

機関番号：82401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790219

研究課題名（和文）BDNF分泌制御に関与する自閉症関連遺伝子CAPS2の機能解析

研究課題名（英文）The functional analysis of autism related and BDNF secretion regulated protein CAPS2

研究代表者

篠田 陽 (SHINODA YO)

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

研究者番号：80403096

研究成果の概要（和文）：脳由来神経栄養因子(BDNF)は脳内で分泌され、神経細胞の新生や生存、発達や可塑性に影響を与える重要なタンパク質であるが、その分泌機構については殆ど明らかにされていない。近年BDNFの分泌を制御するタンパク質として、自閉症関連因子として同定されているCAPS2が発見された。本研究においてBDNFの分泌をタイムラプスイメージングにより検証した結果、CAPS2がBDNFの分泌を速度論的に加速していること、BDNFの1回の分泌量を増加させる事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Brain derived neurotrophic factor (BDNF) plays critical role in neurogenesis, neuronal survival and development and in synaptic development and plasticity. However, the mechanism of the BDNF secretion is largely unknown. Recently, Ca^{2+} dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) has been discovered as a protein which regulates BDNF secretion. In the present study, we demonstrated that CAPS2 not only accelerates BDNF secretion kinetics but also increases BDNF quantal release by using time-lapse BDNF secretion imaging technique. In addition, CAPS2 regulated BDNF secretion plays a critical role in development of GABAergic interneuron network. The GABAergic interneuron impairments affect synaptic plasticity and anxiety-like behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：生理学、精神科学、脳・神経、BDNF、CAPS2、分泌

1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子(BDNF)は脳内で分泌され、神経細胞の新生や生存、発達や可塑性に影響を与える重要なタンパク質であるが、その分泌機構については殆ど明らかにされていなかった。当時BDNFの分泌を制御するタンパク質として、自閉症関連因子として同定されているCAPS2が申請者の研究室におい

て発見されていたが、CAPS2がどのようにBDNFの分泌を制御しているか、そのメカニズムは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

BDNFは脳機能の発達、維持に重要な分子であり、アルツハイマー病やパーキンソン病など、様々な疾患に関与している可能性が

示唆されているにもかかわらず、BDNF の分泌制御機構は未だ不明な点が多い。CAPS2 は近年申請者の所属する研究チーム（以下当研究チーム）においてクローニングされ、自閉症に関連する有力な候補遺伝子として同定された、分泌小胞会合タンパク質遺伝子である。CAPS2 は、BDNF 含有小胞に細胞質側から会合してその分泌に関わっている可能性が示唆されており、CAPS2 タンパク質の生理機能解析は BDNF の分泌制御機構の解明に重要な役割を果たす。当研究チームで作成された CAPS2 ノックアウト (KO) マウスは自閉症様行動のみならず海馬依存性記憶学習能力の低下を示しており、海馬の機能に何らかの影響を与えていることが示唆されていることから、本研究では海馬を材料とし、電気生理学的、組織学的、行動学的手法により CAPS2 が海馬のシナプス可塑性やシナプス形成、発達に与える影響を調べること、CAPS2 の生理機能を明らかにすることを目的とする。CAPS2 の生理機能を明らかにすることは、BDNF の分泌メカニズムの解明といった基礎学術的な意義のみならず、様々な神経疾患の原因解明や治療法の開発に寄与する可能性も高く、関連分野に与える影響は大きい。

3. 研究の方法

CAPS2 の生理機能を明らかにするために、CAPS2 KO マウスを用いた海馬急性切片の電気生理学的手法による解析を行う。まずはフィールド記録によるシナプス伝達及び可塑性の基礎的なデータの取得、およびパッチクランプを用いた mEPSC 測定を行う。また CAPS2 はプレシナプス分泌顆粒に共役しているため、対パルス促進 (PPF) の測定を行い、シナプス小胞の分泌能力の違いを検討する。また BDNF の分泌を、イメージングを用いた定量解析により明らかにする。さらに KO マウスで LTP 導入時に BDNF を投与し、レスキューすることが可能かを検証する。さらに CAPS2 欠損による細胞形態の異常を解析する為に、免疫組織化学的手法による種々シナプス関連タンパク質の分布の定量的解析を行う。また、興奮性細胞、抑制性細胞それぞれを YFP や GFP でラベルした CAPS2 KO マウス交配種を作成し、それぞれの細胞形態への影響を調べる。CAPS2 KO マウスの海馬依存的行動実験（バーンズ迷路、8 枝放射状迷路、Y 迷路、恐怖条件付け）を行い、CAPS2 が海馬依存的な記憶学習能力に与える影響を総合的に検討する。また、免疫組織化学的手法により種々のシナプス関連タンパク質を染色してその分布を観察する。これらの結果により CAPS2 と BDNF が海馬シナプス可塑性と発達、海馬依存的記憶学習にどのような影響を持ち、細胞レベル

の生理機能と行動双方がどのように関連するかを検証する。

4. 研究成果

マウス海馬培養細胞において、CAPS2 及び BDNF の細胞内分布を免疫組織化学によって検証したところ、CAPS2 のおよそ 30% は BDNF と共局在することが明らかとなった。また、CAPS2 と共局在する BDNF のうちおよそ 18% がシナプス部位に、その他はシナプス外部に存在する事が明らかとなった。これによって、少なくとも静止状態では CAPS2 は BDNF 含有小胞をシナプス外部において制御していることが示唆された (図 1)。

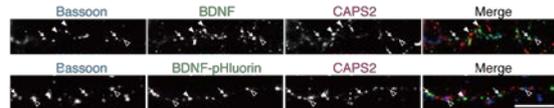


図 1 プレシナプスマーカーである Bassoon と、BDNF および CAPS2 の分布

CAPS2 の BDNF 分泌制御をイメージングによって解析する目的で、CAPS2 ノックアウト (KO) マウスの海馬培養細胞に、BDNF に pH 感受性緑色蛍光タンパク質 (pHluorin) を結合したものを発現させ、BDNF-pHluorin が分泌した瞬間に蛍光を発し、これを撮影することができる、BDNF 分泌のイメージングアッセイ系を確立した。BDNF-pHluorin と共に CAPS2 に赤色蛍光タンパク質 tdTomato を融合した CAPS2-tdTomato を共発現したもの (CAPS2+) と BDNF-pHluorin のみ発現したもの (CAPS2-) のそれぞれにおいて 50mM KCl 刺激による BDNF-pHluorin の分泌を観察したところ、単位領域あたりの BDNF-pHluorin 分泌数、BDNF-pHluorin の分泌速度、および分泌数のピーク時間の全てにおいて、CAPS2 の存在が BDNF-pHluorin の分泌を促進するという結果が得られた (図 2)。

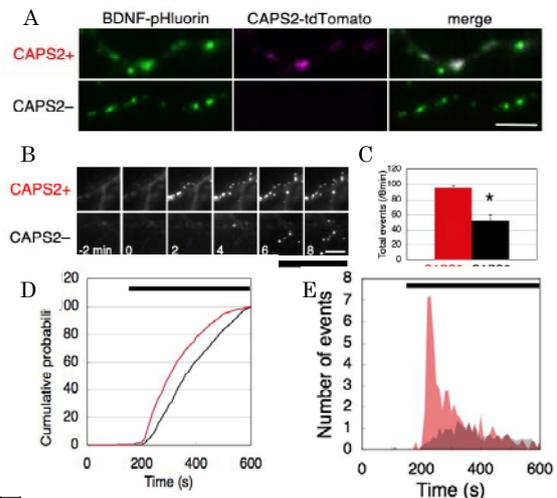


図 2 A) BDNF-pHluorin と CAPS2-tdTomato の局在

B)BDNF-pHluorin の 50mM KCl 刺激後のタイムラプスイメージング C) 領域あたりの BDNF-pHluorin の出現数 D)BDNF-pHluorin 分泌の累積度数分布 E)BDNF-pHluorin 分泌のヒストグラム

また、分泌された BDNF-pHluorin の蛍光強度及び出現時間を比較すると、CAPS2+細胞において有為に蛍光強度が増強している事、及びその出現時間が有為に促進していることがわかった (図 3)

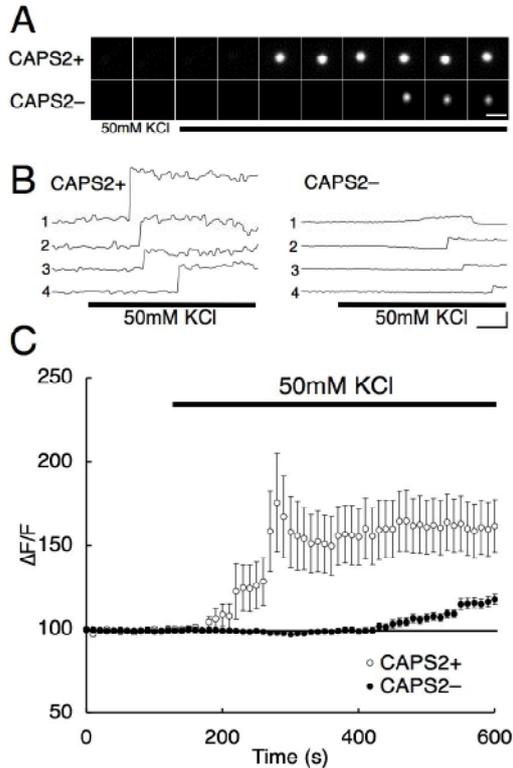


図 3 A)KCl 刺激による BDNF-pHluorin 分泌のタイムラプスイメージングの代表例 B)BDNF-pHluorin 分泌の 1 輝点の蛍光強度のサンプルトレース C)BDNF-pHluorin 分泌の蛍光強度の平均値

CAPS2 が BDNF の分泌を制御しているということは、CAPS2 KO マウスにおいて、BDNF の分泌が障害されていることによる生理学的な影響が観察されるはずである。これまで BDNF は興奮性ニューロン及び抑制性ニューロンの両方の生存、発達、可塑性に影響を与えることが報告されている。そこでまず、全ての抑制性ニューロンが蛍光タンパク質でラベルされているノックインマウスである GAD67-GFP マウスを CAPS2 heterozygote マウスと交配し、CAPS2 野生型/GFP (+/-) と CAPS2 KO/GFP (+/-) を作成して抑制性ニューロンの数を比較したところ、生後 28 日齢の CA1 及

び DG 領域において、抑制性ニューロンの数が有為に減少していることが観察された。また、この減少は生後 8 週齢では見られなくなっていた (図 4)

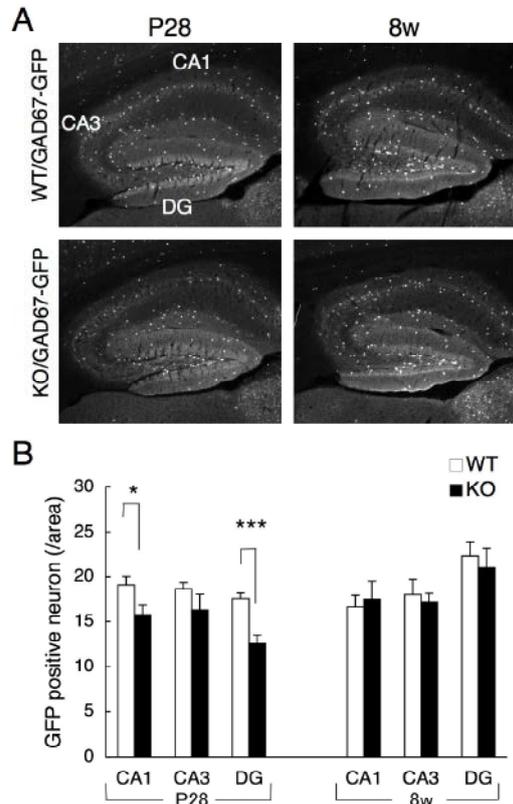
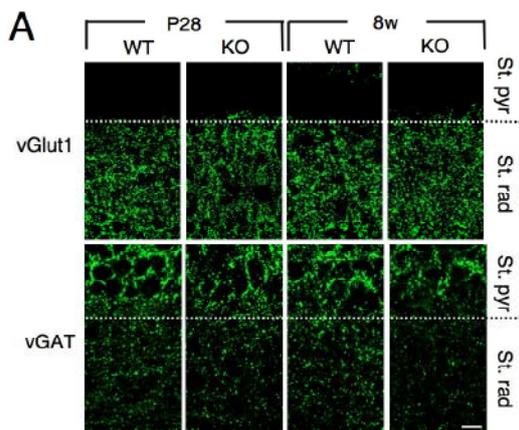


図 4 A)P28, 8w における GFP でラベルされた抑制性ニューロンの代表例 B)各ステージにおける抑制性ニューロンの数の比較

次に興奮性ニューロン及び抑制性ニューロンのシナプスの数を検討するために、それぞれのシナプスマーカータンパク質である vGluT1 及び vGAT で海馬の免疫組織化学を行い、それぞれのシナプスの数を比較したところ、興奮性シナプス (vGluT1) の数には変化がないものの、抑制性シナプス (vGAT) の数が生後 28 日齢、8 週齢ともに CAPS2 KO マウスにおいて減少していた (図 5)。



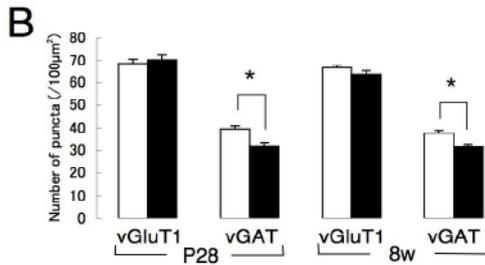


図5 A) P28, 8wにおける興奮性シナプス(vGluT1)及び抑制性シナプス(vGAT)の代表例 B)興奮性及び抑制性シナプス数の統計値

さらに、興奮性、および抑制性シナプスを電子顕微鏡によって詳細に観察したところ、興奮性シナプス小胞については野生型及びCAPS2 KOマウスの双方に顕著な変化は見られなかったものの、抑制性シナプスについては、CAPS2 KOマウスにおいて抑制性シナプス小胞数の有為な減少、及び、抑制性シナプス小胞の分布面積の有為な低下が観察された(図6)。

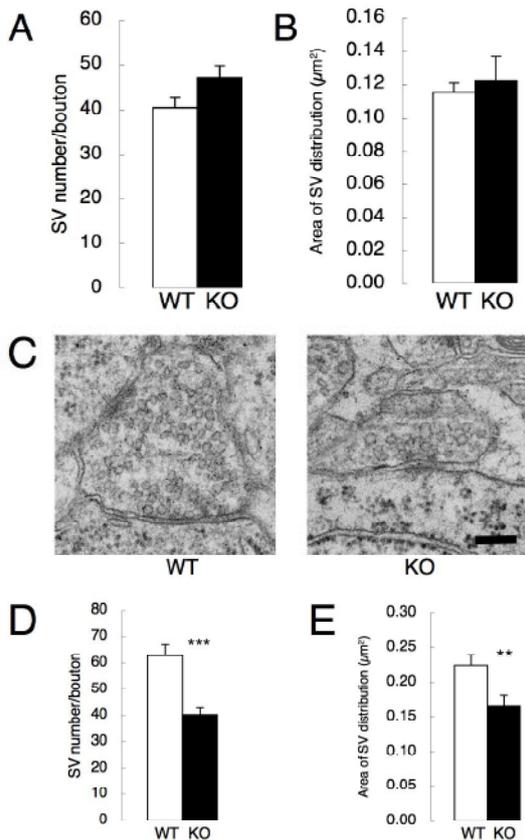


図6 A)8wにおける興奮性シナプスのシナプス小胞数と B)シナプス小胞分布面積 C)抑制性シナプスの代表写真 D)8wにおける抑制性シナプスのシナプス小胞数と E)シナプス小胞分布面積

CAPS2 KOマウスにおいて、抑制性ニューロ

ンの数やシナプスの形態に異常が起きていることが認められたため、そのシナプス機能を調べる事を目的として、電気生理学的実験を行った(図7)

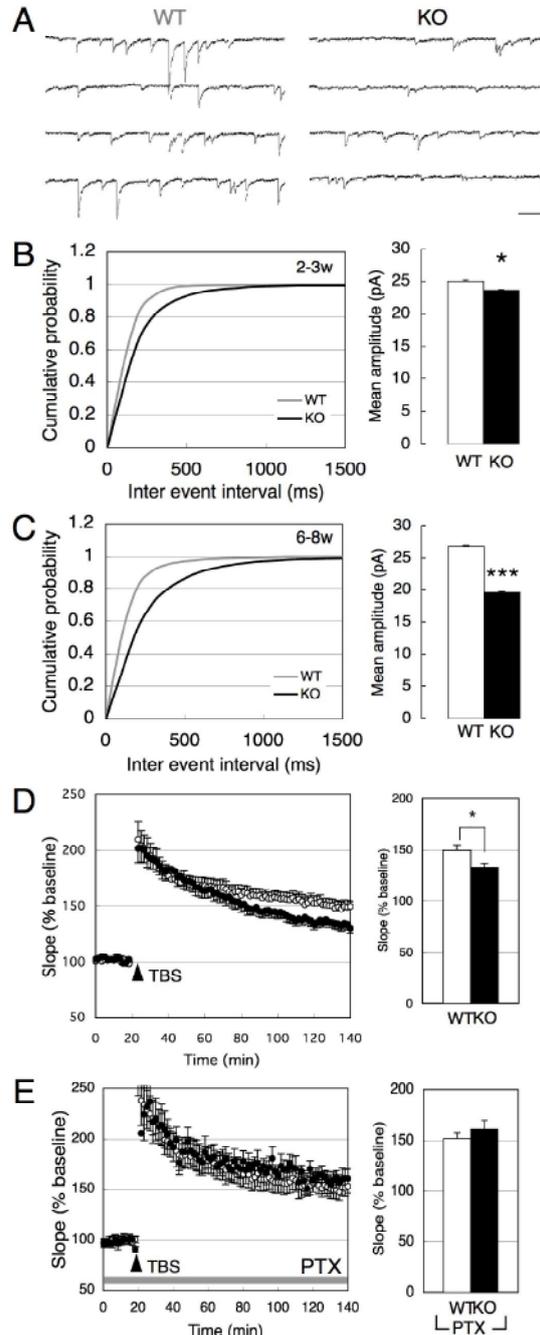


図7 A)海馬急性スライス切片における微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)の代表例 B)生後2-3wおよびC)6-8wのmIPSCの累積度数分布(左)と平均振幅(右) D)θ刺激(TBS)による長期増強(LTP)導入実験 E)GABA_ARのアンタゴニスト存在下におけるTBS-LTP

予想された通り、CAPS2 KOマウスでは微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)の頻度及び振幅が有為に低下していた。これは幼弱期から

アダルトにおいても観察されており、CAPS2 KO マウスでは生後長期にわたって抑制性ニューロンの機能障害が起こっていると考えられる。またシナプス可塑性においては θ 刺激依存的な LTP の後期相が CAPS2 KO マウスにおいて有為に低下していた。さらにこれは抑制性入力を阻害するピクロトキシン (PTX) 存在下で見られなくなることから、この TBS-LTP の低下は抑制性入力の障害によるものだと結論される。

最後に CAPS2 の行動解析を行ったところ、多くの行動解析実験 (Open field with novel object, Elevated plus maze, novelty suppressed feeding, 8-arm radial maze, Y-maze) において、不安傾向が強い事が示唆された。海馬におけるインターニューロンの活動や BDNF の分泌、発現レベルが不安行動に影響するという報告が多数報告されているため、この行動解析の結果は CAPS2 が欠損していることによる BDNF の分泌異常によって引き起こされていると考えられる。

以上のように、海馬において CAPS2 は BDNF の分泌を促進する機能を有しており、この CAPS2 に制御される BDNF 分泌は抑制性ニューロンの発達や機能に影響を与える事が示唆された。また、このインターニューロンの機能異常は、CAPS2 KO マウスの行動パターンに不安傾向を引き起こす可能性が示唆された。

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 2 件)

①Furutama D, Morita N, Takano R, Sekine Y, Sadakata T, Shinoda Y, Hayashi K, Mishima Y, Mikoshiba K, Hawkes R, Furuichi T. *J. Neurosci, Res.*, (2010) 88, 2810-2825. Expression of the IP(3)R1 promoter-driven nls-lacZ transgene in Purkinje cell parasagittal arrays of developing mouse cerebellum. [査読有](#)

②Shinoda Y, Tanaka T, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. *PLoS ONE*, (2010) 5(4), e10390. Persistent Synapse Loss Induced by Repetitive LTD in Developing Rat Hippocampal Neurons. [査読有](#)

[学会発表] (計 7 件)

①Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya,

Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Imaging analysis of the secretory vesicle-associated protein CAPS2 regulated BDNF secretion. Neuro2010, September 2, 2010, Kobe, Japan.

②Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. The imaging analysis of secretory vesicle associated protein CAPS2 regulated BDNF secretion in mouse hippocampus. -The effects of CAPS2 regulated BDNF secretion for GABAergic neuronal network development-. The comprehensive brain summer workshop. July 28, 2010, Sapporo, Japan.

③Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Enhancement of BDNF secretion kinetics by the secretory vesicle-associated protein CAPS2: reduced BDNF levels, impaired development of hippocampal GABAergic neurons and increased anxiety-like behavior in CAPS2 KO mice. The 87th annual meeting of the Physiological Society of Japan. May 17, 2010, Morioka, Japan.

④Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Secretory vesicle-related gene CAPS2 knock-out mice exhibit the reduced number of hippocampal GABAergic interneuron and the impairments in synaptic plasticity and behavior. SfN meeting, October 20, 2009, Chicago IL, USA.

⑤Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Secretory vesicle-related gene CAPS2 knock-out mice exhibit the reduced number of hippocampal GABAergic interneuron and the impairments in synaptic plasticity and behavior. Neuro2009, September 17, 2009, Nagoya, Japan.

⑥Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Vesicle associated protein CAPS2 KO mice show impaired synapse function of hippocampus and exhibit depression-like behavior. IUPS, August 1,

2009, Kyoto, Japan.

⑦ Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Asako Furuya, Ritsuko Katoh-Semba, Teiichi Furuichi. Secretion-associated protein CAPS2 KO mice show impairments in BDNF expression and synapse function in hippocampus and exhibit anxiety-like and/or depression-like behaviors. Gordon Research Conference, June 21-26, 2009, New port RI, USA.

〔図書〕（計 2 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）Vol. 28 No. 5, p63-69, 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 20 巻 4 号 2009

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 陽 (SHINODA YO)

理研 BSI・分子神経形成研究チーム・研究

員

研究者番号：80403096