

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03324

研究課題名(和文) シナプス伝達効率を調節するアクティブゾーンの分子構造基盤と修飾機構

研究課題名(英文) Molecular and structural basis and modification mechanisms of the active zones regulating synaptic transmission efficiency

研究代表者

大塚 稔久 (Ohtsuka, Toshihisa)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：40401806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピオチンリガーゼとCASTのリンカーの長さを変えたコンストラクトを用いて、培養神経細胞での発現・局在解析を進めた。Bassoonとの局在を定量化し、リンカーの長さによってピオチンシグナルとBassoonシグナルとの共局在の程度に統計学的に優位な差が見られた。このことは、リンカーの長さを変えることによってCASTからの距離に応じた異なる結合分子複合体を検出できることを示唆する。RIM1単独の発現では液滴の形成は見られず、CAST/ELKSと共発現する場合のみ、著しい液滴形成を観察することができた。この結果はアクティブゾーンの複合体形成において液-液相分離が重要な機能を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、アクティブゾーンにおける近位ピオチンラベル化法を確立した。アクティブゾーンタンパク質CAST/ELKSが形成するタンパク質複合体のさらなる解析から、複合体のタンパク質組成が脳内の異なる領域でどのように違っているか、分子レベルでの知見が期待される。分子・シナプスレベルでの違いが、最終的には個体レベルの機能(脳機能や行動)にどのような影響をおよぼすのか、その因果関係の解明につながる学術的な意義を有する。また、アルツハイマー病などの認知症においてもシナプスレベルの変化が知られており、本研究で開発した手法をモデルマウス等に用いることで、認知症研究の発展につながり、社会的な意義も高い。

研究成果の概要(英文)：Using constructs with different linker lengths between the biotin ligase and CAST, we proceeded to analyze their expression and localization in cultured hippocampal neurons and quantified their co-localization with Bassoon, showing a statistically significant difference in the degree of co-localization between the biotin signal and the Bassoon signal depending on the linker length. The results showed a statistically significant difference in the degree, suggesting that different linker lengths can detect different binding molecule complexes depending on the distance from CAST at active zones. In addition, no cytoplasmic droplet formation was observed when RIM1 was expressed alone, and significant droplet formation could only be observed when coexpressed with CAST/ELKS. These results suggest that liquid-liquid phase separation may play an important function in the formation of active zone complexes.

研究分野：神経生化学

キーワード：アクティブゾーン CAST ELKS ピオチンリガーゼ 液-液相分離

## 1. 研究開始当初の背景

アクティブゾーン (Active Zone) はプレシナプスの形質膜直下に存在する比較的電子密度の高い構造体で (Landis et al., 1988. Neuron) 神経伝達物質放出のための位置とタイミングを制御する極めて重要な役割を果たしている。申請者は、新規のアクティブゾーン特異的タンパク質 CAST およびそのファミリーメンバー ELKS の同定に成功し、CAST が他のアクティブゾーン・タンパク質と巨大な分子複合体を形成していることを報告してきた (Ohtsuka et al., J. Cell Biol. 2002; Wang et al., 2002. PNAS; Takao-Rikitsu et al., J. Cell Biol. 2004; Deguchi-Tawarada et al., 2004. Genes Cells)。これにより、アクティブゾーンの分子基盤に関する研究の発展に大きく貢献してきた。(Hida and Ohtsuka 2010. J. Biochem.; Sudhof 2012. Neuron) さらに機能面では、海馬において、CAST が興奮性の神経伝達物質の放出を制御していること (Kobayashi et al., 2016. Eur. J. Neurosci.) 網膜においては、CAST がアクティブゾーンのサイズを決定していることを世界に先駆けて報告した (tom Dieck et al., 2012 J. Neurosci.) また、軸索の極性形成を制御する SAD-B キナーゼが (Kishi et al., 2005. Science)、アクティブゾーンに局在して神経伝達物質の放出を制御すること (Inoue et al., 2006. Neuron)、SAD-B が CAST を直接リン酸化して、CAST のリン酸化が神経伝達物質の放出確率や短期可塑性 (シナプス抑圧) をコントロールしていることを見出した (Mochida et al., 2016. Cell Reports.)

このように、アクティブゾーンの分子構造基盤と作用機構が徐々に明らかになってきたものの、依然として、CAST/ELKS ファミリーの機能制御のメカニズムやアクティブゾーンの形成・維持・変容に関しては不明な点が多い。そこで、本申請課題では分子から個体レベルに至る包括的な研究を推進して、アクティブゾーンの構造と機能に関する統合的な理解を深め、当該研究分野の発展に貢献する。

## 2. 研究の目的

神経伝達物質は、学習や記憶、情動などの脳高次機能の調節に必須の役割を果たす。しかし、伝達物質放出の調節が、いかにシナプス伝達の強度とその可塑性をコントロールし、最終的に個体レベルでどのように表現されるのか、その本質は未だ明らかになっていない。本研究では、伝達物質放出の位置とタイミングを決定する構造体であるアクティブゾーンに着目した包括的研究を推進する。特に、アクティブゾーン構成分子 CAST/ELKS の結合タンパク質の同定を足がかりに、アクティブゾーンの分子構造基盤の全容解明を目指す。そして、アクティブゾーンの機能修飾の異常がいかに病態・疾患につながるかを明らかにするために、各種の遺伝子改変マウスを用いた組織・個体レベルの解析を推進する。

## 3. 研究の方法

AAV (Adeno associated virus)-GFP-CAST-BirA を用いた感染実験をスタートさせ、まずは海馬初代培養細胞とマウス脳の両方で結合タンパク質の同定を試みる。すでに、タグ付きの CAST の全長をアクティブゾーンに局在させることに成功しており、感染実験については問題なく遂行できる。感染とピオチン投与の時期については神経初代培養細胞およびマウス脳それぞれ条件検討を行う。得られたタンパク質群を性質や局在、発現パターン等でグルーピングして、年度の

早い時期に、質量分析を行い、既知のものについては文献調査を進めて、CAST 結合タンパク質の候補を抽出する。特に、CAST の anchoring タンパク質の候補として膜貫通タンパク質に着目する。

初代培養系における CAST 複合体構成因子の同定においては cortical neuron からのピオチン標識・精製条件の最適化を行いプロテオームのおおよそのサイズを把握する予定である。In vivo 標識においては、AAV・PHBe serotype による全脳感染および FLEEx system を融合した局所での感染系を確立し、脳領域ごとの CAST 複合体の相違を比較解析することで、ニューロン機能の多様性を理解するための CAST 複合体の基盤を明らかにする。

さらに、CAST のリン酸化シグナルについては、主に培養細胞を用いて CAST の修飾をもたらすシグナルを検討した上、質量分析によるリン酸化修飾部位を同定する。次に、生化学的に相互作用した分子について、シナプスでの発現および局在を確認する。新規分子については抗体の作成を試みる。そして、プレシナプスに局在し、かつ CAST に直接結合することが確認できた分子については、AAV を含む各種発現プラスミド等の作成をすすめリソースをそろえる。機能解析については、海馬初代培養細胞もしくは急性スライスにて、電気生理学的解析および細胞生物学的な局在解析を行う。特に、表現型が顕著なものについては、遺伝子改変マウスの作成を開始する。

#### 4 . 研究成果

AAV (Adeno associated virus)-GFP-CAST-BirA を用いた感染実験をスタートさせるために、各種のコンストラクションの作成を行った。特に、ピオチンリガーゼ・BirA と CAST のリンカーの長さを変えたコンストラクションを作成して、海馬初代培養神経細胞での発現・局在解析を進めた。トランスフェクション後にピオチンを追加し染色したところ、いずれのコンストラクトもピオチンシグナルは内在性のアクティブゾーンマーカー Bassoon と共局在した。さらに、Bassoon との局在を定量化したところ、リンカーの長さによってピオチンシグナルと Bassoon のシグナルとの共局在の程度に統計学的に優位な差が見られた。このことは、リンカーの長さを変えることによって CAST からの距離に応じた異なる結合分子複合体を検出できることを示唆する。

培養系での実験がうまく行ったことを受けて、次にマウス脳における AAV 感染実験を試みた。CAST 複合体の分子基盤がニューロンの多様性を反映している可能性を踏まえ、FLEEx システムを用いた脳領域選択的にピオチン標識を試みたがマウス脳内では十分な発現が見られなかった。挿入 DNA 断片が比較的長いために、Cre-loxP による再配置が困難であることが原因ではないかと考えられた。この問題を解決するため、ALFA tag-nanobody システムを応用し、ピオチンリガーゼ-nanobody のパーツと ALFA tag-CAST のパーツをそれぞれ作製した。ALFA-tag とそれに特異的な nanobody は極めて特異性・親和性が高く、細胞内の標的領域にピオチンリガーゼを送ることが可能であることを確認した。さらに、標識反応速度が速い改良型ピオチンリガーゼ (TurboID) を搭載する事により、CAST との結合が一時的で弱い因子群 (翻訳後修飾関連酵素等) の同定も視野に入れた。また、ALFA-tag CAST および ELKS のノックインマウスを遺伝子編集により作出し、現在バッククロスを進めている。作製した TurboID の in vivo 遺伝子導入に関しては、AAV・PHBe serotype を作製し全脳感染の系の立ち上げを行った。

一方、修飾シグナル (リン酸化) に関しては、ショウジョウバエにおいて SRPK による CAST のリン酸化が報告され (Driller, JH. Et al. 2019, J. Cell. Sci.), 当該セリンのリン酸化抗体を作成したが、哺乳類における CAST のリン酸化は検出することができなかった。今後、質量分析による解析を進めたい。

さらに本研究では、CAST/ELKS の液 液相分離の変容によるアクティブゾーンの分子構造基盤

と神経伝達物質放出の変動にも着目した。先ず生細胞におけるCAST/ELKSの液-液相分離を解析した結果、CAST/ELKSの発現量に比例して、生細胞における液滴のサイズ及び形成率が増加した。興味深いことに、Rab3小胞を動員する機能を持つRIM1の場合、単独の発現では細胞質液滴の形成は見られず、CAST/ELKSと共発現する場合のみ、著しい液滴形成を観察することができた。この結果はアクティブゾーンの複合体形成において液-液相分離が重要な機能を果たす可能性を示唆している。アクティブゾーンの形成および機能におけるCAST/ELKSの液-液相分離の役割を解明するため、CAST/ELKSも欠失変異体を作製した。CAST/ELKSは全長の63%がcoiled-coilドメインであり、N末端とC末端に天然変性領域が集中している。欠失領域による液滴形成を定量的に評価した結果、CASTはN末端とC末端領域が液滴形成において重要であった。一方、ELKSはN末端を欠失しただけで液滴形成が抑制された。さらに、ELKSのN末端欠失によりELKS依存性的RIM1の液滴形成は消失した。今後、液滴形成不全変異体を用いアクティブゾーンの形成や小胞分泌に及ぼす効果を解析する予定である。

当該期間において、CAST/ELKSに結合することが知られているタンパク質については、TurboID法によって同定をすることができ、本手法の有効性を確認することができた。残念ながら、CASTの新規結合分子の同定には至らなかったものの、引き続き解析をすすめ、得られる分子群のなかで、上述のCASTの液相分離能に影響を与える因子の同定を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Hamada Shun, Nagase Masashi, Yoshizawa Tomohiko, Hagiwara Akari, Isomura Yoshikazu, Watabe Ayako M., Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 4
2. 論文標題 An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01977-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chowdhury Md. Imrul Hasan, Nishioka Tomoki, Mishima Noriko, Ohtsuka Toshihisa, Kaibuchi Kozo, Tsuboi Daisuke	4. 巻 45
2. 論文標題 Prickle2 and Igsf9b Coordinately Regulate the Cytoarchitecture of the Axon Initial Segment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 143 ~ 154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.20028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Horigane Shin-ichiro, Hamada Shun, Kamijo Satoshi, Yamada Hirokazu, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Bito Haruhiko, Ohtsuka Toshihisa, Takemoto-Kimura Sayaka	4. 巻 S0168-0102
2. 論文標題 Development of an L-type Ca <sup>2+</sup> channel-dependent Ca <sup>2+</sup> transient during the radial migration of cortical excitatory neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30391-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2020.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya Mai, Nan Haitian, Koh Kishin, Ichinose Yuta, Gao Lihua, Shimozono Keisuke, Hata Takanori, Kim Yeon-Jeong, Ohtsuka Toshihisa, Cortese Andrea, Takiyama Yoshihisa	4. 巻 65
2. 論文標題 RFC1 repeat expansion in Japanese patients with late-onset cerebellar ataxia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1143 ~ 1147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-020-0807-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyata Tomoaki, Kikuchi Keietsu, Ihara Daisuke, Kaito Maki, Ishibashi Yuta, Hakamata Tomoyuki, Yamada Tetsuya, Ishikawa Mitsuru, Mizukoshi Miho, Shoji Shizuku, Fukuchi Mamoru, Tsuda Masaaki, Hida Yamato, Ohtsuka Toshihisa, Kaneda Marisa, Tabuchi Akiko	4. 巻 528
2. 論文標題 Neuron-enriched phosphatase and actin regulator 3 (Phactr3)/ nuclear scaffold-associated PP1-inhibiting protein (Scapinin) regulates dendritic morphology via its protein phosphatase 1-binding domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 322 ~ 329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Radulovic Tamara, Dong Wei, Goral R. Oliver, Thomas Connon I., Veeraraghavan Priyadharishini, Montesinos Monica Suarez, Guerrero Given Debbie, Goff Kevin, L?bbert Matthias, Kamasawa Naomi, Ohtsuka Toshihisa, Young Samuel M.	4. 巻 598
2. 論文標題 Presynaptic development is controlled by the core active zone proteins CAST/ELKS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 2431 ~ 2452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP279736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hagiwara, A., Sugiyama, N., Ohtsuka, T.*	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired experience-dependent maternal care in presynaptic active zone protein CAST-deficient dams.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62072-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hagiwara, A., Hamada, S., Hida, Y., Ohtsuka, T.*	4. 巻 13
2. 論文標題 Double deletion of the active zone proteins CAST/ELKS in the mouse forebrain causes high mortality of newborn pups.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-0557-x.2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koh, K., Ishiura, H., Shimazaki, H., Tsutsumiuchi, M., Ichinose, Y., Nan, H., Hamada, S., Ohtsuka, T., Tsuji, S., Takiyama, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 VPS13D-related disorders presenting as a pure and complicated form of hereditary spastic paraplegia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med.	6. 最初と最後の頁 e1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1108.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohara-Imaizumi, M., Aoyagi, K., Ohtsuka, T.	4. 巻 27S
2. 論文標題 Role of the active zone protein, ELKS, in insulin secretion from pancreatic b-cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Metab.	6. 最初と最後の頁 S81-S91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2019.06.017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka, T., Furuse, M., Ohtsuka, T., Tsuchida, K., Kishi, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Vangl2 interaction plays a role in the proteasomal degradation of Prickle2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39642-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohara-Imaizumi, M.*, Aoyagi, K., Hida, Y., Yoshida, M., Yamauchi, H., Ohkura, M., Abe, M., Akimoto, Y., Nakamichi, Y., Nishiwaki, C., Kawakami, H., Hara, K., Sakimura, K., Nakai, J., Kakei, M., Nagamatsu, S., Ohtsuka, T. *	4. 巻 26
2. 論文標題 ELKS/Voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> channel- $\beta$ Subunit Module Regulates Polarized Ca <sup>2+</sup> Influx in Pancreatic $\beta$ -Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1213-1226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.12.106.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichinose, Y., Ishiura, H., Tanaka, M., Yoshimura, J., Doi, K., Umeda, T., Yamauchi, H., Tsuchiya, M., Koh, K., Yamashiro, N., Mitsui, J., Goto, J., Onishi, H., Ohtsuka, T., Shindo, K., Morishita, S., Tsuji, S., Takiyama, Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 Neuroimaging, genetic, and enzymatic study in a Japanese family with a GBA gross deletion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parkinsonism & Related Disorders	6. 最初と最後の頁 57-63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parkreldis.2018.11.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nan Haitian, Ichinose Yuta, Tanaka Masaki, Koh Kishin, Ishiura Hiroyuki, Mitsui Jun, Mizukami Heisuke, Morimoto Masafumi, Hamada Shun, Ohtsuka Toshihisa, Tsuji Shoji, Takiyama Yoshihisa	4. 巻 64
2. 論文標題 UBAP1 mutations cause juvenile-onset hereditary spastic paraplegias (SPG80) and impair UBAP1 targeting to endosomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0670-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大塚稔久
2. 発表標題 光操作ツールの紹介
3. 学会等名 CREST「オプトバイオ」領域の第5回領域会議 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大塚稔久
2. 発表標題 前シナプスアクティブゾーン因子群のプロテオーム解析と液相分離
3. 学会等名 第93回日本生化学会シンポジウム「生体膜ダイナミクス:細胞レベルの制御機構から個体レベルの生理機能まで」 (招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 Toshihisa Ohtsuka
2. 発表標題 Neuropsychopharmacology of relaxin-3
3. 学会等名 第6回アジア神経精神薬理学会大会 (AsCNP2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚稔久
2. 発表標題 シナプス分子間相互作用から捉える可塑性機構とその破綻
3. 学会等名 日本蛋白質科学会年会・日本細胞生物学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

山梨大学医学部生化学講座第一教室ホームページ <a href="http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/">http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/</a>
---

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
研究分担者	萩原 明  (Hagiwara Akari)  (70402849)	東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授    (32660)	

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
---------	---------