

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究「C」

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21500334

研究課題名（和文） Cadm1 機能シナプス形成に関与するタンパク複合体の解析と機能障害の研究

研究課題名（英文） **CADM1, a molecule linked to Autism Spectrum Disorder, forms a synaptic complex and its function.**

研究代表者

桃井 隆 (MOMOI TAKASHI)

国際医療福祉大学・保健医療学部・教授

研究者番号：40143507

研究成果の概要（和文）：自閉性障害の患者のシナプス接着蛋白 SynCAM/RA175 (Cadm1) 遺伝子に2つの変異を同定し(2009)。細胞培養系を用いた実験では変異 Cadm1 は小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘導し、神経細胞のデンドライト形成を抑制する(2010)。Cadm1-KO マウスは不安、攻撃性の増大する他、小脳に軽い発達異常が見られること、また、ヒト言語障害に対応する超音波コミュニケーション障害が存在すること、またマウス小脳では、Cadm1 は GABAB2 受容体と小脳プルキンエ細胞と Parallel ファイバーとのシナプスに局在した(2012)。Cadm1-複合体の分離および Cadm1 の PDZ 結合モチーフに結合する Scaffold 蛋白を解析したところ、Mupp1 と結合する一方、Neurologin は Mupp1 と結合しないことから、Neurologin と Cadm1 は異なったシナプス複合体を形成していると考えられた。また、Cadm1-KO マウスでは GABAB2 受容体のレベルが増大していることを明らかにした(2012)。一方、実験計画に従い、正常および変異 Cadm1-MycTag を導入した ROSA26 遺伝子の Bac クローンに -Cadm1-Myc を挿入し、ROSA26-Cadm1-Myc-BacTg トランスジェニックマウスを作製したが、正常および変異 Cadm1 分子が脳内で切断されており、Myc 抗体を用いて解析することが困難であり、そこで、CADM1(Y251S)KI マウスを作製中であり、Cadm1-KO マウス、CADM1(Y251S)KI マウスを用いて Loss-of-function と Gain-of-function の両面から ASD の分子病態の解析を行うことにした。

研究成果の概要（英文）：

Autism spectrum disorder (ASD), a neurodevelopmental disorder of uncertain molecular origin, has been previously linked to mutations in synaptic adhesion molecules, an imbalance of excitatory and inhibitory synapses, and/or an impaired cerebellum. Mutations in the synaptic adhesion protein CADM1 (RA175/SynCAM1) are associated with ASD, and *Cadm1* knock out (KO) mice exhibit smaller cerebella with decreased number of synapse of Purkinje cells and some ASD-like symptoms, including impaired ultrasonic vocalization. In the present study, we examined the alteration of the Cadm1 synaptic complex in the mouse cerebellum at postnatal stages. The C-terminal peptide of Cadm1 associated with Mupp1 at PDZ(1-5), a scaffold protein containing 13 PDZ domains, which interacted with GABBR2 at PDZ13, but not with PSD-95. Cadm1 co-localized with Mupp1 and GABBR2 on the dendrites of hippocampal neurons cultured *in vitro* and in the molecular layers of the cerebellum. These observations suggest that the Cadm1 synaptic receptor complex, including Mupp1-GABBR2, is located on the dendrites of Purkinje cells. The amount of GABBR2 protein but not mRNA was increased in the cerebella of *Cadm1* KO mice, suggesting that lack of Cadm1 does not affect transcription but may stabilize the

Mupp1-GABBR2 receptor complex. Up-regulation of GABBR2 in the cerebellum in the absence of CADM1 may be associated with ASD pathogenesis.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学・神経病理学

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1) シナプス (2) Cadm1 (3) 自閉症

1. 研究開始当初の背景

RA175/SynCAM1/ Cadm1 (以下 Cadm1)は現在までにC末端が類似の配列をもつ4種類のメンバーの存在が確認されているが、Neuroigin と異なり、Cadm1 による機能シナプス形成に必要な複合体形成の分子機構は不明である。一方、Neurexin-Neuroigin の結合には PSD95 のクラスター形成に深く関与しており、興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランスをコントロールしている (Nam and Chen 2005, Alaa 2005)。また、Neuroigin-3(R451C)の変異が自閉性障害 (ASD) の患者 (約 3%) に発見され (Jamine et al. 2002), 変異遺伝子を導入したノックインマウスの抑制性シナプスの増大が明らかとなり、シナプス機能不全が ASD 病態と関連することが示唆されているが (Tabuchi et al 2007)、総合的な ASD の分子病態の解明には至っていない。

申請者は、これまでに Cadm1 のノックアウト (KO)マウスを作成し、生体における Cadm1 の機能解析を行ってきた (Fujita et al., 2006, 2007)。Cadm1(129Sv)-KO マウスの雄マウスは精巣での精子細胞とセリトリ細胞との cell junction 形成不全が原因で不妊症状を示す (Fujita et al, 2006)。Cadm1 と PAR-3 の結合不全が精子細胞の cell junction 形成障害の原因であった (Fujita et al. 2007)。精子細胞-セリトリ細胞の cell junction とシナプス形成の類似性を考慮し、Cadm1(C57BL6)-KO マウスを作成し、行動解析を行った。Cadm1(C57BL6)-KO マウスは Social Interaction の減少のほか、超音波音声 (USV)

communication の減少などヒト ASD 患者に共通してみられる社会行動性の異常を示した (Fujita et al., 投稿中)。申請者は言語障害の原因遺伝子の変異である Foxp2(R552H)を導入したノックインマウスが 40-100kHz の超音波音声 (USV) communication の異常を示すことから (Fujita et al, 2008)、マウス USV とヒト言語は脳で共通の分子機構を基盤としていることが明らかにしている。また、自治医大小児科との共同研究で CADM1 の H246N と Y251S 変異が ASD 患者 2 家系を発見した (Zhiling and Fujita et al., 2008)。正常と比較し (Tanabe et al., 2008)、変異 CADM1 の細胞外領域は細胞膜近傍で TACE/ADAM17 により著しく切断され、細胞膜への輸送が阻害され、小胞体に蓄積される (Zhiling and Fujita et al., 2008)。

2. 研究の目的

Neuroigin シナプスと同様、CADM1 シナプスの機能不全と ASD 病態との関連が強く示唆された。しかし、Cadm1-KO マウスが motor learning や social memory の低下など ASD とは関係のない障害も示す。また、Neuroigin と異なり、Cadm1 の C 末端は PSD95 や Syntrophin に結合しないし、Neuroigin の C 末端は Par-3 や MUPP1 に結合しない (未発表)。すなわち、Cadm1 を介してのシナプス複合体形成 (Scaffold タンパク、受容体、下流シグナル分子、酵素、トランスポーター) の機構は解明されておらず、Cadm1 シナプスの機能および Neuroigin 機能シナプスとの類似点と相違点も不明である。また、変異 Cadm1 シ

ナプスの機能不全と ASD 分子病態との関係が明らかでない。MycTag を付加した正常、変異 Cadm1 (Cadm1-MycTag) を導入した ROSA26BAC-Cadm1-MycTag-BACTg マウスの作製を行った (Giel-Moloney et al., 2007)。本研究は Cadm1 による機能シナプス複合体形成の分子機構を解明し、変異 CADM1 のシナプス機能不全と ASD 分子病態との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cadm family の細胞内領域に結合するタンパクの解析。

Pull-down 方法を用いて C 末端に結合する PDZ Scaffold 蛋白の探索。Cadm1、Neuroigin の C 末端領域を GST 融合タンパクとして大腸菌で作成、グルタチオンカラムに結合させ、正常、Cadm1-KO マウス脳抽出液から、結合するタンパクを Pull-down し、候補タンパクの抗体を用いたイムノブロット法により Cadm1 結合タンパクを解析する。

(2) 神経細胞の培養

マウス胎児海馬を採取し、トリプシンにて細胞を分散した後、 1×10^5 cells/cm² になるように神経細胞用培養液を調整し、37°C 5.0% CO₂ で培養後、免疫染色法を行った。

(3) 免疫染色法

細胞または、マウス組織を 2~4%パラホルムアルデヒド含有 PBS にて固定した。1%ヤギ血清および 0.5%スキムミルク含む PBS 溶液でブロッキングし、一次抗体に小胞体関連マーカーを 4°Cで一昼夜反応させ、さらに二次抗体として FITC あるいはテキサスレッド標識抗イムノグロブリン抗体を加え、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。

(4) イムノブロット分析

組織および細胞を回収し、50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma) にて細胞を可溶化し回収した。得られた上清を SDS-アクリルアミドゲルにて泳動した。ニトロセルロースフィルターに転写し、一次抗体、二次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識イムノグロブリン) を反応させ検出した。

(5) 実験動物 (マウス) の飼育および PCR 法による遺伝子型の検定

Cadm1 遺伝子改変マウスは、温度 23.0 ± 2 度、湿度 $50\% \pm 10\%$ の室内にて飼育した。1 mm 程度の尾を採取し DNA を抽出後、PCR を行い、遺伝子型を検定した。

(6) USV 測定法

生後 10 日目の仔マウスを母マウスから離し、仔マウスをチャンバーに入れ、UltraSound Gate118 (Avisoft Bioacoustic) を用いて、40-100 kHz の音域を 1 分後、3 分間の音を測定した。

4. 研究成果

自閉性障害と Cadm1 の関与を調べるために、Cadm1 ノックアウトマウスの行動学的解析を行ったところ、不安、攻撃性などの行動異常、社会的コミュニケーションの異常を示めした。また、自閉性障害の特徴の 1 つであるコミュニケーション障害について検討したところ、Cadm1 ノックアウトマウスは言語障害のモデルマウスにみられる、超音波音声によるコミュニケーションの異常と小脳の発達障害を示した (BBRC 2010)。すなわち、Cadm1 機能シナプスはマウス USV (ヒト言語) 神経回路のシナプス形成に関与している可能性が考えられる。

自閉性障害の患者とその家族に見出した CADM1 の 2 つの変異 (H246N, Y251S) は小胞体ストレスを誘導し、Cadm1 変異を発現させた神経細胞は樹状突起の伸長が抑制されており、Cadm1 変異タンパク質はシナプスマーカーと共局在する割合が少なく、シナプス障害が起こっている (Cell Death Disease 2010)。Neuroigin-3 (R451C) 変異についても同様に、小胞体ストレスが誘導され、CHOP の発現増大が観察された。すなわち、自閉性障害では、シナプス障害が起こっていることが示唆される。Cadm1 は分子層のプルキンエ細胞の樹状突起の端に発現しており、Cadm1-KO マウスではグルタミン酸作動性神経のマーカーである vesicular glutamate transporter 1 (vGluT1) の発現が減少した。この現象は、Foxp2KI マウスと同じであり、Cadm1 の発現している小脳 (プルキンエ細胞) が超音波音声に関与していることを示唆した (PLOS ONE 2012)。また、CADM1 と同様に C 端に PDZ 結合領域を持つシナプス蛋白 CNTNAP2 が、Foxp2 (言語障害を持つ KE 家系で変異が見出されている) に関与している超音波音声コミュニケーションに関わっていることを明らかにした (Neurosci. Lett. 2012)。シナプス後膜では NLGN が PSD95 に結合し膜輸送されるのに対し、Cadm1 が結合する Scaffold 蛋白や受容体についてはこれまで不明であった。本研究により、Cadm1 が PSD95 に結合せず、Multi-PDZ domain protein 1 (Muppl) に結合することを明らかにした (JNC, 2012)。Muppl は 13 個の PDZ を有し、PDZ13 で SynGAP

や GABBR2 と PDZ10 ではセロトニン受容体 (5-HT2R) に結合する (PLOS ONE, 2012)。このように、Cadm1 は Mupp1 を介して種々の受容体と複合体を形成しており、複合体の形成機能障害が ASD の分子病態に関与していると考えられる。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線) [雑誌論文] (計 6 件) 査読あり。

- ① Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum. *J Neurochem*. 2012;123(5):886-894
- ② Fujita E, Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *PLOS ONE*, 2012;7(1):e30151.
- ③ Fujita E, Tanabe Y, Momoi MY, Momoi T. Cntnap2 expression in the cerebellum of Foxp2(R552H) mice, with a mutation related to speech-language disorder. *Neurosci Lett*. 2012;506(2):277-280.
- ④ Maekawa M, Ito C, Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Fujita E, Momoi T, Toshimori K. Localisation of RA175 (Cadm1), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, in the mouse testis, and analysis of male infertility in the RA175-deficient mouse. *Andrologia*. 2011;43(3):180-188.
- ⑤ Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 396 (3): 703-708.
- ⑥ Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Zhiling Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T. Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1. *Cell Death Dis*. 2010; 1: e47.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 神保恵理子、小島華林、田辺裕子、山形崇倫、桃井真里子、桃井隆：自閉性障害に関与するシナプス接着因子 Cadm1 と

Multiple PDZ domain protein(Mupp1)の関与、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋

- ② 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子；自閉性障害候補遺伝子 CADM1 ノックアウトマウスにおける超音波音声、第 34 回日本神経科学大会年会、2011 年 9 月 15 日、横浜
- ③ 藤田恵理子、田辺裕子、桃井隆、桃井真里子；Catnap2 expression in the cerebellum of the Foxp2(R552H) mice, with mutation related to the speech-language disorder、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、横浜
- ④ Tanabe Y, Fujiwara Y, Fujita E, Kasahara T, Yuasa S, Momoi T ; The temporal expression and cytoplasmic localization of the novel Foxp2 isoform lacking forkhead domain in the developing Purkinje cells, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会大会、第 83 回日本生化学会大会合同大会)、2010 年 12 月 8 日、神戸
- ⑤ 藤田恵理子、代紅梅、田辺裕子、Yu Zhiling、山形崇倫、宮川拓也、田野倉優、桃井真里子、桃井隆、自閉性障害における Cadm1 遺伝子変異に誘導される小胞体ストレス、Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会合同大会)、2010 年 9 月 1 日、神戸

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他] なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

桃井 隆 (Takashi Momoi)
国際医療福祉大学・保健医療学部・教授
研究者番号：40143507

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし