

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06471

研究課題名（和文）シナプス間隙コンパートメントの構築機構と機能

研究課題名（英文）Structures and functions of synaptic cleft compartments

研究代表者

浜 千尋 (HAMA, Chihiro)

京都産業大学・総合学術研究所・科研費研究員

研究者番号：50238052

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：われわれの体の中にある神経系がはたらく上で、シナプスとよばれる神経細胞同士の結合部位が重要な働きをします。そして、結合する神経細胞同士の間にある隙間をシナプス間隙とよんでいます。一つの神経細胞から放出された神経伝達物質はシナプス間隙を経てもう片方の神経細胞上に存在する受容体と結合してシグナルを伝えます。われわれの研究チームは、ショウジョウバエの遺伝学を用いてシナプス間隙に存在するタンパク質を2種類発見し、これらのタンパク質が神経伝達物質受容体の一つであるニコチン性アセチルコリン受容体のシナプスにおける局在量を制御する機構を明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経機能が発揮されるうえで中心的な役割を果たすシナプスについての研究は重要であり、実際に多くの研究が行われてきたが、神経伝達物質受容体の一つであるニコチン性アセチルコリン受容体のシナプスにおける局在制御機構は不明であった。今回のわれわれの研究により、その機構の一部を明らかにできたことは神経科学の発展にとって意義のあることである。また、今回の研究により、生理的に機能する受容体サブユニットの一つがシナプス間隙の状態によっては、シナプスの機能を欠損させることが判明しており、このことはヒトの神経変性疾患の発症機序の解明に新たな視点を加えるものである。

研究成果の概要（英文）：When the nervous system functions in our bodies, synapses, which are connecting parts between two adjacent neurons, play its central roles. The gaps between the two neurons are called synaptic clefts. One neuron secretes neurotransmitters, which traverse the clefts and bind their receptors located on the other neuron, thus transmitting neural information. Our team, using *Drosophila* genetics, identified two proteins Hig and Hasp, both of which were located in the synaptic clefts of cholinergic synapses, and found that these proteins regulate the synaptic levels of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) through interacting with particular subunits of the receptors. Notably, one of the subunits become a lethal factor when Hig is missing, which may provide insight into the development of therapies for the disorders associated with the loss of nAChR.

研究分野：分子神経科学

キーワード：シナプス間隙 ニコチン性アセチルコリン受容体 シナプス Hig Hasp ショウジョウバエ サプレッサー変異 sequestering subunit

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

シナプス間隙は、シナプス前部と後部に挟まれた 20 nm の幅をもつ空間であり、そこにシナプス前部から放出され拡散した神経伝達物質がシナプス後膜上の受容体に結合することにより神経伝達が行われる。シナプス間隙は、膨大な数の研究が行われてきたシナプスの一部でありながら、間隙を構成するマトリックス分子とそのシナプス機能における役割については、わずかな知見しか得られていなかった。その中で、Hig (Hikaru genki) タンパク質は、動物種と中枢シナプスの種類を問わず、特定の中枢シナプス間隙に存在するタンパク質として初めて我々の研究グループがショウジョウバエで同定したタンパク質である (Hoshino *et al.*, 1993; Hoshino *et al.*, 1996)。このタンパク質を遺伝的に欠損した個体は致死となり、生き残った成虫は寿命が短い。また、Hig タンパク質はアセチルコリンを神経伝達物質とするコリン作動性シナプスに特異的に存在し (Nakayama *et al.*, 2014)、生存に重要な役割を示すことが判明している。Hig は一つの免疫グロブリンドメインと複数の CCP ドメインを持つ分泌性のタンパク質 (図 1 参照) であるが、様々なニューロンで発現し、また非ニューロンで発現させても、細胞外に分泌されたのちに、コリン作動性シナプスの間隙にトラップされる。この特異的トラップ機構には、やはりコリン作動性シナプスの間隙に特異的に局在する分泌性タンパク質で多数

コリン作動性シナプスのシナプス間隙

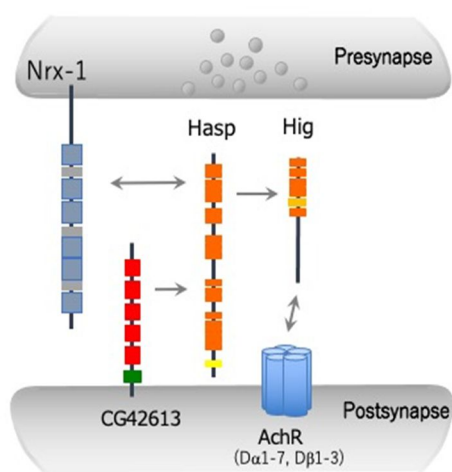


図 1

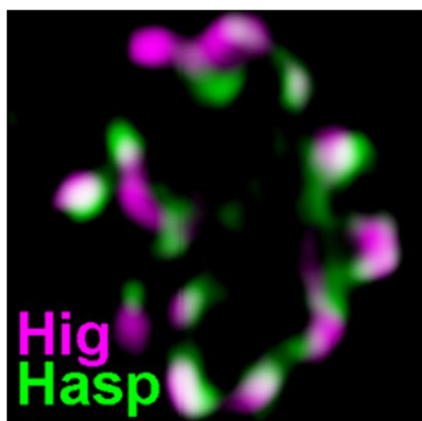


図 2

2. 研究の目的

本研究では、当研究グループが同定したシナプス間隙タンパク質 Hig が、nAChR の局在制御因子である、という知見に基づき、Hig がどのような機構で制御するのかを明らかにすることを目的とする。その結果、今までに明らかにされていない nAChR の局在制御機構が解明されると共に、シナプス間隙のコンパートメント形成の意義と役割に対する知見が得られ、さらにシナプス全体像への新たな理解が期待される。

の CCP ドメインから構成される Hasp タンパク質 (図 1 参照) が必要である (Nakayama *et al.*, 2016)。さらに、この Hasp タンパク質をコリン作動性シナプスの間隙に局在させるためには、膜タンパク質である Sclamp タンパク質 (図 1 中の CG42613) が必要であることも明らかとなっている (北村ら、未発表)。このようにして、我々の研究グループは、脳内のコリン作動性シナプスの間隙に存在するタンパク質群を同定することに成功し、シナプス間隙の分子構成に新たな知見をもたらした。また、Hig と Hasp の間では、Hig の間隙への局在に Hasp が必要であるが、逆に Hasp の局在には Hig を必要とせず、その代わりに Sclamp を必要とする。ここで興味深い点は、可能性として Hig と Hasp は 1 対 1 で結合することが考えられたが、実際にシナプスを超解像顕微鏡 (SIM) で観察したところ、シナプス間隙の中で、Hig と Hasp は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た (Nakayama *et al.*, 2016、図 2 参照)。この知見も、シナプス間隙で従来知られていない新たな発見である。ただし、このコンパートメント形成がシナプス機能の中でどのような意味をもつのかは、現在不明である。

シナプス間隙の分子コンパートメントのシナプス機能における意義を理解するためには、それぞれのコンパートメントを構成する分子の役割をさらに明確にする必要がある。Hasp が Hig の局在を制御する一方で、Hig はどのような役割をもつのだろうか。今までに明らかになったことは、Hig がニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のシナプス後膜上の局在量を制御するという点である (Nakayama *et al.*, 2014)。これは、*hig* 変異体において、nAChR のシナプス領域における局在量が低下したことから得られた結論である。しかし、その制御機構は不明であった。nAChR のシナプスにおける局在制御は、コリン作動性シナプスの分化および疾患を理解する上で極めて重要な問題であるが、その機構については驚くほど僅かな知見しか得られていなかった。

3. 研究の方法

Higによる制御機構を明らかにするため、Higと相互作用する分子の同定を試みた。具体的には、活動性が低下し寿命が短いショウジョウバエ変異体である *hig* 変異体の染色体に化学変異誘起剤を用いて突然変異をランダムに導入し、活動性および寿命が野生型なみに回復したサプレッサー変異体を2株分離した。そのうちの1株について全ゲノムシーケンシングしたところ（当時、理化学研究所・工樂研究室との共同研究）、サプレッサー変異はショウジョウバエゲノム中に存在する10種類のnAChRサブユニットの一つである $D\alpha 5$ をコードする遺伝子に生じていた。もう1株の変異体については $D\alpha 5$ 遺伝子のシーケンシングをしたところ、その遺伝子中に変異が生じていることが判明した。また、 $D\alpha 5$ 遺伝子の機能欠損変異を Crspr/Cas9 法で新たに作成し、その変異を *hig* 変異体に導入したところ、*hig* 変異体の表現型は野生型に顕著に近づいた。これらの結果から、 $D\alpha 5$ 遺伝子の機能欠損変異が *hig* 変異のサプレッサー変異として機能すると結論した。この知見に基づき、以後の解析は、種々のショウジョウバエ変異体を用い、nAChRサブユニットやHigのシナプス局在量を免疫組織化学的に行なった。また、タンパク質の複合体形成や遺伝子発現量の解析は、生化学的手法あるいはPCR法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) nAChRサブユニットのうち $D\alpha 5$ をコードする遺伝子の変異が *hig* 変異のサプレッサーとして作用する

ショウジョウバエゲノムには10種類のnAChRサブユニットをコードする遺伝子が存在する。ここで、*hig* 変異のサプレッサー変異として $D\alpha 5$ 変異が同定されたが、他のサブユニットの遺伝子変異は *hig* 変異のサプレッサー変異としてはたらくのだろうか。このことを明らかにするため、*hig* 変異体を対象にして、その個体中でRNAi法を用いて各サブユニットの発現をノックダウンさせたところ、 $D\alpha 5$ 遺伝子の発現抑制を行なったときのみ *hig* 変異の表現型が回復することが明らかとなった。このことは、10種類のnAChRサブユニットのうち $D\alpha 5$ サブユニットの遺伝子変異のみが *hig* 変異のサプレッサー変異として作用することを示している。したがって、nAChRのうち $D\alpha 5$ がHigと特異的に相互作用することを示唆している。

(2) Higと $D\alpha 5$ は互いにシナプスでの局在に必要である

Higと $D\alpha 5$ の間の遺伝的相互作用は示されたが、それでは具体的に両者間の相互作用を物質的に観察することができるだろうか。Higと $D\alpha 5$ のそれぞれに対する特異抗体を用いて脳のシナプス領域を解析したところ、*hig* 変異体では $D\alpha 5$ が、また $D\alpha 5$ 変異体ではHigの染色強度が減少していた。すなわち、この結果は、シナプス間隙にあるHigとシナプス後膜上にある $D\alpha 5$ が作用して互いにシナプス局在を正に制御していることを示している。また、この結果とは別に、生化学的解析から両者は複合体を作ることが確認された。

(3) Higタンパク質が存在しないと、 $D\alpha 5$ はnAChRサブユニットのシナプス局在を顕著に抑制して致死性をもたらす

$D\alpha 5$ の機能欠損変異が *hig* 変異の致死性を抑制して寿命を回復させるのは、どのような機構によるものだろうか。*hig* 変異の脳のシナプス領域では、 $D\alpha 6$ の局在量が減少することが既に知られていた (Nakayama et al., 2016)。ここで、*hig D\alpha 5* 二重変異体を調べると、*hig* 変異体で減少していた $D\alpha 6$ の局在量は野生型レベルより増加していた。また、 $D\alpha 5$ 単独変異のシナプス領域でも $D\alpha 6$ および $D\alpha 7$ の局在量は野生型より増加していた。すなわち、 $D\alpha 5$ には $D\alpha 6$ および $D\alpha 7$ サブユニットの局在量を負に調節する作用があることになる。また、Higは $D\alpha 5$ と結合して、 $D\alpha 5$ による局在抑制作用を抑えることが、これらの結果により示唆された。

一方、野生型、 $D\alpha 6$ 、 $D\alpha 7$ 変異体の間、および *hig* 単独変異体、*hig D\alpha 6*、*hig D\alpha 7* 二重変異体の間におけるサブユニットの局在量変化はいずれの場合にも観察されなかった。この結果は、nAChRの局在制御に $D\alpha 6$ と $D\alpha 7$ ははたらかず、 $D\alpha 5$ が重要な役割をもつことを示している。

(4) Higタンパク質が存在しない状態で、 $D\alpha 5$ を過剰発現させると、 $D\alpha 5$ はシナプス後膜上に正常に存在できず細胞内に蓄積する

hig 変異体のシナプス領域では $D\alpha 5$ の局在量が減少することから、 $D\alpha 5$ はHigと結合することにより膜上に安定に存在できる、と考えることができる。ここで、*hig* 変異体で $D\alpha 5$ を過剰発現すると、 $D\alpha 5$ は膜上で正常に分布せず、細胞内に蓄積することが抗体染色像において観察された。一方、*hig* 変異体で $D\alpha 6$ や $D\alpha 7$ を過剰発現させると、シナプス後膜上において正常なパターンで $D\alpha 6$ と $D\alpha 7$ の局在量が増加するものの、両者の細胞内での異常な局在は認められなかった。この結果は、 $D\alpha 5$ は $D\alpha 6$ と $D\alpha 7$ に比べて特異的な細胞内移動能をもつことを示している。

(5) キメラタンパク質の作成による、 $D\alpha 5$ サブユニットがもつドメインの機能の解析

$D\alpha 5$ 、 $D\alpha 6$ 、 $D\alpha 7$ 間で細胞外ドメインとそれに続く膜貫通ドメインを入れ替えたキメラタンパク質を作成し、それらを野生型および *hig* 変異体で発現させてシナプス領域におけるHigおよびキメラタンパク質の分布を解析した。その結果、 $D\alpha 5$ と $D\alpha 7$ の細胞外ドメインはHigと正の

相互作用を示すが、D α 6 は示さず、一方、D α 5 の膜貫通ドメインは細胞内への顕著な移動能を示したが、D α 6 と D α 7 は示さなかった。このことから、D α 5 は Hig と正に相互作用する細胞外ドメインと、顕著な細胞内移動能を示す膜貫通ドメインとの複合体であることが明らかとなった。

(6) Hig と D α 5 との相互作用を含む nAChR の局在調節モデル

以上の結果をもとにして、次のような nAChR の局在調節モデルを作成した。すなわち、シナプス後膜上にある D α 5 と D α 7 は細胞外ドメインでシナプス間隙に存在する Hig と正の相互作用を示す。ここで、D α 5 は細胞内へおそらくエンドサイトーシスにより移動するが、Hig と相互作用するため、D α 5 および D α 5 を含む nAChR の細胞内移動頻度は限定的なものになる (図 3 A)。ここで、*hig* 変異体では Hig が存在せず D α 5 を繋ぎ止めることができないため、D α 5 および D α 5 を含む nAChR は高い頻度で細胞内に取り込まれ、その結果、シナプス後膜上における nAChR の局在量は減少し、また個体は致死となる (図 3 B)。D α 5 変異体では D α 5 が存在しないため、シナプス間隙中の Hig の局在量は減少する一方、nAChR は D α 5 による細胞内への取り込みがなくなるため、シナプス後膜上の局在量は野生型よりも増加する (図 3 C)。さらに、*hig* と D α 5 の二重変異体では、Hig は存在しないものの、細胞内へ nAChR を引き込む D α 5 も存在しないため、nAChR のシナプス後膜上の局在量は野生型より増加する (図 3 D)。このようにして、得られたデータは Hig と D α 5 の間の相互作用と D α 5 の細胞内への引き込み能力により説明することができる。

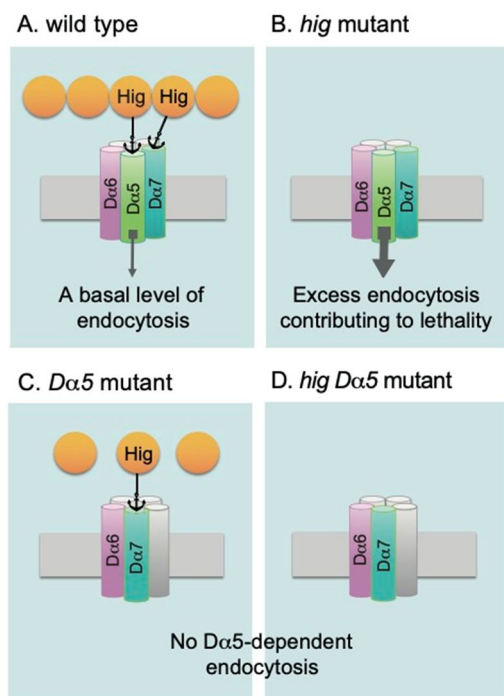


図 3

以上の研究成果は、論文として Nakayama *et al.* (2023) に報告した。D α 5 は nAChR のイオンチャンネルを構成する機能的なサブユニットであるが、その分子が nAChR 全体の局在量を制御しているという新たな知見を得ることができた。nAChR は、神経系が機能を発揮する上で極めて重要な分子であることから、その構造や作動特性について多くの研究が進められてきたが、シナプスにおける局在制御の研究は驚くほど少ない。その理由としては、サブユニットの種類が多数あり、また培養細胞での膜局在が容易でないこと、そして培養細胞ではシナプス間隙タンパク質との相互作用を調べることは困難であることが挙げられる。本研究では、生体内での解析が中心であるため、これらの問題を克服することができた。本研究で得られた知見をもとに nAChR の局在機構の詳細がさらに明らかになることが期待できる。D α 5 と Hig の間および Hig と Hasp の間の相互作用はシナプス間隙の分子コンパートメント形成に必要であることから、今後は得られた知見に基づいて、コンパートメント形成の機序と意義を解明していく必要がある。また、興味深い点として、先にも挙げたように D α 5 はイオンチャンネルを構成する機能的サブユニットであるが、シナプス間隙に Hig が存在しない、あるいは機能しないと、シナプス不全を引き起こし致死因子となってしまうのである。このことは、コリン作動性シナプスの縮退が症状として見られる神経変性疾患の発症機序を考える上で新たな視点を与えるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Yuhi Nishimura, Miwa Kitaichi, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, and Chihiro Hama	4. 巻 in press
2. 論文標題 Control of synaptic levels of nicotinic acetylcholine receptor by the sequestering subunit Dalpha5 and secreted scaffold protein Hig	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 the Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北市三和、浜千尋、中山実
2. 発表標題 シナプス間隙のナノコンパートメント形成に関わるHig, Hasp, Sclamp間の相互作用
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北市三和、西村勇飛、浜 千尋
2. 発表標題 シナプス間隙のナノコンパートメント形成を制御する膜タンパク質Sclamp
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuhi Nishimura, Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, Chihiro Hama
2. 発表標題 Synaptic levels of acetylcholine receptors are controlled by the internalizing subunit Da5 and synaptic cleft protein Hig in the Drosophila brain
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村勇飛、中山 実、西村 理、工樂 樹洋、曾根 雅紀、浜 千尋
2. 発表標題 ショウジョウバエ脳におけるアセチルコリン受容体のシナプス局在量はシナプス間隙タンパク質Higと相互作用するDa1pha5サブユニットにより抑制的に調節される
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama M, Nishimura O, Kuraku S, Sone M, Hama C
2. 発表標題 Synaptic cleft protein Hig inhibits endocytosis of an AchR subunit Da5 to regulate AchR clustering
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神経回路発生研究室ホームページ http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~hama/homepage-j.html/toppu.html 京都産業大学生命科学部教員紹介 http://www.kyoto-su.ac.jp/faculty/professors/1s/hama-chihiro.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------