

CAPS2 タンパク質による分泌制御機構とその機能不全による発達障害の発症

Analyses of CAPS2 protein-dependent exocytosis mechanism and its association with developmental disorders

(神経化学会推薦)

代表研究者 群馬大学 定方哲史 Gunma University Tetsushi Sadakata

Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2 or CADPS2) potently promotes the release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). A rare splicing form of CAPS2 with deletion of exon3 (dex3) was identified to be overrepresented in some patients with autism. Here, we generated Caps2-dex3 mice and verified a severe impairment in axonal Caps2-dex3 localization, contributing to a reduction in BDNF release from axons. In addition, circuit connectivity, measured by spine and interneuron density, was diminished globally. The collective effect of reduced axonal BDNF release during development was a striking and selective repertoire of deficits in social- and anxiety-related behaviors. Together, these findings represent the first mouse model of a molecular mechanism linking BDNF-mediated coordination of brain development to autism-related behaviors and patient genotype.

研究目的

自閉症は、三歳までに発病する精神疾患として知られ、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局、反復的で常同的な行動”を特徴とした疾患である。CAPS2 (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2, official symbol は CADPS2)は、分泌顆粒の分泌に関与する CAPS1 のホモログとして、我々によって新規遺伝子としてクローニングされ、小脳において CAPS2 は BDNF の分泌に関与していることなどが明らかになった¹。これまでに我々は作製した CAPS2 KO マウスの行動解析を行い、自閉症で見られるような様々な形質を示すことが明らかになってきた^{2,3}。さらに、ヒト自閉症患者の血中における CAPS2 の発現を解析したところ、自閉症患者特異的に CAPS2 の exon3 がスキップしていることが分かった³。この exon3 がスキップした欠損型 CAPS2 は、シナプス部に輸送されなくなることも判明した³。これらの結果から、欠損型 CAPS2 の発現によって BDNF の局所的分泌が異常になり、これが神経ネットワーク形成の異常につながる可能性が示唆された。

今回我々は CAPS2 exon 3 skipping マウスを作製し、自閉症様形質を示すかについて解析を行った。また、CAPS2 タンパク質が欠失することで実際にどの分泌ステップが異常を来しているのかについても検討を行った。

研究経過

CAPS2 exon 3 skipping マウスが様々な自閉症様形質を示すことが分かってきた。以下にその結果を示す。

- 1) 通常のオープンフィールドにおいて、野生型と exon 3 skipping 型に、行動量等の違いは見られなかった。しかし、オープンフィールドの中心に新奇物体を置いたときに、野生型に比べ exon 3 skipping 型は、行動量の低下および新奇物体への接触回数の低下を示した。これは新奇性が高い環境において、exon 3 skipping マウスが不安の亢進を示していると考えられる。
- 2) 高架式十字迷路において、野生型に比べ、exon 3 skipping 型は、オープンアームへの進入回数や滞在時間が有意に短かった。これは exon 3 skipping 型に

において不安が高進していることを示している。

- 3) 回転かごを用いて、睡眠覚醒リズムの測定を行った。明暗状態では特に野生型と exon 3 skipping 型に違いは見られなかったが、恒暗状態では exon 3 skipping 型において、サーカディアンリズムが消失しているケースが見られた。
- 4) オープンフィールドを用い、社会性相互作用テストを行った。具体的には小ケージに入れた stranger マウス周辺に滞在する時間を測定した。その結果、野生型に比べ、exon 3 skipping 型は stranger マウス周辺に滞在する時間が有意に減少していた。これは exon 3 skipping 型が社会性において異常があることを示している。
- 5) 野生型母マウスに比べ、exon 3 skipping 型母マウスは、子育てが悪く、出産した仔マウスを死なせてしまうことが多いため、仔の数が有意に減少していた。

さらにこのマウスの解剖学的解析により、BDNF や有芯小胞マーカータンパク質であるクロモグラニンのトラフィッキングの異常やゴルジ体の形態異常が示された。電気生理学的解析においては、paired-pulse facilitation に異常が見られた。

また、CAPS2 タンパク質が有芯小胞分泌のどのステップに関与するかについても詳細に検討した。その結果、以下のことが分かってきた。

- 1) CAPS2 タンパク質は PH ドメインを介してゴルジ体膜に結合し、その結合性は C2 ドメインによって制御されている。
- 2) CAPS2 タンパク質は GDP 結合型のクラス II ARF タンパク質 (ARF4, ARF5) の N 末端に結合する。
- 3) CAPS2 と ARF の結合をブロックした場合、クロモグラニンはゴルジ体へ集積する。
- 4) 同様のクロモグラニン集積は CAPS2 および ARF をノックダウンした場合にも起こる。
- 5) CAPS2 をノックアウトした場合、神経細胞のゴルジ体の形態が異常になる。

以上より、CAPS2 タンパク質が有芯小胞のトラフィッキングに関与するメカニズムが分かってきた。

考察

最近、自閉症患者におけるスプライシング異常が報告されている⁴。しかし、CAPS2 の splicing 異常がなぜ特定の自閉症患者で起きるかについては未だ不明である。我々は exon 3 skipping を起こす自閉症患

者の splicing acceptor サイトや splicing donor サイトの遺伝子解析を行ったが、配列の異常は認められなかった。しかし我々は intron 2 と intron 3 の配列を解析し、splicing 異常を起こす患者特異的な変異を発見した。現在、これらの変異が splicing 異常の原因となるかについて解析を行っている。

CAPS2 以外の遺伝子が CAPS2 の splicing 異常の原因となっている可能性も考えられる。その候補としては splicing factor などが考えられる。その場合、CAPS2 遺伝子以外にも splicing 異常が起きている可能性がある。しかし、今回の報告で CAPS2 exon 3 skipping マウスが様々な自閉症様形質を示したことから、CAPS2 exon 3 skipping を起こしている患者に関して、他の遺伝子の splicing 異常が自閉症の発症の原因となっている可能性は少ない（もしくは寄与率が低い）。これは Rett 障害における MECP2 遺伝子と BDNF 遺伝子の関係に近い。BDNF は Rett 障害において、遺伝子の異常を起こす遺伝子の一つにすぎないが、発症に関する寄与率は非常に高い。我々は今後も CAPS2-BDNF を軸にして、自閉症発症メカニズムについて解析を続けていく予定である。

参考文献

1. The secretory granule-associated protein CAPS2 regulates neurotrophin release and cell survival. Tetsushi Sadakata, Akira Mizoguchi, Yumi Sato, Ritsuko Katoh-Semba, Mitsunori Fukuda, Katsuhiko Mikoshiba, Teiichi Furuichi. *Journal of Neuroscience*. 24(1), p43-52 (2004).
2. Impaired cerebellar development and function in mice lacking CAPS2, a protein involved in neurotrophin release. Tetsushi Sadakata, Wataru Kakegawa, Akira Mizoguchi, Miwa Washida, Ritsuko Katoh-Semba, Fumihiro Shutoh, Takehito Okamoto, Hisako Nakashima, Kazushi Kimura, Mika Tanaka, Yukiko Sekine, Shigeyoshi Itoharu, Michisuke Yuzaki, Soichi Nagao, Teiichi Furuichi. *Journal of Neuroscience*. 27(10), p2472-2482 (2007).
3. Autistic-like phenotypes in CADPS2/CAPS2 knockout mice and aberrant CADPS2 splicing in autistic patients. Tetsushi Sadakata, Miwa Washida, Yoshimi Iwayama,

Satoshi Shoji, Yumi Sato, Takeshi Ohkura, Ritsuko Katoh-Semba, Mizuho Nakajima, Yukiko Sekine, Mika Tanaka, Kazuhiko Nakamura, Yasuhide Iwata, Kenji J. Tsuchiya, Norio Mori, Sevilla D. Detera-Wadleigh, Hironobu Ichikawa, Shigeyoshi Itoharu, Takeo Yoshikawa, Teiichi Furuichi.
Journal of Clinical Investigation. 117(4), p931-943 (2007).

4. Transcriptomic analysis of autistic brain reveals convergent molecular pathology.
Irina Voineagu, Xinchun Wang, Patrick Johnston, Jennifer K. Lowe, Yuan Tian, Steve Horvath, Jonathan Mill, Rita M. Cantor, Benjamin J. Blencowe, Daniel H. Geschwind.
Nature. 474(7351):380-4 (2011).

研究の発表

口頭発表

- 「CAPS2 タンパク質による分泌制御機構とその機能不全による脳発達障害の解明」
定方哲史
山田科学振興財団 2014 年度研究交歓会 成果発表会、東京、2014 年 5 月
- 「自閉症モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明」
定方哲史
平成 25 年度生理学研究所研究会、岡崎、2013 年 6 月
- 「自閉症モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明」
定方哲史
第 11 回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ、前橋、2013 年 3 月
- 「自閉症モデルマウスの作製について」
定方哲史
第 7 回群馬大学医工連携グループミーティング、前橋、2013 年 2 月
- 「自閉症モデルマウスを用いた発症メカニズムの解明」

定方哲史

包括的神経グリア研究会 2013、浜松、2013 年 1 月

6. “Reduced axonal localization of a *Caps2* splice variant impairs polarization of BDNF release and causes autistic-like behavior in mice.”

Tetsushi Sadakata

第 11 回 Japanese Association of Scientists in Singapore (JASS)、シンガポール、2012 年 11 月

7. 「自閉症に関連する遺伝子の研究」

定方哲史

公開講座・世界脳週間 2012、前橋、2012 年 4 月
学会等の慣例に従って記載してください。

誌上発表

- Axonal localization of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum
Tetsushi Sadakata, Wataru Kakegawa, Yo Shinoda, Mayu Hosono, Ritsuko Katoh-Semba, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Yasuki Ishizaki, Michisuke Yuzaki, Masami Kojima, Teiichi Furuichi
PLoS ONE. 9(6), e99524 (2014).
- Mouse Models of Mutations and Variations in Autism Spectrum Disorder-Associated Genes: Mice Expressing *Caps2/Cadps2* Copy Number and Alternative Splicing Variants
Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Akira Sato, Hirotohi Iguchi, Chiaki Ishii, Makoto Matsuo, Ryosuke Yamaga, Teiichi Furuichi
International Journal of Environmental Research and Public Health. 10 (12), p6335-6353 (2013).
- CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain.
Tetsushi Sadakata, Wataru Kakegawa, Yo Shinoda, Mayu Hosono, Ritsuko Katoh-Semba, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Mika Tanaka, Takuji Iwasato,

- Shigeyoshi Itoharu, Kenichiro Furuyama, Yoshiya Kawaguchi, Yasuki Ishizaki, Michisuke Yuzaki, Teiichi Furuichi
Journal of Neuroscience. 33 (44), p17326-17334 (2013)
4. Animal Models of Autism Spectrum Disorder (ASD): A Synaptic-Level Approach to Autistic-Like Behavior in Mice
Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi
Experimental Animals. 62 (2), p71-78 (2013)
5. Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the *CAPS2/CADPS2* gene
Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Teiichi Furuichi.
FEBS Letter. 587(1), p54-59 (2013)
6. Reduced axonal localization of a *Caps2* splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice.
Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Hideki Miwa, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itoharu, Teiichi Furuichi
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109 (51), p21104-21109 (2012)
7. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) interacts with the class II ARF small GTPases and regulates dense-core vesicle trafficking.
Tetsushi Sadakata, Yukiko Sekine, Megumi Oka, Makoto Itakura, Masami Takahashi, Teiichi Furuichi.
FEBS Journal. 279(3), p384-394 (2012)