

令和元年6月21日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06716

研究課題名(和文) 生存因子プロサポニンの受容体GPR37の自閉性障害変異がシグナル伝達に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effects of the GPR37-mutation in autism spectrum disorder on the signal transduction by prosapoinin

研究代表者

神保 恵理子(藤田恵理子)(Jimbo, Eriko)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20291651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症スペクトル障害の患者で、シナプスに存在する様々な分子の変異が見出されている。その一つであるGPR37は、G蛋白質共役型受容体に含まれる。しかし、疾患との関係は知られていない。本研究では、GPR37とPDZ領域を介した足場蛋白質の結合が明らかとなった。一方、変異ではその結合が阻害された。GPR37は、プロサポニンによって活性化される。プロサポニンの活性を持つペプチド断片であるプロサブチドを用いたGPR37欠損マウスの神経細胞では、プロサブチド関与のシグナル伝達が低下したことから、GPR37の重要性が示唆された。また、GPR37と相同性の高いGPR37L1に患者における遺伝子変異を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉性スペクトル障害は近年の社会的な問題であり、治療法の確立が求められているが、発達期の脳は多様な要因に対して影響されるため、分子病態の解明が難しい。本研究では、疾患におけるシナプス接着蛋白質とG蛋白質共役型受容体の複合体形成の異常、シグナル伝達系の異常を明らかにしたところに特徴がある。本研究のような機構解明の足掛かりとなる実験の積み重ねが、患者の社会性行動へ効果や治療にあたり、重要性を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the patients with autism spectrum disorder, mutations of various molecules which exist at synapses, have been found. One of them, GPR37 is included in the G protein coupled receptor. However, little is known about the relation with the disease. In this study, it became clear that GPR37 made each complex of NLGN-PSD95 and CADM1-MUPP1, and bound to scaffold proteins via PDZ binding domain. GPR37 is activated by prosapoinin. A short sequence prosapotide can substitute the prosapoinin. The signaling via prosaptide was reduced in the neurons of GPR37 deficient mice. GPR37 deficient mice showed slight abnormalities in the number of ultrasound vocalization and waveforms by comparison to wild-type mice. In addition, mutations of GPR37L1, which is highly homologous to GPR37, were also found in autism.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：自閉性スペクトラム障害 シナプス接着因子 GPR37 CADM1

1. 研究開始当初の背景

自閉性スペクトラム障害は、社会行動性の異常、常同性を特徴とする脳発達障害である。アメリカ精神医学会の調査では、近年になるに従って、頻度が増している。自閉性スペクトラム障害の原因遺伝子として、数十種類の疾患感受性候補遺伝子(AUTS)領域が想定されている。自閉性スペクトラム障害の原因の単一遺伝子変異には、複数のシナプス接着蛋白質遺伝子{Neurexins (NLGN) (Thomas, et al. Hum Genet, 1999; Jamains et al. Nat Genet, 2003)、SHANK3 (Durand, et al. Nat Genet, 2007; Moessner, et al. Am J Hum Genet. 2007)、報告者らが発見した CADM1(Zhiling et al., BBRC. 2008; Fujita et al., Cell Death Dis. 2010)、CNTNAP2 (Bakkaloglu et al., Am J Hum Genet. 2008) など}のシナプス形成や機能、GRIN2B (O'Roak, et al. Nat Genet, 2011) などの Wnt/ β -カテニンシグナル伝達、CHD8 (O'Roak, et al. Nature, 2012)などのクロマチンリモデリング等}の変異が報告されている。しかしながら、これら遺伝子の変異と自閉性スペクトラム障害の分子病態の関係は未だ明らかでない。また、発達期の脳は多様な要因に脆弱性を持ち、遺伝的要因と環境要因の双方が影響し、より複雑化しており、このような原因遺伝子が自閉性スペクトラム障害を引き起こす分子過程は不明である。

申請者らは、自閉性スペクトラム障害患者の遺伝子に G 蛋白質共役型受容体 (GPCR)である GPR37(R558Q と Del312F)変異を発見した(Fujita et al., PLoS ONE 2012)。GPCR は、細胞膜を 7 回貫通する蛋白質であり、現在において使用されている薬の多くがこれらの受容体をターゲットとしている。細胞外の領域では、細胞に送られてきた分子情報を受け取り、細胞内領域では、直下にある G 蛋白質を経てさらに細胞内へと情報を伝達させる機能を持つことで知られている。しかしながら、未だ内在性リガンドが知られていないオーファン受容体も含め千種類程度の GPCR が存在すると推定されている。

GPR37 は、シナプス前膜で Dopamine transporter と、後膜で Dopamine 受容体 2 型と結合し、Dopamine 代謝を制御している。生存因子であるプロサポニンの受容体でもある。GPR37 の C 末端も先述の NLGN や CADM1 と同様に、PDZ 結合領域を持っている。しかしながら、PDZ 結合領域が関与する蛋白質複合体と自閉性スペクトラム障害との関係はあまり知られていない。これらのことから、自閉性障害スペクトラムの分子病態と GPCR が関与する情報伝達系の接点が存在する可能性を考え、GPR37 の関与する分子機構を調べることにした。

2. 研究の目的

GPR37 は、自閉性スペクトラム障害の原因遺伝子の一つである PSD95 に結合していた。PSD95 は、有する PDZ 領域で、PDZ 結合領域と結合する。この発見は PSD95 と GPR37 の複合体形成異常とプロサポニンの情報伝達系異常が自閉性スペクトラム障害分子病態に関与していることを示唆している。また、GPCR の一種である Oxytocin 受容体(OtxR)のリガンドである Oxytocin は従来の母性行動等の他に、社会性行動へ影響や自閉性スペクトラム障害への治療効果が報告されている (Munesue et al., Neurosci Res. 2010; Watanabe et al., JAMA Psychiatry 2014)。報告者らは、OtxR の C 末端の PDZ 結合領域で PSD95 と結合することを見出している。これらのことから、GPCR と自閉性スペクトラム障害関連複合体とのクロストークの可能性が考えられる。

本研究は、培養細胞、遺伝子改変マウスを用いて、GPR37 変異に因るシナプス接着蛋白質との複合体形成異常と、GPCR の情報伝達系の異常を明らかにし、自閉性スペクトラム障害分子病態の解明の足掛かりを得ることを目的とする。なお、GPR37 変異には R558Q を用いる。変異蛋白質による小胞体ストレスが、複合体形成異常、シグナル伝達異常などを通して自閉性スペクトラム障害の分子病態に関わりに着目した点に特徴がある。

3. 研究の方法

1) 試料

マウス由来の P19EC 細胞および C2C5 細胞、サル由来の COS 細胞、ヒト由来の HEK293 細胞は、10%血

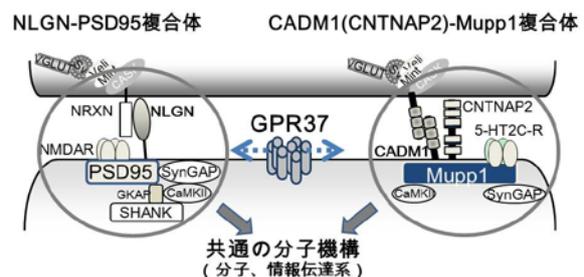


図4 シナプス接着分子複合体に共通の分子機構の解明

清を含んだ Minimum essential medium eagle, alpha modification (α MEM) 培地下で継代、培養した。各細胞に遺伝子をリポフェクタミン 3000 を用いて導入した。なお、遺伝子発現プラスミドは、所属施設における遺伝子組換え委員会の承諾を得た。また、細胞に対してプロサブチドの添加の有無による変化を観察した。

遺伝子変異マウスは、自治医科大学実験医学センターにおいて、所属施設における動物実験委員会承認の下での飼育および実験が行われた。

自閉性スペクトラム障害患者の遺伝子解析には、自治医科大学病院小児科および関連病院の通院患者で、親権者に説明の上、書面で同意が得られた患者を対象とした。患者氏名や付随する個人情報については全て匿名化を行った。また、米人の遺伝子検体は、アメリカの The Autism Genetic Resource Exchange (AGRE)、Coriell Institute for Medical Research から入手した。所属施設における倫理委員会および遺伝子解析委員会の承認の下で解析を行った。自閉性スペクトラム障害の診断は、指標である DSM-IV(自閉性スペクトラム障害、アスペルガー障害、特定不能の汎用性発達障害を含む)または最新指標の DSM-5 の基準を満たすものとした。

2) リンパ芽球培養と DNA 抽出

同意が得られた自閉性スペクトラム障害患者から採血し、末梢血リンパ球を分離し、凍結した。一部検体については、Epstein-Barr virus で芽球化し、10%血清およびペニシリンストレプトマイシンを含んだ RPMI 1640 培地で培養した。全血液、またはリンパ芽球から genomic DNA を抽出した。濃度測定し、遺伝子変異解析を行った。

3) 遺伝子変異解析

抽出した genomic DNA を用い、目的のする遺伝子の全エクソンを PCR で増幅した。PCR 反応条件は、94°C で 3 分反応後、94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 30~60 秒を 35 サイクル、その後 72°C 10 分とした。シーケンサー (Applied Biosystems) を用いて解析した。得られたデータは、Sequence Scanner (Applied Biosystems) で変異を検出し、dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) で照合した。また、Phenotyping v2 (PolyPhen-2)、SIFT、mutation tasting で検出した変異の蛋白質機能の影響を検討した。疾患との関連が推定された変異は、対照群での同領域の配列を確認した。

4) エクソーム解析

患者 genomic DNA を用いて、全エクソームに対し、次世代シーケンサー (Nextseq, Illumina) による解析を行った。

5) Pull-down および western blot 法

遺伝子を導入させた培養細胞から得られた蛋白質抽出液を用い、Pull-down および western blot 法を行った。

6) 免疫染色法

培養細胞は、最終濃度 2% パラホルムアルデヒドになるようにして固定し、抗体抗原反応を行った。野生型および GPR37 遺伝子改変マウスを 4% パラホルムアルデヒドで固定した。脳組織を取り出し、30% スクロースを含む PBS 溶液で数日置換した後、包埋剤と共に凍結した。凍結包埋したマウス組織をクリオスタットまたはビブラトームを用いて切片を作製した。クリオスタットによる 10 μ m 厚の切片は、MAS コーディングされたスライドガラスに貼り付けた。その後、ニッスル染色や抗体を用いた免疫染色を行った。

7) マウス超音波音声解析

Avisoft Bioacoustics 製の超音波音声測定用機器を用いて、40-100kHz の波長の測定を行った。

4. 研究成果

GPR37 全長蛋白質の複合体形成の解析では、GPR37 の C 末端を含む蛋白質とマウス脳を用いた Pull-down アッセイを行ったところ、GPR37 は PSD95 と MUPP1 の両方に結合することが明らかになった。また、COS 細胞および大腸菌における GPR37 発現蛋白質に対して、NLGN-PSD95 と CADM1-MUPP1 のそれぞれの複合体を形成が見られた。PSD95 と MUPP1 に関わる分子としては、Krapivinsky らにより、SynGAP が報告されており (Neuron 2004)、この変異は、自閉性スペクトラム障害、精神遅滞、てんかんを示す患者で存在していた。これらのことから、脳内における GPR37 複合体形成に、NLGN-PSD95-GPR37 および CADM1(CNTNAP2)-MUPP1-GPR37 の存在と、この複合体と SynGAP や、他の GPCR が直接、あるいは双方の下流でクロストークする可能性が考えられる。そし

て、遺伝子および蛋白質変異による複合体形成とシグナル伝達系の異常が自閉性スペクトラム障害の分子病態に繋がる可能性が高いと考えられた。一方、GPR37 変異 R558Q による複合体形成について、変異により、それぞれの複合体との結合が僅かに弱くなっていたことから、変異が蛋白質複合体形成に影響を及ぼしていることが示唆された。野生マウス初代神経細胞に遺伝子を導入した培養系を用いた免疫染色では、GPR37 に比較して、自閉性スペクトラム障害の患者由来の GPR37 変異 R558Q は MUPP1 と弱く相互作用し小胞体に保持され、樹状突起の変化をもたらせた。PDZ 結合ドメインを欠いた GPR37 は細胞表面に輸送されるものの、シナプスにおいて MUPP1、PSD95 と複合体形成しなかった。変異 R558Q により小胞体ストレス誘導が観察された。これらのことから、病因の一つとして GPR37 の自閉性スペクトラム障害の変異により GPR37 複合体の樹状突起上の異常が引き起こされる可能性が示された。また、GPR37 は、神経細胞だけでなく、神経細胞に比較して発現量が少ない希突起膠細胞(オリゴデンドロサイト)の分化過程においても cAMP 依存性による Raf-MAPK-ERK シグナル伝達経路の活性化を調節する可能性がある。細胞種により多様な働きを担うかもしれない。

GPR37-like 1(GPR37L1)は、GPR37 と相同性が高い(ヒト GPR37 に対し 68%の類似および 48%の同一を持つ)。このことから、GPR37 と同様に、自閉性スペクトラム障害原因遺伝子となる可能性、自閉性スペクトラム障害関連複合体への関与が推測された。日本人 96 人、米人 188 人の自閉性スペクトラム障害患者における GPR37L1 遺伝子の変異の有無について解析を行った。その結果、5 種類の SNP 変異が検出された。それらは、細胞外領域に集中していた(図 2)。その中に蛋白質構造に変化をもたらす、疾患および蛋白質機能に関与すると推測される 1 種類(米人由来)が存在した。なお、疾患への関与が予測される 1 種の変異は、PolyPhen-2 analysis では Probably damaging、Mutation Taster analysis では Disease causing、SIFT analysis では Deleterious が示され、強い影響が示唆された。

GPR37 変異や GPR37L1 変異を持ったそれぞれの患者遺伝子において、GPR37 や GPR37L1 以外の既報告の主要な自閉性スペクトラム障害関連遺伝子に変異が含まれるか否かを全エクソーム解析で調べたところ、該当する遺伝子は見られなかった。エンドセリン B 受容体様蛋白質にも属する GPR37 と GPR37L1 は、エンドセリンおよびボンベシン受容体の相同体検索によって同定された。これらの受容体は、エンドセリンまたは関連ペプチドとの結合はなく、両方にプロサポニンに結合し、誘導されるシグナル伝達を媒介していることが知られている(Meyer et al., PNAS 2013)。内因性蛋白質であるプロサポニンは、細胞内でリソソーム酵素機能の調節因子、細胞外では神経保護作用および神経保護作用を有する分泌因子としての役割を持つ機能蛋白質である。プロサポニンを模倣でき、そして生物進化的に保存されている短い配列のプロサブチド合成物を用いて、GPR37 を発現させた HEK293 細胞、P19 細胞および C2C5 細胞での応答を調べた。その結果、HEK293 細胞とそれ以外の細胞でのプロサポニンに対する応答が異なっていた。HEK293 細胞は反応が起らなかった。P19 細胞および C2C5 細胞では、プロサブチドが GPR37 を介して ERK1/2 のリン酸化を誘発した。GPR37 変異により神経保護作用の抑制が見られたが、高濃度条件下での作用と考えられた。プロサポニンの分泌は、損傷およびストレスの条件下で増強されることから、その状態に曝された場合に G 蛋白質経路を活性化するのではないかと考えられた。GPR37 欠損マウスの神経細胞では、プロサブチド関与のシグナル伝達が低下したことから、GPR37 の重要性が示唆された。生体内における GPR37 の発現は、脳に強く発現し、末梢組織においては、比較的低レベルでの発現に止まることから、主に脳での GPR37 の変異が病態に変化を及ぼすことが示唆された。

自閉性障害の指標の一つであるマウス超音波障害について、母仔間に発せられる乳児期の音声の数が野生型と比較して GPR37 欠損マウスのホモ型がやや多く、長音の割合が高かった。規則性については、乏しい傾向を示した。これらのことは、GPR37 欠損マウスの自閉性スペクトラム障害様の表現型を示していると考えられる。

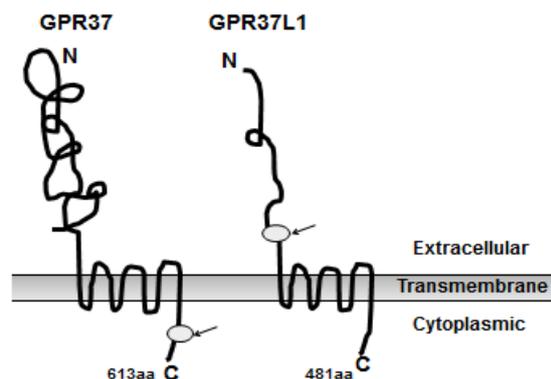


図 2. GPR37 および GPR37L1 の変異それぞれの蛋白質構造を示す。変異箇所は○および矢印にて表記する。

最後に、GPR37のように、脳機能に対するGPR37L1の重要性は、我々が見出した自閉性障害患者における点変異のみならず、Giddensらのグループ (Neurobiol Dis.2017) により変異を持つ患者に観察される難治性てんかんを含んだ重度の神経学的表現型からも導かれている。脳においてGPR37は主にドーパミン作動性神経細胞で高度に発現されており、一方、GPR37とGPR37L1はグリア細胞に多く発現する。今後、In vivoの脳の神経損傷後に強発現するプロサポシンの発現が、GPR37およびGPR37L1シグナルに対しどのくらいの影響を与え、またそれぞれが担っている役割やその違いについてのさらなる解明が望まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5件)

- ①Tanabe Y, Fujita-Jimbo E, Momoi MY, Momoi T. CASPR2 forms a complex with GPR37 via MUPP1 but not with GPR37(R558Q), an autism spectrum disorder-related mutation. J Neurochem. 2015;134(4):783-793. 査読有
- ②Ebisu H, Iwai-Takekoshi L, Fujita-Jimbo E, Momoi T, Kawasaki H. Foxp2 Regulates Identities and Projection Patterns of Thalamic Nuclei During Development. Cereb Cortex. 2017;27:3648-3659. 査読有
- ③Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, Yamagata T, Nagata KI. Role of a circadian-relevant gene NR1D1 in brain development: possible involvement in the pathophysiology of autism spectrum disorders. Scientific Reports 2017;43945. 査読有
- ④Nakamura S, Koyama T, Izawa N, 査読有 Nomura S, Fujita T, Omata Y, Minami T, Matsumoto M, Nakamura M, Fujita-Jimbo E, Momoi T, Miyamoto T, Aburatani H, Tanaka S. Negative feedback loop of bone resorption by NFATc1-dependent induction of Cadm1. PLoS One. 2017:e0175632. 査読有
- ⑤Tulyeu J, Tamaura M, Jimbo E, Shimbo H, Takano K, Iai M, Yamashita S, Goto T, Aida N, Tokuhiko E, Yamagata T, Osaka H. Aggregate formation analysis of GFAPR416W found in one case of Alexander disease. Brain Dev. 2019;41:195-200. 査読有

[学会発表] (計 5件)

(国内学会)

- ①Nakamura S, Osaka H, Muramatsu S, Takino N, Aoki S, Jimbo E, Shimazaki K, Onaka T, Ohtsuki S, Terasaki T, Yamagata T. Gene therapy for a mouse model of glucose transporter deficiency syndrome. 第58回 日本小児神経学会学術大会、2016年06月03日、東京

(国際学会)

- ②Tanabe Y, Jimbo E, Momoi MY, Momoi T. CASPR2 forms a complex with GPR37 via MUPP1 but not with GPR37(R558Q), an autism spectrum disorder-related mutation, Neuro2015, July 28, 2015, Kobe
- ③Kojima K, Jimbo EF, Yamagata T, Momoi M, Momoi T. CADM1 mutation knock-in mice as mice model of ASD showing abnormal excitatory-inhibitory synaptic balance, International Society for Autism Research (INSAR), May 11, 2017: New York.
- ④Goto M, Mizuno M, Matsumoto A, Yang Z, Jimbo EF, Tabata H, Nagata KI, Yamagata T. Role of a Circadian-Relevant Gene; NR1D1; in Brain Development: Possible Involvement in the Pathophysiology of Autism Spectrum Disorder. International Society for Autism Research (INSAR), May 11, 2017: New York.
- ⑤ Fujita-jimbo E, Momoi T. Altered migration of the neurons with Foxp2(R552H), mutation related to the human-speech-language Neuroscience2018, July 28, 2018, Kobe

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：桃井 隆

ローマ字氏名：Momoi Takashi

所属研究機関名：東京医科大学

部局名：医学部

職名：客員教授

研究者番号：40143507

(2)研究協力者

なし