

平成23年 5月10日現在

機関番号： 82401

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20300134

研究課題名(和文)

CAPS2によるBDNF分泌小胞の開口放出メカニズムとその細胞内動態

研究課題名(英文) Regulatory mechanism and cellular dynamics of exocytosis of BDNF-containing secretory vesicles by CAPS2

研究代表者

古市 貞一 (FURUICHI TEI-ICHI)

独立行政法人理化学研究所・分子神経形成研究チーム・チームリーダー

研究者番号： 50219094

研究成果の概要(和文)：

分泌関連タンパク質CAPSの細胞機能と生物学的な意義について、次の事が明らかになった。

- 1) CAPS2が、脳由来神経栄養因子BDNFの活動依存的な分泌の反応速度論的な増強に関与することを明らかにした。また、CAPS2 KOマウスでは、海馬のGABA作動性抑制性神経回路の発達と機能に異常があり、不安様行動が亢進していることが明らかになった。
- 2) 有芯小胞の開口放出への関与に加え、CAPSは低分子GTP分解酵素Arf4/5と会合して、トランスゴルジ網における有芯小胞の生合成と輸送にも関係していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： We analyzed cellular function and biological significance of secretion-associated protein CAPS and reported the following findings.

- 1) CAPS2 promotes kinetics of activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor BDNF. CAPS2 KO mice have impairments in development and function of GABAergic inhibitory circuits and exhibit increased anxiety-like phenotype.
- 2) In addition to involvement in exocytosis of dense core vesicles, CAPS associates with small GTPase Arf4/5 and is associated with biogenesis and trafficking of dense-core vesicles in the *trans*-Golgi network.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：

CAPS2・脳由来神経栄養因子・有芯小胞・トランスゴルジ輸送・不安行動・GABA・抑制性シナプス

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子は、ニューロンの生存と分化、シナプスの形成と可塑性など、神経系の発達と機能の多くの局面を調節する重要な分泌性タンパク質である。神経成長因子 (NGF) がニューロンの生存を促進する因子として最初に発見され、次いで脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、ニューロトロフィン-4 (NT-4) が哺乳類で同定された。いずれも前駆体として産生され、小胞体、ゴルジ体、トランスゴルジ網を経て分泌小胞に分別され、開口放出によって細胞外へ放出される。この過程で、前駆体はプロセシングにより成熟体に変換される。分泌された神経栄養因子は、標的細胞の細胞膜に存在する受容体に作用する。前駆体は、低親和性の受容体 p75NTR に結合する。成熟体も、p75NTR に結合するが、より特異的に受容体型チロシンキナーゼ Trk ファミリーに結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化する。神経栄養因子の分泌には、構成性放出と刺激依存的な調節性放出がある。NGF、NT-3、NT-4 の前駆体は主に構成性放出の小胞に、BDNF 前駆体はより選択的に調節性放出の小胞に分別される。BDNF の調節性分泌小胞への分別には、carboxypeptidase E との相互作用が関係する。また、BDNF 前駆体の 66 番目のアミノ酸 Val が Met に置換される一塩基多型では調節性放出が減少して、精神疾患と記憶障害の要因になることが報告されており、前駆体の Val-66 付近も分泌と機能に関係すると予測される。この様に、神経栄養因子の分泌小胞への分別、突起輸送、そして放出は、神経栄養因子の作用部位と作用機序に重要なプロセスである。しかし、グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質を含有するシナプス小胞の開口放出の分子メカニズム (SNARE など) に比して、神経栄養因子の分泌を調節する分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。従って、その解明は極めて重要な研究課題である。

2. 研究の目的

神経栄養因子はニューロンの生存と分化、シナプスの形成と可塑性を調節し、神経再生や精神疾患などにも関係する極めて重要な分泌因子である。しかしながら、その分泌調節メカニズムの詳細は不明である。本研究課題では、BDNF を含有する分泌小胞に会合してその放出を調節することが最近判った CAPS2 に着目し、その構造機能相関と細胞内動態を明らかにする事で、神経栄養因子の分泌メカニズムを解明する事を目的とする。CAPS2 は発達障害である自閉症の病因との関連性も示唆されており、本研究の成果は学術的、臨床的にも重要な意義をもつ。

3. 研究の方法

神経栄養因子はニューロンの生存と分化、シナプス形成と可塑性などを調節し、神経再生や精神疾患などにも関係する重要な分泌性の生理活性因子である。しかし、その分泌調節の分子メカニズムはよくわかっていない。本研究課題では、BDNF を含有する分泌小胞に会合してその放出を促進する CAPS2 に焦点をあて、CAPS2 の構造機能相関の解析、および分泌小胞の分別、輸送、開口放出の各プロセスにおける CAPS2 の機能的役割と細胞内動態を多角的なアプローチで解析する。

以下の研究計画・方法を遂行する。

第一に、CAPS2 タンパク質の構造機能相関の解析と相互作用タンパク質の同定及び相互作用の役割について、組換え体の形質発現解析、酵母 Two Hybrid 解析、免疫共沈とマスペクトル解析、RNA 干渉解析、ノックアウトマウスのジーンチップ遺伝子発現解析などによって明らかにする。

第二に、BDNF 含有分泌小胞の分別、輸送、開口放出の各プロセスにおける CAPS2 の機能的な役割について、CAPS2-GFP 蛍光標識融合タンパク質の発現によるイメージング法、RNA 干渉法、CAPS2 遺伝子改変マウスなどを用いた解析等で明らかにする。

第三に、CAPS2 を介した刺激依存的な BDNF 放出メカニズムと細胞局所的な動態を明らかにする。

4. 研究成果

有芯小胞 (dense-core vesicle) の分泌関連タンパク質 Ca^{2+} -activated protein for secretion (CAPS) の機能と生物学的な意義について、遺伝子改変マウスなどをもちいて分子・細胞レベルから行動レベルまで解析を行い、次の事が明らかになった。CAPS2 は活動依存的な脳由来神経栄養因子 BDNF の分泌の反応速度論、一分泌現象レベルでの量と頻度を増強することをタイムラプス生細胞蛍光イメージング解析で明らかにした。CAPS2 KO マウスの海馬では、BDNF レベルが低下して、抑制性ニューロン数の減少、抑制性シナプスにおけるシナプス小胞の数と分布領域の減少、微小抑制性後シナプス電流の振幅と頻度の減少が観察された。CA3-CA1 シナプス間の長期増強は誘導されるが後期相が有意に減少し、GABAA 受容体阻害剤 picrotoxin の処理で野生型との差が無くなることがわかった。また、覚醒マウスで GABA 系との関連が示唆される海馬シータ波が低周波になる。さらに、新奇環境下などにおける不安様行動の亢進が明らかになった。これらのことから、CAPS2 KO マウスは CAPS2 による BDNF 分泌増強が欠損して、GABA 作動性抑制性回路の発達と機能に障害をもつことが示唆された。

CAPS は有芯小胞の開口放出を調整すると考えられているが、CAPS タンパク質の多くは分泌部位の膜近傍ではなく細胞体に局在しており、これらの細胞質内 CAPS タンパク質の機能は不明であっ

た。siRNA ノックダウンやタンパク質間相互作用などの実験により、CAPS は低分子 GTP 分解酵素 Arf4/5 と会合して、トランスゴルジ網における有芯小胞の生合成と輸送に関係する新しい役割を明らかにした。

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 12 件)

全て査読有り。

- 1) Shinoda, Y., Sadakata, T., Nakao, K., Katoh-Semba, R., Kinameri, E., Furuya, A., Yanagawa, Y., Hirase, H., and Furuichi, T. (2011) Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108:373-378.
- 2) Huang, J., Furuya, A., Hayashi, K., and Furuichi, T. (2011) Interaction between very-KIND RasGEF and MAP2, and its role in dendrite growth: structure and function of the second kinase non-catalytic C-lobe domain. FEBS J. 278:1651-1661.
- 3) Hamatake, M., Miyazaki, N., Sudo, K., Matsuda, M., Sadakata, T., Furuya, A., Ichisaka, S., Hata, Y., Nakagawa, C., Nagata, K., Furuichi, T., and Katoh-Semba, R. Phase advance of the light-dark cycle perturbs diurnal rhythms of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 levels, which reduces synaptophysin-positive presynaptic terminals in the cortex of juvenile rats. J. Biol. Chem. in press
- 4) Furuichi, T., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, A., Sadakata, T., Huang, J., Shinoda, Y., Hayashi, K., Mishima, Y., Tomomura, M., Nishibe, H., and Yoshikawa, F. (2011) Systematizing and cloning of genes involved in the cerebellar cortex circuit development. Neurochem Res. In press
- 5) Sadakata, T., Shinoda, Y., Sekine, Y., Saruta, C., Itakura, M., Takahashi, M., and Furuichi, T. (2010) Interaction of CAPS1 with the class II Arf small GTPases is required for dense-core vesicle trafficking in the *trans*-Golgi network. J. Biol. Chem. 285:38710-38719.
- 6) Yoshikawa, F., Banno, Y., Otani, Y., Yamaguchi, Y., Nagakura-Takagi, Y., Morita, N., Sato, Y., Saruta, C., Nishibe, H., Sadakata, T., Shinoda, Y., Hayashi, K., Mishima, Y., Baba, H., and Furuichi, T. (2010) Phospholipase D family member 4, a transmembrane glycoprotein with no phospholipase D activity, expression in spleen and early postnatal microglia. PLoS ONE 5 (11):e13932.
- 7) Furutama, D., Morita, N., Takano, R., Sekine, Y., Sadakata, T., Shinoda, Y., Hayashi, K., Mishima, Y., Mikoshiba, K., Hawkes, R., and Furuichi, T. (2010) Expression of the IP₃RI promoter-driven *nls-lacZ* transgene in Purkinje cell parasagittal arrays of developing mouse cerebellum. J. Neurosci. Res. 88:2810-2825.
- 8) Sadakata, T. and Furuichi, T. (2010) Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 and autistic-like phenotypes. Neurosci Res. 67:197-202.
- 9) Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, Y., Sakai, R., Mizutani, A., Knöpfel, T., Mori, N., Mikoshiba, K., and Furuichi, T. (2009) Interaction of Cupidin/Homer2 with two actin cytoskeletal regulators, Cdc42 small GTPase and Drebrin, in dendritic spines. BMC Neuroscience 10:25.
- 10) Sadakata, T. and Furuichi, T. (2009) Developmentally regulated Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) is involved in BDNF secretion and is associated with autism susceptibility. Cerebellum 8:312-322.
- 11) Yoshikawa, F., Sato, Y., Tohyama, K., Akagi, T., Hashikawa, T., Nagakura-Takagi, Y., Sekine, Y., Morita, N., Baba, H., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, A., and Furuichi, T. (2008) Opalin, a transmembrane sialylglycoprotein located in the CNS myelin paranodal loop membrane. J. Biol. Chem. 283:20830-20840.
- 12) Sato, A., Sekine, Y., Saruta, C., Nishibe, H., Morita, N., Sato, Y., Sadakata, T., Shinoda, Y., Kojima, T., and Furuichi, T. (2008) Cerebellar Development Transcriptome Database (CDT-DB): profiling of spatio-temporal gene expression during the postnatal development of mouse cerebellum. Neural Networks 21:1056-1069.

[学会発表] (計 12 件)

1. Furuichi, T. Enhanced secretion of BDNF by CAPS2 is critical for proper brain development and function. International Workshop in UOEH 2011 "Calcium dynamics in cells", January 21, 2011 (Kitakyushu, Japan)
2. Furuichi, T. Increased expression of a rare alternative splicing CAPS2/CADPS2 variant in autism. XVIIIth World Congress on Psychiatric Genetics, October 3-7, 2010 (Athens, Greece)
3. 古市貞一、定方哲史、篠田陽、仙波りつ子 神経回路の発達と機能に必要な CAPS2 の遺伝子欠損マウスは社会性相互作用の障害と不安行動の増加を示す. 第 32 回日本分子生物学会年会・シンポジウム 2009 年 12 月 9-12 日 (横浜)
4. 古市貞一、定方哲史、篠田陽、仙波りつ子 CAPS2 タンパク質による有芯小胞分泌経路の制御と発達障害の感受性. 第 82 回日本生化学会大会・シンポジウム 2009 年 10 月 21-24 日 (神戸)
5. 古市貞一 分泌関連Ca²⁺依存性活性化タンパク質 2(CAPS2)と自閉症感受性. 第 32 回日本神経科学大会・シンポジウム 2009 年 9 月 16-18 日(名古屋)
6. 古市貞一 神経発達障害のモデルマウスと環境-遺伝子相互作用. 脳を巡る環境-遺伝子相互作用の分子基盤シンポジウム 2009 年 8 月 29 日(東京)
7. Furuichi, T. Neurotrophin secretion. Gordon Research Conferences on Neurotrophic Factors, June 21-26, 2009 (Newport, RI, USA)
8. 古市貞一、定方哲史、篠田陽 Ca²⁺依存性活性化分泌関連タンパク質CAPS2 は正常な脳の発達と行動に必須な役割を果たす. 第 61 回日本細胞生物学会大会・シンポジウム 2009 年 6 月 2-4 日 (名古屋)
9. 古市貞一 分泌関連Ca²⁺依存性活性化タンパク質 2 (CAPS2/CADPS2) と社会性行動形質. 行動遺伝学研究会 (国立遺伝学研究所) 2009 年 3 月 12 日 (三島)
10. 古市貞一 脳の発達とその障害の遺伝基盤: CAPS2 によるBDNF分泌調節と自閉症感受性. 第 18 回脳・ライフ研シンポジウム 2008 年 10 月 17 日 (東京)

11. Furuichi, T. Regulated secretion in relation to autism. Gordon Research Conferences on Proprotein Processing, Trafficking and Secretion, July 13-18, 2008 (New London, NH, USA)
12. 古市貞一、定方哲史、篠田陽 CAPS2 に依存したBDNF分泌の欠損は自閉症感受性と関連する. 第 31 回日本神経科学大会・シンポジウム 2008 年 7 月 9 日 (東京)

[図書] (計 6 件)

1. 定方哲史、篠田陽、林周宏、古市貞一 有芯小胞の分泌制御因子CAPS2 と自閉症感受性
実験医学増刊号 (羊土社) Vol. 28 No. 5, pp63-69, 2010
2. 篠田陽、定方哲史、林周宏、古市貞一 自閉症の感受性候補遺伝子と動物モデル 脳と精神の医学 (新興医学出版社) Vol. 20 No. 4, pp303-310, 2010
3. 古市貞一 自閉症と感受性候補遺伝子CADPS2
生体の科学. Vol. 50 No 9, pp476-477, 2008, 医学書院
4. 定方哲史、篠田陽、古市貞一 自閉症の遺伝要因とCAPS2 遺伝子 実験医学増刊号 Vol. 26 No. 12, pp209-217, 2008, 羊土社
5. 定方哲史、古市貞一 CADPS2 分子精神医学 Vol. 8 No. 2, pp66-67, 2008, 先端医学社
6. 古市貞一 (編集) 「分子・細胞・シナプスからみる脳」 シリーズ脳科学(甘利俊一監修), 2008, 東京大学出版会

[その他]

ホームページ等

1. <http://www.brain.riken.go.jp/labs/lmn/indexj.html>
2. http://www.brain.riken.go.jp/jp/t_furuichi.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 貞一 (FURUICHI TEIICHI)

独立行政法人理化学研究所・分子神経形成研究チーム・チームリーダー
50219094

(2) 研究分担者

(3)連携研究者

定方 哲史 (TETSUSHI SADAKATA)

独立行政法人理化学研究所・分子神経形成研
究チーム・基礎科学特別研究員

50219094

篠田 陽 (YO SHINODA)

独立行政法人理化学研究所・分子神経形成研
究チーム研究員

50219094