

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290026

研究課題名(和文)CAPSタンパク質による有芯小胞膜輸送経路の制御機構の研究

研究課題名(英文)Study on the regulatory mechanism of the CAPS protein-mediated trafficking pathway of dense-core vesicles

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) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：1) 自閉症で見つかったCAPS2の本来稀な選択的スプライシング亜型の発現増加は、小脳ニューロンの発達とシナプス生理の異常を発症することをマウスモデルで証明した。2) CAPS2が慢性ストレス負荷時のストレスホルモン応答やインスリン分泌に関与することを示唆した。3) CAPS1が低分子量GTPaseの一種であるセプチンのいくつかのサブタイプと特異的に相互作用することを示し、分泌小胞の細胞内輸送の新しい制御の可能性が示唆された。4) CAPS1が海馬CA1ニューロンにおいて分泌可能なシナプス小胞の制御に関わることを成体マウスの海馬で初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) We showed that expression of a rare alternative splicing subtype lacking exon3 causes impairments in development of cerebellar neurons as well as synaptic transmission at parallel fiber-Purkinje cell synapses. 2) We suggested that CAPS2 is involved in stress hormone response and insulin secretion in response to chronic stress. 3) We suggest that the interaction of CAPS1 with a small GTPase septin regulates the trafficking of secretory vesicles. 4) We showed that CAPS1 regulates stability of releasable synaptic vesicles at the active zone of hippocampal CA3-CA1 synapses.

研究分野：神経化学・神経科学

キーワード：有芯小胞 CAPSタンパク質 シナプス小胞 発達障害 開口放出

1. 研究開始当初の背景

古典的神経伝達物質とペプチド性神経伝達物質の分泌には、シナプス小胞 (SV) と有芯小胞 (DCV) による開口放出現象が関係する。二つの分泌小胞は、生合成、輸送、分泌部位、刺激依存性、量的放出などで共通点と相違点がある。シナプス小胞は、SNARE と呼ばれる膜融合関連タンパク質複合体の作用で、形質膜と融合して開口放出を起こし伝達物質を分泌する。一方、有芯小胞の開口放出は、細胞によって異なるが、プレシナプスのみならず、細胞体、樹状突起、および軸索のシナプス外においても起き、シナプス小胞ではたらく SNARE と類似した分子によって制御されると考えられているが、詳細な分子メカニズムは不明である。両分泌小胞は、容量や放出量、活性化の仕組みや Ca^{2+} 源、関係する SNARE タンパク質のサブタイプ等に違いがあると考えられるが、不明な点が多い。この様な背景から、有芯小胞による分泌メカニズムの解明が必要である。

2. 研究の目的

精神や神経の調節に重要な神経ペプチド (神経ペプチド Y, オキトシンなど) や生体アミン (カテコールアミンやセロトニンなど) は、有芯小胞の膜輸送経路によって分泌される。有芯小胞は、トランスゴルジ網で生合成された後に、分泌が起こる細胞局所へ輸送され、活動依存的に形質膜と融合して開口放出する。有芯小胞による調節的分泌は神経系に必須でありながら、その細胞内膜輸送のしくみはシナプス小胞に比してよくわかっていない。本研究では、有芯小胞分泌関連タンパク質 CAPS を基軸として、生細胞イメージングや遺伝子改変マウスの解析などにより、有芯小胞の生合成から分泌に至る分子メカニズムを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

本研究では、分泌関連タンパク質 CAPS1 と CAPS2 を基軸として有芯小胞膜輸送経路の分子メカニズムとその生理的意義を明らかにする。

- (1) 有芯小胞膜輸送経路による神経ペプチド、神経栄養因子、モノアミンなどの分泌動態メカニズムを蛍光イメージング解析する。
- (2) CAPS や分泌関連タンパク質の遺伝子改変マウスや siRNA ノックダウン細胞等を用いて、有芯小胞がもつ細胞生理から行動における役割を CAPS の変異や欠損の表現型から解析する。
- (3) CAPS相互作用タンパク質の同定と有芯小胞膜輸送経路における機能的役割を解析する。

4. 研究成果

(1) 小脳顆粒細胞の軸索におけるCAPS2機能の欠損は、小脳ニューロンの発達と機能を障害する： 自閉症患者で増加が見つかった

本来稀なexon3欠損型選択的スプライシングサブタイプ (deletion of exon3, 以下dex3と称す) を発現するモデルマウスにおける小脳での表現型を解析した。dex3タンパク質は小脳顆粒細胞の軸索 (平行線維と上行線維) には局在せず、BDNFやNT-3の軸索局所における輸送と分泌が低下した。また、小脳顆粒細胞の生後増殖と細胞移動の遅滞、虫部の低形成、平行線維—プルキンエ細胞間シナプスのアクティブゾーンから約300 nm以上離れた位置のシナプス小胞の増加と対パルス促進の減少などが示された。これらの結果から、dex3を異常に発現すると小脳の発達とシナプス機能に障害を生じることが明らかになった (PLoS ONE, 2014)。

(2) CAPS2 KOマウスは慢性ストレス負荷時のホルモン応答とインスリン分泌に異常を示す： 副腎皮質由来のステロイドホルモン・コルチコステロン (CORT) の慢性投与によって誘導される血清中のCORT、インスリンおよびレプチンの濃度の上昇が起きないことを示した。一方、CORT誘導の不安やうつ様症状を正常とほぼ同じく呈した。これらの結果から、慢性マイルドストレスによって誘導される内分泌応答にCAPS2が関与している可能性が示唆された。CAPS2はインスリン分泌を調節し糖尿病との関連が示唆されている。今回、CAPS2を欠損した遺伝子改変マウスでは慢性ストレス負荷時におけるインスリン分泌の低下に加えてストレスホルモン応答に異常がみられることが明らかとなった (Scientific Rep, 2015)。

(3) CAPS1 は低分子量 GTPase の一種であるセプチンと相互作用する： CAPS1 はシタキシン結合部位付近のC末端領域において低分子量 GTPase ファミリーの一つであるSeptin のタイプ 1, 2, 4, 6, 8 - 11 とタンパク質間相互作用、および細胞内共局在を示すことを明らかにした。このことから、分泌小胞の細胞内輸送と開口放出において CAPS1 - Septin の複合体とシタキシンの相互作用が関係することが示唆された (Neurosci. Lett., 2016)。

(4) CAPS1 は海馬シナプスにおける放出可能なシナプス小胞のアクティブゾーンにおける安定的な状態の制御に関与する： 海馬を含む前脳特異的な条件的 KO (cKO) を作製し、CAPS1 の成熟海馬神経回路におけるグルタミン酸シナプスの電気生理学的解析、微細形態解析、細胞イメージング解析を実施した。その結果、CAPS1 cKO ではシナプス伝達低下し、シナプス小胞が開口放出されずにプレシナプスにたまり、開口放出が起きるアクティブゾーン近傍に分布していることがわかった。これらのことから、CAPS1 は成熟海馬神経回路において、グルタミン酸シナプス伝達にも必須な機能的役割を果たすことが明らかになった (Scientific Rep, 2016)。

(5) CAPSによる有芯小胞の開口放出制御のイメージング解析： BDNFについては、海馬

培養ニューロンの軸索と樹状突起、シナプスとシナプス外部における局所的な分泌にCAPS2が関与すること示唆する実験データを得た。クロモグラニンAについては、pH感受性の橙色蛍光タンパク質mOrange-2を融合して神経細胞へ導入し、脱分極刺激依存的な分泌動態の可視化が可能になり、データを集積中である。脳内モルヒネ様ペプチド・ダイノルフィンの分泌を可視化する蛍光タンパク質を開発した。オキシトシンとバソプレシンについては開発中である。

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12件)

Hayashi K, Furuya A, Sakamaki Y, Akagi T, Shinoda Y, Sadakata T, Hashikawa T, Shimizu K, Minami H, Sano Y, Nakayama M, and Furuichi T. The brain-specific RasGEF very-KIND is required for normal dendritic growth in cerebellar granule cells and proper motor coordination. PLoS ONE 12(3):e0173175, 2017 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0173175
Sadakata, T., Shinoda, Y., Ishizaki, Y., and Furuichi, T. Analysis of gene expression in Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 (Cadps2) knockout cerebellum using GeneChip and KEGG pathways. Neurosci. Lett. 639: 88-93, 2017 査読有 doi.org/10.1016/j.neulet.2016.12.068
Yoshikawa, F., Sato, Y., Tohyama, K., Akagi, T., Furuse, T., Sadakata, T., Tanaka, M., Shinoda, Y., Hashikawa, T., Itoharu, S., Sano, Y., Ghandour, SM., Wakana, S., and Furuichi, T. Mammalian-specific central myelin protein Opalin is redundant for normal myelination: structural and behavioral assessments. PLoS ONE 11(11): e0166732, 2016 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0166732
Shinoda, Y., Nakajima, Y., Iguchi, H., Tatsumi, S., Kitaoka, M., Nakajima, M., Takahashi, T., Fujiwara, M., and Furuichi, T. Galacto-N-biose is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity in vitro. Eur. J. Pharmacol. 791: 711-717, 2016 査読有 doi:10.1016/j.ejphar.2016.10.010
Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Ishii, Y., Sano, Y., Iwasato, T., Itoharu, S., and Furuichi, T. CAPS1 stabilizes the state of readily releasable synaptic vesicles to fusion competence at CA3-CA1 synapses in adult hippocampus. Scientific Reports 6:31540, 2016 査読有 doi:10.1038/srep31540

Nakajima, Y., Iguchi, H., Kamisuki, S., Sugawara, F., Furuichi, T., Shinoda, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. J. Toxicol. Sci., 41:311-319, 2016 査読有 doi: 10.2131/jts.41.311
Hosono, M., Shinoda, Y., Hirano, T., Ishizaki, Y., Furuichi, T., Sadakata, T. Interaction of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 (CAPS1) with septin family proteins in mouse brain. Neurosci. Lett. 617: 232-235, 2016 査読有 doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.035
Mishima, Y., Shinoda, Y., Sadakata, T., Kojima, M., Wakana, S., and Furuichi, T. Lack of stress responses to long-term effects of corticosterone in Caps2 knockout mice. Scientific Reports 5:8932, 2015 査読有 doi: 10.1038/srep08932
Okamura-Oho, Y., Shimokawa, K., Nishimura, M., Takemoto, S., Sato, A., Furuichi, T., and Yokota, H. Broad integration of expression maps and co-expression networks compassing novel gene functions in the brain. Scientific Reports 4:6969, 2014 査読有 doi: 10.1038/srep06969
Sato, Y., Yoshikawa, F., Sadakata, T., Shinoda, Y., Koebis, M., and Furuichi, T. Age-dependent redistribution and hypersialylation of the central myelin paranodal loop membrane protein Opalin in the mouse brain. Neurosci. Lett. 581:14-19, 2014 査読有 doi: 10.1016/j.neulet.2014.08.017
Sadakata, T., Kakegawa, W., Shinoda, Y., Hosono, M., Katoh-Semba, R., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Ishizaki, Y., Yuzaki, M., Kojima, M., and Furuichi, T. Axonal localization of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 2 is critical for subcellular locality of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 release affecting proper development of postnatal mouse cerebellum. PLoS ONE 9(6):e99524, 2014 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0099524
Tanabe, K., Yamazaki, H., Inaguma, Y., Asada, A., Kimura, T., Takahashi, J., Taoka, M., Ohshima T., Furuichi, T., Isobe, T., Nagata, K., Shirao, T., and Hisanaga, S. Phosphorylation of Drebrin by cyclin-dependent kinase 5 and its role in neuronal migration. PLoS ONE 9(3): e92291, 2014 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0092291

[学会発表](計34件)

T. Furuichi. Databasing brain gene expression information. 4th INCF Japan

- Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Nodes Workshop. RIKEN Suzuki Umetero Hall, Wako, Japan. 2016年5月28日 ~ 5月29日
- T. Furuichi. Enhancing Brain Transcriptome Database by Neural Gene Ontology. 第39回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市・パシフィコ横浜. 2016年7月20日 ~ 7月22日
- Y. Ishii, C. Ishii, Y. Shinoda, Y. Sano, T. Furuichi. A deficiency of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion 1 affects hippocampal long-term potentiation. Society for Neuroscience, San Diego, CA, U.S.A., Nov. 12-16, 2016
- M. Wada, M. Ide, T. Atsumi, K. Yagishita, M., Katakai, Y., Shinoda, T. Furuichi, K., Kansaku. A rubber tail task in Ca²⁺-dependent activator protein for secretion (CAPS2) knockout mice. Society for Neuroscience, San Diego, CA, U.S.A., Nov. 12-16, 2016
- A. Sato, N. Munemura, Y. Sano, Y. Shinoda, T. Sadakata, N. Morita, M. Yuzaki, T. Inoue, M. Hashimoto, H. Ohwada, H. Nishibe, Y. Yamaguchi, T. Furuichi. Brain Transcriptome Database (BrainTx). 4th INCF Japan Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Nodes Workshop, RIKEN Suzuki Umetero Hall, Wako, Japan, 2016年5月28日 ~ 5月29日
- D. Miyamoto, H. Ikeno, Y. Okamura-Oho, Y. Okamura, N. Munemura, A. Sato, Y. Yamaguchi, R. Kanzaki, T. Furuichi. Parallelization of the registration method for ISH images into the 3D standard brain atlas. 4th INCF Japan Node International Workshop Advances in Neuroinformatics 2016 and 14th INCF Node Workshop. 2016年5月28日 ~ 5月29日
- Furuichi, T. Brain development transcriptome database and developmental disorder. The 15th China-Japan-Korea Joint Workshop on Neurobiology and Neuroinformatics (NBNI2015). Haeundae Centum Hotel, Pusan, Korea. Dec. 20-22, 2015
- Furuichi, T. The molecular mechanisms of brain development and disorders. INCF Neuroinformatics 2015. Pullman Cairns International, Cairns, Australia, Aug. 20~20, 2015
- Furuichi, T., Shinoda, Y., Sadakata, T. Animal models of autism spectrum disorders: CAPS2 is critical for proper brain development and social behavior, International Symposium of the Center for Animal Disease Models 2015, Gakushi Kaikan, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, Jul. 21, 2015
- 古市貞二. 遺伝子改変動物を用いた自閉症スペクトラム障害(ASD)の基礎研究. 第1回生物学的自閉症研究会, 東京都文京区・東大薬, 2015年3月14日
- 古市貞二. 脳神経科学分野のデータ共有と国際連携. 日本学会会議主催学術フォーラム「科学を変えるデータジャーナル-科学技術データの共有・再利用の新たなプラットフォーム構築に向けて-」. 東京都港区六本木・日本学会会議講堂, 2015年3月4日
- Shinoda, Y., Sato, A., Sadakata, T., Nishibe, H., Morita, N., Inoue, T., Yuzaki, M., Yamaguchi, Y. and Furuichi, T. Brain Transcriptome Database (BrainTx, formerly CDT-DB)-Profiling of spatio-temporal gene expression during postnatal development of mouse brain. Neuroinformatics 2015. Cairns, Australia. Aug. 20~22, 2015
- Minami, H., Yamaga, R., Shinoda, Y., Sakimura, K., Abe, M., and Furuichi, T. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月30日
- Katakai, M., Shinoda, Y., Christoph, S., and Furuichi, T. Possible involvement of the secretion-related protein CAPS2 in regulation of endogenous opioid, dynorphin secretion. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月30日
- Yagishita, K., Shinoda, Y., Senba, R., and Furuichi, T. Possible involvement of CAPS2 in environmental enrichment-dependent adult neurogenesis in mouse hippocampus. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月29日
- Hosaka, K., Shinoda, Y. and Furuichi, T. Expression and function of the mouse RasGEF1 family proteins. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月29日
- Sadakata, T. and Furuichi, T. Reduced axonal localization of a Caps2 splice variant impairs axonal release of BDNF and causes autistic-like behavior in mice. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・神戸コンベンションセンター. 2015年7月28日
- Shinoda, Y., Ishii, C., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Itoharu, S., Iwasato, T., and Furuichi, T. CAPS1 associates tethering of SVs on the synaptic plasma membrane. 第38回日本神経科学大会. 兵庫県神戸市・

- 神戸コンベンションセンター. 2015年7月28日
Shinoda, Y., Sadakata, T., Hirase, H., and Furuichi, T. CAPS2-The positive regulation factor of BDNF secretion and the candidate gene for autism. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日
Katakai, M., Shinoda, Y., and Furuichi, T. Possible involvement of the secretion-related protein CAPS2 in regulation of dynorphin, one of the endogenous opioids, secretion. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日
- 21 Hosaka, K., Shinoda, Y. and Furuichi, T. Function and expression of the mouse RasGEF1 family proteins. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月13日
- 22 Nakajima, Y., Shinoda, Y., and Furuichi, T. Dual imaging of SVs and DCVs exocytosis. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日
- 23 Minami, H., Yamaga, R., Shinoda, Y., Sakimura, K., Abe, M., and Furuichi, T. Conditional knockout and optogenetic study on the involvement of the secretion-related protein CAPS1 in oxytocin-associated social and maternal behavior. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日
- 24 Ishii, Y., Ishii, C., Shinoda, Y., Fukazawa, Y., Sadakata, T., Itohara, S., Iwasato, T., and Furuichi, T. CAPS1 stabilizes SVs docking state in hippocampal CA3-CA1 synapses. 第58回日本神経化学学会大会. 埼玉県さいたま市・大宮ソニックシティ. 2015年9月11日
- 25 古市貞一. マウス小脳をモデルとした生後期の脳発達と遺伝子発現. 第51回群馬大学脳神経発達統御学セミナー、第9回 ASRLD ユニット研究セミナー. 群馬県前橋市. 2014年12月5日
- 26 古市貞一. 自閉症スペクトラム障害関連の遺伝的な変異や多様性をもった動物モデル. 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会. 奈良県奈良市. 2014年9月30日 ~ 9月30日
- 27 T. Furuichi, Y. Sato, F. Yoshikawa, T. Sadakata, Y. Shinoda, M. Koebis. Age-dependent redistribution and hypersialylation of the central myelin loop membrane protein Opalin in the mouse brain. Neuroscience 2014, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., 2014年11月15日 ~ 11月19日
- 28 Y. Yamaguchi, S. Satoh, T. Iijima, r. Kanzaki, T. Furuichi, Y. Shinoda, S. Kakei, S. Masaki, H. Wagatsuma, T. Miyakawa, K. Takao, H. Ikeno, K. Tanaka, Y. Okamura-Oho, Y. Okumura, S. Kamakura, Y. Isono, Y. Morii, S. Suenaga, S. Usui. Tutorial contents on the INCF Japan Node platforms. Neuroscience 2014, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., 2014年11月15日 ~ 11月19日
- 29 M. Koebis, Y. Saito, Y. Shinoda, T. Furuichi. Brain-specific expression of lysosomal-associated membrane protein 5 (LAMP5) gene. Neuroscience 2014, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington D.C., U.S.A., 2014年11月15日 ~ 11月19日
- 30 定方哲史、篠田陽、古市貞一. BDNFの分泌と自閉症. 第36回日本生物学的精神医学会・第57回日本神経化学学会大会. 奈良県奈良市. 2014年10月1日 ~ 10月1日
- 31 柳下香織、篠田陽、古市貞一. 成体ニューロン新生におけるCAPS2の役割. 第37回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市. 2014年9月13日
- 32 齊藤新平、篠田陽、定方哲史、西岡朋生、貝淵弘三、古市貞一. 長期増強のシナプス特異性に寄与するプレシナプスタグの探求. 第37回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市. 2014年9月12日
- 33 中島柚依、篠田陽、古市貞一. シナプス小胞と有芯小胞における同時イメージング解析. 第37回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市. 2014年9月12日
- 34 古戎道則、齊藤由弦、篠田陽、古市貞一. 小脳におけるLAMP5の発現. 第37回日本神経科学大会. 神奈川県横浜市. 2014年9月11日
- 〔図書〕(計 0件)
- 〔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://www.lmn.bs.noda.tus.ac.jp/>

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