

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：2007-2008  
課題番号：19500305  
研究課題名 (和文) 機能シナプス形成に関与する接着蛋白のシナプス前膜、後膜への選択的小胞輸送系の解析  
研究課題名 (英文) The molecular system of the selective transport of Synaptic adhesion molecules to the pre-and post-synaptic membrane.  
研究代表者  
桃井 隆(MOMOI TAKASHI)  
国立精神・神経センター 神経研究所  
疾病研究第 5 部 室長  
研究者番号：40143507

研究成果の概要：シナプス接着蛋白 RA175/SynCAM(Cadml)はシナプス前膜、後膜への選択的に小胞輸送される。シナプス機能に関連した複合体の形成とその分子機構の解明を目的とし、RA175/SynCAM(Cadml)の C 末端の PDZ 結合領域で結合する蛋白を解析した。1) ニューロリギンと異なり、RA175/SynCAM(Cadml)は PSD95, Syntrophin とは結合せず、極性蛋白 Par-3 と結合した。2) シナプス形成しない過剰な RA175/SynCAM(Cadml)は ADAM ファミリーにより切断され、特異的なシナプス形成のみが維持された。3) *CADMI* 遺伝子変異を自閉症患者遺伝子に発見した。変異 *CADM1* は著しく切断され、小胞体に停留し、細胞膜への輸送が阻害されることが自閉症の原因の一つである可能性が示唆された。

### 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：(1) Cadml (2) 自閉症 (3) シナプス (4) RA175 (5) SynCAM1 (6) 接着蛋白 (7) Neuroligin (8) Par-3

#### 1. 研究開始当初の背景

RA175(SynCAM)(Fujita et al., 1998, 2002, 2004, 2006; Urase et al.2001)は機能シナプス形成に関与する (Biederer et al., Science, 2002)。シナプス前膜では Neurexin と同様 RA175 (SynCAM) の C 末端の PDZ 結合領域で CASK と結合し、シナプト小胞の前膜へのドッキングを促進

し、神経伝達物質の開放を誘導する。しかし、申請者が見出した接着蛋白 RA175(SynCAM)の後膜における機能シナプス形成の機構は不明である。

申請者らは、RA175(SynCAM)の機能を解析すべく、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスを作成した。予想に反して、RA175(SynCAM)欠損マウスは雄ホモマウスのみが不妊症状を示したものの、その他には

神経組織、上皮組織を含め顕著な症状は観察されなかった。申請者は、シナプス形成機構は、上皮組織における cell junction 形成は基本的な機構が保存されているものと考え、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスの精巣異常についての解析結果は神経組織およびシナプス伝達機構におけるRA175(SynCAM)の機能の解明に大いに役立つもの確信し、RA175(SynCAM)ノックアウトマウスの精巣異常についての解析を試みた。その結果、cell junction 形成不全により精子細胞への分化が異常であること (Fujita et al, 2005)、精子細胞分化にはRA175(SynCAM)C末端のPDZ結合領域へのPAR-3の結合と接着分子(Jam-C)との相互作用が重要であることが明らかとなった (Fujita et al. 2007)。

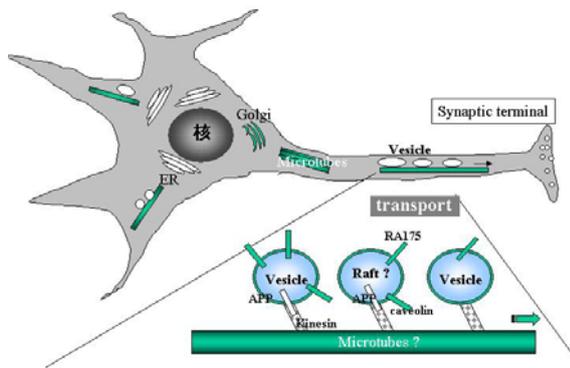


図2. シナプスへの分子輸送機構仮説

## 2. 研究の目的

シナプス接着蛋白 RA175/SynCAM (Cadm1) はシナプス前膜、後膜への選択的に小胞輸送される。シナプス機能に関連した複合体の形成とその分子機構の解明を目的とし、RA175/SynCAM (Cadm1)

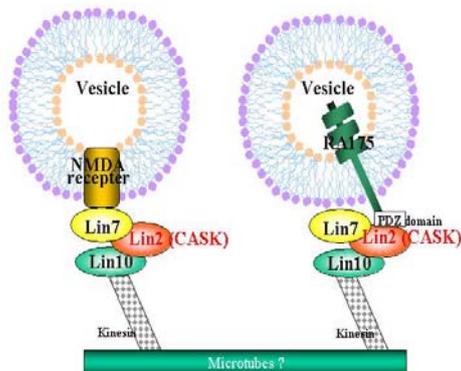


図4. RA175の輸送(仮説)

のC末端のPDZ結合領域で結合する蛋白を解析した。

## 3. 研究の方法

### 1) 酵母 two ハイブリット法

RA175/SynCAM (Cadm1) のC末端をプローブとしてヒト脳酵母ライブラリーをスクリーニングし、候補遺伝子の塩基配列を決定する。また、RA175の細胞質領域とGRIP, SynGAP, GKAP, PSD95, Shank, Homerなどシナプスに局在が知られているPDZ領域を有する蛋白との相互作用を調べるため、細胞発現系のベクターに導入し、免疫沈降法およびGST融合蛋白法、さらに蛋白を用いたプルダウンアッセイを行い、解析を進める。

### 2) Pull-down 法

脳 1% TritonX-100/PBS 抽出溶液をRA175(SynCAM)C末端のPDZ結合領域をリガンドとしたカラムにかけ、結合タンパクを市販のシナプス関連PDZ Scaffold タンパクの抗体を用いて、ウエスタン (イムノ) プロット法にて解析する。12% SDS-アクリルアミドゲルで泳動し、ニトロセルロースフィルターにブロッティングした。抗体と反応させた後、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ラビットおよびマウスイムノグロブリンを用い、発色液で反応させた。

### 3) 細胞、組織染色法

COS細胞を2%パラホルムアルデヒドを含むPBSにて固定後、タグ抗体を用いた免疫染色法を行い、PBSで洗浄した後、ブロッキングとして0.5%ヤギ血清ミルクを用い室温で一時間置いた。一次抗体を用いた免疫染色法を行い、4°Cで一昼夜反応させ、さらに二次抗体としてFITC標識抗イムノグロブリン抗体を加え、37°C一時間反応後PBSで希釈した後グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

マウスを4%パラホルムアルデヒドを含むPBSを用いた還流固定法にて固定した。脳組織を取り出し、スクロースで置換した後、OCTコンパウンドにより包埋凍結し、クリオスタットを用いて切片を作製し、APSコート済スライドガラスに貼り付けた。抗体を用いた免疫染色法を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

### 4) RA175 ノックアウトマウスの行動解析および生理学的解析

RA175 ノックアウトマウスを129SV系統からC57BL/6J系統に10代継代した。このマウスを用いて、行動解析および生理学的解析を進める。

## 4. 研究成果

1) RA175/SynCAM (Cadm1) はニューロリギンと異なり、極性蛋白Par-3と結合した (Fujita et al., 2007)。2) シナプス結合していない過剰なRA175/SynCAM (Cadm1) はADAMファミリーにより切断され、特異的

なシナプス形成のみが維持されることが明らかになった(Tanabe et al., 2008)。  
3)CADM1遺伝子変異を自閉症患者とその家族の遺伝子に発見した (Zhiling Y, Fujita E, et al., 2008) .4)

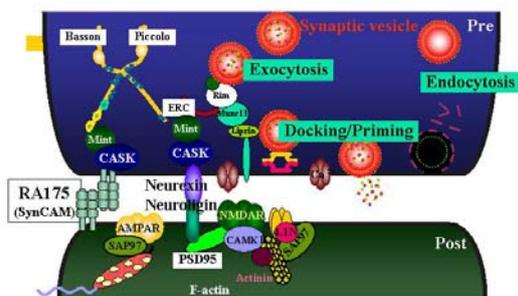


図1. シナプスの機構

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件) (すべて査読有)

- 1: Zhiling Y, Fujita E, Tanabe Y, Yamagata T, Momoi T, Momoi MY. Mutations in the gene encoding CADM1 are associated with autism spectrum disorder. *Biochem Biophys Res Commun.* 377(3):926-9. 2008
- 2: Tanabe Y, Kasahara T, Momoi T, Fujita E. Neuronal RA175/SynCAM1 isoforms are processed by tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM17-like proteases. *Neurosci. Lett.* 444(1):16-21. 2008
- 3: Fujita E, Tanabe Y, Shiota A, Ueda M, Suwa K, Momoi MY, Momoi T. Ultrasonic vocalization impairment of Foxp2 (R552H) knockin mice related to speech-language disorder and abnormality of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(8):3117-22. 2008
- 4: Fujita E, Tanabe Y, Hirose T, Aurrand-Lions M, Kasahara T, Imhof BA, Ohno S, Momoi T. Loss of partitioning-defective-3/isotype-specific interacting protein (par-3/ASIP) in the elongating spermatid of RA175 (IGSF4A/SynCAM)-deficient mice. *Am J Pathol.* 171(6):1800-10. 2007
- 5: Uchio N, Oma Y, Toriumi K, Sasagawa N, Tanida I, Fujita E, Kouroku Y, Kuroda R, Momoi T, Ishiura S. Endoplasmic reticulum stress caused by aggregate-prone proteins containing homopolymeric amino acids. *FEBS J.* 274(21):5619-27. 2007
- 6: Bai J, Nakamura H, Kwon YW, Tanito M, Ueda S, Tanaka T, Hattori I, Ban S, Momoi T, Kitao Y, Ogawa S, Yodoi J. Does thioredoxin-1

prevent mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine?. *Antioxid Redox Signal.* 9(5):603-8. 2007

7: Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, Matsuda C, Hayashi YK, Momoi T. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet.* 16(6):618-29. 2007

8: Kitao Y, Matsuyama T, Takano K, Tabata Y, Yoshimoto T, Momoi T, Yamatodani A, Ogawa S, Hori O. Does ORP150/HSP12A protect dopaminergic neurons against MPTP/MPP(+)-induced neurotoxicity?. *Antioxid Redox Signal.* 9(5):589-95. 2007

[学会発表] (計 3 件)

- 1) 田辺裕子、松崎鮎美、藤田恵理子、Giulo Piluso、大野茂男、石浦章一、Alaa Hussein, Vincenzo Nigro、桃井隆: 脳における RA175/SynCAM 結合蛋白の解析、第 30 回日本神経科学大会、第 50 回日本神経化学会大会、第 17 回日本神経回路学会大会、横浜、9.12.2007.
- 2) Tanabe Y, Fujita E, Giulo P, Nigro V, Momoi MY, Ishiura S, Kasahara T, Momoi T: The RA175/SynCAM complex on the GABAergic synapse、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会、横浜、12.12.2007.
- 3) 田辺裕子、笠原忠、桃井隆、藤田恵理子: メタロプロテアーゼによる RA175/SynCAM1 特異的アイソフォームのプロセッシング *Neuroscience 2008*、東京、7.10.2008.

[図書] (計 1 件)

桃井隆、医学書院、生体の科学、2009、10ページ、ヒト言語とマウス超音波音声の共通の分子基盤—言語障害 (SPCH1) と自閉性障害

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

##### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

桃井隆 (MOMOI TAKASHI)

国立精神・神経センター 神経研究所

疾病第5部 室長

研究者番号：40143507

(2)研究分担者

藤田 恵理子(FUJITA ERIKO)

国立精神・神経センター 神経研究所

疾病第5部 流動研究員

研究者番号：20291651

(3)連携研究者

なし