

## 自閉症関連遺伝子 *CAPS2* の解析

定方 哲史

### 1. 有芯小胞と CAPS

脳ではグルタミン酸やGABAなどのいわゆる古典的神経伝達物質は小型のシナプス小胞に貯蔵されている。一方、ペプチド性の神経伝達物質などは、電子顕微鏡でみると大型で、中に電子密度の高い物質を含有する有芯小胞に貯蔵されている。どちらの小胞でも神経伝達物質は小胞膜と形質膜との結合および融合を伴う、いわゆるCa<sup>2+</sup>依存的な開口放出機構によって放出される。

Ca<sup>2+</sup>-dependent activator protein for secretion (CAPS) は、有芯小胞と形質膜が融合する直前のプライミングと呼ばれるステップに関与することが最初に報告された<sup>1)</sup>。しかし、カテコールアミンやセロトニンの小胞への再取り込み<sup>2)</sup>やグルタミン酸含有シナプス小胞のプライミング<sup>3)</sup>に関わるという異なった役割が報告され、さらにこれらを否定する報告も相次いだ。一方、我々は、CAPSタンパク質がPH (pleckstrin homology) ドメインを介してゴルジ膜や低分子量GTPaseであるARFタンパク質に結合することから、ゴルジ体における有芯小胞の生合成に関与することを示唆した<sup>4,5)</sup>。CAPSファミリーが有芯小胞の分泌経路に関与することは確からしいが、その分子メカニズムの詳細については今後の研究が待たれる。

### 2. CAPS2とBDNF含有小胞

我々は小脳領域間で発現量に差がある新規遺伝子として*CAPS2*を同定した。*CAPS2*タンパク質は*CAPS1*タンパク質と同様に、C2ドメイン、PHドメイン、Munc13-1に相同性がある領域を持つ。*CAPS2*は*CAPS1*にアミノ酸レベルで70.4%の相同性がみられ、組織特異性としては*CAPS1*と相補的な発現パターンを示した<sup>6,7)</sup>。

*CAPS2*会合小胞に内包される物質を同定するために、

抗*CAPS2*抗体を用いて*CAPS2*に対して親和性を持つ小胞画分をマウス小脳より精製し、分泌性ペプチドの在否について抗体を用いて解析した。その結果、脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor : BDNF) が*CAPS2*会合小胞において陽性であった。

そこで我々は次に*CAPS2*がBDNFの分泌を促進する可能性を検討した。PC12細胞に*CAPS2*の全長タンパク質、*CAPS2*のC2ドメインとPHドメインだけを含むタンパク質、*CAPS2*のC2ドメインとPHドメインが欠失したタンパク質をBDNFと共発現させ、培地へ分泌されたBDNFをELISA法にて測定した。その結果、50mM KCl刺激による培地へのBDNFの分泌が、野生型*CAPS2*の発現により増強されることが明らかになった。この増強は欠失型*CAPS2*の発現では確認されなかった。また、EGTA存在下では、野生型*CAPS2*タンパク質によるBDNF分泌の増強は確認されなかった。このことから*CAPS2*はBDNFの活動依存的な分泌に関与することが明らかになった<sup>6)</sup>。

### 3. CAPS2 KO マウスの形質

我々は*CAPS2*と有芯小胞分泌の関連を*in vivo*にて解析すべく、*CAPS2*ノックアウト (KO) マウスを作製した<sup>8)</sup>。*CAPS2* KOマウス小脳の初代分散培養ではプルキンエ細胞数が正常に比べて減少し、この減少が培地にBDNFを添加すると回復することから、BDNFの分泌不全がプルキンエ細胞の生存に影響していることが示唆された。さらに、平行線維-プルキンエ細胞シナプスでは、シナプス前終末の形態異常とシナプス小胞の減少、分割したシナプス後肥厚部の増加が観察された。*CAPS2* KOマウスの大脳皮質や海馬においてもBDNF分泌活性が低下していた。幼若期におけるこれら二つの脳領域では、パルプアルブミン免疫陽性の抑制性介在ニューロン数の減少が観察され、BDNFの脳室内投与でその回復がみられた。

*CAPS2* KOマウスの行動形質には重度な障害は認められないが、詳細な行動解析からいくつか特徴的な障害が判明した。まず、6日間の自発活動による水平運動量を測定すると、*CAPS2* KOマウスは野生型に比べて多動の傾向を示した。また、同じケージで飼育したことのない2匹の雄マウスをテスト箱に入れて相互交渉 (接近して嗅ぎあったり、接触したりする行動) の頻度を比較すると、KOで有

群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット (〒371-8511 前橋市昭和町3-39-22)

Analysis of autism-related gene *CAPS2*

Tetsushi Sadakata (Advanced Scientific Research Leaders Development Unit, Gunma University, 3-39-22 Showa-machi, Maebashi, Gunma 371-8511, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880501

© 2016 公益社団法人日本生化学会

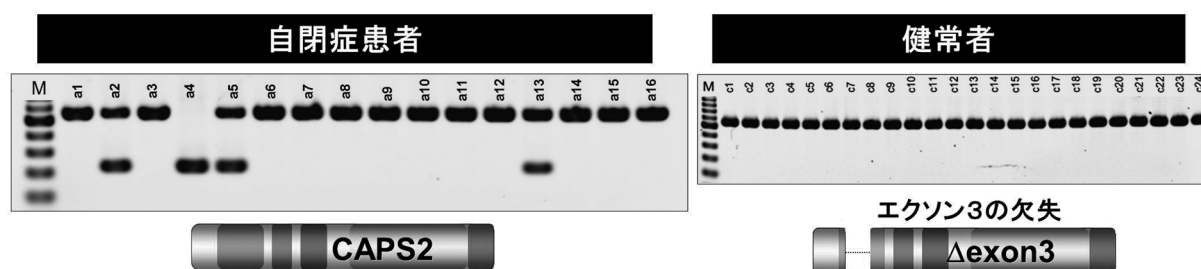


図1 自閉症患者特異的に同定されたCAPS2のエクソン3スキップ  
一部の患者からエクソン3配列のみをスキップするCAPS2の異常なスプライシングバリエントが同定されたが、健常者では見つからなかった。

意な低下がみられた。この結果は、このマウスにおける社会性の異常を示唆している。オープンフィールドの中央位置に見慣れない物体を設置した新奇環境では、CAPS2 KOマウスの行動量が有意に低下し、物体への接触回数も著減したため、新奇環境における不安の亢進が示唆された。CAPS2 KOマウスの解析結果は、自閉症を特徴づける行動障害との類似性を暗示し、自閉症に関する解析へとつながった。

#### 4. 自閉症と遺伝子

自閉症は、3歳ごろまでに診断される発達障害であり、“対人関係やコミュニケーション能力の障害”、“興味の限局と反復的で常同的な行動”を特徴とする。一卵性双生児で両方が自閉症を発症する一致率は高く（70～90%）、発端者の同胞が一般人口よりも約25倍高い危険性を示すことなどから、自閉症には遺伝素因が深く関わっていると考えられている。これまでに自閉症と関連する候補遺伝子は多数報告されているが、シナプスや神経回路の発達や機能発現に関連する遺伝子が多い。たとえば、シナプス後肥厚部（postsynaptic density：PSD）に存在するシナプス接着因子のニューロリジン3（遺伝子名NLGN3：染色体と位置Xq13.1）とニューロリジン4（NLGN4X：Xp22）、そのシナプス前部側の結合相手となる接着因子のニューレキシン1（NRXN1：2p16.3）、PSDの足場タンパク質シャンク3（SHANK3：22q13.3）、GABA<sub>A</sub>受容体β3サブユニット（GABRB3：15q12）、ユビキチンタンパク質リガーゼE3A（UBE3A：15q11.2）、ニューレキシンファミリーのコンタクチン関連タンパク質様タンパク質2（CNTNAP2：7q35）、ニューロンの細胞移動と配置に関係する分泌タンパク質リリーリン（RELN：7q22）などがある。また、自閉症患者家族のゲノムワイドな連鎖解析から、染色体微小領域の欠失や重複による*de novo*コピー数多型（copy number variation：CNV）が孤発例の患者で有意に高いことが示されている。しかし、これまでに報告されたいずれの遺伝子変異も自閉症患者全体の数%程度（もしくはそれ以下）の原因

でしかない。現在最も説得力があるのは、相互に関係する複数の遺伝子の変異の組み合わせで自閉症の感受性が高まるとする説明である。

#### 5. 自閉症におけるCAPS2遺伝子の異常

ヒト7番染色体長腕部にあるCAPS2遺伝子（7q31.32）は自閉症感受性領域（AUTS1：7q31-33）に位置している。この付近の微小欠失や重複による*de novo* CNVが複数の自閉症患者から見つかっている。CAPS2 KOマウスが自閉症の特徴を暗示させる表現型を持つことから、我々は自閉症とCAPS2の関連性に着目して解析を行った。

##### i) 自閉症特有の非同義的SNP

自閉症患者（252人）と健常者のゲノムDNAを用いてCAPS2遺伝子（全28エクソン）の塩基配列の比較を行った結果、患者に特異的な非同義的一塩基多型（SNP）を7か所同定した<sup>9)</sup>。機能などへの影響は解析中である。

##### ii) 自閉症におけるエクソン3をスキップする選択的スプライシングの増加

ヒト末梢血から好塩基球に発現しているCAPS2 mRNAを検出する方法を確立し、自閉症におけるCAPS2 mRNAの解析を行った。その結果、一部の患者からエクソン3配列のみをスキップ（欠失）する異常なスプライシングバリエントを見いだした（図1）<sup>9)</sup>。一卵性双生児の両方が自閉症でエクソン3スキップ型のCAPS2 mRNAを示すケースも観察された。

##### iii) エクソン3スキップ型CAPS2の軸索輸送の欠損

その後、CAPS2のエクソン3配列を含む周辺は軸索輸送に関与するDynactin1/p150<sup>Glued</sup>タンパク質との結合に関与することが明らかになった。エクソン3スキップ型を大脳や小脳の初代培養ニューロンに発現させると、細胞体と樹状突起のみに分布して軸索に輸送されないことから、エクソン3スキップ型が増えるとシナプス前終末からの局所分

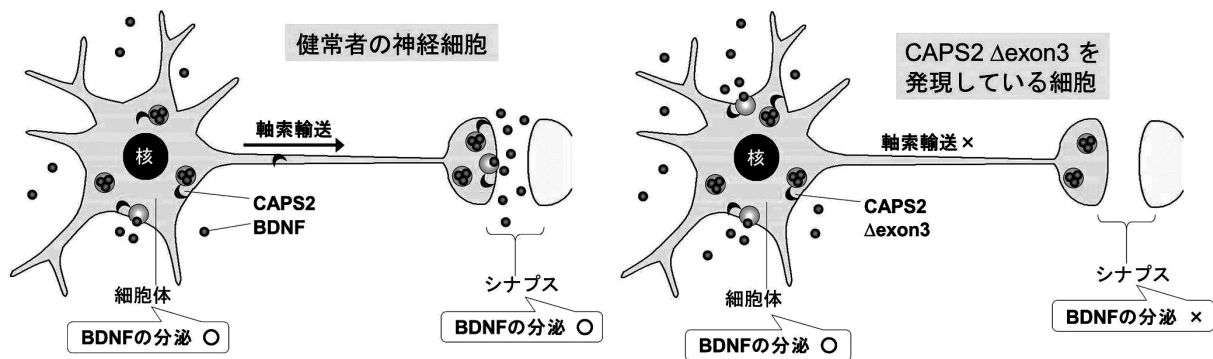


図2 エクソン3スキップ型CAPS2によるBDNFの分泌異常

健康者の神経細胞においてCAPS2タンパク質はBDNFを含む小胞に結合し、BDNFの分泌を促進する。正常なCAPS2タンパク質はシナプス前部に運ばれ、BDNFはシナプスで分泌される。これに対し、エクソン3スキップ型CAPS2 (CAPS2  $\Delta$ exon 3) は軸索輸送されないため、BDNFはシナプスではほとんど分泌されない。

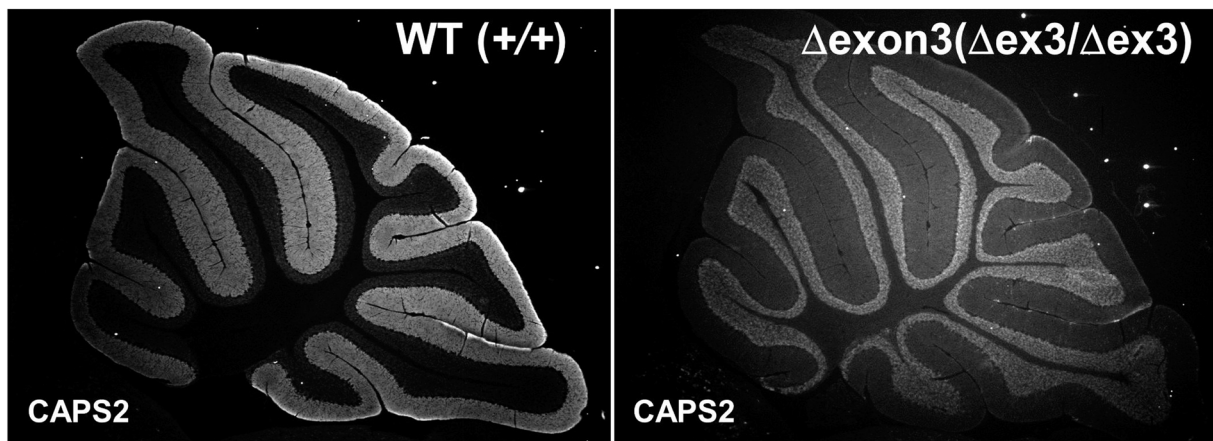


図3 CAPS2  $\Delta$ exon 3 マウスにおけるCAPS2タンパク質の輸送の異常

顆粒細胞で発現するCAPS2タンパク質は、野生型マウスの小脳(左)においては軸索に輸送され、分子層に局在するが、CAPS2  $\Delta$ exon 3 マウス(右)においては軸索輸送されずに細胞体にとどまるため、内顆粒層が染色される。

泌が減少することが示唆された。

BDNFはシナプスの発達と可塑性、神経回路の形成と機能を調節し、記憶・学習などの高次脳機能に関与することが知られており、分泌量の変化と精神疾患との関連性が示唆されている。エクソン3スキップ型CAPS2が増加すると、BDNFの分泌パターン(軸索vs樹状突起や細胞体)がかく乱され、神経回路の形成と機能発現が異常になる可能性が考えられる(図2)。我々は、エクソン3スキップによってCAPS2によるBDNFの分泌パターンが異常になると脳の発達障害のリスクを高めるという仮説を立てた。エクソン3スキップがなぜ起こるのかについては、シスとトランス作用の遺伝要因やエピジェネティクスによる非遺伝要因の可能性もあり、解明すべき課題である。

## 6. CAPS2 $\Delta$ exon 3 マウスの自閉症様形質

我々はこの仮説を検証すべくCAPS2のエクソン3のみが

スキップを起こす自閉症モデルマウス(CAPS2  $\Delta$ exon 3 マウス)を作製した<sup>10)</sup>。この変異マウスは、一部の自閉症患者で見いだされた111アミノ酸残基が短い異常なCAPS2タンパク質を発現する。このモデルマウスを解析することで、短いCAPS2亜型は、大脳皮質、海馬、小脳皮質の神経回路において、神経軸索の投射領域にはほとんど分布せず、細胞体あるいは樹状突起にほぼ限局して存在し(図3)、軸索やシナプス前部におけるBDNFの分泌が低下することが明らかになった<sup>10)</sup>。また、興奮性シナプスの形態や一部の抑制性ニューロンの分化などに影響が観察された。これらの結果から、CAPS2はニューロンにおける軸索、樹状突起、細胞体からのBDNFの局所的な分泌に必須であることがわかってきた。すなわち、111アミノ酸残基を欠失した短い異常なCAPS2タンパク質の発現増加は、BDNFの分泌パターンを異常にすることが明らかとなった。

このマウスに関して、自閉症に関連する社会行動などに



ついて以下の解析を行った。

#### i) 社会的相互作用テスト

同じケージで飼育したことのない2匹の雄マウスをテストケージに入れ、マウスの社会的相互作用を評価した。CAPS2遺伝子改変マウスは、相互作用の時間に有意な低下がみられた。また、初見のマウスや既知のマウスに関係なく、相互作用が減少した。このことから、変異マウスには社会的な相互作用に障害があることが明らかになった。

#### ii) 養育行動テスト

母親マウスの自ら出産した仔マウスへの養育行動を調べた。変異を持つ母親マウスは子育てを放棄する割合が高く、養育行動に障害があることが示された。

#### iii) 不安行動テスト

高架式の十字迷路（高所に設置した十字路のうち、一方の通路には塀があり、他方向の通路には塀がなく下が見える）にマウスを入れたとき、変異マウスは、野生型マウスに比べて（不安をより感じる）塀のない通路への進入率が低い傾向があった。このことから、変異マウスは不安行動の亢進があることがわかった。

#### iv) 新奇環境への適応テスト

オープンフィールド内に見慣れない新奇の物体を設置した際に、マウスが示す探索行動や、新奇物体への接触回数を調べた。この結果、変異マウスは行動量が有意に減少し、新奇物体への接触を避ける傾向を示した。このことから、変異マウスは新奇性の高い環境下での適応性の低下があることがわかった。

また、変異マウスは、サーカディアン・リズムの異常や、母子分離時の変異仔マウスでの超音波領域における発声の低下もみられた。なお、変異マウスは、通常の飼育環境下での視覚、嗅覚、聴覚の基本的な感覚機能は正常であった。

以上の変異マウスの行動解析結果から、CAPS2による分泌制御は社会行動や不安などに関係しており、エクソン3スキップ型CAPS2の発現増加は、自閉症でみられるような社会的相互作用の低下、未知の環境への適応力の低下、不安の増大などの行動障害を示すことが明らかになった。

これらの結果から、異常なCAPS2の発現によってBDNFの局所的分泌パターンが異常になり、これが神経ネットワークの形成異常につながり、自閉症様の症状をもたらす可能性が示唆された（図2）<sup>10, 11)</sup>。

## 7. CAPS2 タンパク質量の減少と自閉症

我々がCAPS2遺伝子と自閉症との関連を最初に報告した後、複数の自閉症患者からCAPS2遺伝子を含む非常に狭い領域が片方の染色体で欠失している例が見つかってきた<sup>12, 13)</sup>。野生型マウスとCAPS2ヘテロマウスにおける脳のCAPS2タンパク質量を比較したところ、後者で半減していることがわかった。このCAPS2ヘテロマウスの解析を行ったところ、社会性行動の異常や新奇性の高い環境への適応低下といった一部の自閉症様行動がみられることが明らかになった。このことからCAPS2タンパク質の減少も一部の自閉症の症状の原因となることが示唆された<sup>14)</sup>。

## 8. おわりに

自閉症の感受性には、複数の遺伝要因が組み合わさって関与していると考えられている。我々は、CAPS2のエクソン3スキップ、SNP、CNVなどによって、局所的な有芯小胞分泌促進作用が欠損すると脳の発達障害のリスクを高めるという仮説を提唱している。CAPS2がBDNFの他にカテコールアミンや神経ペプチドの分泌にどれだけ寄与するかについては現在解析中である。将来、CAPS2を軸とした高精度・高感度の生化学的な簡易検査法が確立されれば、自閉症の早期診断と、療育や対症療法の早期開始に貢献できると考え、この方面での研究も展開している。

## 謝辞

本稿で紹介した研究成果は、多くの共同研究者と研究室スタッフの協力と支援により得られました。ここで全員の名前をあげることはできませんが、あらためて心より感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Grishanin, R.N., Kowalchuk, J.A., Klenchin, V.A., Ann, K., Earles, C.A., Chapman, E.R., Gerona, R.R., & Martin, T.F. (2004) *Neuron*, **43**, 551–562.
- 2) Speidel, D., Bruederle, C.E., Enk, C., Voets, T., Varoqueaux, F., Reim, K., Becherer, U., Fornai, F., Ruggieri, S., Holighaus, Y., Weihe, E., Bruns, D., Brose, N., & Rettig, J. (2005) *Neuron*, **46**, 75–88.
- 3) Jockusch, W.J., Speidel, D., Sigler, A., Sørensen, J.B., Varoqueaux, F., Rhee, J.S., & Brose, N. (2007) *Cell*, **131**, 796–808.
- 4) Sadakata, T., Shinoda, Y., Sekine, Y., Saruta, C., Itakura, M., Takahashi, M., & Furuichi, T. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 38710–38719.
- 5) Sadakata, T., Sekine, Y., Oka, M., Itakura, M., Takahashi, M., & Furuichi, T. (2012) *FEBS J.*, **279**, 384–394.
- 6) Sadakata, T., Mizoguchi, A., Sato, Y., Katoh-Semba, R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., & Furuichi, T. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 43–52.
- 7) Sadakata, T., Itakura, M., Kozaki, S., Sekine, Y., Takahashi, M.,

- & Furuichi, T. (2006) *J. Comp. Neurol.*, **495**, 735–753.
- 8) Sadakata, T., Kakegawa, W., Mizoguchi, A., Washida, M., Katoh-Semba, R., Shutoh, F., Okamoto, T., Nakashima, H., Kimura, K., Tanaka, M., Sekine, Y., Itoharu, S., Yuzaki, M., Nagao, S., & Furuichi, T. (2007) *J. Neurosci.*, **27**, 2472–2482.
  - 9) Sadakata, T., Washida, M., Iwayama, Y., Shoji, S., Sato, Y., Ohkura, T., Katoh-Semba, R., Nakajima, M., Sekine, Y., Tanaka, M., Nakamura, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Mori, N., Detera-Wadleigh, S.D., Ichikawa, H., Itoharu, S., Yoshikawa, T., & Furuichi, T. (2007) *J. Clin. Invest.*, **117**, 931–943.
  - 10) Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Miwa, H., Tanaka, M., Itoharu, S., & Furuichi, T. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 21104–21109.
  - 11) Sadakata, T., Kakegawa, W., Shinoda, Y., Hosono, M., Katoh-Semba, R., Sekine, Y., Sato, Y., Saruta, C., Ishizaki, Y., Yuzaki, M., Kojima, M., & Furuichi, T. (2014) *PLoS ONE*, **9**, e99524.
  - 12) Autism Genome Project Consortium, Szatmari, P., *et al.* (2007) *Nat. Genet.*, **39**, 319–328.
  - 13) Christian, S.L., Brune, C.W., Sudi, J., Kumar, R.A., Liu, S., Karamohamed, S., Badner, J.A., Matsui, S., Conroy, J., McQuaid, D., Gergel, J., Hatchwell, E., Gilliam, T.C., Gershon, E.S., Nowak, N.J., Dobyns, W.B., & Cook, E.H. Jr. (2008) *Biol. Psychiatry*, **63**, 1111–1117.
  - 14) Sadakata, T., Shinoda, Y., Oka, M., Sekine, Y., & Furuichi, T. (2013) *FEBS Lett.*, **587**, 54–59.

## 著者寸描

### ●定方 哲史 (さだかた てつし)



群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット講師。医学博士。

■略歴 2004年東京大学大学院医学系研究科博士課程脳神経医学専攻修了。同年理化学研究所脳科学総合研究センター分子神経形成研究チーム研究員。07年理化学研究所同基礎科学特別研究員。11年群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット助教 (テニュアトラック)。15年より現

職。

■研究テーマと抱負 分泌と疾患をテーマに基礎研究を行っている。再現性のある本質的な研究を行うことを心がけている。

■ウェブサイト [http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/tsadakata/tetsushi\\_sadakata.html](http://asrldu.dept.med.gunma-u.ac.jp/tsadakata/tetsushi_sadakata.html)

■趣味 バレーボール。