

自閉症責任遺伝子 SPARCL1 の変異体は炎症反応を誘導する: 自閉症発症の新たなメカニズムの解明

武富 巧 (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】

自閉症とは、対人関係障害などを有する発達障害である。近年、自閉症を罹患する人は 100 人に 1 人いると報告されており、発症メカニズムの解明は社会的に大きな課題となっている。自閉症は主に遺伝的要因で発症し、罹患した人の脳内では炎症反応が亢進する。さらに、ゲノムワイド関連研究によって、自閉症を発症する原因と推定される遺伝子変異が複数同定されている。これまでに所属研究室では、自閉症責任遺伝子の一つ USP15 の欠損により、別の自閉症責任遺伝子 SPARCL1 のスプライシングを異常にすることで変異体を産出することを発見している。SPARCL1 はアストロサイトや神経細胞で発現する分泌タンパク質で、炎症抑制に関わることが報告されている。本研究は、自閉症責任遺伝子 SPARCL1 の変異体の脳内炎症における新規機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】

(1) 免疫細胞染色

細胞を播種したカバーガラスを PBS で洗浄したのち、4% PFA/PBS に置換し、氷上で 10 分間固定した。PBS で洗浄した後、5% BSA/0.4% Triton X-100/PBS を添加し、室温で 30 分間透過処理とブロッキングした。一次抗体として、抗 SPARCL1 抗体 (1:500, R&B, Cat# AF2836)、抗 RFP 抗体 (1:500, Rockland Immunochemicals, Cat# 600-401-379)、抗 Iba1 抗体 (1:500, wako, Cat# 019-19741)、抗 p65 抗体 (1:500, CST, Cat# C22B4)、抗 MAP-2 抗体 (1:500, Milipore, Cat# MAB3418) を添加し、4°C で一晩反応させた。核の染色には Hoechst33342 (1:10000, Invitrogen) を用いた。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl ZEISS, LSM700) を用いて観察した。ImageJ を用いて、得られた画像の共局在指数 (Pearson's value) や蛍光強度比 (核細胞質) を算出した。

(2) ウェスタンブロッティング

細胞を冷却した PBS で洗浄し、Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) を用いて細胞を溶解し、細胞抽出液とした。培養上清はサンプルを回収する直前に回収した。サンプルは 4× Sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.01% Bromophenol blue, 10% 2-Mercaptoethanol) を添加した後、5 分間ボイルを行った。サンプルはアクリルアミドゲルで、電気泳動を行い分離した。Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Ethanol) を用いて、アクリルアミドゲルから PVDF 膜へ 100V で 60 分間の転写を行った。PVDF 膜は、5% スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) によりブロッキングした後、5% BSA/TBS-T に希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 SPARCL1 抗体 (1:1000, R&D, Cat# AF2836)、抗 BiP 抗体 (1:1000, CST, Cat# C50B12)、抗 Tubulin 抗体 (1:1000, SIGMA, Cat# DM1A) を用いた。その後、TBS-T で洗浄し、5% スキムミルク/TBS-T に 1/20000 で希釈した二次抗体を 1 時間反応させ

た。TBS-T で洗浄し、PVDF 膜をケミルミワシ Super (nacalaitesque, Cat# 02230-30) で検出した。

【結果・考察】

変異体 SPARCL1 の同定

はじめに、USP15 欠損によって、どのような変異体 SPARCL1 が産出されるのかを検証した。その結果、EF ハンドの一部を欠損している SPARCL1 ΔEF や、ミトコンドリアの構成遺伝子である NDUFA11 が融合している SPARCL1-NDUFA11 が見つかった。

変異体 SPARCL1 は小胞体に蓄積し小胞体ストレスを誘導する

分泌タンパク質は合成とともに小胞体内腔に移行し、ゴルジ体・小胞を介して分泌される。しかし、異常な構造を持つタンパク質は小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘導することが知られている。SPARCL1 が分泌タンパク質であることから、変異体 SPARCL1 が小胞体に蓄積しているかを検証した。その結果、野生型に比べ、変異体はより多く小胞体に蓄積していた。次に変異体 SPARCL1 が小胞体ストレスを引き起こしているかを検討した。その結果、野生型に比べ、変異体は小胞体ストレスマーカー BiP を発現上昇させることが明らかになった。

変異体 SPARCL1 は異常修飾され、細胞外に分泌される

炎症抑制タンパク質である SPARCL1 は変異が入ると小胞体に蓄積する。それゆえ、変異体 SPARCL1 の分泌効率低下が、自閉症の症状の一つ炎症につながると考えた。実際に変異体 SPARCL1 分泌量が減っているかをウェスタンブロッティングで検討した。その結果、変異体 SPARCL1 はわずかに分泌効率が低下していたものの、顕著な差は認められなかった。さらによく観察すると、驚くべきことに、変異体 SPARCL1 は異常修飾産物が分泌されることを発見した。このことから、私は変異体 SPARCL1 の修飾が炎症につながるのではないかと考えた。

変異体 SPARCL1 発現細胞の培養上清は炎症を引き起こす

次に、異常修飾された変異体 SPARCL1 が炎症応答を誘導するかを検証するために、マイクログリアに変異体 SPARCL1 発現細胞培養上清を添加し、炎症応答時に核内移行する p65 の局在を観察した。その結果、変異体 SPARCL1 発現細胞培養上清で培養したマイクログリアは、p65 核移行が促進した。

さらに、SPARCL1 が直接マイクログリアに作用するのかを検証したところ、野生型 SPARCL1 はマイクログリアの取り込まれるのに対し、変異体 SPARCL1 は細胞膜上で凝集していることを見出した。これら結果は、変異体 SPARCL1 がマイクログリアの何らかの受容体と結合して炎症を引き起こす可能性を示唆している。

本研究では、自閉症責任遺伝子 SPARCL1 の変異は、小胞体ストレスを誘導し、異常修飾を介して炎症を誘導することを見出した。以上の結果から、自閉症発症に重要な炎症が自閉症責任遺伝子 SPARCL1 の変異によって誘導されるメカニズムの一端を明らかにした。今後は、精製した変異体 SPARCL1 が炎症を誘導するのかを検証する予定である。