

201224068A

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24年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成25(2013)年 3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24年度 総括研究報告書

研究代表者 神保 恵理子

平成25(2013)年 3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

自治医科大学 神保恵理子----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 8

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 9

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・講師

研究要旨

自閉性障害は、脳発達障害である。近年、病態と遺伝性についての関与について少しずつ明らかにされようとしているものの、未だ分子病態が十分に把握されておらず、治療法の確立がされていない。これまで発症に強く関連する遺伝子として、Neurologin3、Neurologin4、Neurexin、Shank3、CADM1などのシナプス関連タンパクの遺伝子異常が報告されており、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。本研究では、遺伝子変異を起因とする機能不全によるLoss-of-function、また変異によるGain-of-functionが病態に関わっている可能性について、機能シナプスに関与する *Cadm1* に着目し、検討を行ってきた。Loss-of-functionとしては、*Cadm1*ノックアウトマウスを用いた実験により、不安行動の増大、社会性の欠如、コミュニケーション障害が見られた。Gain-of-functionとしては、*CADM1*変異遺伝子導入細胞の解析の結果により、小胞体ストレスの誘導が示唆された。本年度は、*CADM1*変異が個体に及ぼす影響について作製した変異ノックインマウスを用いた解析を行い、限局的な行動を含む自閉性障害様の行動を示すことを明らかにした。また、患者リンパ芽球を用いた小胞体ストレスの解析では、変異遺伝子により小胞体ストレスを誘発しやすいことを見出した。

A. 研究目的

自閉性障害は、その社会行動性、コミュニケーションの欠如という特徴を持ち、その頻度は、88人に1人との報告があり、近年社会的な大きな問題となっている。しかしながら、分子病態が把握されておらず、現在の治療は、基本的には対処療法に留まり、療育や行動療法が中心となっている。

その原因は発達期の脳は、多様な要因に脆弱性をもち遺伝的要因と環境要因の双方が影響し、病態解明が困難であり、バイオマーカーが決まらず、成人（家族を含む）の診断が困難な点に起因する。

近年の病因候補遺伝子解析では、強い関連を示すものにシナプス結合や機能に関する遺伝子が多く報告されていることから、主要病体はシナプス

形成・機能不全と考えられている。

細胞が正常に機能するには、遺伝情報に従って合成されたタンパク質が正しい高次構造を獲得するフォールディングが必要である。様々な化学的、物理的、遺伝的因子に起因する異常タンパク質(unfolded protein)が小胞体に蓄積した場合、細胞の正常機能の妨げとなるため、それを回避するために、細胞自体が持つ小胞体品質管理機構である小胞体ストレス応答 (UPR: unfolded protein response) を用いて対応する。しかしながら、小胞体内に過度の不良タンパク質が蓄積しUPRでは対処できなくなったとき、細胞が受ける小胞体ストレスによって変化が起こされる。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、自閉性障害に見出された遺伝子変異産物 (神経接着蛋白CADM1) が誘導するCADM1変異タンパク質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質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ことを目的とする。

かつて神経変性疾患である遺伝性家族性パーキンソン病などの少数の疾患の分子病態の解明が疾患の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

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。

ヘテロに持つ自閉性障害家系からインフォームドコンセントにより得られた血液からリンパ球を分離した。さらにリンパ球にEBウイルスを添加し、培養細胞株を樹立し、リンパ芽球とした。リンパ芽球は、通常抗生物質ストレプトマイシン、および10%非動物血清入りRPMI培地で継代し、小胞体ストレス実験に用いる際は抗生物質未添加培地にまき直し、翌日まで37°C5.0%CO₂インキュベーターで培養後、小胞体ストレス誘導試薬であるツニカマイシンやサブシガルジン有無で、一定時間経過後に細胞を回収した。

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5 ml加え、1~2分静置後、上清を取り除き、Hanks solutionを5 ml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を行った後、免疫染色法を行った。

3) リアルタイムPCR

リンパ芽球から、Rneasy mini kitを用いてtotal RNAを抽出した。、RNAにランダムヘキ

サマープライマーにてアニーリングした後、dNTP、DTT、緩衝液、逆転写酵素を加え混合し、37°C2時間反応させたのち、95°C5分で反応を停止させ、cDNA合成した。

得られたcDNAに対し、小胞体ストレスマーカーであるCHOP (TaqMan Gene Expression Assays)プローブおよびコントロールプローブGAPDを用い、リアルタイムPCR定量 (Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system) を行った。リンパ芽球におけるCHOPの発現量の変化を観察した。

4) 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。

5) 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。

6) 行動解析法

6-1) Open Field Test

マウスを正方形の field(60×60×40cm、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。

6-2)light-dark transition

暗い箱と明るい箱(60×60×30cm、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することが多く、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。

6-3)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、25×5cm) と壁の無い道 (enclosed-arm、25×5cm) を探索させ、滞在時間、回数、行動を観察した。なお、壁は15cmの高さ、照明は60luxを採用した

6-4)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。

6-5)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。

6-6)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。

6-7) 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。

6-8) Foot print test

30 cm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。

6-9) 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。

6-10) 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。

6-11) 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。

6-12) 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。

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

マウスは、温度 23.0 ± 2 度、湿度 $50\% \pm 10\%$ の室内にて飼育した。

Cadm1ノックインマウスについては、作出されたF1ヘテロミュータントマウス同士を交配した後、C57BL/6Jと8世代交配継代した。

遺伝型を調べるために、尾部組織を採取し、SDS

およびプロテアーゼK溶液に溶解し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により、DNAを得た。DNAは、PCRを行い、遺伝子型の検定を行った。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 (Forward primer: 5'-ATGTATTTACAGGA

ATTGTTTGATG-3'、Reverse primer: 5'-TGTGAATGCACATCTTCATGTTG-3')

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30秒58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(承認番号 11-25)。

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(承認番号 11-157)。

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った。マウス各組織の採取のための麻酔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ンブータ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に行い、苦痛の無いように動物に対する倫理面での十分な配慮をした(動物実験承認番号 12-176)。

C. 研究結果

これまで、Cell Death Disease (平成22年度受理：2010年)には、自閉性障害の患者に見出したCADM1の変異、また Bourgeron らが発見した Neuroligin-3(R451C)変異で小胞体ストレスが誘導されたことを報告した。BBRCおよびPLOS ONE (平成22年度受理：2010、平成23年度受理：2012)では、Cadm1ノックアウトマウスが、行動異常、Social Communicationの異常を示し、また自閉性障害の特徴の1つでもあるコミュニケーション障害に対応する超音波音声によるコミュニケーション異常を示したことを発表した。これらのことから、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した。

本年度では、①シナプスにおけるCadm1複合体形成と機能について、②これまで解析を行ってきたCadm1ノックアウトマウスではなく、自閉性患者により近い変異を導入した *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、解析を実施した。

Cadm1はホモフィリックな結合をし、シナプス前膜で、C末端のPDZ結合領域を介してCASKと結合し膜輸送される。一方、シナプス後膜ではNLGNがPSD95に結合し膜輸送されるのに対し、Cadm1が結合するScaffold 蛋白や受容体についてはこれまで不明であったが、本研究においてCadm1

がPSD95に結合せず、Multi-PDZ domain protein 1 (Mupp1)に結合することを明らかにした(平成24年度受理：JNC, 2012) (図1)。

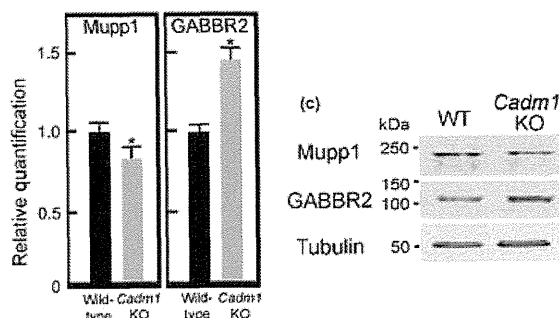


図1 Cadm1ノックアウトマウスにおけるMupp1GABA receptor B2の変動

Mupp1は13個のPDZを有し、PDZ13でSynGAPやGABBR2とPDZ10ではセロトニン受容体 (5-HT_{2R}) に結合する(平成23年度受理：PLOS ONE, 2012)。また、*Cadm1*ノックアウトマウスではグルタミン酸作動性神経のマーカーの発現が減少したことから、興奮性のシナプスの関与が示唆され、Mupp1を介した複合体形成が、興奮性と抑制性シナプスのバランスの変化に重要な役割を果たしていると考えられる。種々の受容体と結合できるMupp1を介して形成するCadm1複合体に、変化が生じることがASDの分子病態に関与していると考えられる。

*Cadm1*ノックインマウスの解析では、まず仔の遺伝型比率は201匹調べたところ、WT：ヘテロ：ホモ=52:102:47となり、約1:2:1の結果となった。また、胎内致死や発達過程における死亡率は、変異型により違いは観察されなかった。したがって、生死に遺伝子変異が影響していないと考えられる。

マウスの神経組織、生理学および行動解析における解析を行った。行動解析では、Cadm1ノックアウトマウスで見られなかった常動性の行動が現れた。これらのことから、Loss-of-functionのみ

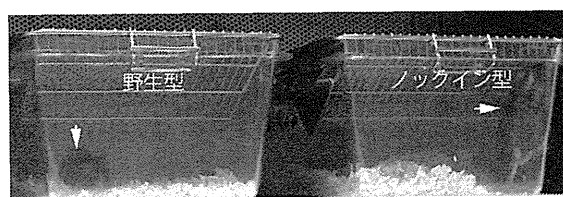


図2. Cadm1 変異ノックインマウスの常同性行動

ならず、変異によるGain-of-functionが病態に関与する可能性がさらに高まった。Cadm1変異ノックインマウスの初代海馬神経細胞は、デンドライトの伸長が抑制されていたことから、変異蛋白によるシナプス障害が起こっていることが示唆された。

また、変異CADM1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に着目し、遺伝子変異による小胞体ストレス誘導をリンパ芽球で検出可能な系を確立した。ASD患者家系のリンパ芽球に、小胞体ストレス試薬であるツニカマイシン(TM)を存在下または存在無しで、小胞体ストレスマーカーであるCHOPの発現を経時的に観察し、小胞体ストレスの変化を解析した。その結果、変異を持つ者(Y251S)は、変異を持たない者に比べ、CHOPの値が常に高かった。なお、コントロール遺伝子プローブGAPDによる検出値を相対的に扱った。さらにTM存在下では、変異を持つ者(Y251S)はCHOP上昇のピークが約1時間早期に出現し、小胞体ストレスに対する感受性が高いことを示した。内在性の変異CADM1が、小胞体ストレスに関与していることが明らかとなった(2013, 投稿中)

ASDに見出された遺伝子変異産物であるCADM1蛋白による機能障害(Loss-of-function)と小胞体ストレス(Gain-of-function)としてのシナプス機能障害との関係を明らかにした。

D. 考察

遺伝子変異による機能障害(Loss-of-function)に加え、変異蛋白が誘導する小胞体ストレス(Gain-of-function)によるシナプス受容体複合体の機能障害がASDの分子病態に関与していると考えられる。

本研究は候補遺伝子の一つであるCadm1を解析することにより、道筋をつけるものであり、方向性が示されたと思われる。

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明するものであり、本研究に

よりASDにおけるシナプス機能障害との関係の解明に貢献した。

本研究を足掛かりとして、今後さらなる分子病態解明および治療法開発研究により、1%以上ともいわれるASD患者の社会的不適応の改善が望まれる。

E. 結論

*Cadm1*ノックアウトマウスによりCadm1がコミュニケーション障害、社会性、不安行動に関与していること、また*Cadm1*変異が神経細胞のシナプスに障害を及ぼすことが明らかとなった。さらに、CADM1の変異を導入したノックインマウス(個体)を用いた実験により、ノックアウトマウスの行動にはなく、より自閉性障害に近い常動性の行動が表れた。これらのことから、Loss-of-functionだけではなく、変異によるGain-of-functionが病態に関わっているとの結論に達した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

※Fujita E(藤田恵理子)およびJimbo EF(神保恵理子は同一人物)。藤田は旧姓。

1) 論文発表

1. [Fujita E](#), Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum. *J Neurochem.* 2012;123(5):886-894
2. [Fujita E](#), Tanabe Y, Imhof BA, Momoi MY, Momoi T. Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity. *PLOS ONE*, 2012;7(1):e30151.

2) 学会発表

1. Kojima K, Yamagata T, Saito M, Matsumoto A, Jimbo EF, Momoi MY: Secretin receptor and the associated molecular processes relevant to autism spectrum disorder . American Society of Human Genetics (ASHG) 62nd annual meeting, San Francisco, USA, November 6-10, 2012.
2. Matsumoto A, Yamagata T, Nozaki Y, Jimbo E, Momoi MY. 12q21 deletion syndrome with intellectual disability and facial dysmorphism. American Society of Human Genetics (ASHG) 62nd annual meeting, San Francisco, November 6-10, 2012.
3. 小島華林、松本歩、楊志亮、神保恵理子、山形崇倫、桃井眞里子: CADM1 遺伝子変異をもつ自閉性障害患者のリンパ芽球を用いた小胞体ストレス感受性についての検討. 日本人類遺伝学会第 57 回大会、2012 年 10 月 26 日、東京
4. 神保恵理子、小島華林、田辺裕子、山形崇倫、桃井眞里子、桃井隆: 自閉性障害に関与するシナプス接着因子 Cadm1 と Multiple PDZ domain protein(Mupp1)の関与、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

※Fujita Eは、神保恵理子の旧姓および名を示す。

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., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., Momoi T.	A complex of synaptic adhesion molecule CADM1, a molecule related to autism spectrum disorder, with MUPP1 in the cerebellum.	J Neurochem	123	886-894	2012
Fujita, E., Tanabe, Y., Imhof, B.A., Momoi, M.Y., Momoi T.	Cadm1 at synapses on the dendrites of Purkinje cells is involved in mouse ultrasonic vocalization activity.	PLoS ONE	7	e30151	2012

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

ORIGINAL
ARTICLEA complex of synaptic adhesion molecule CADM1,
a molecule related to autism spectrum disorder,
with MUPP1 in the cerebellumEriko Fujita,^{*,1} Yuko Tanabe,^{†,1} Beat A. Imhof,[‡] Mariko Y. Momoi^{*} and
Takashi Momoi[†]^{*}Department of Pediatrics, Jichi Medical University, Tochigi, Japan[†]Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, Tochigi, Japan[‡]Department of Pathology and Immunology, University of Geneva, CMU, Geneva, Switzerland**Abstract**

Mutations in the synaptic adhesion protein CADM1 (RA175/SynCAM1) are associated with autism spectrum disorder (ASD), a neurodevelopmental disorder of uncertain molecular origin. *Cadm1*-knock out (KO) mice exhibit smaller cerebella with decreased number of synapse of Purkinje cells and some ASD-like symptoms, including impaired ultrasonic vocalization. In this study, we examined the alteration of the *Cadm1* synaptic complex in the mouse cerebellum at post-natal stages. The C-terminal peptide of *Cadm1* associated with Mupp1 at PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)(1-5), a scaffold protein containing 13 PDZ domains, which interacted with gamma-aminobutyric acid type B receptor (GABBR)2 at PDZ13, but not with PSD-95. The GABBR2 was detected in a set of proteins interacting with *Cadm1* C-terminal. *Cadm1* colocalized with Mupp1 and GABBR2 on the dendrites of Purkinje

cells in the molecular layers of the developing cerebellum and on the dendrites of hippocampal neurons cultured *in vitro*. These observations suggest that the *Cadm1* synaptic receptor complex, including Mupp1–GABBR2, is located on the dendrites of Purkinje cells. The amount of GABBR2 protein, but not mRNA, was increased in the cerebella of *Cadm1* KO mice, suggesting that lack of *Cadm1* does not affect transcription of GABBR2, but may stabilize the Mupp1–GABBR2 complex; the Mupp1–GABBR2 interaction may be stabilized by conformational change in Mupp1 or association with other adhesion molecules and by anchorage to the post-synaptic membrane. Up-regulation of GABBR2 in the cerebellum in the absence of CADM1 may be associated with ASD pathogenesis.

Keywords: autism, *Cadm1*, cerebellum, GABBR2, Mupp1, Purkinje cell.

J. Neurochem. (2012) **123**, 886–894.

RA175/SynCAM1/CADM1 (CADM1), a member of the immunoglobulin superfamily, localizes to both sides of the synaptic cleft and functions as a synaptic cell–cell adhesion molecule. The extracellular domain of *Cadm1* mediates calcium-independent, homophilic *trans*-interactions (Biederer *et al.* 2002; Fujita *et al.* 2003). Patients bearing the CADM1 mutations H246N and Y251S are diagnosed with autism spectrum disorder (ASD) (Zhiling *et al.* 2008), a heritable neurodevelopmental disorder (Pickett and London 2005). *Cadm1*-knock out (KO) mice (Fujita *et al.* 2006, 2007) exhibit abnormal social and emotional behavior similar to the human symptoms of ASD (Takayanagi *et al.* 2010), *Cadm1*-KO pups possess smaller cerebella than wild-type pups and emit impaired ultrasonic vocalization (USV) like *Foxp2*(R552H)-knock in (KI) pups, who carry a mutation related to speech–language disorder (Fujita *et al.* 2008, 2012a).

Cerebellar abnormalities with Purkinje cell loss occur in human autopsy samples from ASD patients (Ritvo *et al.* 1986; Bauman and Kemper 1994; Fatemi *et al.* 2000). While *Cadm1* mRNA also appears in the Purkinje cells and

Received March 20, 2012; revised manuscript received June 27, 2012; accepted September 10, 2012.

Address correspondence and reprint requests to Takashi Momoi, Center for Medical Science, International University of Health and Welfare, 2600-1, Kitakanemaru, Ohtawara, Tochigi, Japan. E-mail: momoi@iuhw.ac.jp. (or) Mariko Y. Momoi: Department of Pediatrics, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimotsukeshi, Tochigi, Japan. E-mail: mymomoi@jichi.ac.jp

¹These authors contributed equally to this work.

Abbreviations used: ASD, Autism spectrum disorder; *Cadm1*, Cell adhesion molecule 1; CASK, calmodulin-associated serine/threonine kinase; GABBR, Gamma-aminobutyric acid type B receptor; KI, knock in; KO, knock out; Mupp1, Multiple PDZ domain protein 1; NLGN, Neuroligin; PDZ, PSD-95/Dlg/ZO-1; USV, ultrasonic vocalization.

external granular cells of the developing cerebellum (Urase *et al.* 2001), Cadm1 protein is expressed in the developing brain, including the cerebrum and cerebellum (Fujita *et al.* 2005, 2012a). Cadm1 partly colocalizes with VGluT1 and VGluT2 in the developing cerebellum (Miyazaki *et al.* 2003; Fujita *et al.* 2012a). Thus, it is likely that Cadm1 is involved in the cerebellular synaptic function.

In this study, we focused on the Cadm1 molecular complexes in cerebellar synapses. Cadm1 harbors a band 4.1 region and a PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ)-binding motif in its cytoplasmic tail (Fujita *et al.* 2003). At the pre-synapse, Cadm1 associates with calmodulin-associated serine/threonine kinase (CASK) via the PDZ domain (Biederer *et al.*, 2002). In contrast with pre-synapse, little is known about Cadm1 molecular complex at the post-synapse. The localization and clustering of Cadm1, neurotransmitter receptors, and channels can be crucial for the proper function of post-synaptic neurotransmitter receptor complexes, with PDZ domains acting as adaptors. Scaffolding molecules such as PSD-95 structurally organize macromolecular complexes in the post-synaptic density (Sala *et al.* 2001).

The C-terminal region of neuroligin (NLGN), another synaptic molecule, interacts with PSD-95, a multiscaffold protein which forms a complex with excitatory N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) and Shank; PSD-95 assembly causes an imbalance of excitatory and inhibitory receptors (Gerrow and El-Husseini 2007). Multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1) is another multi-PDZ scaffold protein containing a PDZ13 domain, and interacts with SynGAP and GABBR2 at PDZ13 (Kraplinsky *et al.* 2004; Balasubramanian *et al.* 2007); Mupp1–SynGAP form a complex within the excitatory NMDAR signaling complex (Kraplinsky *et al.* 2004). Although GABBR2 and Cadm1 carry PDZ-binding motifs in their terminal regions and localize to Purkinje cells and their dendrites (Luján and Shigemoto 2006; Fujita *et al.* 2012a), little is known about Cadm1–neurotransmitter receptor complexes at the post-synaptic membrane.

In this study, we examined Cadm1-binding scaffold proteins by pull-down assay. Cadm1 specifically interacts with Mupp1, but not with PSD-95, and may form a ternary complex with Mupp1–GABBR2 in the cerebellum. We also demonstrate that GABBR2 is up-regulated in *Cadm1*-KO mice

Materials and methods

Ethics statement

We followed the Fundamental Guidelines for Proper Conduct of Animal Experiments and Related Activities in Academic Research Institutions under the jurisdiction of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, and all of the protocols for animal handling and treatment were reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of Jichi University (approval numbers, H22-179, 10-179) and International University of Health and Welfare (approval numbers, D1008; 10118). Wild-type,

Cadm1-KO mice (Fujita *et al.* 2006) (male mice) were used for the experiments.

Plasmid construct

GST-tagged pEF-BOS mammalian expression vector (pEB-GST)-RA175C and -RA175ΔC (lacking C-terminus EYFI), and pcDNA-Cadm1myc (pcDNA4/TO/myc-His expression vector) were previously described (Fujita *et al.* 2007, 2010). cDNA fragments encoding PDZ domains of rat Mupp1 and mouse neuroligin3 (Nlgn3) were obtained from pcDNA3-GFP–Mupp1 (kindly gifted from Dr. Ullmer) and derived from mouse brain (C57BL/6J), respectively. They were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primers: the forward primer for Mupp1(PDZ 1-5) and Mupp1(PDZ 1-8); 5'- AAGATGTTGGAAACCATAGAC -3', reverse primer for Mupp1(PDZ 1-5); 5'- ATACCTTCTAGAG-GTCACAGAGGCA-3', reverse primer for Mupp1(PDZ 1-8); 5'-CTGCTGCATTCTAGATCATACGGCC-3', reverse primer for Mupp1, the forward primer for Nlgn3: 5- GGATCCATGAC-GACCTTGCACCCC-3', reverse primer for Nlgn3: 5-3'. PCR products for Mupp1 were amplified by one cycle of 95°C for 2 min, 10 cycles of 95°C for 30 s and 62°C for 6 min, and one cycle at 72°C for 7 min, and cloned into pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA) and then subcloned in-frame into *EcoRI* site of the pEGFP-C1 vector (BD Bioscience-Clontech Laboratories, Inc., San Jose, CA, USA). PCR products for Nlgn3 were amplified by one cycle of 95°C for 2 min, 10 cycles of 95°C for 30 s and 62°C for 3 min, and one cycle at 72°C for 7 min, and cloned into pGEM-T easy vector, and then subcloned in-frame into *BamHI* sites of the pGEX-4T-3 vector (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ, USA). PSD-95–GFPGW1 (kindly gifted from Dr. El-Husseini) was subcloned into *HindIII* and *EcoRI* site of pEGFPN1 vector (Clontech).

Cell culture

COS and C2C5 cells were cultured in α -minimum essential medium (MEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Neurons were isolated from the brains of rat at embryonic day 18 as described (Goslin and Banker 1998). Neurons were cultured using Neurobasal medium with 2% B27 supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and L-glutamine (0.5 mM). Cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 6 days *in vitro* (DIV), neurons were transfected with pcDNA3-GFP–Mupp1, pcDNA3-GFP (vacant vector), or pcDNA3-GABBR2 and myc-tagged CADM1 using the calcium phosphate method and incubated for 2 DIV.

Immunoblot analysis

Brain of male mice and transfected COS cells were lysed with the buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 1 mM dithiothreitol, the protease inhibitor cocktail, and 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride). After centrifugation at 15 000 g for 30 min, the cell extracts (50 μ g protein) were subjected to pull-down assay, immunoprecipitation assay, and sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel (7.5–12%) electrophoresis and immunoblot analysis using mouse and/or rabbit anti-GST (Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA, USA), mouse anti-GFP (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) and/or rabbit anti-GFP (Clontech), mouse anti-Tubulin (Sigma-Aldrich, St Louis,

MO, USA), mouse anti-Mupp1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and rabbit anti-GABBR2 (Alomone, Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel).

Pull-down assays and immunoprecipitation assay

For *in vitro* pull-down assays, GST-fused Cadm1-C containing or not containing EYFI (GST-Cadm1-C, GST-Cadm1-delta-C, or GST), and Nlgn3-C were purified by glutathione sepharose beads from the extract of *E. coli* containing each plasmid. GST-fusion proteins (5 µg) was incubated for 3 h at 4°C with lysates from brain or transfected COS cells. The lysates were applied to glutathione column after centrifugation at 15 000 *g* for 10 min. After the column was washed with the lysate buffer, the bound proteins were eluted with glutathione buffer (10 mM glutathione), and subjected to the silver (Ag) staining and or immunoblot analysis using mouse anti-Mupp1, rabbit anti-GST, rabbit anti-GFP, and rabbit anti-GABBR2.

Immunoprecipitation was performed as previously described (Fujita *et al.* 2006, 2007). pBgs (mammalian expression vector)-GST-Cadm1 or pBgs-GST-Cadm1-delta-C (2 µg), and pcDNA3-GFP-Mupp1 (2 µg) or vehicle (pcDNA3 vector) were cotransfected into COS cells by Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the specimen. COS cells were lysed with lysis buffer. Cell lysates were clarified by centrifugation at 16 000 *g* for 30 min. Cadm1 and Mupp1 were immunoprecipitated by mouse anti-GST or mouse anti-GFP. Cadm1 and Mupp1 in the immunoprecipitates were detected by immunoblot analysis using rabbit anti-GFP, rabbit anti-GST, respectively.

Immunostaining

Wild-type and *Cadm1*-KO mouse brains were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline at 4°C overnight. Frozen sections (10-µm thick) were cut on a cryostat and immunostained with chicken anti-SynCAM1 (Cadm1; MBL), mouse anti-Mupp1, rabbit anti-GABBR2, mouse anti-myc (Nacaratetsque, Kyoto, Japan), rabbit anti-GFP. For the immunostaining for the C2C5 cells and neuronal cells, the transfected cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed with phosphate-buffered saline, and then incubated with rabbit anti-GFP and mouse anti-myc overnight at 4°C. Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies against rabbit, mouse, and chicken IgG were purchased from Molecular Probes. Nuclei were detected using Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The reactivity was viewed using a confocal laser-scanning microscope CSU-10 (Yokogawa Electric Corp., Tokyo, Japan) and a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). At least three animals per genotype were examined, and experiments were repeated three times. Quantification of staining intensities was done using LAS AF software (Leica Microsystems). The mean pixel value in the area of interest and in the same size area of the background was calculated. The background level was subtracted from the value found in the area of interest (in the molecular layer). Reported intensities were normalized to control, and the Student's *t*-test was performed for statistical analysis.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was prepared from testes of wild-type and *Cadm1*-KO male mice (P 10) using RNeasy mini kit (QIAGEN Inc., Valencia,

CA, USA) according to the manufacturer's specifications. Complementary DNAs were synthesized from total RNA (1 µg) using reverse transcriptase (Invitrogen) as described previously (Fujita *et al.* 2007). Real-time PCR analysis was performed using Applied Biosystems 7500 fast real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) based on published sequences for genes encoding the respective mouse *Mpdz* (MUPP1) and GABBR2, and VIC-labeled mouse *Gapd* (VIC-labeled MGD probe; Applied Biosystems) as endogenous control. For each sample, the 20 µL total volume consisted of 10 µL TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x; Applied Biosystems), 1 µL TaqMan Gene Expression Assays, and 5 µL of each first-strand cDNA sample. The real-time PCR fragments were amplified as follows: one cycle at 95°C for 20 s, 60 cycles at 95°C for 3 s, and 60°C for 30 s. Results were analyzed using student's *t*-tests ($p < 0.05$ was considered statistically significant).

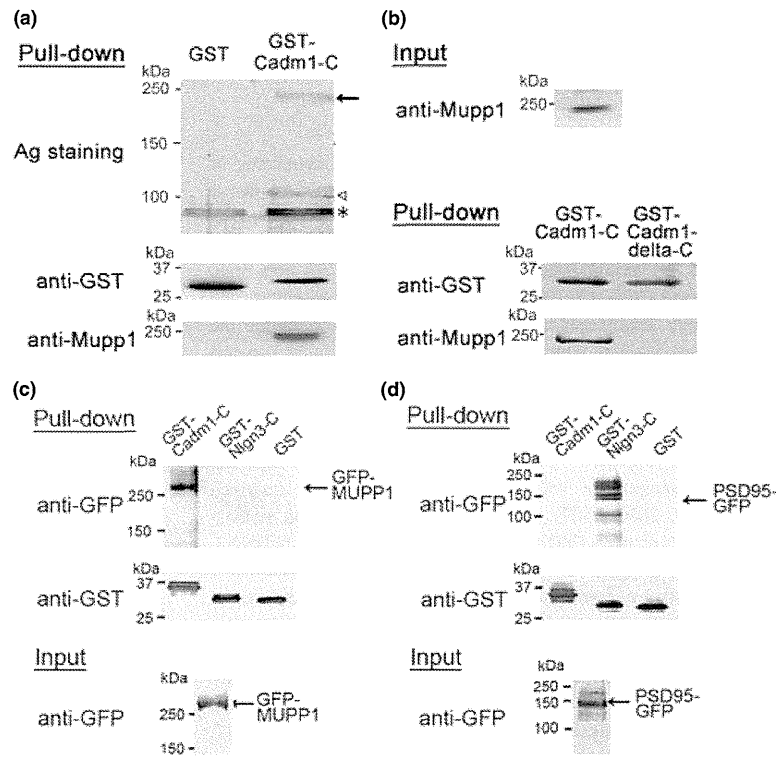
Results

We focused on the interaction of proteins via their PDZ-binding motifs. We examined the proteins interacting with the sequence EYFI in the cytoplasmic tail of Cadm1 (Cadm1-C). Pull-down experiments using brain extracts revealed that purified GST-fused Cadm1-C peptides (GST-Cadm1-C) interacted with proteins with apparent molecular weights of 220 kDa, 110 kDa, and 85 kDa (Fig. 1a); via immunoblotting, we identified the 110-kDa protein as CASK located at the pre-synaptic membrane (unpublished data), and the 220-kDa protein as Mupp1, a scaffold protein containing 13 PDZ domains. However, the anti-Mupp1 antibody did not detect the band in the set of proteins bound to GST-Cadm1-C lacking the PDZ-binding motif EYFI (Cadm1-delta-C) (Fig. 1b), demonstrating that, in the brain, Cadm1 specifically interacts with Mupp1 via its EYFI-PDZ domain. The 85-kDa band (with asterisk) may contain both non-specific proteins interacting with GST and unknown proteins specifically interacting with Cadm1-C. However, Cadm1 did not interact with PSD-95, with which Nlgn3 can interact, whereas Nlgn3 did not interact with Mupp1 (Fig. 1c and d).

The intracellular association of Mupp1 with the Cadm1 PDZ-binding domain was further confirmed in COS and C2C5 cells by immunoprecipitation and immunostaining (Fig. 2). GFP-Mupp1 associated with Cadm1-C, but not with GST-Cadm1-delta-C (Fig. 2a), and Cadm1-myc and GFP-Mupp1 colocalized in C2C5 cells (Fig. 2b). Cadm1-myc alone or GFP-Mupp1 alone diffusely localized to the cytoplasm, whereas GFP-Mupp1 and Cadm1-myc were assembled and tightly colocalized in the intracellular region.

Mupp1 interacts with the PDZ regions of various receptors, including GABBR2 (Becamel *et al.* 2001; Balasubramanian *et al.* 2007). To determine which PDZ domain of Mupp1 associates with Cadm1-C, we implemented pull-down assays between Cadm1-C and truncated Mupp1 peptides of different molecular weights. Cadm1 interacted with Mupp1(PDZ1-5)

Fig. 1 Pull-down and immunoblot analysis for the proteins associated with cell adhesion molecule 1 (Cadm1)-C. (a) Proteins in the brain associated with Cadm1-C. The arrow (220 kDa) and open triangle (110 kDa) indicate the major proteins bound to GST-Cadm1-C. Asterisk (85 kDa) indicates the mixture of the non-specific band and the bands of unknown proteins specifically interacting with Cadm1-C. The major 220-kDa protein was identified as multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1) by immunoblot analysis using anti-Mupp1, and the 110-kDa protein was identified as calmodulin-associated serine/threonine kinase (CASK) by anti-CASK immunoblotting (unpublished observation). (b) Mupp1 was associated with GST-Cadm1-C, but not with GST-Cadm1-delta-C lacking the PDZ-binding motif (EYFI). Interaction between Mupp1 (c) or PSD-95 (d) with Cadm1-C and Nlg3-C was examined by pull-down and immunoblot analysis.



with greater affinity than with Mupp1(PDZ1-13) or with Mupp1(PDZ1-8) (Fig. 3a). Multiple bands of GFP-PDZ(1-5) with molecular weight higher than 110 kDa were detected, and may be because of phosphorylation or ubiquitination of GFP-PDZ(1-5). Furthermore, Cadm1 colocalized with Mupp1(PDZ1-5), Mupp1(PDZ1-13), and Mupp1(PDZ1-8) in C2C5 cells (Fig. 3b).

GABBR2 has a PDZ-binding domain and interacts with Mupp1 (Balasubramanian *et al.* 2007). As both GABBR2 and Cadm1 are expressed in the developing cerebellum (Luján and Shigemoto 2006; Fujita *et al.* 2012a), we examined whether Cadm1 can associate and colocalize with GABBR2 in the developing cerebellum (Fig. 4). We detected not only Mupp1 and CASK but also GABBR2 in the set of proteins pulled down by GST-Cadm1C (Fig. 4a). Furthermore, Cadm1 colocalized with GABBR2 in the developing cerebellum (Fig. 4b). At day 5 post-natal (P5, an early stage), Cadm1 and GABBR2 colocalized in the soma of Purkinje cells before dendrite formation. At P8, GABBR2 staining was positive in the soma, dendrites, and dendritic arbors of Purkinje cells, whereas Cadm1 staining was positive around and along the dendrites of Purkinje cells. At P11, GABBR2 mainly occurred in the dendritic stems and soma of the Purkinje cells and also in the dendritic arbors, whereas Cadm1 expression increased and extended to the apical-distal region in the molecular layer. Cadm1

colocalized with GABBR2 throughout the dendritic arbors of Purkinje cells, in particular the basal region of the molecular layer, but Cadm1 staining was almost negative in the soma and the dendritic stems of Purkinje cells. Cadm1 was also expressed in granular cells, but GABBR2 expression was not detected in these cells. At P14, both Cadm1 and GABBR2 expression decreased in the molecular layer.

In the cerebellum, Mupp1 can be detected in Purkinje cells and in the granular and molecular layers (Sitek *et al.* 2003). In the molecular layer of the cerebellum at P11, Cadm1 and Mupp1 partly colocalized to the dendrites of Purkinje cells, although with different intensities; Mupp1 preferentially localized at the proximal dendritic portion, whereas Cadm1 appeared in the apical-distal dendritic portion (Fig. 5a). Compared with wild-type mice, anti-GABBR2 immunoreactivity was more intense in the molecular layer of *Cadm1*-KO mice, WT : KO = 1 : 1.45, whereas anti-Mupp1 immunoreactivity was slightly decreased in *Cadm1* KO mice, WT : KO = 1 : 0.82 (Fig. 5a and b), and the levels of GABBR2 and Mupp1 in the cerebellum at *Cadm1*-KO mice were approximately double and a little lower, respectively (Fig. 5c). Thus, lack of *Cadm1* up-regulates the level of GABBR2 in the cerebellum, although quantitative real-time PCR (qRT-PCR) indicated that the mRNA levels of Mupp1 and GABBR2 were not altered following knockout of *Cadm1* (Figure S1).

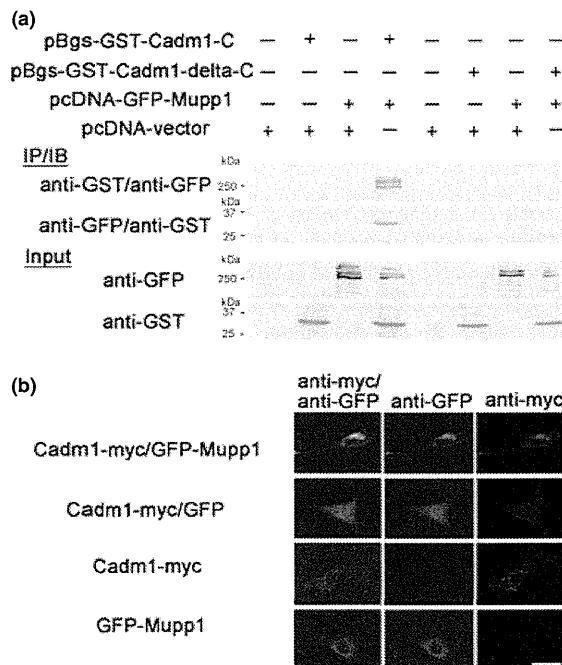


Fig. 2 Intracellular interaction between cell adhesion molecule 1 (Cadm1)-C and multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1). (a) Immunoprecipitation and immunoblot analysis. pBgs-GST-Cadm1-C or pBgs-GST-Cadm1-delta-C was cotransfected with pcDNA3-GFP-Mupp1 or vehicle into COS cells. Cadm1 and Mupp1 were immunoprecipitated by mouse anti-GST and mouse anti-GFP, respectively. Cadm1 and Mupp1 in the immunoprecipitates were detected by immunoblot analysis using rabbit anti-GFP or rabbit anti-GST, respectively. (b) Colocalization of Cadm1 and Mupp1 in C2C5 cells. Cadm1-myc and GFP-Mupp1 were cotransfected into C2C5 cells and their intracellular localization was visualized by immunostaining with anti-myc and anti-GFP. Bar indicates 20 μ m.

We evaluated the colocalization of Cadm1 and Mupp1 or GABBR2 on neurons cultured *in vitro*. In hippocampal neurons, Cadm1-myc colocalized with GFP-Mupp1 at spines assembled on the dendrites (Fig. 6a) and also colocalized with GABBR2 (Fig. 6b).

Discussion

The Cadm1-Mupp1-GABBR2 complex in the cerebellum Mupp1 is a multi-PDZ scaffold that is highly expressed in the brain and displays distinct expression patterns including hippocampal and cerebellar localization (Sitek *et al.* 2003). Mupp1 is highly enriched in synaptosomes, specifically in post-synaptic densities, and interacts with SynGAP and GABBR2 at PDZ13, 5-HTR2C at PDZ10, and JAM-A at PDZ9 (Becamel *et al.* 2001; Hamazaki *et al.* 2002; Kraplinsky *et al.* 2004; Balasubramanian *et al.* 2007).

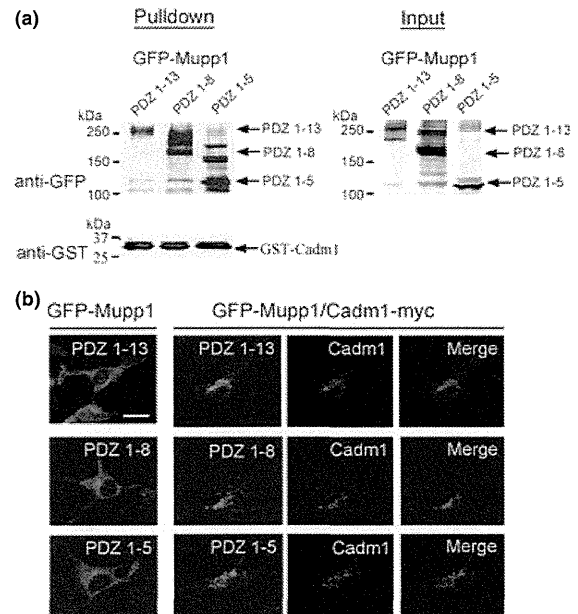


Fig. 3 The region of multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1) that interacts with cell adhesion molecule 1 (Cadm1)-C. (a) Identification of the region associating with Cadm1-C by pull-down and immunoblot analysis. Three different GFP-Mupp1 regions [GFP-PDZ(1-13), -PDZ(1-8), and -PDZ(1-5)] were transfected into COS cells, and cell lysates were incubated with Cadm1-C-conjugated beads; the bound GFP-Mupp1 domain was analyzed by immunoblot analysis using anti-GFP. (b) Identification of the Mupp1 region interacting with Cadm1 by immunostaining. Cadm1-myc and GFP-PDZ(1-13), -PDZ(1-8), -PDZ(1-5) were transfected. Colocalization of Cadm1-myc and the three GFP-Mupp1 regions was visualized with anti-myc (red) and anti-GFP (green). Bar indicates 20 μ m.

Cadm1 occurs at both sides of the synaptic cleft and is assumed to act as a synaptic adhesion molecule that clusters neurotransmitter receptors via the PDZ-binding domain in its C-terminus. Cadm1 interacted with Mupp1 at PDZ(1-5), and Mupp1 and GABBR2 were detected in Cadm1-associated proteins in the brain, suggesting that Cadm1 forms a ternary complex with synaptic receptors, including GABBR2 at the post-synaptic membrane via interaction with Mupp1. Therefore, it is likely that the Cadm1-Mupp1-GABBR2 complex localizes to the inhibitory synapses between Purkinje cells and parallel fibers. However, VGluT1 is down-regulated in the *Cadm1*-KO mice (Fujita *et al.* 2012a), suggesting that Cadm1 also localizes to the excitatory synapse. Within the excitatory NMDAR signaling complex, disruption of the Mupp1-SynGAP complex increases the number of synapses containing functional AMPA receptors by regulating p38 MAP kinase activity (Kraplinsky *et al.* 2004). Cadm1 may anchor the GABBR2 complex and the SynGAP-NMDAR complex via Mupp1 to the inhibitory and excitatory post-synaptic membranes, respectively. A possible

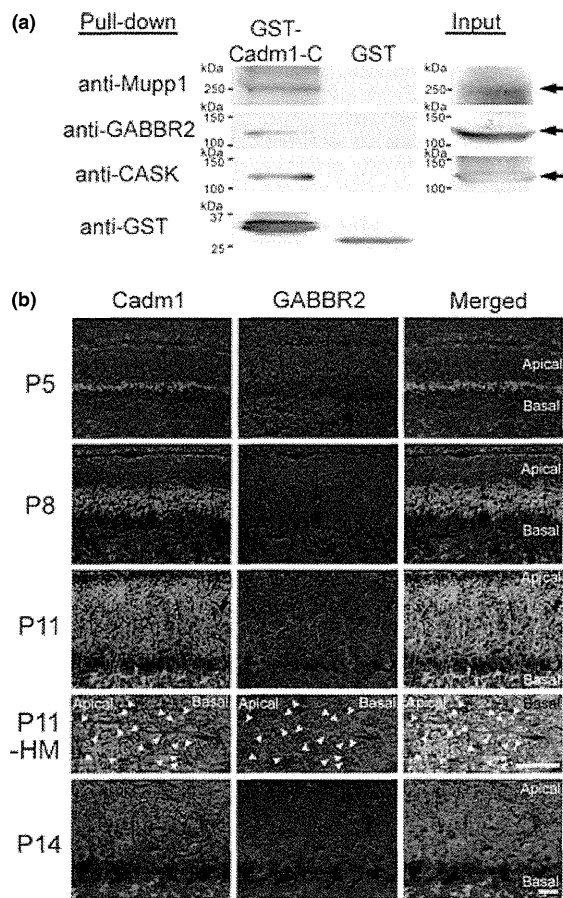


Fig. 4 Cell adhesion molecule 1 (Cadm1) and gamma-aminobutyric acid type B receptor (GABBR2) form a complex in the cerebellum. (a) Interaction among Cadm1, multiple PDZ domain protein 1 (Mupp1), and GABBR2 in the mouse brain revealed by pull-down assay. GABBR2 (108 kDa) was detected in the proteins associated with Cadm1-C by immunoblotting with anti-GABBR2. (b) Distribution of Cadm1 and GABBR2 in the developing cerebellum. There are several types of synapses in the molecular layer of the cerebellum; Purkinje cells receive two excitatory afferents, parallel fibers, and climbing fibers. Most of the Cadm1 and GABBR2 signal colocalized in the soma of Purkinje cells at P5. At P8–11, the dendrites extended to the distal-apical region. Cadm1 expression increased in the distal-apical region in the molecular layer at P11. Cadm1 mainly colocalized with GABBR2 over the dendritic arbor of Purkinje cells. HM, highmagnified picture. Arrowheads indicate both Cadm1- and GABBR2-positive spines assembled on the dendrites. Cadm1 and GABBR2 intensities decreased at P14. Bars, 30 μm.

Cadm1–Mupp1–GABBR2 and Cadm1–Mupp1–SynGAP–NMDAR complex is illustrated in Fig. 7.

PSD-95 is the multiscaffold protein, which forms a complex with NMDAR at excitatory synapse (Gerrow and El-Husseini 2007). However, Cadm1 and Nlgn3 did not interact with PSD-95 and Mupp1, respectively (Fig. 1c and

d). Therefore, the two synaptic adhesion molecules may form different receptor complexes, such as Cadm1–Mupp1 and Nlgn3–PSD-95, at the post-synaptic membrane. Cadm1–Mupp1 and Nlgn3–PSD-95 regulation system at excitatory and inhibitory synapse will be major issue for the future study.

Possible molecular mechanism of the up-regulation of GABBR2 in the Purkinje cells of Cadm1–KO mice

Cadm1 deficiency increased GABBR2 protein level, but not its mRNA level (Figure S1), suggesting that GABBR2 is more stable in the cerebellum lacking Cadm1. Cadm1 deficiency may cause a conformational change in Mupp1 and its destabilization, but also association of Mupp1 with other adhesion molecules that anchors the Mupp1–GABBR2 complex to the post-synaptic membrane and stabilizes it, resulting in an imbalance of inhibitory and excitatory synapses that may be linked with ASD pathogenesis.

Cadm1 and Mupp1 preferentially localized to the apical-distal and proximal dendritic portions of the molecular layer, respectively, suggesting that other cell adhesion molecules interact with Mupp1 in the proximal region. Cntnap2 may associate with the Mupp1–GABBR2 receptor complex because the cytoplasmic tail of Cntnap2 harbors a PDZ-binding motif, KKEWLI, similar to that of Cadm1, KKEYFI, (Biederer *et al.* 2002; Fujita *et al.* 2003) and interacts with Mupp1 (Horresh *et al.* 2008). In the cerebellum, Cntnap2 occurs in the proximal stems of dendrites and in the soma of Purkinje cells (Fujita *et al.* 2012b), and the Cntnap2-positive area was observed to extend to the apical-distal dendritic portion in the molecular layer of *Cadm1*-KO mice (unpublished data). Thus, it may be possible that the Cntnap2–Mupp1 complex contributes to GABBR2 stabilization by forming a ternary complex in place of the Cadm1–Mupp1 complex and the increased GABBR2 levels in the cerebella of *Cadm1*-KO mice.

However, *Cadm1*-KO mice exhibit some ASD-like symptoms and impaired USV, suggesting that Cntnap2 or other cell adhesion molecules cannot sufficiently compensate for Cadm1 function (Fujita *et al.* 2012b). This deficiency may be because of differences in the targets of pre-synaptic members; the Cntnap2–Mupp1 complex may have a synaptic function distinct from that of the Cadm1–Mupp1 complex because Cntnap2 forms a *cis*-complex with members of the contactin family, which have their own target molecules for cell adhesion.

Loss of function of Cadm1 and up-regulation of GABBR2 in the cerebellum of Cadm1–KO mice

Infant rodents utilize USVs for critical mother–offspring interactions (Branchi *et al.* 2001). In addition to ASD symptoms (Takayanagi *et al.* 2010), *Cadm1*-KO pups (P10) display impaired USVs similar to the USVs of *Foxp2*(R552H)-KI pups (P10) who carry a mutation related