

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300137

研究課題名(和文)CAPSによるBDNFおよびカテコールアミン含有大型有芯小胞の分泌制御機構の解明

研究課題名(英文)Study on the molecular mechanisms underlying CAPS-mediated exocytosis of dense-core vesicles containing BDNF and catecholamine

研究代表者

古市 貞一 (Furuichi, Teiichi)

東京理科大学・理工学部・教授

研究者番号：50219094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,500,000円、(間接経費) 4,650,000円

研究成果の概要(和文)：CAPSはArf4/5と相互作用することでトランスゴルジ網における小胞輸送に関与することを示した。一部の自閉症患者で異常な発現増加を示す本来稀なCAPS2の選択的スプライシング亜型dex3について、CAPS2-dex3発現マウスを作製し、dex3が軸索局在できないために軸索における有芯小胞開口放出の促進作用を失いBDNFなどの分泌が減少して、シナプスの発達や生理が異常となり、社会行動や不安行動をはじめとした行動障害に陥ることを示唆した。さらに、CAPS1条件的欠損マウスを作製して、CAPS1がトランスゴルジ網での小胞輸送に関係し、糖尿病とうつ病が併発するメカニズムにも関連する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We showed that CAPS1 and CAPS2 interacts with Arf4/5, which is possibly involved in dense-core vesicle (DCV) trafficking in the trans-Golgi network (TGN). Dex3 (deletion of exon3) is a rare alternative splicing CAPS2 variant which was identified to be increased in some of patients with autism. We generated a dex3-expressing mice and verified an impairment in axonal dex3 localization, contributing to a reduction in BDNF release from axons and thereby resulting in abnormal synapses. Dex3 mice also showed deficits in social and anxiety behaviors, suggesting a possible association of dex3 with brain development and behavior related to autism. Although CAPS1 regulates insulin secretion, its function in the brain is essentially unknown because of neonatal death of CAPS1 KO mice. We generated CAPS1 conditional knockout mice and suggested that loss of CAPS1 disrupts the TGN-DCV pathway and BDNF release, which may be associated with a mechanism underlying diabetes and comorbid depression.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：CAPS1 CAPS2 有芯小胞 BDNF トランスゴルジ網 自閉症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) シナプス伝達を担う神経伝達物質や神経機能の調節に重要な神経栄養因子などの分泌物質は、分泌小胞に取り込まれたのち、神経活動依存的に小胞膜と形質膜の融合によって生じる融合孔を通してシナプス間隙や細胞外へ開口放出される。分泌小胞には、大別して、小型の(直径約 50nm)シナプス小胞(synaptic vesicle, SV)と直径 80-120nm の大型有芯小胞(large dense-core vesicle, LDCV)の二種類がある。これら二つの分泌小胞は、生合成と輸送、分泌部位、刺激依存性、量的放出などに相違点があると考えられている。LDCVは、トランスゴルジネットワーク(TGN)から生合成され、樹状突起や軸索に小胞輸送されて、シナプス外やシナプスからの放出に関与する。LDCVには古典的な神経伝達物質であるカテコールアミン(ドーパミン、ノルエピネフリンなど)やセロトニンなどのモノアミン、およびペプチド性の神経伝達物質(神経ペプチドなど)や神経栄養因子が含有される。神経ペプチドは、主に前駆体として翻訳される。この時、翻訳と共役して小胞体へ転送され、次に前方に小胞輸送されてゴルジ装置内に移行する。前駆体は、TGNでLDCVが生合成される時に、その内腔に取り込まれ、分泌部位まで小胞輸送される過程で成熟型に変換される。一方、低分子化合物であるモノアミンは、LDCV膜上に存在する小胞型モノアミン輸送体(VMAT)によってLDCV内腔に充填される(モノアミンは同様の輸送体によってSV内腔にも取り込まれシナプスからも放出される)。一方、SVは、初期エンドソームからの膜輸送で生合成される。グルタミン酸、GABA、アセチルコリンなどに特異的な輸送体によってそれぞれの伝達物質がSV内腔に充填され、プレシナプスの活性帯に輸送される。活動電位によって電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル(VGCC)を介したCa<sup>2+</sup>増加が誘導されると、SNAREと呼ばれる膜融合関連タンパク質複合体などの作用によってSV膜と形質膜が膜融合して開口放出が起こり、神経伝達物質がシナプス間隙へ分泌される。LDCVとSVの開口放出には類似した分子が関与すると示唆されているが、LDCV分泌に関連する分子についてはあまりわかっておらず、分子メカニズムには不明な点が多い。

(2) 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を調節する重要な生理活性因子である。前駆体ポリペプチドとして産生され、小胞体(ER)-TGNを経てLDCVに取り込まれ、開口放出によって分泌される。この過程で、前駆体はプロセッシングにより成熟型に変換される。分泌された神経栄養因子は、標的細胞に存在する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。脳由来神経栄養因子(BDNF)の発現量の変化や輸送・分泌障害は、統合失調症やうつ病

などの精神疾患、記憶障害との関連が示唆されている。最近、BDNFと蛍光タンパク質(pHluorinなど)との融合タンパク質を海馬ニューロンなどに発現させた生細胞のタイムラプス蛍光イメージングによって、BDNFの分泌にはNMDA受容体やVDCCによるCa<sup>2+</sup>流入とリアノジン受容体によるCa<sup>2+</sup>放出で活性化されるCaMKIIが促進的に作用する(7)、Synaptotagmin-IVが抑制的に作用する(8)、軸索と樹状突起におけるBDNFの分泌動態が異なる(9)などが明らかになってきた。しかし、精神神経の発達と機能調節に重要なBDNFを含有するLDCVの分泌制御の分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。

(3) 我々は、Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2)がBDNF含有小胞に会合して脱分極刺激依存的なBDNF放出を促進することを明らかにした。CAPS2はBDNF分泌を促進することが示された初めての分子である。また、CAPS2ノックアウトマウスにおいて、BDNF分泌活性が著減し、ニューロンの発達遅滞やシナプス形態と生理の異常、およびマウス個体間の相互作用の低下や新奇環境下における不安様行動の増加などの行動障害を発症することを明らかにした。さらに、発達障害である自閉症の患者において、exon 3が欠失する稀な選択的スプライシングCAPS2変型の異常な発現増加と、稀な非同義的SNPを発見した。興味深い事に、exon 3欠失型は軸索輸送が減少することから、軸索やプレシナプスからの局所的なBDNF分泌が欠損して、回路の発達や機能の障害の原因になることが示唆される。パラログであるCAPS1では、カテコールアミン含有のLDCVのATP依存的なPrimingステップ後に細胞膜のリン脂質PIP<sub>2</sub>と結合してCa<sup>2+</sup>依存的な開口放出に関係するとの報告や、LDCVへのカテコールアミンの充填に関与するとの報告があり、まだ議論の余地がある。最近、CAPSがSNAREタンパク質と結合してLDCVと形質膜の融合を促進すると報告された。申請者らは最近、BDNF-pHluorinを用いた海馬神経細胞のタイムラプス蛍光イメージングで、CAPS2がBDNF分泌の頻度、時定数、振幅を増強することを示した。また、exon 3欠失型CAPS2を発現するマウスモデルの開発に最近成功し、BDNFの局所分泌の解析が可能になっている。さらに、ノルアドレナリンの産生部位(青斑核)とドーパミンの産生部位(腹側被蓋野・黒質緻密部)にそれぞれCAPS1とCAPS2が発現することがわかり、またCAPS1条件的KO(cKO)マウスの開発を進めておりカテコールアミンのLDCV分泌を解析できる状況になる。これらの研究経緯から、CAPSを切り口としたBDNFとカテコールアミンの分泌動態の解析によってLDCVの分泌制御の分子メカニズムの解明に迫る事を着想した。

## 2. 研究の目的

大型有芯小胞(LDCV)による開口放出は、カテコールアミンやペプチド性神経伝達物質の分泌に関与することから、精神神経の調節に重要な役割をもつと考えられる。しかし、SVに比して、LDCV分泌制御の基礎をなす分子メカニズムの詳細は不明である。最近、申請者らは、LDCVに会合するCAPS2タンパク質が脳由来神経栄養因子BDNFの分泌活性を促進し、そのノックアウトマウスがニューロンとシナプスの発達異常および自閉症様の行動障害を示すことを明らかにした。また、CAPS1とCAPS2がカテコールアミン産生部位に特異的に発現することもわかってきた。本研究では、CAPS遺伝子改変マウスなどを用いたBDNFとカテコールアミンの分泌動態の解析によりCAPSによるLDCV分泌制御のメカニズムを明らかにし、また改変マウスの分子・細胞・生理・形態レベル、および行動レベルの表現型を解析してCAPS依存的なLDCV分泌機構の生物学的な意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、CAPSによる大型有芯小胞分泌制御メカニズムとその生物学的な意義を明らかにする。

(1) CAPS2ノックアウト(KO)やexon3欠失型CAPS2(dex3)のモデルマウスの海馬ニューロンなどにBDNF-pHluorinを発現させ、ライブセル蛍光イメージングにより分泌動態を解析する。また、CAPS2変異体の強発現、関連タンパク質のsiRNAノックダウンによる影響を解析する。

(2) CAPS2マウスの他にCAPS1 cKOマウス(KOは生後致死のため)のドーパミン産生細胞やPC12培養細胞などにおけるカテコールアミン分泌動態について、蛍光偽神経伝達物質を用いたドーパミン分泌蛍光イメージングなどによる解析を行う。また、変異体の強発現、関連タンパク質のsiRNAノックダウンによる影響を解析する。

(3) KO、dex3、cKOマウスにおける脳内BDNFやカテコールアミンの定量、細胞やシナプスの形態・生理、行動形質など、関連する各種表現型を多角的に解析する。

## 4. 研究成果

(1) CAPS2がArf4/5低分子量GTPaseと相互作用しArf4/5をゴルジ体膜に会合させること、両者の相互作用部位に変異を入れるとトランスゴルジ網の形態が変化し有芯小胞マーカータンパク質のクロモグラニンAの細胞突起への分布が減少すること、などを明らかにした。この結果から、CAPS2はArf4/5をゴルジ体にリクルートすることで、有芯小胞の形成に関与することが示唆される。

(2) 一部の自閉症患者から見出した本来稀な選択的スプライシング亜型CAPS2-dex3の異常増加について、その生物学的な意義を調

べるために、CAPS2-dex3を発現するマウスモデルを開発した。CAPS2-dex3は、エクソン3を欠失した亜型であり、初代培養ニューロンに発現すると軸索での分布が特異的に著減する。CAPS2-dex3マウスにおいてもニューロンの軸索投射部位での免疫反応の低下し、軸索からのBDNF分泌が減少することが個体レベルで証明された。また、CAPS2-dex3マウスは、社会行動の減少、特定の新奇環境下での不安の亢進、母性養育行動の減少、日内リズムの欠損などを示した。これらの結果から、CAPS2は細胞局所におけるBDNF分泌の増強に重要な役割を持つこと、また、CAPS2がエクソン3を欠失すると軸索部でのBDNFの分泌促進がなくなり、おそらく神経回路の障害を引き起こして、社会行動などの行動障害をきたす可能性が示唆される。

(3) 自閉症患者ゲノム解析で、CAPS2のコピー数多型が複数例報告されている。そこで、CAPS2のヘテロマウスが1コピーのCAPS2遺伝子を持つモデルとして行動解析したところ、不安の増加は見られたが社会行動に有意な障害は見られなかった。自閉症は多因子疾患と考えられることから、CAPS2遺伝子が1コピーだけでは発症には至らず、他の変異との組み合わせが発症リスクを高めるのではないかと予測される。

(4) CAPS2-dex3マウスの小脳における表現型について解析を行った。顆粒細胞の軸索部におけるBDNFとNT-3の局在が減少し、分泌が低下する。その結果、プルキンエ細胞の樹状突起形成、小脳虫部の裂形成、顆粒細胞前駆体の増殖などに異常が観察された。また、平行線維-プルキンエ細胞シナプスにおけるプレシナプス機能の低下が示された。これまでのCAPS2-dex3マウスの表現型データを総合すると、軸索部におけるCAPS2を介した有芯小胞の開口放出の促進作用は、大脳皮質、海馬、小脳皮質の神経回路などにおける興奮性シナプスの形態や一部の抑制性ニューロンの分化や発達に重要であることがわかった。また、この変異マウスをモデルとして使用することで、自閉症の発症や病態のメカニズムを解明する糸口となる可能性があり、さらに、自閉症関連の応用研究につながる可能性も期待できる。

(5) 有芯小胞の輸送や開口放出の調節に関与すると考えられている分泌関連タンパク質CAPS1について、遺伝子改変マウスを作製して生体における役割を解析した。CAPS1はインスリンなどのペプチドホルモンやノルエピネフリンなどの生体アミンを内包した有芯小胞の分泌に関与する。これまでCAPS1タンパク質が減少したマウスは糖尿病様の症状を示すことが報告されてきたが、全身でCAPS1遺伝子が完全に欠損したマウスは生後すぐに致死となることから成体での解析ができず、実際にCAPS1欠損マウスの個体レベルでの病態については不明であった。我々は、大脳や海馬などの前脳領域に特異的、および小脳領

域に特異的な2種類のCAPS1遺伝子条件的欠損マウスの開発に成功した。この2種類のモデルマウスを解析した結果、CAPS1を欠損した脳領域では細胞内のトランスゴルジ網の形態異常、シナプスの発達や生理での異常などを呈することが明らかになった。また、BDNFの輸送や分泌に障害が検出された。BDNFはうつ病との関連が考えられており、また糖尿病患者はうつ病を併発しやすいことが知られている。これらの知見と、今回明らかになった特定の脳領域におけるCAPS1遺伝子欠損マウスの病態から、CAPS1が糖尿病とうつ病が併発するメカニズムに関連する可能性が示唆される。

#### 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 14 件)

- ① Sadakata, T., Kakegawa, W., Shinoda, Y., Hosono, M., Katoh-Semba, R., Sekine, Y., Sato, Y., Tanaka, M., Iwasato, T., Itohara, S., Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Ishizaki, Y., Yuzaki, M., and Furuichi, T. CAPS1 deficiency perturbs dense-core vesicle trafficking and Golgi structure and reduces presynaptic release probability in the mouse brain. *J. Neurosci.*, 33:17326-17334, 2013.
- ② Motoyoshi-Yamashiro, A., Tamura, M., Moriyama, M., Takano, K., Kawabe, K., Nakajima, H., Katoh-Semba, R., Furuichi, T., and Nakamura, Y. Activation of cultured astrocytes by amphotericin B: Stimulation of NO and cytokines production and changes in neurotrophic factors. *Neurochem. Int.* 63:93-100, 2013.
- ③ Tanaka, M., Shih, P.Y., Gomi, H., Yoshida, H., Nakai, J., Ando, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. Astrocytic Ca<sup>2+</sup> signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Mol. Brain* 6:6, 2013
- ④ Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., and Furuichi, T. Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the CAPS2/CADPS2 gene. *FEBS Lett.* 587:54-59, 2013
- ⑤ Shinoda, Y., Sadakata, T., and Furuichi, T. Animal Models of Autism Spectrum Disorder (ASD): A Synaptic-level Approach to Autistic-like Behavior in Mice. *Exp. Anim.* 62(2), 71-78, 2013
- ⑥ Sadakata, T., Shinoda, Y., Sato, A., Iguchi, H., Ishii, C., Matsuo, M., Yamaga, R., Furuichi, T. Mouse models of mutations and variations in autism spectrum disorder-associated genes: mice expressing caps2/cadps2 copy number and alternative splicing variants. *Int J Environ Res Public Health.* 10(12):6335-6353, 2013.
- ⑦ Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Miwa, H., Tanaka, M., Itohara, S., and Furuichi, T. Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109:21104-21109, 2012
- ⑧ Fujita, H., Morita, N., Unno, T., Furuichi, T., and Sugihara, I. Clustered fine compartmentalization of the mouse embryonic cerebellar cortex is rearranged into the postnatal striped organization. *J. Neurosci.* 32:15688-15703, 2012.
- ⑨ Sadakata, T., Sekine, Y., Oka, M., Itakura, M., and Furuichi, T. Calcium-dependent activator protein for secretion 2 interacts with the class II ARF small GTPases and regulates dense-core vesicle trafficking. *FEBS J.* 279:384-394, 2012
- ⑩ Otani, Y., Yamaguchi, Y., Sato, Y., Furuichi, T., Ikenaka, K., Kitani, H., and Baba, H. PLD4 is involved in phagocytosis of microglia: expression and localization changes of PLD4 are correlated with activation state of microglia. *PLoS One* 6(11):e27544, 2011.
- ⑪ Hamatake, M., Miyazaki, N., Sudo, K., Matsuda, M., Sadakata, T., Furuya, A., Ichisaka, S., Hata, Y., Nakagawa, C., Nagata, K., Furuichi, T., Katoh-Semba, R. Phase advance of the light-dark cycle perturbs diurnal rhythms of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 protein levels, which reduces synaptophysin-positive presynaptic terminals in the cortex of juvenile rats. *J. Biol. Chem.* 286:21478-21487, 2011
- ⑫ Huang, J., Furuya, A., Hayashi, K., and Furuichi, T. 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, 2011

- ⑬ Shinoda, Y., Sadakata, T., Nakao, K., Katoh-Semba, R., Kinameri, E., Furuya, A., Yanagawa, Y., Hirase, H., and Furuichi, T. 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, 2011
- ⑭ Furuichi, T., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Sato, A., Sadakata, T., Huang, J., Shinoda, Y., Hayashi, K., Mishima, Y., Tomomura, M., Nishibe, H., and Yoshikawa, F. Systematizing and cloning of genes involved in the cerebellar cortex circuit development. Neurochem Res. 36:1241-1252, 2011

[学会発表] (計 10 件)

- ① 三島百合子、須田翔子、猿田千尋、定方哲史、篠田陽、和田直之、小島正巳、若菜茂晴、古市貞一. Ca<sup>2+</sup>依存性分泌関連タンパク質 CAPS ファミリーのマウス胚脳神経系における遺伝子発現。第 86 回日本生化学会大会。2013 年 9 月 11 日~13 日
- ② 石井千晶、篠田陽、定方哲史、古市貞一. CAPS1 コンディショナル・ノックアウトマウスにおけるシナプス伝達。Neuro2013 2013 年 6 月 20 日~23 日
- ③ 井口大壽、小林翔太、定方哲史、篠田陽、古市貞一. マウスドーパミン作動性神経の初代培養系における大型有芯小胞からのドーパミン分泌と CAPS2 の関係。Neuro2013. 2013 年 6 月 20 日~23 日
- ④ 古市貞一. 脳の正常な発達とその障害-分泌関連因子 CAPS ファミリーの機能。都医学研セミナー。2013 年 1 月 11 日
- ⑤ 古市貞一. 脳の正常な発達とその障害-分泌関連因子 CAPS2 の役割について。埼玉大学・研究機構 脳科学融合研究センター シンポジウム (III) 脳の発生・発達とその破綻の理解をめざして。2012 年 10 月 6 日
- ⑥ Ayana Nagae, Yumi Sato, Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, and Teiichi Furuichi. Co-localization of Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion (CAPS) proteins with oxytocin in the mouse pituitary. 第 35 回日本神経科学大会。2012 年 9 月 18 日~21 日
- ⑦ 古市貞一. 有芯小胞分泌調節分子 CAPS2 遺伝子欠損マウスにおける行動障害。日本実験動物科学・技術 九州 2012. 2012 年 5 月 24 日~26 日
- ⑧ Mishima Y, Sadakata T, Semba-Katoh R, Saruta C and Furuichi T. Examining the effects of chronic

corticosterone administration in Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 (Caps2) knockout mice: implication for anxiety/depression-like behaviors. Annual Meeting of Society for Neuroscience. 2011 年 11 月 12 日~16 日

- ⑨ Furuichi T., Sadakata T and Shinoda Y. Enhanced secretion of BDNF by CAPS2 is critical for proper brain development and behavior. The 32nd Naito Conference. 2011 年 10 月 18 日~21 日
- ⑩ 三島百合子、定方哲史、仙波りつ子、猿田千尋、古市貞一. 長期的なコルチコステロン投与による不安・鬱様行動への影響: Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion 2 (Caps2) 遺伝子欠損マウスを用いた実験。第 34 回日本神経科学大会。2011 年 9 月 14 日~17 日

[図書] (計 4 件)

- ① 定方哲史、篠田陽、古市貞一 ゴルジ体における有芯小胞の生成と CAPS タンパク質の役割。生体の科学 63(5):414-415, 2012
- ② 篠田陽、定方哲史、三島百合子、古市貞一 自閉症の発症要因と動物モデル。実験医学 30(20):236-241, 2012
- ③ 篠田陽、古市貞一 BDNF の分泌制御と脳神経回路の形成~CAPS2 による BDNF 分泌促進とその機能的役割~。生化学 84(2):106-111, 2012
- ④ 定方哲史、古市貞一 自閉症感受性候補遺伝子 CAPS2/CADPS2 における遺伝的多型とノックアウトマウスの行動障害。医学のあゆみ 239(6):701-707, 2011

[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

<http://www.lmn.bs.noda.tus.ac.jp/#!home/j/c11by>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 貞一 (FURUICHI, Teiichi)  
東京理科大学・理工学部・教授  
研究者番号: 50219094

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし