

令和元年5月20日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06721

研究課題名(和文) シナプス間隙マトリックスによるコンパートメント形成とシナプス分化機構

研究課題名(英文) Synaptic cleft matrix exhibiting molecular compartments regulates synaptic differentiation

研究代表者

浜 千尋 (HAMA, Chihiro)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：50238052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の神経細胞間の接続部であるシナプスに焦点を当て、その中でもアセチルコリンを神経伝達物質として用いているコリン作動性シナプスについて解析をしている。特に、シナプスにおける神経細胞間の隙間であるシナプス間隙を構成するHigタンパク質を同定し、それがアセチルコリン受容体の局在量を制御していることを明らかにした。さらに、同じシナプス間隙に第2のタンパク質Haspを同定することに成功し、それがシナプス間隙におけるHigの局在に必須であることを明らかにした。シナプス間隙の中でHigとHaspはそれぞれが分子コンパートメントを形成し、近接しながらも異なる位置に存在することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプスは脳内の情報伝達装置として脳機能の形成に重要な役割をもつ。多くの研究者がシナプスを研究してきたが、シナプスの一部であるシナプス間隙の解析は進んでおらず、シナプスの正しい理解は得られていない。われわれは、ショウジョウバエを用いてコリン作動性シナプスの間隙に存在する分泌性タンパク質Higを世界に先駆けて発見し、Higがアセチルコリン受容体の局在量を調節していることを見出した。さらにHigのシナプス間隙における局在にはHaspが必要であることも明らかにした。HigとHaspがシナプス間隙の中で異なるコンパートメントを形成して局在するという知見は、シナプス研究において質的に新しい発見である。

研究成果の概要(英文)：We are interested in studying the differentiation of synapses in the *Drosophila* brain, focusing on the synaptic clefts of cholinergic synapses that use acetylcholine as a neurotransmitter. We initially identified Hig as a matrix protein constituting synaptic cleft matrices. This protein intriguingly regulates the levels of nicotinic acetylcholine receptors on the postsynaptic membranes. We recently succeeded in identifying a second matrix protein Hasp in the cholinergic synaptic cleft. Hasp is required for Hig to localize at the synaptic clefts. Notably, Hig and Hasp form distinct molecular compartments located closely but separately within the cleft. This suggests that the interaction of Hig with Hasp is not via 1 to 1 molecular ratio, and there would be a novel mechanism underlying the formation of cleft matrices.

研究分野：分子神経科学

キーワード：シナプス シナプス間隙 ショウジョウバエ Hig Hasp アセチルコリン受容体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シナプス間隙のマトリックスとして定義されるシナプトマトリックスは、シナプス分化を多面的に制御し、神経伝達物質受容体の集積やシナプスの安定化に関わる他、シナプス異常を示す疾患の原因となり得ることが近年の研究によりしだいに明らかにされている。しかし、そのなかでコリン作動性シナプスについては、神経と筋肉の接合部では詳細な解析が進んでいるものの、中枢シナプスではシナプスマトリックスの構成因子や構築機構についての知見は殆ど得られていなかった。われわれは、中枢コリン作動性シナプスの間隙に存在するタンパク質として Hig タンパク質を世界に先駆けて発見し、シナプス間隙に視点を据えたシナプスの分化と機能の解析を進めてきた。当研究室は、この分野の研究の先導的な位置に立つこととなり、分子レベルでの研究をさらに精力的に進めていく必要があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、当研究室がショウジョウバエを用いて発見した中枢コリン作動性シナプスのマトリックスタンパク質である Hig を出発点として、新たに Hig と相互作用する分子を同定し、Hig およびその相互作用分子が如何にシナプトマトリックスを形成し、コリン作動性シナプスの構築と機能を統御するのか、その機構を分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエを材料に用いて遺伝学、分子遺伝学、生化学、免疫組織化学的解析を行った。中枢コリン作動性シナプスにおける新規シナプトマトリックス構成タンパク質の同定、および Hig の作用を受けるシナプスの膜上ならびに末端内の因子を同定するため、Hig を出発点とした遺伝学的な解析を行った。さらに、得られた因子の機能を *in vivo* で明らかにするため、それぞれの突然変異体ないし RNAi などを用いて様々なシナプスマーカーの分布の異常を調べ、シグナルの流れを解析した。新たに得られた因子については抗体を作製し、シナプトマトリックスの構造的な詳細を超高解像レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を用いて明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 新たなシナプスマトリックスタンパク質 Hasp の同定：

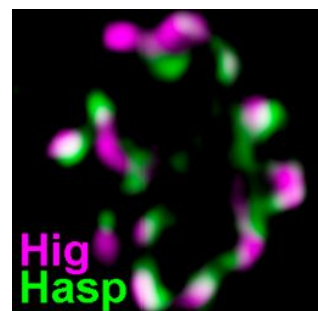
中枢コリン作動性シナプスのシナプス間隙には Hig が特異的に局在することを見出してきた。分泌性の Hig タンパク質は様々な種類の脳神経細胞で産生され細胞外を拡散してコリン作動性シナプスの間隙に局在するようになる。したがって、コリン作動性シナプス間隙に Hig をつなぎとめる第二の因子が必要であることが予想された。そこで、まずショウジョウバエのデータベースより、Hig タンパク質中に最大5個存在する CCP ドメインに注目し、そのドメインをもつ他のタンパク質を選択して解析を進めた。その結果、Hig と同様に分泌性のタンパク質 Hasp (Hig-anchoring scaffold protein) を同定し、このタンパク質がコリン作動性シナプスの間隙に Hig を局在化させるために必須であることを見出した。Hasp をコードする遺伝子に挿入されたトランスポゾンの imprecise excision (不正確な切出し) 法により遺伝子機能を失った *hasp* 欠質変異を作成したところ、この変異のホモ接合体は *hig* 変異のホモ接合体と同様に致死となり、わずかに生まれた成虫の寿命も短くなっていた。さらに、*hig* と *hasp* の二重変異のホモ接合体は、それぞれの単独変異と同様な致死性と寿命の長さを示した。この結果は、Hig と Hasp が同じシグナル経路で機能して等しい作用をもたらすからであると解釈できる。実際に *hasp* 変異体の脳を Hig 抗体で染色すると Hig タンパク質は細胞体には野生型と変わらず存在していたが、シナプス領域からは消失することが判明した。すなわち、Hasp タンパク質は Hig がコリン作動性シナプスのシナプス間隙に局在するために必須であることが分かった。

*hig* 変異体の脳では、アセチルコリン受容体サブユニット  $D\alpha 6$  および  $D\alpha 7$  が減少するが、*hasp* 変異体の脳でも同様な現象が観察された。このことは、*hasp* 変異体のコリン作動性シナプスには Hig が存在できないため、その結果として  $D\alpha 6$  および  $D\alpha 7$  が減少すると考えられる。

Hasp タンパク質の局在を様々な神経伝達物質に関連したマーカーの抗体で染色することにより解析したところ、Hasp は Hig と同様にコリン作動性シナプスに特異的に存在することが判明した。さらに、免疫電子顕微鏡法によりその局在を解析したところ、Hasp はシナプス間隙に存在することが明らかとなった。

#### (2) コリン作動性シナプス間隙における Hig と Hasp のコンパートメント形成：

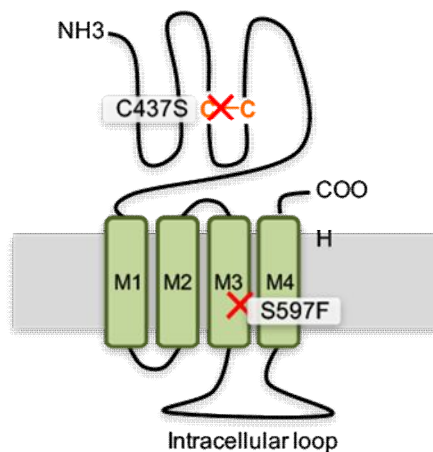
Hig と Hasp は共に中枢コリン作動性シナプスのシナプス間隙に特異的に存在している。それでは、シナプス間隙でどのような分布を示すのだろうか。当初、予想していたことは、Hasp は Hig のシナプス間隙での局在に必要なことから、両者が 1 対 1 の相互作用を示し、同じ分布パターンを示すということであった。しかし、解析結果はその予想とは異なるものであった。まず、ショウジョウバエ成虫脳を Hig および Hasp 抗体により二重染色してレーザー顕微鏡で観察すると、両タンパク質は近傍に存在しているが、部分的に重ならない像が得られた。そこで、さらに高解像度の像を得るために、超解像顕微鏡 (Structured



illumination Microscope) を用いたところ、両タンパク質はシナプス間隙内で近接しながらも異なる分子コンパートメントを形成していることが判明した(図の蛍光画像には複数のシナプスが存在しており、それに伴い複数のシナプス間隙が示されている。赤紫が Hig、緑が Hasp の局在部位を示す)。今までに、動物種およびシナプスの種類を問わず、シナプス間隙内のコンパートメント構造についての知見は全く得られておらず、今回初めて発見された。このコンパートメントの存在がシナプス構造の構築機構と機能を理解する上で新たな光をもたらすことが期待される。

### (3) *hig* 変異に対するサブレッサー変異の分離:

Hig タンパク質が欠損すると、コリン作動性シナプスからアセチルコリン受容体 (nAChR) のサブユニットである  $D\alpha 6$  と  $D\alpha 7$  のシナプス後部における局在量が半分に減少することが、我々の以前の研究により明らかにされている。すなわち、Hig はシナプス間隙からシナプス後部の nAChR の局在量を制御していることになる。この制御機構を明らかにすることを一つの狙いとして、Hig と相互作用するタンパク質を同定することを試みた。具体的には遺伝学的手法を用いて第 2 染色体上の *hig* 遺伝子変異に対するサブレッサー変異のスクリーニングを行った。*hig* 変異は前述の通りにそのホモ接合体が致死性を示し、生き残った成虫は寿命が短く、また活動性が低い。そこで、*hig* 遺伝子変異をもつ個体に対して変異誘起剤である EMS 処理を行い第 2 の変異を生じさせた。その処理をした後に第 2 染色体上に生じた変異が維持されるようにした系統を 400 作成し、*hig* 変異をホモ接合にした時に低下する活動性が回復することを指標としてスクリーニングを行った。その結果、独立に 2 種の変異を分離することに成功し、遺伝学的解析の結果、いずれも劣性変異として *hig* 変異をサブレッサーすることが判明した。この変異をもつ染色体から余分の変異を染色体の乗換えにより除去した後に、1 種の変異体については次世代シーケンス法により全ゲノムシーケンシングを行った。その結果、nAChR サブユニット  $D\alpha 5$  をコードする遺伝子内に候補変異が見出された。そこで、もう 1 種の変異体の  $D\alpha 5$  遺伝子の塩基配列を決定すると、やはり変異が生じていることが判明した。これら 2 種の変異は、 $D\alpha 5$  の異なる位置のアミノ酸の置換変異であることが予想された(図: 細胞外ドメインのシステインループを形成する 437 番のシステインがセリンに、3 つ目の膜貫通ドメイン M3 中の 597 番のセリンがフェニルアラニンに置換していた)。また、得られた 2 種の変異によるトランスヘテロ接合体を作成すると、やはり *hig* 変異をサブレッサーしたことから  $D\alpha 5$  遺伝子変異が *hig* のサブレッサーである可能性が高くなった。ここで、さらに CRISPR/Cas9 法により  $D\alpha 5$  遺伝子のノックアウト変異を作成して *hig* 変異との二重変異を作成したところ、*hig* 変異の表現型が回復した。このことから、 $D\alpha 5$  変異は *hig* 変異のサブレッサーとして機能すると結論した。したがって、 $D\alpha 5$  は Hig と密接に相互作用し、また、Hig が存在しない状態では、個体に害を与え致死性が生じる原因になることが明らかとなった。



$D\alpha 5$  に対する抗体を作成して脳を染色すると、 $D\alpha 5$  は Hig の分布とよく似ていることが判明した。また、2 種のサブレッサー変異をもつ  $D\alpha 5$  タンパク質は、細胞体には蓄積しているがシナプスにはわずかししか認められないことから、シナプスへの輸送あるいは安定性において異常が生じている可能性が考えられた。

$D\alpha 5$  と Hig の関係性を明らかにするため、それぞれの null 変異における局在を調べてみると、 $D\alpha 5$  変異体の脳のシナプス領域では Hig は約半分に減少し、さらに  $D\alpha 5 D\alpha 7$  二重変異体の脳のシナプス領域では Hig のほとんどが消失していた。逆に *hig* 変異体の脳のシナプス領域では、 $D\alpha 5$  と  $D\alpha 7$  は半減していた。したがって、シナプス後膜上の  $D\alpha 5$  と  $D\alpha 7$  はシナプス間隙に存在する Hig と相互作用し、互いにシナプスにおける局在を正に制御し合っていることになる。

サブレッサー変異スクリーニングにより、 $D\alpha 5$  変異が *hig* 変異のサブレッサーとして同定されたが、今回のスクリーニングは第 2 染色体の遺伝子に対して行われたため、nAChR のうち  $D\alpha 5$  変異だけがサブレッサーとして作用するのかわかり不明である。はたして、他の nAChR サブユニットの変異はサブレッサーとして働かないのだろうか。ショウジョウバエには 10 種類のサブユニットがゲノム上にコードされている。そこで、*hig* 変異体に対して各サブユニット遺伝子の発現を RNAi の手法によりノックダウンし、*hig* 変異体の表現型が回復するかどうかを解析した。その結果、 $D\alpha 5$  遺伝子をノックダウンしたときのみ、*hig* 変異の表現型が回復した。すなわち、nAChR サブユニットのうち  $D\alpha 5$  の機能欠損のみが *hig* 変異をサブレッサーすることが明らかとなった。

コリン作動性シナプスのシナプス間隙に存在する Hig が欠損すると、Hig 欠損個体は致死性を示すが、その致死性は  $D\alpha 5$  の欠損により抑えられる。したがって、Hig の欠損による致死性は  $D\alpha 5$  を通して生じていることになる。今後はどのような機構により致死性が生じ、またそれが抑えられるのかを分子レベルで解明していく必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

Nakayama, M., Suzuki, E., Tsunoda, S., Hama, C.

The matrix proteins Hig and Hasp exhibit segregated distribution within synaptic clefts and play distinct roles in synaptogenesis. The Journal of Neuroscience ( 査読有 ) 36, 590-606 (2016).

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2300-15.2016

[ 学会発表 ] ( 計 8 件 )

Nakayama, M., Nishimura, O., Kuraku, S., Sone, M., Hama, C.

Synaptic cleft protein Hig inhibits endocytosis of an AchR subunit D $\alpha$ 5 to regulate AchR clustering.

The 41<sup>st</sup> Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society

July 26, 2018 (Oral presentation), Kobe Convention Center

和田悠太郎、中山 実、浜 千尋

Hasp 局在化を制御するシナプスタンパク質の RNAi スクリーニング

第 4 0 回日本分子生物学会年会 ( 生命科学系学会合同年次大会 )

2017 年 12 月 6 日 ( ポスター ) 神戸ポートアイランド

高橋郁夫、中山 実、浜 千尋

アセチルコリン受容体のシナプス後膜上への集積における D $\alpha$ 5 サブユニットの役割

第 4 0 回日本分子生物学会年会 ( 生命科学系学会合同年次大会 )

2017 年 12 月 6 日 ( ポスター ) 神戸ポートアイランド

中山 実、西村 理、工樂 樹洋、曾根 雅紀、浜 千尋

シナプス間隙タンパク質 Hig は D $\alpha$ 5 サブユニットを介してアセチルコリン受容体の集積を制御する

第 4 0 回日本分子生物学会年会 ( 生命科学系学会合同年次大会 )

2017 年 12 月 6 日 ( ポスター ) 神戸ポートアイランド

中山実、西村理、工樂樹洋、曾根雅紀、浜千尋

アセチルコリン受容体集積を制御する分泌性シナプス間隙タンパク質 Hig

第 3 9 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日 ( ポスター ) 横浜

太田麻友、Thomas Senard、Dennis Kruk、鈴木章弘、中山実、浜千尋、曾根雅紀

ショウジョウバエ Hikaru genki タンパク質のシナプス輸送における発生時期特異的な制御機構

第 3 9 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日 ( ポスター ) 横浜

中山実、鈴木えみ子、角田慎一、浜千尋 ショウジョウバエのシナプス間隙に局在するマト

リックスタンパク質 Hig と Hasp が示すコンパートメント形成と機能

第 3 8 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日 ( ポスター ) 神戸

中山実、浜千尋 ショウジョウバエのシナプス間隙に局在するマトリックスタンパク質 Hig

と Hasp が示すコンパートメント形成と機能

シナプス研究会、2015 年 6 月 ( 口頭発表 ) 岡崎 国立生理学研究所

[ その他 ]

ホームページ [www.cc.kyoto-su.ac.jp/~hama/homepage-j.html/toppu.html](http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~hama/homepage-j.html/toppu.html)

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 中山 実

ローマ字氏名 : NAKAYAMA, Minoru

所属研究機関名 : 東邦大学

部局名 : 理学部

職名 : 研究員

研究者番号 ( 8 桁 ) : 40449236

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。