研究を遂行するにあたり、御協力頂きました、岡田翔太修士、馬場優志学士、山本果奈学士、北川航平氏、三浦大樹修士、五十嵐久人修士ならびに大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野の皆様に深謝致します。

参考文献

1. American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®), American Psychiatric Pub., 2013.
2. de la Torre-Ubieta, L., Won, H., Stein, J.L. & Geschwind, D.H. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Medicine* **22**, 345-361 (2016).
3. Courchesne, E.*, et al.* The ASD Living Biology: from cell proliferation to clinical phenotype. *Molecular Psychiatry* **24**, 88-107 (2018).
4. Xu, G., Strathearn, L., Liu, B. & Bao, W. Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among US Children and Adolescents, 2014-2016. *Jama* **319**, 81-82 (2018).
5. Christensen, D.L.*, et al.* Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C. : 2002)* **65**, 1-23 (2018).
6. Tick, B., Bolton, P., Happe, F., Rutter, M. & Rijsdijk, F. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines* **57**, 585-595 (2016).
7. Gaugler, T.*, et al.* Most genetic risk for autism resides with common variation. *Nature Genetics* **46**, 881-885 (2014).
8. Abrahams, B.S.*, et al.* SFARI Gene 2.0: a community-driven knowledgebase for the autism spectrum disorders (ASDs). *Molecular Autism* **4**, 36 (2013).
9. Carter, M.T. & Scherer, S.W. Autism spectrum disorder in the genetics clinic: a review. *Clinical Genetics* **83**, 399-407 (2013).
10. Tammimies, K.*, et al.* Molecular Diagnostic Yield of Chromosomal Microarray Analysis and Whole-Exome Sequencing in Children With Autism Spectrum Disorder. *Jama* **314**, 895-903 (2015).
11. Turner, T.N.*, et al.* Genomic Patterns of De Novo Mutation in Simplex Autism. *Cell* **171**, 710-722 (2017).
12. Janecka, M.*, et al.* Advanced paternal age effects in neurodevelopmental disorders-review of potential underlying mechanisms. *Translational Psychiatry* **7**, e1019 (2017).
13. Deciphering Developmental Disorder Study. Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature* **542**, 433-438 (2017).
14. Wilfert, A.B., Sulovari, A., Turner, T.N., Coe, B.P. & Eichler, E.E. Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Medicine* **9**, 101 (2017).
15. De Rubeis, S.*, et al.* Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature* **515**, 209-215 (2014).
16. Hashimoto, R.*, et al.* Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *Journal of Human Genetics* **61**, 199-206 (2016).
17. Iossifov, I.*, et al.* The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216-221 (2014).
18. Takata, A.*, et al.* Integrative Analyses of De Novo Mutations Provide Deeper Biological Insights into Autism Spectrum Disorder. *Cell Reports* **22**, 734-747 (2018).

19. Li, J., *et al.* A comparative study of the genetic components of three subcategories of autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry* **24**, 1720-1731(2019).
20. Vissers, ELM, L., *et al*. A de novo paradigm for mental retardation. *Nature genetics* **42**, 1109-1112 (2010).
21. Fischdach, G., D., & Lord C., *et al*. The Simons Simplex Collection: A Resource for Identification of Autism Genetic Risk Factors. *Neuron* **68**, 192-195
22. Krumm, N., *et al.* Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. *Nature Genetics* **47**, 582-588 (2015).
23. Sanders, S.J., *et al.* Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron* **87**, 1215-1233 (2015).
24. Gompers, A.L., *et al.* Germline Chd8 haploinsufficiency alters brain development in mouse. *Nature Neuroscience* **20**, 1062-1073 (2017).
25. Platt, R.J., *et al.* Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell Reports* **19**, 335-350 (2017).
26. Durak, O., *et al.* Chd8 mediates cortical neurogenesis via transcriptional regulation of cell cycle and Wnt signaling. *Nature Neuroscience* **19**, 1477-1488 (2016).
27. Katayama, Y., *et al.* CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature* **537**, 675-679 (2016).
28. Jung, E.M., *et al.* Arid1b haploinsufficiency disrupts cortical interneuron development and mouse behavior. *Nature Neuroscience* **20**, 1694-1707 (2017).
29. Shibutani, M., *et al.* Arid1b Haploinsufficiency Causes Abnormal Brain Gene Expression and Autism-Related Behaviors in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, E1872 (2017).
30. Celen, C., *et al.* Arid1b haploinsufficient mice reveal neuropsychiatric phenotypes and reversible causes of growth impairment. *eLife* **6**, e25730 (2017).
31. Dentici, M.L., *et al.* Expanding the phenotypic spectrum of truncating POGZ mutations: Association with CNS malformations, skeletal abnormalities, and distinctive facial dysmorphism. *American Journal of Medical Genetics. Part A* **173**, 1965-1969 (2017).
32. Yuen, R., *et al.* Whole genome sequencing resource identifies 18 new candidate genes for autism spectrum disorder. *Nature Neuroscience* **20**, 602-611 (2017).
33. White, J., *et al.* POGZ truncating alleles cause syndromic intellectual disability. *Genome Medicine* **8**, 3 (2016).
34. Stessman, H.A.F., *et al.* Disruption of POGZ Is Associated with Intellectual Disability and Autism Spectrum Disorders. *AmericanJournal of Human Genetics* **98**, 541-552 (2016).
35. Tan, B., *et al.* A novel de novo POGZ mutation in a patient with intellectual disability. *Journal of Human Genetics* **61**, 357-359 (2016).
36. Fukai, R., *et al.* A case of autism spectrum disorder arising from a de novo missense mutation in POGZ. *Journal of Human Genetics* **60**, 277-279 (2015).
37. Ye, Y., *et al.* De novo POGZ mutations are associated with neurodevelopmental disorders and microcephaly. *Cold Spring Harbor molecular case studies* **1**, a000455 (2015).
38. Matsumura, K., *et al.* De novo POGZ mutations in sporadic autism disrupt the DNA-binding activity of POGZ. *Journal of Molecular Psychiatry* **4**, 1 (2016).

39. Matsumura, K., *et al*. Pathogenic POGZ Mutation Causes Impaired Cortical Development and Reversible Autism-Like Phenotypes. *Nature Communications* **11**, 1-16 (2020).
40. Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J., & Zugaza, J.L. Protein kinase D: a novel target for diacylglycerol and phorbol esters. *Biochemical Society Transactions* **25**, 565-571 (1997).
41. Rozengurt, E., *et al*. Protein kinase D signaling: multiple biological functions in health and disease. *Physiology* **26**. 23-33 (2011).
42. Matsumura, K., *et al*. Autism-associated protein kinase D2 regulates embryonic cortical neuron development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **519**, 626-632 (2019).
43. Ostapcuk, V.*, et al.* Activity-dependent neuroprotective protein recruits HP1 and CHD4 to control lineage-specifying genes. *Nature* **557**, 739-743 (2018).
44. Gunther, M., Laithier, M. & Brison, O. A set of proteins interacting with transcription factor Sp1 identified in a two-hybrid screening. *Molecular and Cellular Biochemistry* **210**, 131-142 (2000).
45. Gudmundsdottir, B.*, et al.* POGZ Is Required for Silencing Mouse Embryonic beta-like Hemoglobin and Human Fetal Hemoglobin Expression. *Cell Reports* **23**, 3236-3248 (2018).
46. Vermeulen, M.*, et al.* Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell* **142**, 967-980 (2010).
47. Pietras, A., von Stedingk, K., Lindgren, D., Pahlman, S. & Axelson, H. JAG2 induction in hypoxic tumor cells alters Notch signaling and enhances endothelial cell tube formation. *Molecular Cancer Research : MCR* **9**, 626-636 (2011).
48. Esteves de Lima, J., Bonnin, M.A., Birchmeier, C. & Duprez, D. Muscle contraction is required to maintain the pool of muscle progenitors via YAP and NOTCH during fetal myogenesis. *eLife* **5**, e15593 (2016).
49. Lui, J.H., Hansen, D.V. & Kriegstein, A.R. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* **146**, 18-36 (2011).
50. Rusanescu, G. & Mao, J. Notch3 is necessary for neuronal differentiation and maturation in the adult spinal cord. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **18**, 2103-2116 (2014).
51. Nelson, S.B. & Valakh, V. Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* **87**, 684-698 (2015).
52. Paterson, C. & Law, A.J. Toward Better Strategies for Understanding Disrupted Cortical Excitatory/Inhibitory Balance in Schizophrenia. *Biological Psychiatry* **83**, 632-634 (2018).
53. Eguchi, M. & Yamaguchi, S. In vivo and in vitro visualization of gene expression dynamics over extensive areas of the brain. *NeuroImage* **44**, 1274-1283 (2009).
54. Seiriki, K.*, et al.* High-Speed and Scalable Whole-Brain Imaging in Rodents and Primates. *Neuron* **94**, 1085-1100 e1086 (2017).
55. Seiriki, K.*, et al.* Whole-brain block-face serial microscopy tomography at subcellular resolution using FAST. *Nature Protocols* **14**, 1509-1529 (2019).
56. Mundy, P. A review of joint attention and social-cognitive brain systems in typical development and autism spectrum disorder. *The EuropeanJournal of Neuroscience* **47**, 497-514 (2018).
57. van Loo, K.M.J. & Martens G.J.M. Genetic and Environmental Factors in Complex Neurodevelopmental Disorders. *Current Genomics* **8**, 429-444 (2007).

58. Stamou, M., Streifel, K.M., Goines, P.E. & Lein, P.J. Neuronal connectivity as a convergent target of gene x environment interactions that confer risk for Autism Spectrum Disorders. *Neurotoxicology and Teratology* **36**, 3-16 (2013).
59. Tordjman, S., *et al*. Gene x environment interactions in autism spectrum disorders: role of epigenetic mechanisms. *Frontiers in Psychiatry* **5**, 53 (2014).
60. Cardoso, A.R., *et al*. Essential genetic findings in neurodevelopmental disorders. *Human Genomics* **13**, 31 (2019).
61. Richards, S., *et al*. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* **17**, 405 (2015).
62. Isidor, B., *et al*. De Novo Truncating Mutations in the Kinetochore-Microtubules Attachment Gene CHAMP1 Cause Syndromic Intellectual Disability. *Human Mutation* **37**, 354-358 (2016).
63. Agarwal, N., *et al*. MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Neurotoxicology and Teratology* **36**, 3-16 (2013).
64. Wang, Y.M., et al. MicroRNA-197 controls ADAM10 expression to mediate MeCP2's role in the differentiation of neuronal progenitors. *Cell Death & Differentiation* **26**, 1863-1879 (2019).
65. Cubelos, B., *et al*. Cux1 and Cux2 regulate dendritic branching, spine morphology, and synapses of the upper layer neurons of the cortex. *Neuron* **66**, 523-535 (2010).
66. Nithianantharajah, J. & Grant, S.G. Cognitive components in mice and humans: combining genetics and touchscreens for medical translation. *Neurobiology of Learning and Memory* **105**, 13-19 (2013).
67. Sundelin, H.E*., et al.* Autism and epilepsy: A population-based nationwide cohort study. *Neurology* **87**, 192-197 (2016).
68. Tuchman, R. & Rapin, I. Epilepsy in autism. *The Lancet. Neurology* **1**, 352-358 (2002).
69. Selimbeyoglu, A*., et al.* Modulation of prefrontal cortex excitation/inhibition balance rescues social behavior in CNTNAP2-deficient mice. *Science Translational Medicine* **9**, eaah6733 (2017).
70. Yizhar, O*., et al.* Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* **477**, 171-178 (2011).
71. Richter, M., *et al*. Altered TAOK2 activity causes autism-related neurodevelopmental and cognitive abnormalities through RhoA signaling. *Molecular Psychiatry* **24**, 1329-1350 (2019).
72. Rozengurt, E., Rey, O. & Waldron, R. T. Protein kinase D signalling, *Journal of Biological Cehmistry* **280**, 13205-13208 (2005).
73. Rykx, A., *et al*. Protein kinase D: a family affair, *FEBS Letters* **546**, 81-86 (2003).
74. Hao, Q., Wang, L., Zhao, Z. J. & Tang, H. Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **284,** 799-806 (2009).
75. Peterburs, P., *et al*. Protein kinase D regulates cell migration by direct phosphorylation of the cofilin phosphatase slingshot 1 like, *Cancer research* **69**, 5634-5638 (2009).
76. Avriyanti, E., *et al*. Functional redundancy of protein kinase D1 and protein kinase D2 in neuronal polarity, *Neuroscience Research* **95**, 12-20 (2015).

77. Yin, D.M., Huang, Y.H., Zhu, Y.B. & Wang, Y. Both the establishment and maintenance of neuronal polarity require the activity of protein kinase D in the Golgi apparatus. *Journal of Neuroscience* **28**, 8832-8843 (2008).
78. Reiner, O., Karzbrun, E., Kshirsagar, A. & Kaibuchi, K. Regulation of neuronal migration, an emerging topic in autism spectrum disorders. *Journal of Neurochemistry* **136**, 440-456 (2016).
79. Ye, T., Fu, A.K. & Ip, N.Y. Emerging roles of Axin in cerebral cortical development, *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**, 217 (2015).
80. Avino, T.A. & Hutsler, J.J. Abnormal cell patterning at the cortical gray–white matter boundary in autism spectrum disorders. *Brain Research* **1360**, 138-146 (2010).
81. Schmitz, C. & Rezaie P. The neuropathology of autism: where do we stand?, *Neuropathology and Applied Neurobiology* **34**, 4-11 (2008).
82. Sturany, S., *et al*. Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2 a novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases, *Journal of Biological Chemistry* **276** 3310-3318 (2001).
83. Tan, M., Hao, F., Xu, X., Chisolm, G.M. & Cui, M.Z. Lysophosphatidylcholine activates a novel PKD2-mediated signaling pathway that controls monocyte migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **29**. 1376-1382 (2009).
84. Sinnett-Smith, J., Zhukova, E., Rey, O. & Rozengurt, E. Protein kinase D2 potentiates MEK/ERK/RSK signaling, c-Fos accumulation and DNA synthesis induced by bombesin in Swiss 3T3 cells. *Journal of Cellular Physiology* **211**, 781-790 (2007).
85. Chan, W.S., *et al*. Differential regulation of proliferation and neuronal differentiation in adult rat spinal cord neural stem/progenitors by ERK1/2, Akt, and PLCγ. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **6**, 23 (2013).
86. Li, Z., Theus, M.H. & Wei, L. Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells, *Development Growth and Regeneration* **48**, 513-523 (2006).
87. Moors, M., Cline, J.E., Abel, J. & Fritsche, E. ERK-dependent and-independent pathways trigger human neural progenitor cell migration. *Toxicology and Applied Pharmacology* **221**, 57-67 (2007).
88. Segarra, J., Balenci, L., Drenth, T., Maina, F. & Lamballe F. Combined signaling through ERK, PI3K/AKT, and RAC1/p38 is required for met-triggered cortical neuron migration. *Journal of Biological Chemistry* **281,** 4771-4778 (2006).
89. Snyder, M., Huang, X.Y., & Zhang, J.J. Stat3 is essential for neuronal differentiation through direct transcriptional regulation of the Sox6 gene, *FEBS Letters* **585**, 148-152 (2011).
90. Rhim, J.H., *et al*. Cell type-dependent Erk-Akt pathway crosstalk regulates the proliferation of fetal neural progenitor cells. *Scientific Reports* **6**, 26547 (2016).
91. Lelieveld, S.H., *et al*. Meta-analysis of 2,104 trios provides support for 10 new genes for intellectual disability. *Nature Neuroscience* **19** 1194 (2016).
92. Deciphering Developmental Disorders Study, Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* **519**. 223 (2015).
93. Kong, A., *et al.* Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* **488**, 471 (2012).
94. O'Roak, B.J., *et al*. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo

mutations. *Nature* **485**, 246 (2012).

95. Liu, T., *et al*. Developmental protein kinase C hyper-activation results in microcephaly and behavioral abnormalities in zebrafish. *Translational Psychiatry* **8**, 232(2018).
96. Bemben, M. A., *et al*. Autism-associated mutation inhibits protein kinase C-mediated neuroligin-4X enhancement of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 2551-2556 (2015).
97. Ji, L., Chauhan, A. & Chauhan V. Reduced activity of protein kinase C in the frontal cortex of subjects with regressive autism: relationship with developmental abnormalities. *International Journal of Biological Sciences* **8**, 1075 (2012).
98. Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N. & Okazaki, T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *Journal of Cell Biology* **109**, 1963-1973 (1989).
99. Nakazawa, T., *et al*. Differential gene expression profiles in neurons generated from lymphoblastoid B-cell line-derived iPS cells from monozygotic twin cases with treatment-resistant schizophrenia and discordant responses to clozapine. *Schizophrenia Research* **181**, 75-82 (2017).
100. Maga, A.M., Navarro, N., Cunningham, M.L. & Cox T.C. Quantitative trait loci affecting the 3D skull shape and size in mouse and prioritization of candidate genes in-silico. *Frontiers in Physiology* **6**, 92 (2015).
101. Scattoni, M.L., Gandhy, S.U., Ricceri, L. & Crawley, J.N. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism. *PloS One* **3**, e3067 (2008).
102. Akamatsu, M., Yamashita, T., Hirose, N., Teramoto, S. & Kwak, S. The AMPA receptor antagonist perampanel robustly rescues amyotrophic lateral sclerosis (ALS) pathology in sporadic ALS model mice. *Scientific Reports* **6**, 28649 (2016).