

平成23年4月4日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700421

研究課題名(和文)

自閉症に関連する遺伝子CAPS2の有芯小胞分泌における役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of CAPS2 gene function

研究代表者

定方 哲史 (SADAKATA TETSUSHI)

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： 90391961

研究成果の概要(和文)：

CAPSタンパク質が有芯小胞分泌のどのステップに関与するかを詳細に検討した。その結果、以下のことが分かってきた。

(1) CAPSはPHドメインを介してGolgi体膜に結合する。(2) CAPSとPHドメインの結合性はC2ドメインによって制御されている。(3) CAPSはクラスII ARFタンパク質 (ARF4, ARF5) のN末に結合する。(4) CAPSはGDP結合型のARFに結合する。(5) CAPSとARFの結合をブロックした場合、有芯小胞マーカータンパク質であるクロモグラニンはゴルジ体へ集積する。(6) 同様のクロモグラニン集積はCAPSおよびARFをノックダウンした場合にも起こる。

以上より、CAPSタンパク質が有芯小胞の trafficking に関与するメカニズムが分かってきた。

研究成果の概要(英文)：

CAPS protein regulates exocytosis of catecholamine- or neuropeptide-containing dense-core vesicles (DCVs) at secretion sites such as nerve terminals. However, large amounts of CAPS protein are localized in the cell soma, and the role of somal CAPS protein remains unclear. We showed that somal CAPS1 plays an important role in dense-core vesicle (DCV) trafficking in the *trans*-Golgi network. The anti-CAPS1 antibody appeared to pull down membrane fractions, including many Golgi-associated proteins such as ADP-ribosylation factor (ARF) small GTPases. Biochemical analyses of the protein-protein interaction showed that CAPS1 interacted specifically with the class II ARF4/ARF5, but not with other classes of ARFs, via the pleckstrin homology (PH) domain in a GDP-bound ARF form-specific manner. The PH domain of CAPS1 showed high affinity for the Golgi membrane, thereby recruiting ARF4/ARF5 to the Golgi complex. These findings implicate a functional role for CAPS1 protein in regulating DCV trafficking 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
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：神経、分泌、自閉症

1. 研究開始当初の背景

脳ではグルタミン酸などの神経伝達物質は小型のシナプス小胞に貯蔵され、ペプチド性の神経伝達物質は、大型の有芯小胞に貯蔵されている。脳以外においては、膵臓のインスリンなどが有芯小胞に含まれている。どちらの小胞でも神経伝達物質は小胞膜と形質膜との融合による Ca^{2+} 依存的な開口放出によって放出されるが、シナプス小胞の開口放出機構が詳細に研究されているのに対し、有芯小胞の開口放出機構は殆ど分かっていなかった。

2. 研究の目的

CAPS ファミリータンパク質の構造機能相関、および有芯小胞トラフィッキングにおける CAPS 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し、有芯小胞がいかにしてゴルジ体から生まれるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質の結合は精製タンパク質を用い生化学的に解析した。細胞内局在に関しては、蛍光タンパク質をタグとして用いた。

4. 研究成果

CAPSタンパク質が有芯小胞分泌のどのステップに関与するかを詳細に検討した

。その結果、以下のことが分かってきた。

- (1) CAPSはPHドメインを介してGolgi体膜に結合する。
 - (2) CAPSとPHドメインの結合性はC2ドメインによって制御されている。
 - (3) CAPSはクラスII ARFタンパク質 (ARF4, ARF5) のN末に結合する。
 - (4) CAPSはGDP結合型のARFに結合する。
 - (5) CAPSとARFの結合性は Ca^{++} 濃度に依存する。
 - (6) CAPSとARFの結合をブロックした場合、有芯小胞マーカータンパク質であるクロモグラニンはゴルジ体へ集積する。
 - (7) 同様のクロモグラニン集積はCAPSおよびARFをノックダウンした場合にも起こる。
 - (8) CAPSをノックアウトした場合、神経細胞のゴルジ体の形態が異常になる。
- 以上より、CAPS タンパク質が有芯小胞のトラフィッキングに関与するメカニズムが分かってきた。

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5件)

① Yo Shinoda, Tetsushi Sadakata, Kazuhito Nakao, Ritsuko Katoh-Semba, Emi Kinameri, Asako Furuya, Yuchio Yanagawa, Hajime Hirase, and Teiichi Furuichi.

Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) promotes BDNF secretion and is critical for the development of GABAergic interneuron network.

Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 (1), p373-378 (2010) 査読有り

② Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Yukiko Sekine, Chihiro Saruta, Makoto Itakura, Masami

Takahashi, and Teiichi Furuichi.
Interaction of CAPS1 with the class II ARF
small GTPases is required for dense-core
vesicle trafficking in the *trans*-Golgi
network.

Journal of Biological Chemistry. 285(49),
p38710-38719 (2010) 査読有り

③Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi.
Ca²⁺-dependent activator protein for
secretion 2 and autistic-like phenotypes
Neuroscience Research. 67(3), p197-202
(2010) 査読有り

④Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi.
Response to the letter by Eran et al.
(Comment on "Autistic-like phenotypes in
Cadps2-knockout mice and aberrant *CADPS2*
splicing in autistic patients")
Journal of Clinical Investigation. 119(4),
p680-681 (2009). 査読有り

⑤Tetsushi Sadakata, Teiichi Furuichi.
Developmentally-regulated Ca²⁺-dependent
activator protein for secretion 2 (CAPS2)
is involved in BDNF secretion and is
associated with autism susceptibility.
Cerebellum. 8(3): 312-322 (2009). 査読
有り

[学会発表] (計8件)

①Tetsushi Sadakata
Autistic-like phenotypes in CAPS2
exon-skipped mice
XVIIIth World Congress on Psychiatric
Genetics, Oct 3-7, 2010, Athens, Greece

②定方 哲史

CAPS2 のエキソン3スキップマウスは自閉症様形
質を示す
Neuro 2010、2010年9月2-4日、神戸

③定方 哲史

CAPS2 による有芯小胞分泌と自閉症
第27回東北大学脳科学グローバルCOE若手フォー
ラム、2010年8月27日、仙台

④Tetsushi Sadakata

CAPS2 protein-mediated regulation of
dense-core vesicle secretion pathway and
susceptibility to developmental disorders
東北大学脳科学グローバルCOE・第3回脳神経科
学サマーリトリート、2010年7月31日、仙台

⑤Tetsushi Sadakata

CAPS and ARFs are associated with dense-core
vesicle biogenesis from the Golgi complex
The Japan-Korea Conference on Cellular
Signaling for Young Scientists, 2009年11月
24-26日、長崎

⑥Tetsushi Sadakata

CAPS1 とクラス II ARF はゴルジ体における有芯小
胞の生成に関わる
日本生化学会、2009年10月21-24日、神戸

⑦Tetsushi Sadakata

The functional role of CAPS family proteins in
dense-core vesicle trafficking
日本神経科学学会、2009年9月16-18日、名古屋

⑧Tetsushi Sadakata

ペプチドを含む有芯小胞はゴルジ体よりいかにし
て生まれるか？
日本神経内分泌学会、2009年9月4-5日、北九州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

定方 哲史 (SADAKATA TETSUSHI)
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
90391961

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者