

## 自閉症責任遺伝子の変異が小胞体ストレスを誘導するメカニズムを発見

自閉スペクトラム症（ASD）は、社会的コミュニケーションが困難になる発達障害（脳機能障害）の一つです。すでに、ASD 発症リスクの増加につながる責任遺伝子の変異が数多く報告されていますが、これらの変異が ASD をもたらすメカニズムは未解明です。

これまでに本研究グループは、ASD 責任遺伝子 Usp15 に異常が生じると、スプライシング反応（転写後修飾）が破綻し、複数の異常な転写産物が生じることを発見しています。今回、Usp15 のノックアウト（KO）マウス脳から見いだした、別の ASD 責任遺伝子 Hevin に着目してスプライシング異常を解析し、Hevin の C 末端領域に位置する EF-hand モチーフが欠損した変異体を 2 つ同定しました。これらの機能解析から、Hevin 変異体は小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘導することが分かりました。次に、ASD 研究の遺伝子発現解析のデータベースで、EF-hand モチーフ内に変異を持つ Hevin を探索したところ、Hevin W647R 変異体を見つけ、これも小胞体ストレスを誘導することを突き止めました。また、タンパク質の構造変化を追跡する分子動力学シミュレーションにより、変異部位周辺で、複数の疎水性アミノ酸で構成される構造（疎水コア）が崩壊していることを明らかにしました。以上の結果から、Hevin W647R 変異体は、疎水コアの崩壊により構造的な不安定性が増し、小胞体からの分泌に異常をきたすことが示唆されました。

本研究成果は、細胞内の膜輸送系の異常に起因する小胞体ストレス誘導が ASD 症状悪化につながる可能性を示しており、小胞体ストレス緩和や特定構造を標的とした薬物による ASD 予防・治療への応用が期待されます。

### 研究代表者

筑波大学生命環境系

鶴田 文憲 助教

## 研究の背景

自閉スペクトラム症 (Autism spectrum disorder; ASD)は、社会コミュニケーション障害と常同行動によって特徴づけられる発達障害(脳機能障害)の一つであり、世界中で 100 人に 1 人は発症していると推定されています。特別教育や医療に関わる社会的な経済負担が増加していることから、ASD の発症メカニズムに基づいた治療法の確立が望まれています。

これまでに、ASD 患者と定型発達者の遺伝子を比較することで、発症リスクに関わる遺伝子の変異が数多く特定されてきました。中でも、シナプス結合を増強させる分泌タンパク質 Hevin では、ASD 発症リスクを高める変異が、中央部から C 末端 (カルボキシル基で終端している末端) 領域にかけて集中して存在しています。しかし、Hevin 変異体がどのようにして ASD の発症につながるのか、その詳細な分子メカニズムは不明でした。

## 研究内容と成果

これまでに本研究グループは、ASD 責任遺伝子 Usp15<sup>注1)</sup> の欠損によりスプライソソーム<sup>注2)</sup> の機能が破綻し、異常な転写産物が複数産生されることを報告してきました。本研究では、まず、同定した異常な転写産物の中から、ASD に関連する別の遺伝子を探索し、分泌タンパク質 Hevin<sup>注3)</sup> を見いだしました。そして、Hevin のどの領域が変化しているか解析したところ、C 末端領域の EF-hand モチーフ<sup>注4)</sup> を欠損した変異体を 2 つ同定しました。これらの変異体は、スプライソソームの機能低下によるスプライシングエラーの産物であると推測されます。そこで、分子生物学的な解析を行い、Hevin 変異体は細胞外への分泌効率が低下し、細胞小器官の小胞体に蓄積しやすくなることが分かりました。また、小胞体に蓄積した Hevin 変異体は、小胞体ストレス<sup>注5)</sup> を誘導し、小胞体ストレスマーカーであるシャペロンタンパク質 BIP<sup>注6)</sup> の発現上昇を引き起こすことを発見しました。これらの結果から、Hevin C 末端領域の EF-hand モチーフの異常が、小胞体ストレス誘導に関与することが明らかになりました。

次に、ASD 発症に関連した Hevin の変異が EF-hand モチーフ近傍に存在するか、ASD 患者家系における大規模遺伝子解析のデータベースを調査したところ、Hevin を構成する 647 番目のアミノ酸トリプトファンがアルギニンに置換している変異体 (Hevin W647R) を見つけました。この変異体の動態を調べるため、野生型と変異体の Hevin を培養細胞に導入し、分泌効率や局在を検討しました。その結果、Hevin W647R 変異体は、EF-hand モチーフ欠損変異体と同様に、分泌効率が低下し、小胞体に蓄積することで小胞体ストレスを誘導することが分かりました。分泌タンパク質の分泌効率低下は、タンパク質の構造異常が原因で起きることが知られています。そこで分子動力学シミュレーション<sup>注7)</sup> を用いて、野生型および変異体 Hevin 構造の変化を追跡しました。これにより、野生型で観察された、球状タンパク質内部のトリプトファンを中心とした疎水性アミノ酸のかたまり (疎水コア) が、変異体では親水性のアルギニンに置換されることで崩壊し、疎水コアの溶液への露出頻度が増加していることが明らかになりました (参考図)。以上の結果から、ASD 発症リスクを亢進する W647R 変異体は、分泌効率の低下と小胞体ストレスの誘導を惹起し、ASD 発症につながることを示唆されました。

本研究成果は、分子生物学的手法と分子動力学シミュレーションを用いて、ASD 責任遺伝子 Hevin の変異が、部分的なタンパク質折りたたみ異常を引き起こし、小胞体ストレスを誘導することを、世界に先駆けて発見したものです。

## 今後の展開

本研究により、ASD 責任遺伝子である Hevin の変異体が構造異常になり、小胞体ストレスや分泌効率低下を誘導するメカニズムが明らかになりました。ASD 患者の脳内では小胞体ストレス経路関連遺伝子の発現量が高いことから、他の ASD 責任遺伝子の変異によっても小胞体ストレスが誘導されている可能性があります。今後、マウス等を用いた個体内での小胞体ストレスや分泌効率低下の影響が明らかになれば、より詳細な ASD 発症メカニズムが解明されると考えられます。また、今回の発見は、タンパク質部位特異的な薬剤や小胞体ストレスを緩和する薬剤の開発により、ASD の予防や治療につながると期待されます。

## 参考図

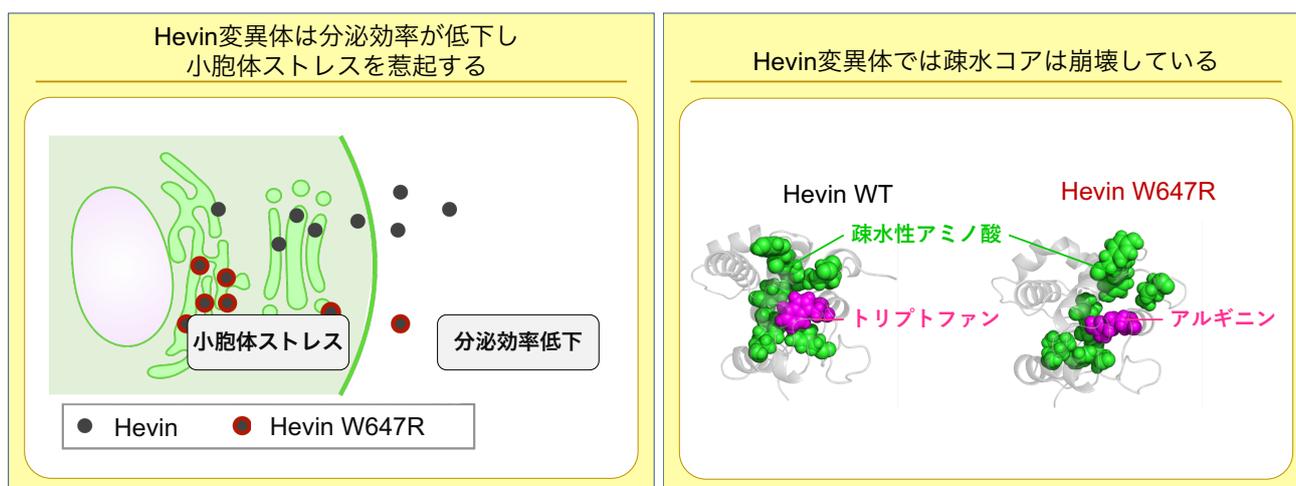


図 本研究の概要

(左) Hevin 変異体は小胞体に蓄積することで、小胞体ストレスや分泌効率低下を誘導する。(右) 野生型 Hevin (Hevin WT) で形成される疎水コアは W647R 変異により崩壊する。

## 用語解説

### 注1) USP15

脱ユビキチン化活性を持つシステインプロテアーゼで、タンパク質やオルガネラの品質管理、細胞内シグナル伝達、RNA の代謝、遺伝子発現を制御する。ASD 責任遺伝子としても知られている。

### 注2) スプライソソーム

未成熟 mRNA 前駆体からイントロン (転写後に除去される塩基配列) を取り除き、成熟 mRNA を産生するタンパク質と RNA の複合体。コアとなる 5 つの低分子リボ核タンパク質と複数のタンパク質から構成される。

### 注3) Hevin

Sparcl1 遺伝子にコードされた分泌タンパク質 (細胞外に放出されるタンパク質)。哺乳動物では主にアストロサイトから分泌され、シナプス結合や細胞外マトリクス形成に寄与する。ASD 患者家系において複数の変異が報告されている。

### 注4) EF-hand モチーフ

Ca<sup>2+</sup>結合モチーフ (タンパク質のアミノ酸配列中の部分構造) の一つ。垂直に位置した 2 つの  $\alpha$  ヘリックスと短いリンカーから構成される。EF-hand モチーフは、Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質の多くにみられ、細胞内シグナル伝達や筋収縮などを調節する。

#### 注5) 小胞体ストレス

小胞体内腔における折りたたみ不全タンパク質の蓄積など、小胞体の機能や恒常性が破綻した状態。折りたたみを補助するシャペロンタンパク質によって小胞体ストレス応答が軽減される。改善されない場合、細胞死を誘導することがある。

#### 注6) BIP

タンパク質合成において折りたたみ構造の獲得を補助するシャペロンタンパク質で、小胞体内に局在する。またこのタンパク質が異常タンパク質を認識することで、小胞体ストレス応答経路のきっかけになることが示唆されている。

#### 注7) 分子動力学シミュレーション

コンピュータ上でタンパク質の動きをシミュレーションする手法。タンパク質を構成する原子に働く全ての相互作用をもとに運動方程式を解き、タンパク質の動きを追跡する。タンパク質や核酸など生体分子の動的・静的性質を調べることができる。

#### 研究資金

本研究は、日本学術振興会科学研究費、公益財団法人アステラス病態代謝研究会、筑波大学計算科学研究センター学際共同利用プログラム（LSC and MOLBIO）の助成を受けて実施されました。

#### 掲載論文

【題名】 Autism-associated mutation in Hevin/Sparcl1 induces endoplasmic reticulum stress through structural instability

(自閉症関連 Hevin/Sparcl1 変異体は構造不安定性を介して小胞体ストレスを誘導する)

【著者名】 Taketomi T., Yasuda T., Morita R., Kim J., Shigeta Y., Eroglu C., Harada R., Tsuruta F.

【掲載誌】 Scientific Reports

【掲載日】 2022年7月13日

【DOI】 10.1038/s41598-022-15784-5

#### 問い合わせ先

【研究に関すること】

鶴田 文憲 (つるた ふみのり)

筑波大学 生命環境系 助教

URL: <https://ftsuruta.wixsite.com/fuminori-tsuruta>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: [kohositu@un.tsukuba.ac.jp](mailto:kohositu@un.tsukuba.ac.jp)