

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670149

研究課題名(和文) 自閉症発症機構解明を志向した細胞接着因子結合タンパク質群の同定

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms underlying cell-adhesion molecule-dependent autism spectrum disorders

研究代表者

原 雄二 (Hara, Yuji)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60362456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス間における細胞接着分子群の結合は、神経活動の調律に必須である。細胞接着因子間の結合破綻は自閉症をはじめ様々な神経疾患を惹起する。当研究では自閉症原因遺伝子CNTNAP2に着目し、結合因子の同定によりその病態発症機構解明を目指した。

同分子細胞外ドメインを介して結合する分子群を、プロテオーム解析により同定を目指した。非特異的結合タンパク質の同定検討を重ねている過程で、海外の研究グループにより結合因子群の網羅的同定がなされた。そこで当研究ではホモログであるCNTNAP4にも焦点を広げ、神経疾患発症メカニズム解明をめざしてさらに研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：Interactions mediated by cell adhesion molecules are important for fine-tuning of neuronal activities. It has been shown that disrupted interactions between pre- and post-synaptic cells lead to a variety of neural diseases including autism spectrum disorders. In this study we aimed to elucidate the molecular mechanisms underlying autism spectrum disorders, by means of identification interacting molecules for autism spectrum disorder-related factor CNTNAP2.

We carried out proteomic approaches by utilizing the extracellular region of CNTNAP2 as an affinity column. However, during the course of this study, other researchers identified CNTNAP2-interacting molecules by comprehensive proteomic approaches. Thus we decided to also focus on other cell-cell adhesion molecules such as CNTNAP4 that is involved in synaptic transmission in mice.

研究分野：生化学

キーワード：細胞接着因子 自閉症 Neurexinファミリー CNTNAP2

1. 研究開始当初の背景

細胞接着分子群の結合は、シナプス間あるいはニューロン-グリア間における直接的・機能的相互作用に深く関わり、神経活動およびその調律に必要不可欠である。細胞接着因子間の結合破綻は様々な神経疾患を惹起することが知られている。例を挙げると細胞接着因子タンパク質として機能する Neurexin は、その結合パートナーである Neuroligin を介したシナプス間の結合に必須であり、その機能破綻は自閉症や癲癇・失語症等の原因因子であることが知られている。

Neurexin と同源性を有する因子群はスーパーファミリーとして知られている。同ファミリーを構成する因子の特徴として、ラミニン球状ドメインを有することが知られている。同ドメインは膜タンパク質ジストログリカンをはじめとする様々なタンパク質との結合に関わるとされ、同ドメインはシナプス間の機能に重要であると考えられてきた。Neurexin スーパーファミリーに属する分子のうち、CNTNAP2 (Contactin-associated protein like-2) は最近自閉症との連関が報告されたことから、細胞接着因子としてシナプス間での機能に重要な役割を果たすことが示唆された(下図参照)。

図: Contactin-associated protein-like2 (CNTNAP2) および Neurexin1 (NRXN1)のドメイン構造

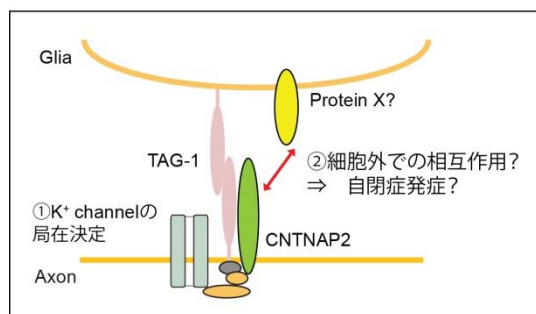


2. 研究の目的

そこで、当研究では、細胞接着因子の機能破綻により惹起されるメカニズム解明を目指した。具体的には Neurexin スーパーファミリーに属する分子のうち、その機能が解明されて

いない CNTNAP2 に着目した。CNTNAP2 はこれまで結合因子として TAG-1 しか同定されておらず、さらに TAG-1 遺伝子変異に伴う自閉症発症は報告されていないことから、新規結合因子が存在し、その変異により自閉症発症に至るという作業仮説を立てた。CNTNAP2 患者変異はラミニン球状ドメインを含む細胞外ドメインに多く導入されることから、CNTNAP2 細胞外ドメインを介して結合する分子群をプロテオーム解析により同定し、その機能解析を通じ、細胞接着因子群の相互作用破綻に伴う神経疾患発症機構の解明を目指した(下図参照)。

図2: CNTNAP2 の神経系における機能



3. 研究方法

本申請では自閉症原因遺伝子 CNTNAP2 について、その細胞外領域に結合する因子の同定および解析を通じて、自閉症・癲癇などの神経疾患の発症メカニズムの解明を目指した。本研究課題において、以下の方法に従って結合タンパク質同定を試みた。

ヒト培養細胞 HEK293 を用いた CNTNAP2 細胞外領域の安定発現系の構築

同タンパク質結合因子をマウス脳から単離し、プロテオーム解析による同定

また当初の研究では、単離された因子群の相互作用の再検討、及び免疫染色等による局在検討、および同因子への結合の機能解析お

および意義解明 も行う予定であった。

4. 研究成果

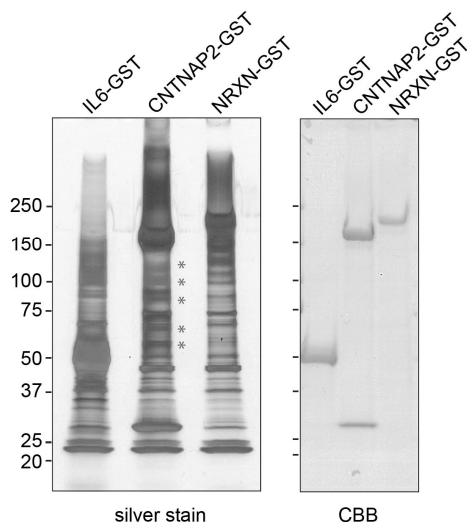
(1) HEK293 細胞を用いた CNTNAP2 細胞外領域の安定発現系構築

当該領域は 1000 アミノ酸残基以上からなることから、大腸菌等からの発現は困難であることが予想された。そこで当研究ではヒト由来培養細胞である HEK293 細胞を用いて安定発現株を樹立し、血清不含培地での大量培養系を適用したところ、大量培養系の構築に成功した。同手法を用いることで、レコンビナントタンパク質のより高純度の生成等、様々な研究に応用できるものと期待される。

(2) マウス全脳からの CNTNAP2 結合タンパク質の同定

上記実験で精製したタンパク質を用いて、マウス全脳からの CNTNAP2 結合タンパク質の同定を試みた。マウス全脳画分を 1% NP40 にて可溶化し、CNTNAP2 細胞外領域タンパク質カラムにて結合タンパク質同定を試みた。しかし下図で示す通り、非特異的な結合が多く見られた。この原因として、CNTNAP2

図： マウス全脳からの各融合タンパク質への結合タンパク質群の同定



カラムからのタンパク質溶出 カラムへの非特異的吸着 が挙げられた。

これらの改善点を克服するため、まず CNTNAP2 カラムからの溶出を防ぐべく、これまでの GST タグを改め、Halo-タグを用いることにした。同カラムは Halo-tag レジン (プロメガ社) と共有結合することができ、結合アッセイにおける望まないタンパク質溶出を最小限に抑制できるためである。Halo-tag 発現安定発現株の樹立を試み、成功をおさめた。

また結合時における非特異的なタンパク質吸着を防ぐため、界面活性剤の効果を検討し、最低な条件の確立に成功した。さらにマウス脳画分の精製 (核画分の除去等) を行うことで条件の改善が認められた。

しかし、当研究分野は競争が極めて激しく、海外の研究グループにより、CNTNAP2 結合タンパク質の網羅的同定に関する報告、および CNTNAP2 の生理的意義解明に関する論文が相次いでなされた。さらにこれらのグループは CNTNAP2 欠損マウス等の遺伝子改変モデル系を作出し、解析も併せて行なっている。以上の点を考慮し、同じ分子で研究を行うことは競争として厳しいと判断した。そこで CNTNAP2 だけでなく、そのホモログである CNTNAP4 にも着目した。CNTNAP4 は CNTNAP2 と同様のドメイン構造を有している。遺伝性疾患との連関は報告されていないものの、マウスレベルではシナプス形成等に重要であると報告されているためである (文献 参照)。CNTNAP2 とともに CNTNAP4 との結合因子比較を行うことで、Neurexin スーパーファミリーの神経機能に対する寄与を解明するため、CNTNAP4 に関わるリソースの開発等 (発現系の構築等) を行った。現在も当研究で培ったリソースを生かして研究を進

行させている。

また、当研究で培った生化学的手法は、神経筋疾患全般の発症機構解明にも非常に有効であった。申請者は神経筋疾患に関わるストア作動性カルシウムチャネル群の発症機構解明についてもこれまで行ってきた（文献参照）。その結合因子の同定の際に、当研究で培った実験技術の構築は大変有用であったと言える。

<引用文献>

Karayannis T et al., Cntnap4 differentially contributes to GABAergic and dopaminergic synaptic transmission. *Nature* 511, 236-240, 2014

Endo Y, *Noguchi S, Hara Y, Hayashi YK, Motomura K, Miyatake S, Murakami N, Tanaka S, Yamashita S, Kizu R, Bamba M, Goto YI, Matsumoto N, Nonaka I, Nishino I. (2015) Dominant mutations in ORAI1 cause tubular aggregate myopathy with hypocalcemia via constitutive activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Hum Mol Genet.*24,637-648

5 . 主な発表論文等

【雑誌論文等】計 0 報

【主要学会発表】計 0 件

【図書】該当なし

【産業財産権】該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

原 雄二 (HARA, Yuji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60362456

(2) 研究分担者

田邊 賢司 (TANABE, Kenji)

東京女子医科大学・医学部・テニユアトラック准教授

研究者番号：80423341