

201027121A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらす
シナプス機能障害と小胞体ストレス誘導
についての研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成23(2011)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業
(精神障害分野)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらす
シナプス機能障害と小胞体ストレス誘導
についての研究

平成22年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成23(2011)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

(研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況、健康危険情報を含む)

自閉性障害における遺伝子変異がもたらすシナプス機能障害と
小胞体ストレス誘導 についての研究

神保恵理子----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 9

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 10

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（精神障害分野）
総括研究報告書

自閉性障害における遺伝子変異がもたらすシナプス機能障害と
小胞体ストレス誘導 についての研究

研究代表者 神保 恵理子 自治医科大学・医学部・ 助教

研究要旨

脳発達障害である自閉性障害は、社会的な大きな問題であり、治療法の確立が緊急な課題である。しかしながら、分子病態が未だ十分に把握されていない。これまで申請者らが見出した機能シナプスに関与するCADM1の2つの変異(H246N, Y251S)は、小胞体ストレスを誘導し、シナプス機能障害を引き起こすことが明らかとなった。また、Cadm1欠損マウスを用いた不安様行動、攻撃行動、社会性行動などの行動解析では、不安、攻撃性などの行動異常、社会的コミュニケーションの異常を示し、シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性が示唆されるものの、自閉性障害の特徴的な症状（限定的な行動など）は観察されなかった。これらの行動解析や神経細胞を用いた解析などを踏まえ、次年度には本年度作製を試みたCadm1変異ノックインマウスの解析と比較することが可能となる。Loss-of-functionの他に、変異によるGain-of-functionが病態に及ぼす影響についての検討を引き続き行う。

A. 研究目的

脳発達障害である自閉性障害は子供の約1%近くを占めており、その社会行動性、コミュニケーションの欠如は社会的な大きな問題であり、治療法の確立が緊急な課題である。しかしながら、疾患解明が遅れているのが現状であり、その主な原因は発達期の脳は、多様な要因に脆弱性を持ち遺伝的要因と環境要因の双方が影響し、分子病態が把握されていない点にある。本研究は、自閉性障害関連変異タンパクの機能障害ではなく、変異タンパクが誘導する小胞体

ストレスに着目した点に独創性がある。変異タンパクは、小胞体ストレスセンサーを介してCHOP、ATF4などの様々なUPR (Unfolded protein response) を誘導し、GABA受容体などのシナプスへの膜輸送を障害する。

本研究は患者細胞、モデルマウスを用いて、CADM1変異タンパクが誘導する小胞体ストレスシグナルにより、UPRが引き起こすシナプス機能タンパクの膜輸送障害と自閉性障害統一的病態との関係を明らかにする。

神経変性疾患において、少数ではあるが遺伝性

家族性パーキンソン病、アルツハイマー病など分子病態の解明が疾患病態解明に大いに役立ったように、自閉性障害患者群の一部ではあっても単一遺伝子の変異で説明できる遺伝子変異データの集積が自閉性障害の統一的病態解明の飛躍的理解につながるものと考えられる。すでに遺伝子変異が確定した症例を中心に、遺伝子変異産物による小胞体ストレスに注目することで、自閉性障害における遺伝的要因と環境的要因の相互作用を解析するものであり、本研究により自閉性障害におけるシナプス機能障害との関係が明らかにされることが期待される。本研究は、治療戦略構築の研究の突破口につながる研究であると考えており、自閉性障害患者の社会的不適応に対する治療法の開発は医療費、治療費を減額するだけでなく、患者本人自身の社会生活の改善、また患者に関わる社会的な問題および家庭の問題の改善が見込まれる。厚生行政に貢献するのみならず、人間の個々の生活、日本の労働力を向上する点においても大いに貢献することが期待される。

B. 研究方法

CADMI変異タンパクの機能障害についての解析では、言語障害を伴う2人の男子患者とその家族に発見されたCadm1のイムノグロブリン領域のN端から3番目に存在するH246N、Y251Sの変異を、培養細胞系およびマウスおよびラット初代神経細胞系に導入し、神経マーカーあるいは小胞体ストレスマーカーなどを用いた免疫染色を行い局在の違いを観察し、シナプス機能タンパク膜輸送障害との関係について解析を行った。Cadm1変異モデルマウスの作製を試みた。

Cadm1欠損マウスにおける行動解析では、Cadm1欠損マウスを用いて、知覚・運動機能、不安様行動、攻撃行動、社会性行動などの行動解析を

行った。

また、Cadm1変異ノックインマウスの作製を試みた。

なお、以下に具体的な方法を記した。

1) 細胞培養

COS細胞およびC2C5細胞は、37°C5.0%CO₂インキュベーターで培養した。トランスフェクションはリン酸カルシウム法、あるいはlipofectamine 2000を用いて行った。

2) 神経細胞の培養

マウス胎児の脳から海馬を採取した後、高グルコースDMEM溶液に入れ、終濃度0.25%になるようトリプシンを加えて37°Cで15分インキュベートした後、900rpmで5分間遠心分離を行った後、上清を取り除き、Hanks solutionを5ml加え、1~2分静置後、上清を取り除き、Hanks solutionを5ml加えて(3回繰り返し)、ピペティング1×10⁵ cells/cm²、神経細胞用培養液を0.3ml/well入れ、3週間程度37°C5.0%CO₂インキュベーターで培養後、トランスフェクション有または無の工程を経た後、免疫染色法を行った。

3) 免疫染色法

細胞を終濃度2%パラホルムアルデヒドを含むPBSにて固定後、PBSで洗浄した後、ブロッキングとして1%ヤギ血清および0.5%スキムミルクを含むPBS溶液を用い室温で一時間置いた。一次抗体に小胞体関連マーカーを4°Cで一昼夜反応させ、さらに二次抗体としてFITCあるいはテキサスレッド標識抗イムノグロブリン抗体を加え、37°C一時間反応後PBSで希釈した後グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

4) イムノブロット分析

組織および細胞を回収し、PBSで2回洗浄し

遠心分離後、上清を捨て沈殿した細胞を50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (Sigma)にて細胞を可溶化し回収した後、蛋白質量をBradford法にて測定した。得られた上清をSDS-アクリルアミドゲルにて泳動した。ニトロセルロースフィルターに転写し、一次抗体で反応させた後、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識イムノグロブリンを用い、BCIPおよびNBTを含む発色液で反応させた。

5) 行動解析法

5-1) Open Field Test

マウスを正方形の field(60X60X40cm, 60luxの照明下)に滞在させ、新規環境での活動量や不安様行動について10分間測定した。

5-2) light-dark transition

暗い箱と明るい箱 (60X60X30cm、照明 100lux)をマウスが5分間行き来できるように連結させた装置を用い、暗い箱にマウスを入れ、測定を開始した。マウスは暗い方を好むが、通常は探索行動をするので明るい箱の方にも行くが、不安の強いマウスは暗い箱にいることが多く、明るい箱に行く回数や明るい箱での滞在時間が少ない傾向を示す。これによってマウスの不安様行動を測定した。

5-3) elevated plus-maze test

マウスが壁際を好むという性質を利用して、壁の無い道 (open-arm, 25X5cm) と壁の無い道 (enclosed-arm, 25X5cm) を探索させ、滞在時間、回数、行動について観察した。なお、壁は15cmの高さ、照明は60 . luxを採用した

5-4) social interaction test

29×18×12cmの箱の中に同群の2匹の雄マウスを入れて赤色光下で2日間観察し、社会性相互作用について測定した。

5-5) Hand-scored behaviors in social interaction test

2匹のマウスを5分間テストケージに移動させ、カテゴリー別に(社会的でない探索行動、approaching(近寄る)、crawling(這いずる)、sleeping(相手と共に寝る)、sniffing(相手のにおいを嗅ぐ)、following(相手の後を追う)、grooming(相手の毛づくろいをする)、fighting(攻撃行動))時間を測定した。

5-6) social memory/recognition test (Social investing behavior)

低い位置にいくつかの穴の開いた透明なアクリル製円筒をケージの中央に置いた。雄マウスは個々のケージに移動させ、二時間置いた後、卵巣摘出した雌マウスを5分間円筒に入れ、その後移す作業を3回繰り返し、15分間のインターバルをとり、3回目までと4回目で異なった雌マウスを入れ、新たな侵入者を調べるのに費やす時間を測定した。

5-7) Rotarod test

直径3cmの回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げ、マウスが落下するまでの時間を測定する。回転する棒の上にマウスをのせて徐々に速度を上げ(5分間に4回転~40回転まで)、マウスが落下するまでの時間を測定した。

5-8) Foot print test

30cmの壁のある50cmの廊下と10cmの廊下を3回添って歩くように練習させ後、4回目の前に足にインクをつけて紙上を歩かせ、歩幅・後肢の幅を測定した。

5-9) Buried food pellet test

食べ物をケージの隅の5cm深いところに埋め、18時間絶食状態のマウスをケージの中央に放ち、食べ物を見つけ出す時間を測定した。

5-10) Grip strength test

マウス前肢をばねに付け、体を引き寄せる力を測定した。

5-11) tail immersion hot plate test

熱刺激としてプロジェクターランプによる輻射熱をマウスやラットの尾に与え、尾を払いのけるなどの逃避反応を起こすまでの時間を測定した。

5-12) Tail suspension test

マウスの尾にテープを貼り付け、そのテープに穴を開けて懸垂用のフックに掛け、6分間の無動であった時間（無動化時間）を計測した。

6) 実験動物（ノックインマウス）の作製

6-1) 標的遺伝子のゲノムクローンの探索、および取得

標的遺伝子のcDNAをクエリーにしてマウスBACクローンライブラリーを検索し、標的遺伝子のゲノム配列を含むマウスBACクローンを探索し、マウス標的遺伝子を含むBACクローンを入手した。

6-2) Red/ET テクノロジーを利用したRecBAC発現ベクターの構築

大腸菌のセレクションマーカを含むフラグメント、および標的遺伝子のゲノムDNA配列をタンデムに連結させ、Red/ETターゲティングベクターを構築し、タグタンパク質をコードする遺伝子カセット、および標的遺伝子のゲノムDNA配列をタンデムに連結させ、トランスファーフラグメントを構築した。

BACクローンのマウス標的遺伝子の特異的領域に、Red/ETターゲティングベクターを挿入させる。トランスファーフラグメントにより、Red/ETターゲティングベクターに含まれる大腸菌のセレクションマーカを置換、除去した後、シーケンス解析、サザン解析法により構築したRecBAC発現ベクターのコンフ

ィギュレーションを確認した。得られた発現プラスミドのシーケンス解析を行って、確認した。

6-3) 高純度RecBAC発現ベクター溶液の調製

RecBAC発現ベクターでトランスフォームされたDH10B大腸菌株を培養し、プラスミドをキアゲン、プラスミドミディキットを用いて精製し、制限酵素PI-SceIにより反応させ、直鎖化を行った。直鎖化された高分子のRecBAC発現ベクターをパルスフィールド電気泳動により分離させ、目的のサイズのDNA断片を含むゲルを切り出して、電気溶出により遊離させ、回収した。透析により受精卵注入用バッファーに置換し、DNA濃度を決定し、DNA断片の溶液を2 ng/ μ lになるように希釈して高純度RecBAC発現ベクター溶液とした。

7) 実験動物（マウス）の飼育およびPCR法による遺伝子型の検定

Cadm1-K0マウス、CADM1 (Y251S) -myc-Tgマウスについては、温度 23.0 ± 2 度、湿度 $50\% \pm 10\%$ の室内にて飼育し、実験に必要なマウスについて1mm程度の尾を採取しDNAを抽出後、PCRを行い、遺伝子型を検定した。DNA抽出法は、採取したマウス尾に対して40 μ lの滅菌水を加えた後、95度10分加熱し、プロテイナーゼK（終濃度2mg/ml）を10 μ l加えた後55度で120分、さらに95度10分加熱し、DNA抽出物とした。PCR反応液として、DNA溶液2 μ l、1 \times buffer、0.25mM dNTP、2.5mM MgCl₂、primer 1pmol、滅菌水 合計15 μ lになるように調整し、PCR反応（95度3分1サイクル、94度20秒60度30秒72度30秒35サイクル、72度7分1サイクル）を行った。

（倫理面への配慮）

あらかじめ当該研究機関である自治医科大学

の長等の承認、届出、確認等が必要な研究については、研究開始前に手続を行った後、研究を行った。

本邦自閉性障害児（3-15歳）のシナプス関連遺伝子群の変異解析に用いる末梢血液細胞は、自治医科大学において、自閉症の原因遺伝子解析を課題として、研究倫理委員会の承諾を得て、実施された。人体から採取された試料等を用いる場合は、文書により説明し、文書による同意（研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意、インフォームド・コンセント）を得た検体に対して実験を行った。

組換えDNA実験に関しては、所属施設での承認を受け指針に従う。取扱い者は組換えDNA実験および微生物の取り扱いの技術を持ち合わせ、内容に関しても熟知しており、適切な対応を行った。

マウスを用いた動物実験は、施設にて設定されている動物取り扱いマニュアルに沿って行う。マウス各組織の採取およびやむを得ず施行した安楽死に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、筋肉弛緩剤であるネブタール麻酔下あるいは二酸化炭素充満させた箱内で無痛下において二度と覚醒しないよう安楽死させてから行うことにしており、苦痛の無いように動物に対する倫理面での十分な配慮がなされた本研究で行う動物実験はいずれも脊椎動物に対し全く苦痛や不快感を与えないと期待される実験あるいは瞬間的なわずかな苦痛、不快感しかおこさない処理、および脊椎動物に対し限局的な短時間継続する軽いあるいは中程度の痛みを起こす処置に属するものであり、実験に際しては、動物への恐怖感、苦痛をさけるため、麻酔下で行うこと

にしており、動物に対する倫理面での十分な配慮がなされた。マウス各組織の採取に際しては、深いエーテル麻酔を行い無痛下で二度と覚せいしないよう、安楽死させてから行い、苦痛の無いよう配慮をした。

C. 研究結果

申請者が発見したRA175は神経細胞に特異的に発現するイムノグロブリンスーパーファミリーに属する神経接着蛋白である(Fujita et al., 1998;2001;2003;2005)。NeurologinやNeurexinと同様にC末端にPDZ結合領域を持ち、機能シナプスを形成することから、SynCAM1(Biederer et al, Science, 2002)と命名されたが、現在はCadm1に統一されている。

ヒト自閉性障害は言語障害を伴い、Social interactionや communication異常が知られている。遺伝性自閉性障害患者の1%がNeurologinの変異を持つことが報告されている。これまでの解析で、申請者らは遺伝性自閉性患者(米国自閉症協会)200人のCADM1遺伝子の変異解析により、言語障害をともなう2人の男子患者とその家族にH246N、Y251Sの変異を発見し、これらの変異はCadm1のイムノグロブリン領域のN端から3番目に存在することを報告した(Fujita co-first author et al., 2008)。小胞体は変異を原因とする折りたたみ異常の蛋白質(ミスフォールド蛋白質)を分解除去する品質管理機構を有している。こうした小胞体の品質管理機構として、小胞体関連分解(endoplasmic-reticulum-associated degradation, ERAD)機構がある。すなわち、小胞体で新生された蛋白質は、熱ショック蛋白質ファミリー、チオレドキシシンファミリー、レクチンファミリーなどの分子シャペロンが一過性に会合し、折りたたみを識別する。変異蛋白が

ミスフォールド蛋白質として認識されると、レクチン様蛋白質が会合し、小胞体のチャンネル蛋白質(Sec61複合体、Derlinなど)を介してサイトゾルへ輸送される。サイトゾルではVCPなどのATPaseがミスフォールド蛋白質を引き出し、各種ユビキチンリガーゼによってユビキチン化された後、プロテアゾームで分解される。

CADM1の2つの変異(H246N, Y251S)、および Bourgeronらにより見出された Neuroligin-3(R451C)変異を細胞に過剰発現させたところ、小胞体ストレスが誘導され、それと共にCHOPの発現増大が観察された。またCadm1変異を発現させた神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制されており、Cadm1正常タンパクが神経細胞のシナプス小胞などの分泌顆粒に局在する38kDaの膜蛋白質であるシナプトフシンなどシナプス機能タンパクと共局在する割合に対し、Cadm1変異タンパクが共局在する割合は顕著に低かった。このことからシナプス障害が起こっていることが示唆された(平成22年度 投稿受理 (Fujita et al., 2009) および投稿中)。また、申請者はCadm1と脳機能との関係を明らかにする目的で、Cadm1欠損マウスを作製し、細胞極性に関与するPar-3との結合について報告してきた(Fujita et al., 2005; 2007)。自閉性障害とCadm1の関与を調べるために、Cadm1欠損マウスの行動学的解析をおこなった。Open field tests、light-dark transition、elevated plus-maze tests法を用い、anxiety-related behavior (不安関与行動) について検討したところ、まずOpen field testsではCadm1欠損マウスは野生型と比べて、中央にいる時間が短く、light-dark testsでは明るい箱にとどまる時間が少なかった。活動距離は両者でほぼ同じことから、Cadm1欠損マウスは不安行動傾向にあることが示された。しかしながら、elevated

plus-maze testsでは両者に顕著な差が見られなかったことから、Cadm1欠損マウスはある環境において不安行動を示すと考えられる。

また、直接的なマウス間の24時間の行動解析の結果、Cadm1欠損マウスは野生型と比較して、多動で他マウスとの接触時間が短かった。また、2匹のマウスを新しいケージに入れた後の5分間の行動を解析したところ、欠損マウスはケージを探すことに費やす時間は少なく、他のマウスを追うことに時間を費やした。ファイティングに費やす時間は欠損マウスの方が多かった。これらの結果から、欠損マウスはより積極的な行動を引き起こすことが明らかになった。social memory/recognition testsを用いたSocial investing behaviorの解析では、欠損マウスは親近感を形成することが難しいことが明らかになった。

トレーニングの後の試験ではマウスが落下するまでの時間が野生型と比較して短いという結果であった。このことから、欠損マウスは運動機能の不器用さが見られ、これは自閉性障害患者でたびたび見られる症状とも似ている。Foot print testでは、顕著な差がみられなかったものの、欠損マウスでは後ろ足の幅が長かった。小脳の機能と関係がある可能性を示唆した。

なお、嗅覚機能を測定するBuried food pellet、視覚を測定する visual placing test、聴覚を測定する startle response test には顕著な差は生じなかった。

基礎的な能力であるmuscle strength (筋力)、grip strength (握力)、熱源との接触刺激に対する試験tail immersion hot plate testについて顕著な差がみられなかった。以上のことから、Cadm1ノックアウト(KO)マウスは、不安、攻撃性などの行動異常、Social Communicationの異常を示すことが明らかになった(平成22年度 投

稿受理(Takayanagi et al., 2009))。しかしながら、このCADM1欠損マウスは自閉性障害の特徴的な症状である限定的な行動、社会性行動異常などを示さなかった。

また、CADM1欠損マウスは超音波音声によるコミュニケーションの異常も示し、シナプス機能不全が自閉性障害の病態基盤である可能性を示唆した。すなわち、Cadm1機能シナプスはマウスUSV(ヒト言語)神経回路のシナプス形成に関与していると考えられる。

タンパク間相互作用については、CHOPのLeucine-zipper領域をリガンドとしたPull-down法とイムノブロット法にて検出した。未知のタンパクなどについては、TOFF-Massを用いて現在解析している。

D. 考察

CADM1の2つの変異(H246N, Y251S)、およびNeuroigin-3(R451C)変異を細胞に過剰発現させた結果、小胞体ストレスが誘導された。またCadm1変異を発現させた神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制され、シナプスマーカーと一致した局在を示さないことからシナプス障害が起こっていることが示唆される。

またCadm1欠損マウスは攻行動解析の結果、不安、攻撃性などの行動異常、社会的コミュニケーションの異常を示したものの、このマウスは自閉性障害の特徴的な症状(限定的な行動など)は観察されなかった。これらのことから、Loss-of-function以外に、変異によるGain-of-functionが病態に関わっている可能性が高いと考えられる。

そのため、次年度以降は、22年度で作製を試みたCadm1欠損マウスとは異なるCadm1変異(Y251S)ノックインマウスについて解析することが研究の進展につながると考えられる。マ

ウスの生理学のおよび行動解析、神経組織における解析、さらにCADMを発現する患者由来の細胞における小胞体ストレス応答に対する感受性を調べる予定である。

E. 結論

CADM1の2つの変異(H246N, Y251S)、は、小胞体ストレスを誘導し、Cadm1変異を発現させた神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制され、シナプス障害が起こっていたことが明らかとなった。またCadm1欠損マウスでは十分に自閉性障害を説明できないため、Loss-of-function以外に、変異によるGain-of-functionが病態に関わっている可能性が高いと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T. Impairment of social and emotional behaviors in Cadm1-knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396: 703-708.
2. Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Zhiling Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T. Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e47.

2. 学会発表

1. 藤田恵理子、代紅梅、田辺裕子、Yu Zhiling、山形崇倫、宮川拓也、田野倉優、桃井真里子、桃井隆、自閉性障害におけるCadm1遺伝子変異に誘導される小胞体ストレス、Neuro2010（第33回日本神経科学大会、第53回日本神経化学学会大会、第20回日本神経回路学会大会合同大会）、2010年9月2日、神戸.

2. Yuko Tanabe、Yuji Fujiwara、Eriko Fujita、Tadashi Kasahara、Yuasa Shigeki、Takashi Momoi、The temporal expression and cytoplasmic localization of the novel Foxp2 isoform lacking forkhead domain in the developing Purkinje cells,

BMB2010（第33回日本分子生物学会大会、第83回日本生化学会大会合同大会）、2010年12月8日、神戸.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fujita E, Dai H, Tanabe Y, Zhiling Y, Yamagata T, Miyakawa T, Tanokura M, Momoi MY, Momoi T.	Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, CADM1.	Cell Death Disease	1	e47	2010
Takayanagi Y, Fujita E, Yu Z, Yamagata T, Momoi MY, Momoi T, Onaka T.	Impairment of social and emotional behaviors in Cadml-knockout mice.	Biochem Biophys Res Commun.	396	703-708.	2010

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Autism spectrum disorder is related to endoplasmic reticulum stress induced by mutations in the synaptic cell adhesion molecule, *CADM1*

E Fujita^{1,2}, H Dai^{1,3}, Y Tanabe^{1,3}, Y Zhiling², T Yamagata², T Miyakawa⁴, M Tanokura⁴, MY Momoi² and T Momoi^{*,1,3}

Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder with an unknown molecular pathogenesis. A recent molecular focus has been the mutated neuroligin 3, neuroligin 3(R451C), in gain-of-function studies and for its role in induced impairment of synaptic function, but endoplasmic reticulum (ER) stress induced by mutated molecules also deserves investigation. We previously found two missense mutations, H246N and Y251S, in the gene-encoding synaptic cell adhesion molecule-1 (*CADM1*) in ASD patients, including cleavage of the mutated *CADM1* and its intracellular accumulation. In this study, we found that the mutated *CADM1* showed slightly reduced homophilic interactions *in vitro* but that most of its interactions persist. The mutated *CADM1* also showed morphological abnormalities, including shorter dendrites, and impaired synaptogenesis in neurons. Wild-type *CADM1* was partly localized to the ER of C2C5 cells, whereas mutated *CADM1* mainly accumulated in the ER despite different sensitivities toward 4-phenyl butyric acid with chemical chaperone activity and rapamycin with promotion activity for degradation of the aggregated protein. Modeling analysis suggested a direct relationship between the mutations and the conformation alteration. Both mutated *CADM1* and neuroligin 3(R451C) induced upregulation of C/EBP-homologous protein (CHOP), an ER stress marker, suggesting that in addition to the trafficking impairment, this CHOP upregulation may also be involved in ASD pathogenesis.

Cell Death and Disease (2010) 1, e47; doi:10.1038/cddis.2010.23; published online 3 June 2010

Subject Category: Neuroscience

Autism spectrum disorder (ASD) is the most common heritable neurodevelopmental disorder, characterized by impaired social interactions, communication impairments, and restricted and repetitive behaviors; over 15 susceptibility loci are currently estimated,¹ but the major mode of inheritance remains unknown. Genetic testing in individuals with ASD has identified mutations in the genes encoding several synaptic cell adhesion molecules, including neuroligin (NLGN) 3 and 4, cell adhesion molecule-1 (*CADM1*), and contactin-associated protein-like 2.^{2–4} NLGNs are postsynaptic cell adhesion proteins that interact with neuroligins on the presynaptic membrane,⁵ and they are required for synapse maturation.⁶ Neuroligin–NLGN interactions induce differentiation of γ -aminobutyric acid (GABA) and glutamate postsynaptic specializations.⁷ The ASD-related mutant, NLGN3(R451C), is retained intracellularly, which limits its pre-synaptic interactions.⁸ Some of the mutated NLGN4 also fails to transport to the cell surface and is instead retained in the endoplasmic reticulum (ER).⁹

CADM1 (also known as RA175/SynCAM1) is a membrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin (Ig) superfamily and is localized to both sides of the synaptic cleft. Its extracellular domain displays calcium-independent homophilic *trans*-cell adhesion activity,^{10,11} and its intracellular domain associates with calmodulin-associated serine/threonine kinase via individual PDZ-binding domains (PDZ: post synaptic density protein/*Drosophila* disc large tumor suppressor/zonula occludens-1 protein).¹⁰ Recently, we identified two missense mutations, C739A (amino acid: H246N) and A755C(Y251S), in the *CADM1* gene of male Caucasian patients with ASD and their family members.³ Both mutations are located in the third Ig (Ig3) domain of *CADM1*, which is essential for *trans*-active interactions. These ASD-related mutations stimulate the cleavage of *CADM1* and induce defective trafficking to the cell surface.³ These results suggest an association between impaired synaptogenesis and the pathogenesis of ASD.

¹Division of Differentiation and Development, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi-machi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan; ²Department of Pediatrics, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsukeshi, Tochigi 329-0498, Japan; ³Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Kitakanemaru 2600-1, Ohtawara, Tochigi, 324-8501, Japan and ⁴Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

*Corresponding author: T Momoi, Division of Differentiation and Development, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi-machi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan or Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Kitakanemaru 2600-1, Ohtawara, Tochigi, 324-8501, Japan.

Tel: +81 42 341 2711 (ext. 5273); Tel/Fax +81-287-24-3162; E-mail: momoi@ncnp.go.jp or momoi@iuhw.ac.jp

Keywords: autism; *Cadm1*; ER stress

Abbreviations: ASD, autism spectrum disorder; *CADM1*, cell adhesion molecule-1; Ig, immunoglobulin; NLGN, neuroligin; CHOP, upregulation of C/EBP-homologous protein; PDZ, post synaptic density protein/*Drosophila* disc large tumor suppressor/zonula occludens-1 protein; eIF2 α , eukaryotic initiation factor-2 α ; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; UPR, unfolded protein response; TSC, tuberous sclerosis complex; GABA, aminobutyric acid; 4-PBA, phenyl butyric acid; Thap, thapsigargin

Received 08.2.10; revised 29.3.10; accepted 31.3.10; Edited by V De Laurenzi

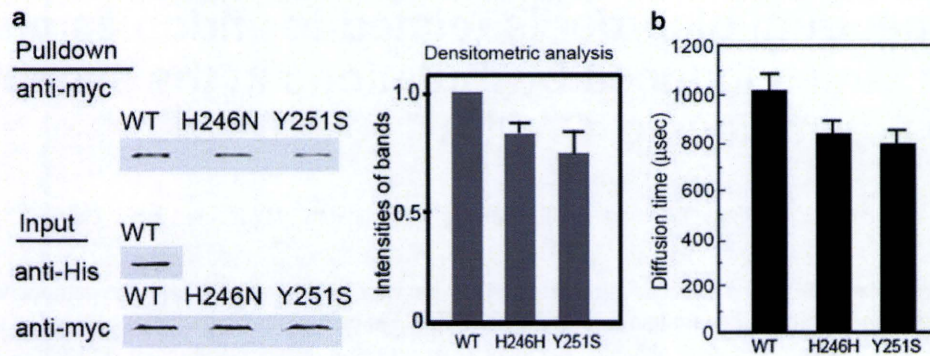


Figure 1 Effects of the mutations on the interaction activity. (a) Interaction between His-tagged wild-type (WT) CADM1 and myc-tagged WT or mutated CADM1. (left panel) Immunoblot analysis. Myc-WT and mutated (H246N- or Y251S-) CADM1 interacting with His-WT CADM1 were detected by western blot analysis using anti-myc antibody. Compared with the WT, the mutated CADM1 was not associated with His tagged-CADM1. (right panel) Densitometric analysis. Data from three experiments were scanned. Band intensities for the bound CADM1(H246N) and (Y251S) were normalized to the bound wild-type CADM1 and presented as the mean \pm s.d. All experiments were performed three times, and typical data are shown. $P < 0.05$ compared with wild-type. (b) FCS analysis of the protein-protein interaction between recombinant proteins of WT CADM1 or those of mutated CADM1. The interaction was detected by FCS using TAMRA-labeled molecules as probe. We examined the interaction between TAMRA-labeled and non-labeled WT-CADM1, TAMRA-labeled and non-labeled CADM1(H246N), and TAMRA-labeled and non-labeled CADM1(Y251S). All experiments were performed three times. Results are the mean \pm s.d. of three different determinations. $P < 0.05$ compared with wild-type

However, *nlg3*-deficient mice do not show the core symptoms observed in patients with ASD.⁶ In contrast, knock-in mice that express NLGN3(R451C), a mutation implicated in ASD,¹² do show behaviors analogous to the core symptoms of ASD, including impaired social behavior.^{12,13} This finding suggests that both a loss-of-function and a gain-of-function mutation are involved in the pathogenesis of ASD. ER stress is a gain-of-function associated with the mutated protein.

The ER quality control system recognizes unfolded or misfolded proteins and activates stress-signaling pathways termed the unfolded protein response (UPR), via ER stress sensors.^{14–16} The PKR-like ER kinase, one of the stress sensors in the ER, specifically upregulates the translation of the CAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein (CHOP/Gadd153)¹⁷ via phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α). It is of interest that CHOP regulates synaptic function by regulating membrane trafficking¹⁸ and that an eIF2 α kinase, GCN2, controls synaptic plasticity, learning, and memory.^{19,20} However, little is known regarding the association between ASD-related mutated molecules and ER stress.

In this study, we show that the ASD-related CADM1 mutations, H246N and Y251S, and the NLGN3 mutation, R451C, cause an UPR response with upregulation of CHOP as a gain of function.

Results

At first, we examined the *trans*-interaction between wild-type and mutated CADM1 molecules *in vitro* by pull-down and western blot analysis (Figure 1a). We compared the *trans*-interactions between bead-conjugated recombinant CADM1-His-tag proteins that lacked the transmembrane domain and either wild-type CADM1 or mutated CADM1 proteins (Figure 1a). Compared with the interaction between wild-type and wild-type, interactions between the mutant

and wild-type proteins were slightly reduced and most of their interaction, 83.5% of CADM1(H246N) and 74.6% of CADM1(Y251S), remained. To evaluate this homophilic interaction quantitatively, we prepared recombinant extracellular domains of the wild-type and mutated CADM1 proteins and examined their interactions by fluorescence correlation spectroscopy (Figure 1b). Mutated CADM1 homophilic interaction activity was about $20 \pm 5\%$ weaker than that of wild-type CADM1.

We also modeled the chemical structure of CADM1 (Figure 2a) with a model in which the H246 and Y251 residues are located in the region that corresponds to the NH2-terminal strand of the Ig3 domain (amino acid sequence 160–324). The model showed that H246N and Y251S mutations represented reductions in the size of the side-chains of the NH2-terminal strand. Mutations also induced a conformational change (Figure 2b), and compared with H246N, the Y251S mutation induced a larger conformational change in the region.

To examine the relationship between a mutated CADM1 and the pathogenesis of ASD, we transfected myc-tagged wild-type CADM1 and H246N- or Y251S-mutated CADM1 sequences into neurons and examined their colocalization with synaptophysin, a marker of synapse. We excluded influences of the endogenous Cadm1 by using neurons isolated from *Cadm1*-deficient mouse embryos at embryonic day (E)16. Dendrites of the transfected neurons mainly showed three types of morphology (Figure 3, Table 1): most neurons that expressed wild-type CADM1 had long dendrites ($> 100 \mu\text{m}$) with synaptophysin-positive spines; neurons that expressed mutated CADM1 either had short dendrites ($< 100 \mu\text{m}$) without synaptophysin or no dendrites at all. Thus, neurons that expressed mutated CADM1 showed abnormal dendrites and impaired synaptogenesis.

Compared with the wild-type molecules, the mutated CADM1 more frequently showed intracellular accumulation. We examined the intracellular localization of wild-type CADM1 and CADM1(Y251S) proteins in transfected C2C5

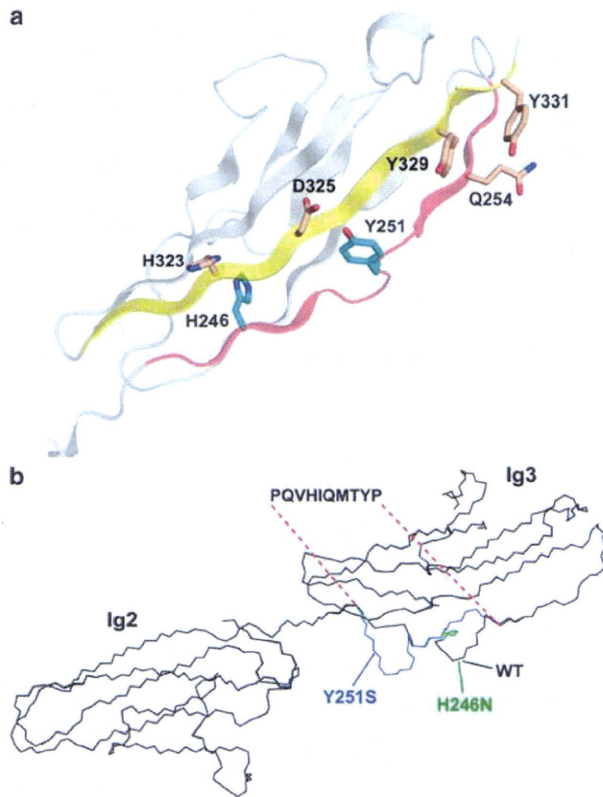


Figure 2 The modeled structure of mutated CADM1. (a) The Ig3 domain of CADM1, which was built using the Ig3 domain of NCAM as a template and registered in MODBASE.³⁹ The NH₂- and COOH-terminal strands of the model are red and yellow, respectively. The residues shown as sticks are possibly involved in the *trans*-interaction. The mutant residues, H246 and Y251, are in cyan. (b) The superimposed models of wild-type (black), H246N mutant (green), and Y251S mutant (blue) CADM1 using MOLMOL.⁴⁰ The amino acid sequence, P Q V H I Q M T Y P, shows the altered region in the Y251S mutant compared with the wild-type

cells and neurons (Figure 4a). Wild-type CADM1 was partly colocalized with anti-KDEL, a marker for ER, whereas CADM1(Y251S) was predominantly accumulated in the ER. Wild-type CADM1 was also partly colocalized with beclin, which is localized on the various organelle including *trans*-Golgi, mitochondria, and ER,²¹ whereas the accumulated CADM1(Y251S) was colocalized with ER-localized beclin (Figure 4b). The beclin was mainly localized on the ER under ER stress (Figure 4c), suggesting that the accumulation of CADM1(Y251S) in the ER caused the ER stress.

The cells expressing CADM1(Y251S) frequently showed an abnormal round cell morphology (Figures 4 and 5a). 4-phenyl butyric acid (4-PBA), a potential chemical chaperone in the ER²² reduced the intracellular accumulation and the abnormal morphology of the cells expressing the mutated CADM1(Y251S) (Figure 5a and b). ER-localized beclin has a role in regulating autophagy.²¹ Rapamycin, which stimulates the degradation of the accumulated protein via activation of the autophagosome,²³ inhibited the intracellular accumulation of CADM1(Y251S) (Figure 5a and b).

We also examined the mutated CADM1-induced CHOP upregulation downstream of the ER stress.^{24,25} Both CADM1(H246N) and CADM1(Y251S) induced CHOP upregulation (Figure 6a), and CHOP-positive cells were more frequently detected in cells that expressed CADM1(H246) and (Y251S) (Figure 6b). In the cells expressing NLGN3(R451C), CHOP-positive cells are also more frequently detected compared with the cells expressing wild-type NLGN3 (Figure 6c). Thus, the mutated CADM1(H246) and (Y251S) proteins as well as the NLGN3(R451C) protein most likely stimulated ER stress, causing CHOP upregulation.

Discussion

ER stress and the mutated CADM1. The mutated CADM1 showed the most *trans*-interaction activity *in vitro* but accumulated in the ER and showed impaired trafficking, suggesting that the impaired synaptic function caused by defective trafficking of the mutated CADM1 could be related to the pathogenesis of ASD. However, *cadm1*-deficient mice²⁶ as well as *nlg3*-deficient mice⁶ did not show all of the core symptoms of ASD (Takayanagi *et al.*, submitted elsewhere); in addition to infertility,²⁶ *cadm1*-deficient mice manifested abnormal anxieties and impaired ultrasonic vocalization but did not show the impaired social interaction and restricted stereotyped behaviors. In contrast with *cadm1* in the testis, the loss of synaptic function of *cadm1* in *cadm1*-deficient mice could be partly compensated by other members of the Cadm family. This possibility suggests that the loss of function of CADM1 or NLGN3 is one of the factors but not a sufficient factor alone to cause ASD. The gain of function of their mutated molecules could be another feature related to the pathogenesis of ASD.²⁷

The ER stress is a gain of function associated with the mutated proteins.²⁵ The misfolded and unfolded proteins are checked under the surveillance of the ER quality control system in the ER, followed by processing by the ER-associated degradation (ERAD) system, but if degradation is not sufficient, they are accumulated and cause ER stress with UPR.²⁵ ER stress is the signal elicited by the quality control system in the initial stages of the UPR. Rapamycin inhibits ER stress by stimulating the activation of autophagosome formation,^{25,28} which also contributes to the degradation of the accumulated mutated proteins on the ER membrane in cooperation with ubiquitin/proteasome-mediated ERAD.^{23,29} The sensitivity of CADM1(Y251S) to the rapamycin suggests that ubiquitin/proteasome-mediated ERAD is not sufficient for its degradation. This inference is also supported by the altered conformation and the sensitivity to 4-PBA. Furthermore, the mutated CADM1 as well as NLGN3(R451C) caused CHOP upregulation, suggesting that the mutated CADM1 as well as NLGN3(R451C) were retained in the ER, causing ER stress with CHOP upregulation as the UPR. This will be one of the important issues in the future.

Relationship between ER stress and the pathogenesis of ASD. Chronic and excess ER stress leads to neuronal cell death and may be related to the pathogenesis of

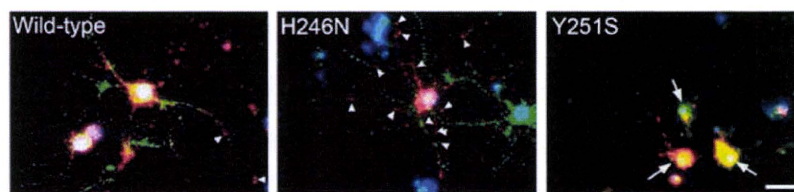


Figure 3 Localization of wild-type and mutated CADM1 in the neurons. Isolated neurons from *cadm1*-deficient mice embryos (E16) were transfected with wild-type and mutated CADM1 (H246N or Y251S). Their localization at the synapse was examined by immunostaining with anti-SynCAM (Cadm1; red), anti-synaptophysin (green), and Hoechst (blue). Closed arrowheads: CADM1 with no synaptophysin; arrows, neurons with short or no dendrites. Scale bars: 25 μ m

Table 1 Percentages of the neurons expressing three types of dendrites in the neurons transfected with wild-type or mutated CADM1

Types ^a (8 DIV ^b)	Wild-type	H246N	Y251S
Neurons with long dendrites, > 1000 μ m	63.6 \pm 6.0%	30.0 \pm 2.9%	9.1 \pm 1.8%
Neurons with short dendrites, < 1000 μ m	27.3 \pm 2.6%	40.0 \pm 3.8%	36.4 \pm 3.5%
Neuron with no dendrites, < 100 μ m	9.1 \pm 0.8%	30.0 \pm 2.2%	54.5 \pm 4.3%

The schematic illustration and evaluation of the length of the dendrites are described in Supplementary Figure S1. ^aTotal dendritic length/cell. ^bDIV = days *in vitro*

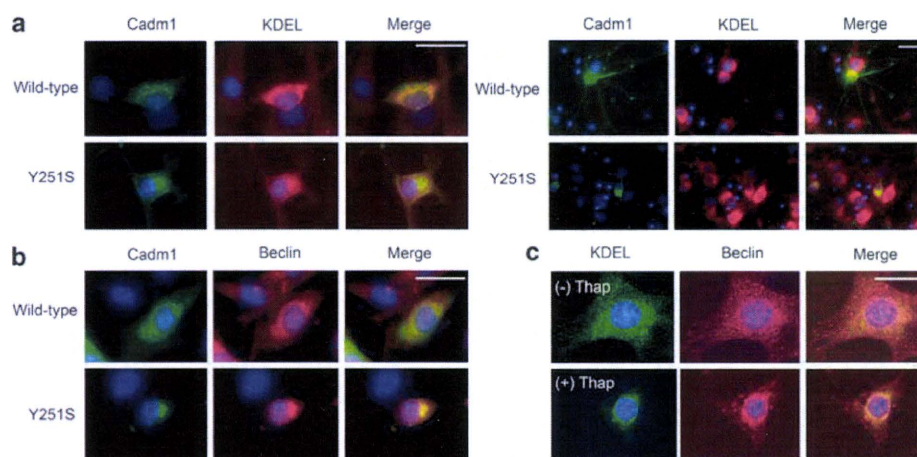


Figure 4 The localization of wild-type and mutated CADM1. (a) C2C5 cells and neurons were transfected with wild-type and mutated CADM1 (Y251S) for 26 h. After fixation, cells were immunostained with anti-SynCAM (Cadm1, green), anti-KDEL (red). (b) Transfected C2C5 cells were immunostained with anti-SynCAM (green), anti-beclin (red), and Hoechst (blue). (c) C2C5 cells were also treated with or without thapsigargin (Thap, 1 μ M) for 24 h and were detected by anti-KDEL (green), anti-beclin (red), and Hoechst (blue). Scale bars: 20 μ m

neurodegenerative diseases.³⁰ However, little is known about the relationship between ER stress and the pathogenesis of ASD. Other studies have shown that tuberous sclerosis complex (TSC), a neurogenetic disorder caused by a loss-of-function mutation in either the *TSC-1* or *TSC-2* genes, may also be related to ER stress. TSC frequently results in prominent central nervous system manifestations, including epilepsy, mental retardation, and ASD.^{31,32} TSC-deficient cells have shown constitutive activation of mammalian target of rapamycin and proved to be highly susceptible to ER stress.³³ Thus, a wide variety of mutations that cause ER stress may be linked to the pathogenesis of ASD.

ASD may be the result of abnormal membrane trafficking of the synaptic functional molecules induced by ER stress. CHOP interacts with the heterodimeric receptors GABA_{B1a}R/GABA_{B2}R and inhibits the formation of heterodimeric

complexes; this results in intracellular accumulation and reduced cell surface expression of receptors.¹⁸ In ASD patients, the GABA_{B1}R level is significantly decreased in Brodmann area 9 and Brodmann area 40 of the cerebrum and cerebellum, whereas the GABA_{B2}R level is significantly reduced in the cerebellum.³⁴ Therefore, it is possible that relatively low levels of ER stress may alter the intracellular transport of GABA_BR to the cell surface by upregulation of CHOP without affecting the cell death of the neurons in the brain.

Abnormal morphology of neurons expressing mutated molecules may be due to the ER stress and ER stress-associated the abnormal membrane trafficking. At present, however, it is not clear whether the mutated molecules-mediated ER stress is linked with ER stress-mediated autophagosome activation in the pathogenesis of ASD.

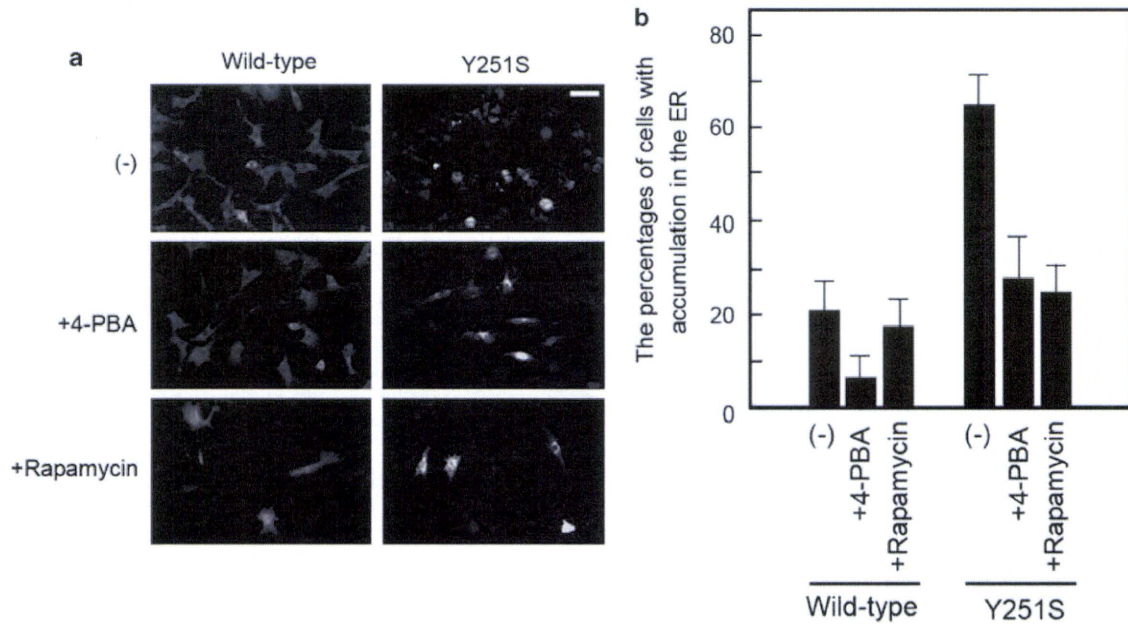


Figure 5 The effects of 4-phenyl butyric acid (4-PBA) or rapamycin on the intracellular accumulation of the mutated CADM1 in C2C5 cells. **(a)** The accumulation of the mutated CADM1 (Y251S) in the presence or absence of 4-PBA (7.5 mM) or rapamycin (10 μ g/ml). C2C5 cells were transfected with wild-type and CADM1(Y251S) for 28 h and then fixed with paraformaldehyde and immunostained with anti-SynCAM (Cadm1). Scale bars: 50 μ m. **(b)** The cell population showing accumulation of wild-type and mutated CADM1 (Y251S) in the presence or absence of 4-PBA or rapamycin. Three experiments were done. Bars indicate s.d.

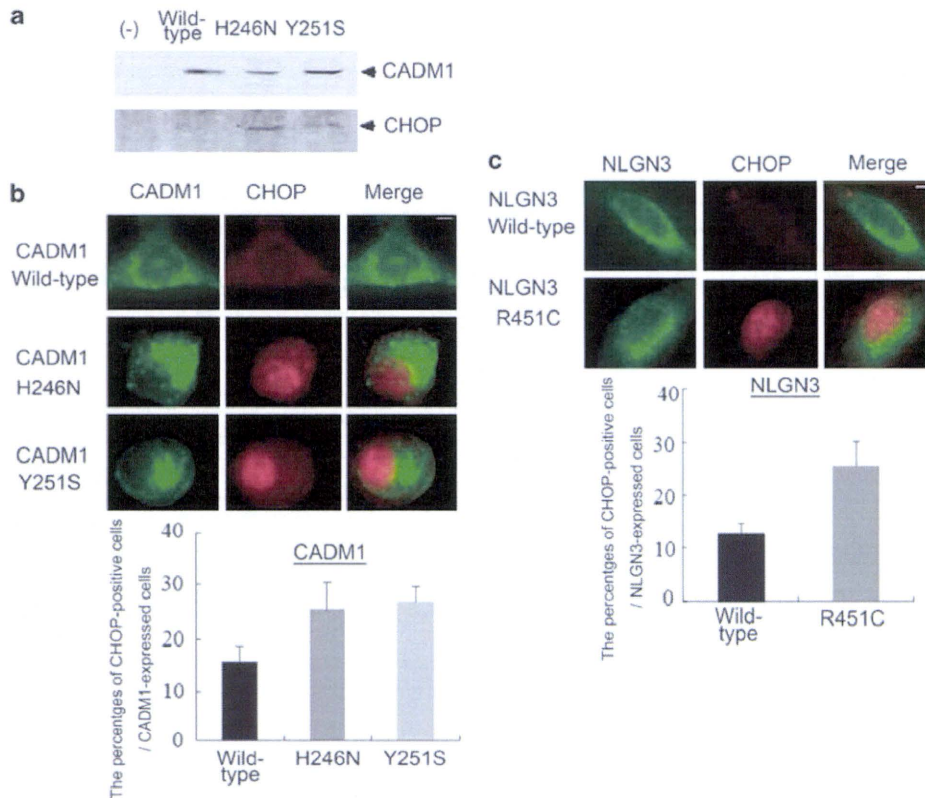


Figure 6 The expression of CHOP in the cells expressing the mutated CADM1 and the mutated neuroigin 3. **(a)** The mutated CADM1-induced upregulation of CHOP. C2C5 cells were transfected with wild-type, CADM1 (H246N), or (Y251S) cDNA and incubated for 24 h. The upregulation of CHOP was analyzed by immunoblot analysis using anti-CHOP. **(b)** The percentage of the CHOP-positive cells in the cells expressing wild-type or mutated CADM1s. **(c)** The percentage of the CHOP-positive cells in the cells expressing wild-type or R451C-mutated neuroigin (NLGN) 3. Scale bars: 5 μ m. Bars indicate s.d.