

令和 3 年 10 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06744

研究課題名(和文) 自閉症Mupp1変異による5-HT受容体複合体-スパイン形成の異常と分子病態解析

研究課題名(英文) Molecular Pathogenesis of the abnormal spine morphology and 5-HTR complex induced by ASD-related mutated Mupp1

研究代表者

桃井 隆 (MOMOI, TAKASHI)

東京医科大学・医学部・客員教授

研究者番号：40143507

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)：Caspr2(Cadm1)はMulti-PDZタンパクMUPP1を介して、GPCRであるGPR37やセレトニン受容体と結合し、複合体形成することが知られている。Cadm1、GPR37の遺伝子変異やCaspr2の変異が自閉症スペクトラム障害(ASD)の患者遺伝子に見出されているにも関わらず、複合体がASDの分子病態とどのように関連しているかは明らかでない。本研究はMUPP1の遺伝子変異をASD患者に見出すとともに、変異MUPP1が複合体形成異常を示し、スパイン形態形成に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、Caspr2(Cadm1)-Mupp1-receptor複合体に関して、自閉症スペクトラム障害(ASD)関連の変異とスパイン形成との関連を明らかにした点に学術的意義がある。また、本研究結果は、ASDの分子病態の解明に役立つとともに、ASDの治療法の開発に役立つことが期待される点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Caspr2 has a PDZ binding domain at C-terminal region and forms a complex with receptors via interaction with Multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1). However, little is known about the impaired Caspr-2-Mupp1-receptor complex related to the pathogenesis of ASD. Caspr2 and GPR37 mainly interacted with PDZ3 and PDZ11 domains of Mupp1 via their C-terminal PDZ binding domains, respectively. In the present study, we found two missense mutations in Mupp1 gene of the ASD patients and investigated the density and morphology of PSD95-positive dendritic spines and protrusions in cultured hippocampal neurons overexpressing the mutated Mupp1. Compared to the Mupp1, mutated Mupp1 significantly reduced the density of PSD95-positive dendritic spines and decreased the width of dendritic spines. Thus, ASD-related Mupp1 missense mutations have influence on the dendritic spine morphogenesis, causing the pathogenesis of ASD.

研究分野：神経分子生物学

キーワード：自閉症スペクトラム障害 MUPP1 CADM1 スパイン形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者はシナプス接着蛋白 CADM1 の Y251S 変異を自閉症スペクトラム障害の患者に見出しているが、NLGN と異なり、CADM1 は CNTNAP2 同様、PSD95 と結合せず、MUPP1 と結合する。MUPP1 はセレトニン受容体 5-HT2R や SynGAP、Kalirin-7(Rac-GEF) と結合する。5-HT2R と Kalirin-7 はスパイン形態形成を制御するが、脳、神経細胞でのこれら複合体の存在と自閉症スペクトラム障害の分子病態との関係は未だ不明である。

(1) CADM1、CNTNAP2-MUPP1 複合体

申請者が発見したシナプス接着蛋白 RA175/SynCAM1 (CADM1) は N 末端の細胞外領域のイムノグロブリンドメインを介して、ホモフィリックな細胞接着活性を持つ(Fujita et al., Exp. Cell Res. 2003)。CADM1 と CNTNAP2 は細胞内領域でホモロジーが高く、C 末端の PDZ 結合配列 EYFI と EWLI を介して Mupp1(Multi-PDZ domain protein 1) に結合する(図 1、Fujita et al., JNC. 2012 ; Jones et al., PNAS 2009)。MUPP1 には 13 個の PDZ ドメインがあり、CaMKII、GABAB 受容体、5-HT2 受容体(5-HT2R)、SynGAP、Kalirin-7 等が結合する(図 1、Krapivinsky et al., Neuron 2004; Balasubramanian et al., J Biol Chem. 2007; Becamel et al., J Biol Chem. 2001; Penzes et al., Neuron 2001)。SynGAP は AMPAR の活性化に、また Kalirin-7 は Rac-GEF としてスパインの形態形成に関与している。NLGN は興奮性シナプスで、PSD95-SHANK との結合を介して NMDAR や 5-HT2R と、抑制性シナプスで、GABA 作動性の Gephyrin を介して GABAA 受容体と複合体形成している。しかしながら、脳、神経細胞での CADM1(CNTNAP2)-MUPP1 複合体形成とシナプス機能との関係は明らかでない。

(2) 自閉症スペクトラム障害における変異による、複合体形成不全とスパイン形態形成異常と分子病態

申請者らは自閉症スペクトラム障害患者の CADM1 遺伝子に 2 つの点変異(H246N、Y251S)を見出した(Zhiling et al., BBRC 2008; Fujita et al., Cell Death Dis. 2010)。一方、CNTNAP2 の D1129H 変異が自閉症スペクトラム障害の患者家系に発見されている(Bakkaloglu et al., Am J Hum Genet. 2008)。Cadm1-KO マウスは、不安過敏、小脳発達障害、ヒト言語に対応する超音波音声(USV)コミュニケーション障害など、一部自閉症スペクトラム障害様の症状を示した(Fujita et al., PLoS ONE 2012)が、自閉症スペクトラム障害に特徴的な症状(常同性行動)は観察されなかった。一方、Cadm1(Y251S)-KI(129sv)マウスを解析したところ、自閉症スペクトラム障害の特徴である常同性症状や社会性行動異常、USV 障害や、不安過敏の症状を観察した(投稿中)。このことから、CADM1、CNTNAP2 変異が Mupp1 との複合体形成不全をもたらす可能性が考えられた。MUPP1

や PSD95 に結合する Kalirin-7 (Rac-GEF) は PKA を活性化し、スパイン形態形成、remodeling に関与し(Xie et al., Cell 2007)、一方 5-HT2R の A,B,C 型の C 端には、PDZ 結合領域が存在しており、MUPP1 と PSD95 に結合し、Kalirin-7 を介して、スパイン形態形成に関与する。しかし、脳、神経細胞での、

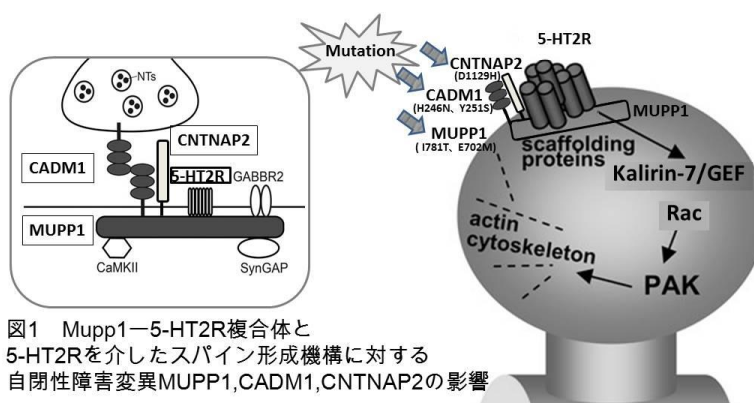


図1 Mupp1-5-HT2R複合体と5-HT2Rを介したスパイン形成機構に対する自閉性障害変異MUPP1,CADM1,CNTNAP2の影響

CADM1(CNTNAP)-MUPP1 と Kalirin-7 や 5-HT2R との複合体形成、および自閉症スペクトラム障害患者由来の変異による複合体形成不全やスパイン形成異常、また自閉症スペクトラム障害の分子病態との関係は不明である。5-HT2R と同様 GPCR

である GPR37(Pael-R) はパーキンソン病の原因遺伝子として知られている。また、GPR85 は精神分裂疾患のハイリスク遺伝子である。最近、申請者は染色体上の自閉性障害の感受性領域である 7p 31 に局在する GPR37 や GPR85 に着目し、解析を行ってきたが、自閉症スペクトラム障害の家系に特徴的に見られる変異を複数見出した(図 1 Tanabe et al. J Neurochem. 2015, Fujita-Jimbo et al., PLoS One. 2012; Mol Autism. 2014)。

2. 研究の目的

本研究では、GPR37 変異と MUPP1 複合体に注目する一方、申請者らは、MUPP1 の変異(I718T、E702M)を自閉症スペクトラム障害患者に見出したことから、これら変異はスパインの形態形成の異常について解析した。本研究は、脳、神経細胞での CADM1(CNTNAP2)-MUPP1-5HT2R や GPR37 複合体の形成を明らかにし、自閉症スペクトラム障害における変異 Muppl や GPR37 による CADM1-MUPP1 複合体の形成不全とスパイン形成異常がもたらす自閉症スペクトラム障害の分子病態との関係の解明を試みた。

3. 研究の方法

MUPP1 を介した CADM1(CNTNAP2)と 5-HT2R や GPR37 との複合体形成と自閉症スペクトラム障害変異による複合体形成不全、スパイン形態形成異常と分子病態との関係を培養細胞、変異マウスを用いて調べた。

- ①CADM1(CNTNAP2)-MUPP1-5-HT2R, Kalirin-7 複合体の存在をマウス脳、COS 細胞、神経細胞で Pull-down/IB、免疫沈降(IP)、免疫染色(IS)で解析する。
- ②MUPP1(E702M)、GPR37 変異が及ぼす 5-HT2R, Kalirin-7 との複合体形成不全を COS 細胞、神経細胞を用いて、Pull-down/IB 法、IP、およびスパイン形成について免疫染色にて解析した。
- ③セロトニン誘導体による自閉症スペクトラム障害変異がもたらすスパイン形態形成への影響について免疫染色法を用いて観察した。

4. 研究成果

- (1)マウス脳、COS細胞、神経細胞でのMUPP1を介するCADM1(CNTNAP2)と 5-HT2RやKalirin-7との複合体形成

これまでの Pull-down を用いた解析により、5-HT2A,B,CR は 10 番目の PDZ 領域に、Kalirin-7 は 10-13 番目の PDZ 領域に結合した。一方、Cadm1 の C 末端は MUPP1 の 5 番目の PDZ 領域(E702、I718 を含む)に結合した。

- ①Tag 付加発現ベクターにて 5HT2A,B,CR, Kalirin-7 を MUPP1(共存、非共存下)で発現させた COS 細胞を用いて、CADM1, CNTNAP2 の C 末端による Pull-down/immunoblot(IB)、免疫沈降 (IP) /IB で MUPP1 を介して、5-HT2R、Kalirin-7 との複合体を形成することを明らかにした。
- ②脳内での複合体の存在について、マウス新生児の脳抽出液の CADM1, CNTNAP2 の C 末端による Pull-down/IB で、MUPP1、5-HT2R、Kalirin-7 との結合することを明らかにした。
- ③神経細胞上での複合体の存在を CADM1 抗体、CNTNAP2 抗体、MUPP1 抗体、5-HT2A,B,CR 抗体、Kalirin-7 抗体を用いた免疫染色で明らかにした。

- (2) MUPP1 の 5-HT2R との複合体と自閉症スペクトラム障害変異がもたらす複合体形成不全とスパイン形態形成不全

- ①CADM1 や CNTNAP2 の C 末端を用いた Pull-down/IB 法や IP/IB 法で、MUPP1(E702M)、MUPP1(I718T)との結合を調べたところ、結合の低下が見られた。
- ②5-HT2R、Kalirin-7 の C 末端による Pull-down/IB、MUPP1 抗体による IP/IB 法により、MUPP1 と CADM1(Y251S)や CNTNAP2(D1129H)、また、CADM1 又は CNTNAP2 と MUPP1(E702M)や MUPP1(I718T)との複合体形成に異常があり、スパイン形態形成不全をもたらすことが明らかになった。
- ③免疫染色により自閉症スペクトラム障害変異 MUPP1(E702M, I718T)が神経細胞のスパイン形態形成異常をもたらすことが明らかになった。
- ④神経細胞上での複合体の異常性について、抗体を用いた免疫染色で明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①Ebisu 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(7):3648-3659. doi: 10.1093/cercor/bhw187(査読あり)。
- ②Tanabe 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):783-93. doi: 10.1111/jnc.13168. (査読あり)。

〔学会発表〕 (計 2 件)
(国際学会)

- ① Kojima K, Jimbo EE, 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
- ② 田辺裕子、神保恵理子、桃井真里子、桃井隆 CASPR2 は MUPP1 を介して GPR37 と複合体形成するが自閉性障害変異 GPR37(R558Q)とは複合体形成しない. 第 38 回日本神経科学学会大会(Neuro2015)、2015 年 07 月 28 日、神戸

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：林 由起子
ローマ字氏名：Yukiko Hayashi
所属研究機関名：東京医科大学
部局名：医学部
職名：主任教授
研究者番号 (8 桁)：50238135

研究分担者氏名：神保 恵理子
ローマ字氏名：Eriko Jimbo
所属研究機関名：自治医科大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号 (8 桁)：20291651

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。