

自閉症関連タンパク質 Hevin/Sparcl1 変異体の機能解析

菊川 潤音（筑波大学生物学類） 指導教員：鶴田 文憲（筑波大学 生命環境系）

【背景と目的】

自閉症スペクトラム症候群（ASD）は、コミュニケーション・対人関係における困難さや限局した興味・反復行動が見られる神経発達障害である。ASD 責任遺伝子として知られる Sparcl1 遺伝子は、細胞外マトリクスを構成する分泌タンパク質 Hevin をコードしており、リスク要因となる点変異が 12 種類報告されている。

Hevin はシナプス形成を増強することが知られており、N 末端の紐状の酸性ドメイン [amino acid(a.a.) 17-429]と C 末端の粒状構造にある FS ドメイン(a.a. 430-510)、EC ドメイン(a.a. 511-664)によって構成されている。FS ドメインはシナプス形成増強の際にシナプス前膜や後膜のタンパク質と相互作用することが知られている。EC ドメインはカルシウムイオン結合構造をとる EF ハンドモチーフを 2 つ(a.a. 586-618, 625-651)含有するドメインである。

これまでに当研究室では、報告された変異体の一つである W647R 変異の影響を培養細胞において検証し、W647R と相同なアミノ酸配列に同様な変異の入ったマウスタンパク質では、構造異常により小胞体ストレスが引き起こされることを突き止めている。一方で、他の Hevin 変異体における ASD の発症メカニズムは未検証である。また、ヒトとマウスの Hevin タンパク質のアミノ酸レベル相同性は 53%であるため、一塩基置換変異体の詳細なメカニズム解明にはヒトのタンパク質を用いた解析が必要である。

本研究では、それぞれのヒト Hevin 変異体における ASD 発症の分子メカニズムに着目し、それぞれの特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. プラスミド構築

既存のヒト由来 Sparcl1 プラスミドに見られた二ヶ所の Natural Variant (c146a, c316g)の塩基置換に修正を加えるプライマーを作成した。これを用いて二ヶ所の Natural Variant に挟まれた配列を PCR により増幅し、アガロースゲル電気泳動後に Gilbert 法で精製し、Slice 法によって Ligation した。得られたプラスミドに対し、報告された点変異を加えるプライマーを作成した。その後、インバース PCR によりプラスミド全長を増幅し、Slice 法を用いて自閉症関連 Sparcl1 変異プラスミドを作成した。

2. ウェスタンブロッティング

SDS-PAGE 及び Native-PAGE により、作製したサンプル中のタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した。その後、PVDF 膜を 5%スキムミルク/TBS-T で blocking し、5%BSA/TBS-T で希釈した抗 hHevin 抗体、抗 Bip 抗体、抗 Tubulin 抗体を用いて 4℃で一晩反応させた。一次抗体反応後、TBS-T で洗浄し、5%スキムミルク/TBS-T で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。HRP 標識二次抗体反応後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

3. qPCR

4 週齢の野生型 (Sparcl1^{+/+}) マウスと Hetero 変異型(Sparcl1^{ΔEF/+})マウスそれぞれの前頭前野皮質から total-RNA を ISOGEN II (Nippongene)を用いて抽出し、RevaTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO)を用いて逆転写を行った。その後 SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いて Real-Time PCR System (Applied Biosystems, QuantStudio1) で反応させ、5S をインターナルコントロールとして Bip, Chop の mRNA の発現を定量した。

4. 行動実験 (Marble Burying test)

2 ヶ月齢の Sparcl1^{+/+} と Sparcl1^{ΔEF/+}マウスそれぞれに対し実験用フィールドで Habituation を 20 分間行った。その後、同一フィールドの床敷上に 15 個のビー玉を横 3 行、縦 5 列で等間隔に配置し、マウスに自由に行動を取らせた。その後 2/3 以上が床敷に埋められたビー玉をカウントした。

【結果・考察】

ASD リスク因子である変異体の分子特性を確認するために、作成したヒト Hevin 変異体 [E51 stop codon, S240C, T461I, N476S, H610Y, P651frame shift(fs)]を HEK293T 培養細胞に発現させ、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、HevinP651fsを発現させた細胞においてのみ小胞体ストレスマーカーである Bip タンパク質の存在量上昇が認められた。この変異体は、先行研究において解析されたマウス由来 W647R 同様、C 末端側に存在するアミノ酸の変異体である。このことから、自閉症責任変異のうち小胞体ストレスを引き起こすものはアミノ酸配列の C 末端に集中していることが示唆された。特に、両者は共通して二つ目の EF ハンドモチーフ内部、及びそれ以降のアミノ酸配列を変化させていることから、EF ハンドモチーフの小胞体ストレスへの関与が示唆された。

EF ハンドモチーフの小胞体ストレス及び自閉症発症への影響を検証するため、一つ目の EF ハンドモチーフ以降の配列が欠落した Sparcl1^{ΔEF/+}マウスを用い、行動実験と前頭前野皮質の qPCR を行った。その結果、行動実験では自閉症様行動は認められず、qPCR でも小胞体ストレスマーカー (Bip, Chop) の上昇は認められなかった。これらのことから、特に二つ目の EF ハンドモチーフ以降に生じた変異が小胞体ストレスを誘導しうることがわかった。また、それ自体の欠損が直ちに小胞体ストレスの発生や自閉症の発症につながるわけではないことが示唆された。今後は、小胞体ストレスを引き起こす変異において Hevin の構造・性質がどの様に変化するのか、また、そのほかの変異についてどの様な経路で自閉症発症に至っているのかを解明していきたい。