

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16898

研究課題名(和文)細胞内輸送障害と樹状突起形成異常が引き起こすSTXBP1脳症の病態機序の解明

研究課題名(英文)STXBP1 haploinsufficiency impairs membrane trafficking and dendrite growth

研究代表者

戸澤 雄紀 (Tozawa, Takenori)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30804950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：STXBP1脳症は、乳児期早期発症の発達性てんかん性脳症の一つである。STXBP1がコードするMunc18-1はSTX1Aのシャペロン分子としてシナプス開口放出の調整の機能を持つと言われているが、STXBP1脳症の病態にどのように関わっているのかは不明である。今回我々はAP-MS法を用いた網羅的解析でMunc18-1の新規相互作用因子MyosinVaを同定し、マウス脳シナプトソームにおいてSTX1Aとともに複合体を形成していること、Neuro2A細胞を用いたロックダウン実験で、STX1Aの細胞膜への移動には、Munc18-1を介したMyosinVaへの結合が必要であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでSTXBP1がコードするMunc18-1のSTX1A以外のbinding partnerの知見が少なかったため、Munc18-1のシナプス開口放出の調整以外の機能は不明であった。本研究において、Munc18-1がモーター蛋白質MyosinVaとの相互作用によってプレシナプス蛋白質を膜へ輸送する機能を持つことが分かったことは、STXBP1脳症の病態理解に役立つ点で学術的な意義が高い。

研究成果の概要(英文)：STXBP1 encephalopathy (STXBP1-E) is one of the early infantile onset developmental epileptic encephalopathy. Munc18-1, the gene encoding STXBP1, has a role in regulation of exocytosis as a chaperone protein of STX1A. However, there is little knowledge about another binding partner associated with STXBP1-E pathology. In this study, we found a novel interacting partner of Munc18-1, MyosinVa, by using affinity purification coupled to mass spectrometry. We revealed that Munc18-1, MyosinVa and STX1A are co-immunoprecipitated in mouse brain synaptosomes and colocalized in primary hippocampal culture neuron. Furthermore, RNAi-mediated gene knockdown in neuro2a cell demonstrate that the interaction between Munc18-1 and MyosinVa is required for membrane trafficking STX1A.

研究分野：小児神経学

キーワード：STXBP1脳症 Munc18-1 Syntaxin1A MyosinVa 細胞内輸送障害

1. 研究開始当初の背景

STXBP1 脳症は、乳児期早期に発症し、難治性てんかんに加え重度の発達遅滞や自閉症を呈する発達性てんかん性脳症の一つであり、原因遺伝子 STXBP1 の遺伝子産物である Munc18-1 のハプロ不全が原因であると言われている。Munc18-1 は、シナプス開口放出に関わる Syntaxin1A (STX1A) のシャペロン分子としての開口放出の調節を行う機能を持つと言われているが、STXBP1 脳症において、Munc18-1 がどのように病態に関わっているのかは明らかにされていない。

我々の研究グループは、ナンセンス変異を有する STXBP1 脳症の患者由来の iPS 細胞を分化誘導させた神経細胞において、STX1A の局在異常が起こることを報告した (Yamashita et al. *Epilepsia* 2016)。そこで我々は、Munc18-1 はシナプス開口放出における機能のみならず、STX1A などのプレシナプス蛋白質の細胞内輸送の機能を有しているのではないかと仮説をもとに、Munc18-1 の細胞内輸送に関わる新規相互作用因子の検索に着手した。AP-MS (Affinity purification coupled to mass spectrometry) 法を用いて、PC12 細胞における Munc18-1 の long isoform、short isoform の相互作用因子を検索した結果、両者ともに、中枢神経に豊富に存在する小胞の膜輸送の機能を持つモーター蛋白質 MyosinVa が候補として挙げられた (課題番号:18K15724)。シナプス開口放出において重要な機能を持つ STX1A の膜への輸送に、シャペロン分子である Munc18-1 とモータータンパク質である MyosinVa との相互作用が必要である可能性が出てきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Munc18-1 の機能として、シナプス開口放出の調節以外に、STX1A などの開口放出にかかわるプレシナプス蛋白質の膜への輸送を担っていると仮説を立て、未だ明らかにされていない Munc18-1 の細胞内輸送に係る新規相互作用因子を検索し、Munc18-1 のハプロ不全でみられる STX1A の膜への輸送障害の機序について検証し、STXBP1 脳症の新たな治療介入のターゲットを探ることである。

3. 研究の方法

- 1) 新規相互作用候補因子 MyosinVa と Munc18-1 のマウス脳の内在性蛋白質を用いた共免疫沈降実験と海馬初代培養を用いた共局在の評価を行う。
- 2) Munc18-1, STX1A, Munc18-1 のタグ付きリコンビナント蛋白質を用いた再構成実験を行い、MyosinVa の deletion mutant を用いた Munc18-1 との結合部位の評価を行う。
- 3) shRNA により Munc18-1 と MyosinVa をノックダウンした Neuro2A 細胞を用いて、STX1A の膜への輸送が障害されるかを評価する。

4. 研究成果

- 1) MyosinVa と Munc18-1 との共免疫沈降実験並びに海馬初代神経細胞における共局在の評価

PC12 細胞を用いた AP-MS 解析の結果では、Munc18-1 の long isoform と short isoform 両者ともに MyosinVa が候補相互作用因子として挙げられた。まず ICR 系マウスの胎生期から生後 30 日までの MyosinVa の発現パターンを調べた結果、MyosinVa は Munc18-1 の short isoform や STX1A とともに胎生早期から発現

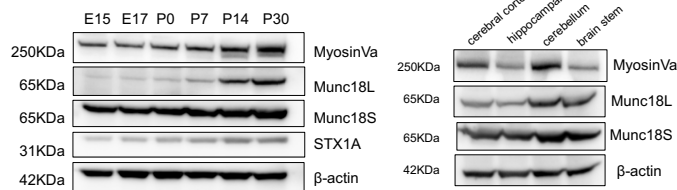


図1a マウス脳 (whole brain) の胎生期から生後30日までの蛋白質発現量の比較

図1b 成体マウスの脳内部位別の蛋白質発現量の比較

を認め、Munc18-1 long isoform は胎生期に発現が少ないことが分かった (図 1a)。また成体マウス脳内の部位別の発現に大きな差は認めなかった (図 1b)。

マウス脳の内在性蛋白質を用いた共免疫沈降実験においては、Munc18-1 short isoform 特異的な抗体で MyosinVa ならびに STX1A が共沈降を認めたが、long isoform 特異的抗体では、STX1A は共沈降するが、MyosinVa は共沈降しなかった。MyosinVa 抗体を用いた Reverse-IP においても同様の結果を示した (図 2a, b)。以上の結果より MyosinVa は Munc18-1 short isoform に親和性が高く、以後の実験は Munc18-1 short isoform を用いて解析を行うことにした。またマウス脳のシナプトゾーム分画をエンリッチさせた分画で共免疫沈降実験を行い、Munc18-1 と STX1A と MyosinVa は、シナプトゾームにおいて共沈降することを確認した (図 3a, b)。

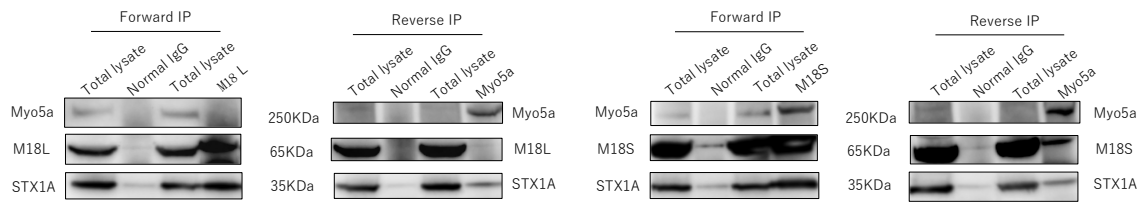


図2a. Munc18L抗体による共免疫沈降実験

図2b. Munc18S抗体による共免疫沈降実験

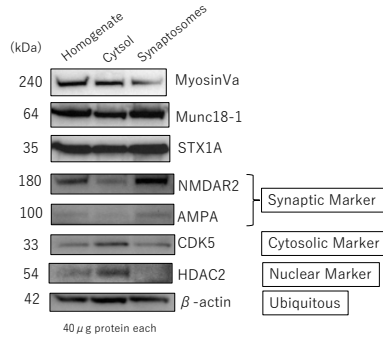


図3a. マウス脳の細胞内分画

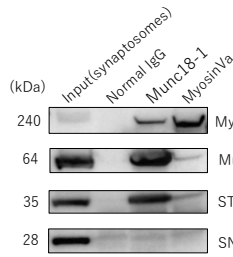


図3b. シナプソーム分画を用いた共免疫沈降実験

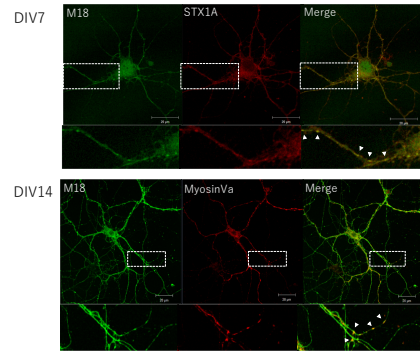


図4. マウス海馬初代神経細胞の免疫染色

また ICR 系妊娠マウス E18 の胎児脳を取り出し、海馬をパパイんで消化後に培地に播種し DIV7, 14 で免疫染色を行った。Munc18-1 と Myosin-Va, STX1A の局在を観察したところ、それぞれシナプスボタンで共局在していることが分かり、共免疫沈降実験の結果と合わせて、3 者はシナプスにおいて共局在していることが確認できた (図 4)。

2) Munc18-1, STX1A, MyosinVa のタグ付きリコンビナント蛋白質を用いた再構成実験

マウス脳の内在性蛋白質で確認できた Munc18-1, STX1A, MyosinVa の 3 者 complex が、タグ付きリコンビナント蛋白質でも再現できるかを確認するために、それぞれ HA タグ, Myc タグ, FLAG タグを fusion させた蛋白質を発現させるコンストラクトを作成し HEK293 細胞に発現させ、それぞれのタグに対する抗体を用いて共免疫沈降実験を行った。その結果、3 者の複合体を形成していることを確認でき (図 a)、さらに MyosinVa はその N 末端側で Munc18-1 と結合していることが確認された (図 5b)。

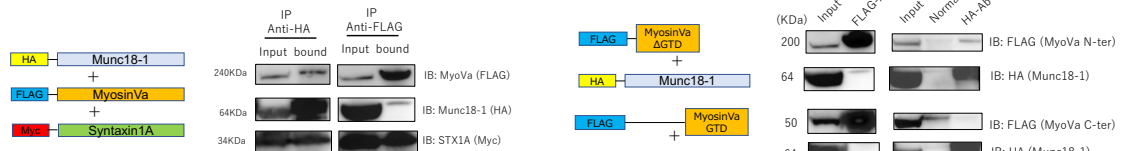


図5a. タグ付きリコンビナント蛋白質を用いた共免疫沈降実験

図5b. MyosinVa deletion mutantとMunc18-1の結合部位の評価

3) Munc18-1 ならびに MyosinVa をノックダウンした Neuro2A 細胞における STX1A の局在異常の評価

シナプス開口放出において重要な機能を持つ STX1A の膜への輸送に、Munc18-1 ならびに MyosinVa との相互作用が必要であることを確認するために、それぞれの遺伝子をターゲットにした shRNA を組み込んだレンチウィルスパーティクルを用いて Neuro2A 細胞に導入し、ノックダウン効率を mRNA 並びに蛋白質レベルで確認した (図 6)。

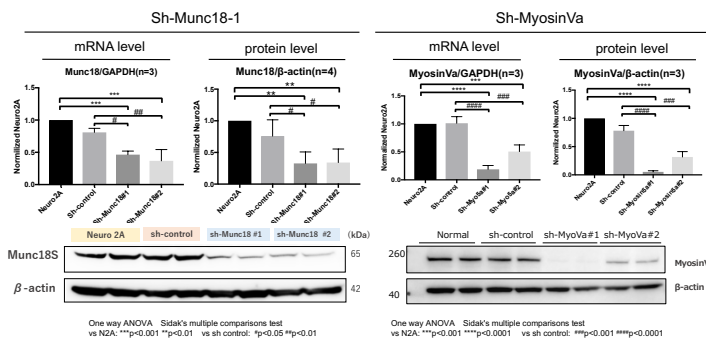


図6. shRNAによるMunc18-1とMyosinVaのノックダウン効率の評価

次にノックダウン細胞における STX1A の局在の変化を評価するために、細胞膜の Myc-STX1A の蛍光強度の平均と細胞質の Myc-STX1A の蛍光強度の平均の比をとり、細胞膜と細胞質のどちらに局在しているかを評価した。Munc18-1 をノックダウンした Neuro2A では、コントロール配列を導入したものと比べて STX1A は膜での発現が減少し、細胞質内で凝集することが確認できた (図 7a)。MyosinVa をノックダウンした細胞においても、同様に STX1A の細胞質内での凝集を認め、それらはレスキュー実験で STX1A の膜への局在が回復することが確認できた (図 7b)。さらに、MyosinVa をノックダウンした細胞においては STX1A のみならず Munc18-1 も細胞質内に凝集していることが分かった (図 7c)。以上よりプレシナプスにおいて開口放出の機能を持つ STX1A の膜への移動には、シャペロン分子である Munc18-1 とモーター蛋白質 MyosinVa の両者の相互作用が必要であることが分かった。

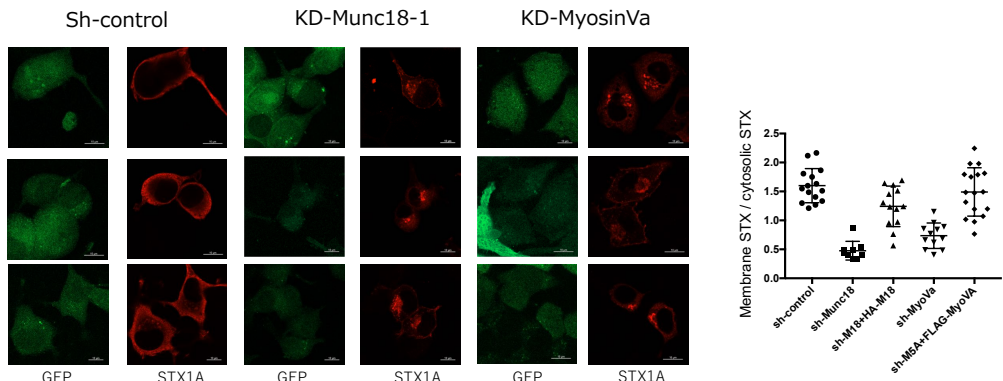


図7a Munc18-1とMyosinVa KDによるSTX1Aの細胞質への凝集

図7b レスキュー実験による STX1Aの局在異常の回復

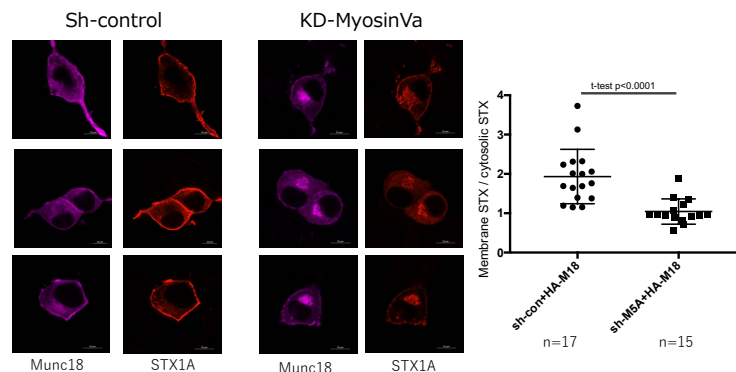


図7c MyosinVa KDによるMunc18-1の凝集

本研究により、Munc18-1 の機能として、これまで報告されていたプレシナプスの開口放出の調節以外に、Munc18-1 は MyosinVa と結合することでプレシナプス蛋白質 STX1A を膜へ運ぶためのアダプター蛋白質としての機能をもつことが明らかになった (図 8)。STXBP 脳症がてんかんのみならず重度知的障害を呈するのは、プレシナプス蛋白質の輸送障害が関わっている可能性があり、これまで報告のなかった開口放出の調節以外の Munc18-1 の新たな機能を発見した学術的に意義の高い結果と考えられる。

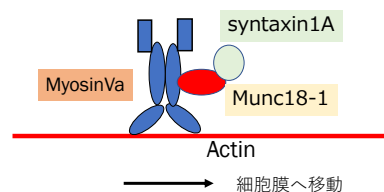


図8 Syntaxin1Aの膜輸送のモデル

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 Ichise Eisuke, Chiyonobu Tomohiro, Ishikawa Mitsuru, Tanaka Yasuyoshi, Shibata Mami, Tozawa Takenori, Taura Yoshihiro, Yamashita Satoshi, Yoshida Michiko, Morimoto Masafumi, Higurashi Norimichi, Yamamoto Toshiyuki, Okano Hideyuki, Hirose Shinichi | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Impaired neuronal activity and differential gene expression in STXBP1 encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Human Molecular Genetics | 6. 最初と最後の頁 1337 ~ 1348 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddab113 | 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 千代延 友裕 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いたSTXBP1脳症の病態解析 |
| 3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Eiske Ichise, Tomohiro Chiyonobu, Mitsuru Ishikawa, Yasuyoshi Tanaka, Takenori Tozawa, Satoshi Yamashita, Michiko Yoshida, Norimichi Higurashi, Toshiyuki Yamamoto, Hideyuki Okano, Shinichi Hirose. |
| 2. 発表標題 Functional and transcriptomic analysis of STXBP1 encephalopathy iPSC-derived GABAergic neuron. |
| 3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Eiske Ichise, Tomohiro Chiyonobu, Mitsuru Ishikawa, Yasuyoshi Tanaka, Mami Shibata, Takenori Tozawa, Satoshi Yamashita, Michiko Yoshida, Masafumi Morimoto, Norimichi Higurashi, Toshiyuki Yamamoto, Hideyuki Okano, Shinichi Hirose. |
| 2. 発表標題 Impaired activity and differential gene expression in STXBP1 encephalopathy patient iPSC-derived GABAergic neurons. |
| 3. 学会等名 日本人類伝学会第66回大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|