

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700454

研究課題名（和文）CAPSファミリータンパク質の生体における役割の解明

研究課題名（英文）Analyses of the function of CAPS family proteins *in vivo*

研究代表者

定方 哲史（SADAKATA TETSUSHI）

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：90391961

研究成果の概要（和文）：我々は CAPS2 exon 3 スキップマウスを作製し、その行動解析により、様々な自閉症様行動を示すことが分かってきた。さらにこのマウスの解剖学的解析により、トラフィッキングの異常やゴルジ体の形態異常が示された。以上より、このマウスは自閉症モデルマウスとして有用であることが示された。

また、CAPS2 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、CAPS2 タンパク質は PH ドメインを介してゴルジ体膜に結合することや GDP 結合型のクラス II ARF タンパク質（ARF4, ARF5）の N 末端に結合することなどが分かってきた。以上より、CAPS2 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。

研究成果の概要（英文）：Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2 or CADPS2) potently promotes the release of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). A rare splicing form of CAPS2 with deletion of exon3 (dex3) was identified to be overrepresented in some patients with autism. Therefore, we generated Caps2-dex3 mice and verified a severe impairment in axonal Caps2-dex3 localization, contributing to a reduction in BDNF release from axons. In addition, circuit connectivity, measured by spine and interneuron density, was diminished globally. The collective effect of reduced axonal BDNF release during development was a striking and selective repertoire of deficits in social- and anxiety-related behaviors. Together, these findings represent the first mouse model of a molecular mechanism linking BDNF-mediated coordination of brain development to autism-related behaviors and patient genotype.

We found that somal CAPS2 is associated with the Golgi membrane, and mediates binding and recruitment of the GDP-bound form of ARF4 and ARF5 (members of the membrane trafficking small GTPase family) to the Golgi membrane. CAPS2 knockdown and over-expression of CAPS2-binding-deficient ARF4/5 both induced accumulation of the DCV resident protein chromogranin A (ChgA) around the Golgi apparatus. CAPS2 knockout mice have dilated trans-Golgi structures when viewed by electron microscopy. These results for CAPS2 strongly support our idea that the CAPS family proteins exert dual roles in DCV trafficking, mediating trafficking at both the secretion site for exocytosis and at the Golgi complex for biogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経化学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：CAPS、分泌、自閉症

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、三歳までに発病する精神疾患として知られ、“対人関係における障害”、“言語などによるコミュニケーションの障害”、“興味の限局、反復的で常同的な行動”を特徴とした疾患である。CAPS2 (official symbol は CADPS2) は、分泌顆粒の分泌に関与する CAPS1 のホモログとして、我々によって新規遺伝子としてクローニングされ、小脳において CAPS2 は BDNF の分泌に関与していることが明らかになった。CAPS2 遺伝子はヒト7番染色体長腕部にある自閉症責任領域 (AUTS1) に位置しているため、我々は作製した CAPS2 KO マウスの行動解析を行った。その結果、自閉症で見られるような様々な形質を示すことが明らかになった。そこで、ヒト自閉症患者の血中における CAPS2 の発現を解析したところ、自閉症患者特異的に CAPS2 の exon3 がスキップしていることが分かった。この exon3 がスキップした欠損型 CAPS2 は、シナプス部に輸送されなくなるなどが判明した。これらの結果から、欠損型 CAPS2 の発現によって BDNF の局所的分泌が異常になり、これが神経ネットワークの形成異常につながる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

自閉症患者特異的に CAPS2 の exon 3 skipping が見られたため、我々は CAPS2 exon 3 skipping マウスを作製した。このマウスに関しては、行動実験を中心に展開する一方、自閉症様形質を発症するメカニズムについても、生化学・解剖・生理学的レベルで検討する。

我々は自閉症を、広い意味で分泌顆粒の分泌異常により発症する病気と捉えている。CAPS2 KO マウスが自閉症様の様々な形質を示すが、CAPS2 タンパク質が欠失することで実際にどの分泌ステップが異常を来しているのかを捉えることを考えている。さらに、酵母 Two Hybrid 解析や免疫共沈、質量分析等により結合タンパク質を同定し、細胞内での役割を明らかにする

3. 研究の方法

平成23年度は、各種遺伝子改変マウスの基礎的解析を中心に行う。また、CAPS2 の

各ドメインの構造機能相関やゲノム上の CAPS2 遺伝子を解析して、自閉症様形質を引き起こす CAPS2 タンパク質の機能変化について統合的に明らかにする。

平成24年度では、放出部位およびそれ以外での CAPS2 の細胞内分布とその動態、また分泌小胞の生成・調節性と構成性の分泌小胞への分別及び突起輸送・調節性と構成性の開口放出の各プロセスにおける CAPS の役割について解析する。

4. 研究成果

研究成果の概要 (和文) : CAPS2 exon 3 スキップマウスの行動解析により、様々な自閉症様行動を示すことが分かってきた。以下は野生型マウスと比較した場合における exon 3 スキップマウスの形質である。

- オープンフィールドにおいて、新奇物体を置いたときに、行動量の低下や、新奇物体への接触の低下が見られた。
 - 高架式十字迷路において、不安が高進していた。
 - 回転かごにおいて、恒暗状態ではサーカディアンリズムが消失するケースが見られた。
 - オープンフィールドを用いた社会性相互作用テストにおいて、社会性相互作用の低下が見られた。
 - 母マウスの哺育行動に異常が見られた。
- さらにこのマウスの解剖学的解析により、BDNF やクロモグラニンのトラフィッキングの異常やゴルジ体の形態異常が示された。電気生理学的解析においては、paired-pulse facilitation に異常が見られた。以上より、このマウスは自閉症モデルマウスとして有用であることが示された。

以上の結果は、Sadakata et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. (2013)にて報告した。

CAPS2 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。

- CAPS2 タンパク質は PH ドメインを介してゴルジ体膜に結合し、その結合性は C2 ドメインによって制御されている。
- CAPS2 タンパク質は GDP 結合型のクラス II ARF タンパク質 (ARF4, ARF5) のN末端に結合する。
- CAPS2 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に集積する。

●同様のクロモグラニン集積は CAPS2 および ARF をノックダウンした場合にも起こる。
●CAPS2 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、CAPS2 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。
以上の結果は、Sadakata et al., *FEBS J.* (2012)にて報告した。

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3件)

- ① Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice.

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Yumi Sato, Chihiro Saruta, Hideki Miwa, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itohara, Teiichi Furuichi

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 109 (51), p21104-21109 (2013) 査読有

- ② Autistic-like behavioral phenotypes in a mouse model with copy number variation of the CAPS2/CADPS2 gene

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Megumi Oka, Yukiko Sekine, Teiichi Furuichi.

FEBS Letter. 587(1), p54-59 (2013) 査読有

- ③ Calcium-dependent activator protein for secretion 2 (CAPS2) interacts with the class II ARF small GTPases and regulates dense-core vesicle trafficking.

Tetsushi Sadakata, Yukiko Sekine, Megumi Oka, Makoto Itakura, Masami Takahashi, Teiichi Furuichi.

FEBS Journal. 279(3), p384-394 (2012) 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 「CAPS2 遺伝子異常による自閉症発症機序の解明」

定方哲史

(ポスター発表および一般口頭発表)

第85回日本生化学会大会、福岡、2012年12月16日

- ② 「CAPS2 の splicing 異常と自閉症」

定方哲史、古市貞一

(一般口頭発表)

平成24年度 日本生化学会関東支部例会、前橋、2012年6月23日

- ③ “Reduced axonal transport of a Cadps2 splice variant causes impaired BDNF-mediated brain circuit development and autism-related behavior in a mouse model”

Tetsushi Sadakata, Yo Shinoda, Yukiko Sekine, Megumi Oka, Yumi Sato, Mika Tanaka, Shigeyoshi Itohara, Shigeharu Wakana, and Teiichi Furuichi

(ポスター発表)

第二回国際放射線神経生物学会大会、前橋、2011年12月3日

[図書] (計3件)

- ① 「ゴルジ体における有芯小胞の生合成と CAPS タンパク質の役割」

定方哲史、篠田陽、古市貞一

生体の科学、p414-415、Vol.63、No.5 (増刊)、医学書院 (2012)

- ② 「自閉症の発症要因と動物モデル」

篠田陽、定方哲史、三島百合子、古市貞一

実験医学 (Experimental Medicine)、p236-241、Vol.30、No.2 (増刊)、羊土社 (2012)

- ③ 「自閉症感受性候補遺伝子 CAPS2/CADPS2 における遺伝子多型とノックアウトマウスの行動障害」

定方哲史、古市貞一

医学のあゆみ、p701-707、Vol.239、No.6 (増刊)、医歯薬出版株式会社 (2011)

[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
http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/tsadakata/tetsushi_sadakata.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

定方 哲史 (SADAKATA TETSUSHI)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教
研究者番号：90391961

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし