

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300120

研究課題名（和文） 神経シナプスアクティブゾーンの分子構造基盤と生理機能の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms and physiological functions of presynaptic active zones

研究代表者

大塚 稔久（OHTSUKA TOSHIHISA）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：40401806

研究成果の概要（和文）：神経終末アクティブゾーンは神経伝達物質の放出を時間的・空間的に制御していると考えられている。本研究では、アクティブゾーン特異的蛋白質 CAST が神経終末においてカルシウムチャンネルと直接複合体を形成してチャンネルの開口を制御していることを見出した。さらに、CAST 遺伝子改変マウスの網膜シナプスの解析から、CAST がアクティブゾーンの長さを制御し網膜における光信号の伝達に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The presynaptic active zone is thought to regulate release of neurotransmitter from nerve terminals in a spatially and temporally coordinated manner. In this research, it has been shown that the active zone protein CAST directly interacts with voltage-dependent calcium channels (VDCCs), regulating the opening of VDCCs. Moreover, using CAST knockout mice, CAST was demonstrated to regulate the size of specialize active zone in the retina, so called ribbon synapse and required for normal vision.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学、神経薬理学

キーワード：神経伝達物質・受容体、アクティブゾーン、シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の学術的背景

（国内外の研究動向および位置づけ）アクティブゾーン（以下、AZ: Active Zone）は前シナプス形質膜直下に存在する比較的電子密度の高い特殊な構造体で（Couteaux and Pecot-Dechavassine, 1970. *Hebd. Seances Acad. Sci. D. Sci. Nat.*; Hirokawa et al., 1989. *J. Cell Biol.*; 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（Sudhof 1995. *Nature*）。AZ の存在は 1960 年代から知られていたものの、その分子構造基盤については長らく不明であった。研究代表者が見出した CAST および ELKS をはじめとして、AZ 構成分子群は Bassoon, Piccolo, Munc13-1, RIM1 など数個しか知られていない。CAST/ELKS 以外の AZ 蛋

白質の遺伝子改変マウスはすでに欧米の研究チームから報告されているが、AZの構造に異常はみられず、また、学習や記憶などの脳高次機能に関しても関与は明らかになっていない。脳内における多種多様なシナプス構造を考慮すると、未知のAZ蛋白質の存在が容易に想像できるが、AZを特異的かつ高度に精製する生化学的手法はいまだ開発されていない。

一方で、シナプス小胞が正確に放出部位にドッキング・融合するためには、AZが形質膜に固定・制御されることが不可欠である。しかし、前シナプスに存在すると考えられる接着分子とAZ蛋白質の相互作用もこれまで報告されていない。すなわち、巨大な蛋白質の複合体であるAZがどのようにして前シナプスの形質膜と相互作用し固定されているのかはまったく不明である。

さらに最近、神経の極性形成（軸索形成）を制御するリン酸化酵素 SAD キナーゼが（Kishi et al., 2005. **Science**）AZに局在して神経伝達物質の放出を制御していることが明らかとなった（Inoue et al., 2006. **Neuron**）。このような軸索特異的に発現しAZに局在するリン酸化酵素は他に類を見ない。AZの構造と機能に関わる研究分野は、神経科学分野の中でももっとも競争の苛烈な分野のひとつである。今後この分野の流れは、AZが脳の高次機能やその破綻である精神神経疾患の発症においていかなる役割を担っているのか、それを分子・細胞・個体レベルで明らかにすることになると考えられる。したがって、本研究計画は神経科学分野における中心的な問題を設定かつ解決する極めて重要な課題と位置づけられ、得られる成果は当該研究領域をさらに発展させるのみならず、関連した新たな研究分野の創造につながる事が期待できる。

2. 研究の目的

神経伝達物質放出の調節が、いかにシナプス伝達とその可塑性を制御し、最終的に個体レベルでどのように表現されるのか、その本質は今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：AZに着目した、学際的研究を推進する。未だ完全に明らかにされていないAZの分子構造基盤を解明し、脳精神機能における生理的役割を明らかにする。これらを通して、AZの機能制御の動作原理を分子・個体レベルで解明するとともに、神経精神疾患の原因解明や新たな治療法の確立に貢献できる基礎データを提供する。

3. 研究の方法

まず、AZを高度に精製する精製システムの構築（新規のAZ蛋白質と前シナプス接着分子

の精製・単離）を試みるとともに、それらの分子間相互作用を詳細に解析する。新規分子群を含めたAZ蛋白質群に対する特異抗体を作製し、生体内におけるAZ蛋白質の3次元マップの構築を行う。また、遺伝子改変マウスを用いてCAST/ELKSファミリーおよびSADキナーゼの機能解析を進めるとともに、これらの標的蛋白質や上流のシグナル伝達経路を生化学的に明らかにする。とくに、SADキナーゼによるCASTのリン酸化については、CASTのリン酸化がシナプス伝達、シナプス可塑性、学習や記憶・情動形成などにいかなる役割を担っているのかを分子・個体レベルで解析する。このように、（1）神経終末AZの分子構造基盤の全容解明；（2）個体レベルすなわち脳神経高次機能におけるAZの役割の解明について、学際的な研究を展開する。

（1）分子レベルからのアプローチ（生化学的・細胞生物学的解析を含む）

①新規アクティブゾーン蛋白質と前シナプス接着分子群の精製・同定と生化学的解析：研究代表者は、シナプス結合画分を高度に精製する系を樹立しているが（Ohtsuka et al., 2002. **J. Cell Biol.**）、本画分はAZとPSD（postsynaptic density:後シナプス肥厚部）を両方含んでいる。そこでまず、各種界面活性剤、pH、バッファー（緩衝液）、マグネシウムイオン（Pfenniger, 1971. **J. Ultrastruct. Res.**）、蛋白質変性剤（グアニジンやUreaなど）を組み合わせることで、AZとPSDの膜構成成分を別々に精製できる系の確立を目指す。最終ステップ産物は、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムなどで再度分離し、質量分析法でシークエンスを確認する。さらに、膜貫通蛋白質の多くは細胞外領域に糖鎖修飾を受けていることが知られており、糖鎖を認識する蛍光試薬をもちいて検出を試みる。なお、上記の精製系がうまくいかない場合を想定し、免疫沈降実験や yeast two-hybrid、pull-down assayなども同時に進める。この場合、AZ蛋白質に結合するものを同定していくが、研究代表者はCAST/ELKSおよびSADキナーゼに加え、Bassoon、Piccolo、Munc13-1、RIMsなど他のAZ蛋白質のcDNAおよび抗体もすべて有しており、実験遂行に全く問題はない。

②SADによるCASTのリン酸化の動態・機能解析：現在、SADがCASTのN末45番目のセリン残基を特異的にリン酸化することを明らかにしている（未発表データ）。すでに、本リン酸化部位特異抗体の作製は終了し、予備実験で vivo においても本部位がリン酸化されていることを確かめている（未発表データ）。そこで、本抗体を用いて①発生段階におけるリン酸化パターン、②軸索内のどの領域でCASTがリン酸化されているのか、および③神経活動依存的なリン酸化の状態をウ

エスタンブロット法、免疫染色法(免疫電顕法を含む)などを用いて解析する。

また、SAD ノックアウトマウスをハーバード大 Joshua Sanes 博士より入手し、本マウスで CAST のリン酸化状態を調べる。その際、CAST のリン酸化が *in vivo* では SAD に依存していない場合は、生体内で CAST をリン酸化しているリン酸化酵素の同定を試みる。

さらに、CAST の 45 番目のセリン残基をアラニン残基に置換した変異体をラット上顎神経節細胞に過剰発現させると、神経伝達が著明に阻害されることをすでに見出している(持田澄子博士との共同研究)。22年度は、シナプス短期可塑性に焦点を絞って解析を行う。また、CAST の各種リン酸化部位変異体を海馬・大脳皮質初代培養細胞に導入し、軸索形成に対する影響を詳細に解析する。

③神経終末カルシウムチャネルの機能制御と CAST:すでに、CAST がカルシウムチャネルの beta サブユニットと直接結合し、電位依存型カルシウムチャネルの活性化を制御していることを見出していた。22年度は *in vivo* における CAST と beta サブユニットとの結合を生化学的に解析するとともに、この結合のカルシウムチャネルの機能と局在に対する影響を生化学的・電気生理学的に解析する(電気生理は京大工学部、森教授との共同研究)。

(2) 個体レベルからのアプローチ:

①CAST遺伝子改変マウスの解析:現在、海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析を、東大医科学研究所、真鍋俊也教授との共同研究ですでに開始している。2発刺激促進などで異常を見出しており、22年度は、テタス後増強等のシナプス短期可塑性および、シナプス伝達が長期にわたり強化される長期増強(LTP)などのシナプス長期可塑性への影響を調べる。さらに、神経伝達物質放出可能プール、放出可能プールへの小胞の補充への関与についても電気生理学的に解析する。また、形態学的解析については北海道大学渡辺教授との共同研究にて行う(免疫電顕法など)。さらに、網膜と内耳有毛細胞における AZ の構造異常の解析(光顕および電顕レベル)および電気生理学的解析をドイツマックスプランク研究所、Susu Dieck博士および Tobias Moser博士との共同研究にて行う。

②ELKSコンディショナル遺伝子改変マウスの作製:新潟大崎村教授との共同研究で、ELKSコンディショナルKOマウスの作製を開始した(通常のELKS KOは胎生致死のため)。現在、キメラマウスの作製は終了しており、22年度は flox-ELKS のホモの個体作製と Creマウスとの交配を行う。どのような Creマウスを使用するかは、専門家のアドバイスを仰ぎつつ決定したい(Nestin, CaMKII, Foxg1などが候補)。

③SAD 遺伝子改変マウスの解析:入手した SAD 遺伝子改変マウスを用いて、CAST 遺伝子改変マウスと同様の電気生理学的解析を東京慈恵医大渡部博士との共同研究で行う。

また、SAD ノックアウトマウスの脳サンプルを用いて、ノックアウトでリン酸化が低下・消失している蛋白質をリン酸化プロテオーム解析にて同定する。また、SAD-A/-B ダブルノックアウトの神経細胞では、通常1本の軸索が複数形成され極性形成が破たんする(Kishi et al., 2005. *Science*)。そこで、この表現型のレスキュー実験を行う。具体的には、SAD ダブルノックアウトマウスの海馬初代培養神経細胞に CAST を含めた AZ 蛋白質の変異体 cDNA を導入し、軸索の伸長・形態・数などを詳細に解析する。

<平成23年度以降>

AZ の分子構造基盤: CAST, ELKS, SAD については、モノクローナル抗体作製し、22年度に得られた AZ 特異的蛋白質や接着分子群については、ポリクロ・モノクローナル抗体を適宜作製する。これら抗体を用いて、生化学的解析を行うとともに萩原博士が中心となり、光顕・電顕レベルでこれら分子群の局在を明らかにする。そして、脳内における AZ 関連蛋白質群の3次元マップを作製し、興奮性と抑制性神経終末のアクティブゾーンおよび接着装置の分子コンポーネントの違いや、本研究計画で得られる遺伝子改変マウスと野生型マウスにおけるマップを比較し、AZ 関連蛋白質群の発現・局在プロファイルを構築する。これによって、網膜の特殊な AZ を有するリボンシナプスの構成分子群や、中枢神経と末梢神経の AZ のコンポーネントの違いなども明らかにできる。研究代表者はこれまで抗体作製に関して十分な経験と実績があり、特異的抗体の作製については問題ないと考えている。さらに、得られた分子群間の相互作用を詳細に解析し、AZ 蛋白質間の分子間相互作用の全貌を明らかにする。

現在、synCAM や neuroligin などシナプス結合を制御すると考えられている接着分子がいくつか同定されているが、いずれもその遺伝子改変マウスではシナプス結合は intact に保たれている。初年度に同定した膜貫通蛋白質の中で、AZ 蛋白質とりわけ CAST/ELKS ファミリーに結合するものを pull down assay や免疫沈降実験を用いてスクリーニングする。そして、AZ に局在しシナプス結合を制御する接着分子の同定・解析を行う。**遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの解析:**

(1) **CAST 遺伝子改変マウスの解析:** 電気生理学的解析に加えて、記憶学習試験(Morris 水迷路・食餌報酬試験・恐怖条件付け試験など)および恐怖反応試験(明所忌避試験・驚愕反射試験・Porsolt 強制水泳など)などに

より、CAST のマウスの学習・行動・情動能力などの発達への影響を解析する。

(2) **CAST/ELKS ダブルノックアウトマウスの作製と解析**: CAST/ELKS 以外の AZ 蛋白質はノックアウトマウスが作製・解析されているが、AZ の構造に異常は見られない (Altrock et al., 2003. *Neuron*; Castillo et al., 2002. *Nature*; Augustin et al., 1999. *Nature*)。したがって、高等動物における AZ の形態異常・破綻の生理的意義を明らかにするために、CAST/ELKS ダブルノックアウトマウスの作製は必要不可欠と考えられる。22年度中に作製する ELKS コンディショナルノックアウトマウスとの交配を開始し、ダブルノックアウトマウスの作製・解析を行う。

(3) **CAST リン酸化部位変異導入マウスの作製と解析**:

CAST リン酸化部位に変異を導入したノックインマウスを作製する。本マウスはすでに ES 細胞のスクリーニングを行っている。本遺伝子改変マウスは、通常は CAST のリン酸化部位をコードする正常な exon を発現するが(45番目のセリン残基)、Cre 遺伝子組換え酵素の作用により、正常 exon がリン酸化されない変異型 exon に入れ替わる新たなコンディショナルノックアウトである(セリン残基がアラニン残基に入れ替わる)。この遺伝子改変マウスを用いて CAST リン酸化の発生初期や成熟したシナプス機能における役割を個体レベルで解析できる。

4. 研究成果

22年度実績概要

神経終末アクティブゾーンは神経伝達物質を含有したシナプス小胞が特異的にドッキングし前シナプス形質膜と融合する部位であり、神経伝達物質の放出を時間的・空間的に制御していると考えられている。アクティブゾーンは種を超えて、また中枢神経のみならず末梢神経においてもよく保存された構造体である。リン酸化酵素 SAD キナーゼは大脳海馬の神経終末において、シナプス小胞とアクティブゾーンに局在している。そこで、SAD の末梢神経における局在を明らかにするために SAD-B 特異抗体を用いてマウスの神経筋接合部 neuromuscular junction (NMJ) を解析した。NMJ のマーカーには神経毒である alpha-bungarotoxin を用いた。マウス横隔膜の NMJ において、SAD-B はいま一つのアクティブゾーン蛋白質 Bassoon と同様の点状の局在を示し、アセチルコリン受容体(後シナプスに局在)に結合する alpha-bungarotoxin と近接する局在パターンであった。Bassoon が主に点状のパターンであるのに対し、SAD-B は点状でかつ diffuse なパターンも示し、これはシナプス小胞のマーカーである synaptophysin と同様であった。また、SAD-B

のノックアウトマウスでは、SAD-B のシグナルは消失した。同様の局在は、脊髄 spinal cord でも観察でき、このことは SAD-B が中枢神経のみならず末梢神経においても同様の発現と局在をしていることを示唆する。NMJ においても SAD-B が神経伝達物質の放出に関与している可能性が高く、SAD ノックアウトマウスでは個体が生後すぐに死亡することから、その原因の一つとして NMJ による神経伝達物質の放出が阻害されることによる呼吸不全も考えられる。

23年度実績概要

神経終末アクティブゾーンには CAST, ELKS, Bassoon などの構造蛋白質以外に、カルシウムイオンの流入を制御する電位依存性カルシウムチャンネル VDCC が存在する。本年度は、まず、CAST が VDCC の beta サブユニットと直接結合し、生体内においても分子複合体を形成していることを生化学的に明らかにした。VDCC beta サブユニットは CAST の C 末領域に結合した。さらに、CAST はチャンネル活性を有する VDCC alpha サブユニットとも結合したが、beta サブユニットとの結合よりは弱かった。また、BHK 細胞に VDCC 複合体および CAST を過剰発現させ、VDCC の機能を電気生理学的に解析したところ、CAST が存在することで VDCC が開口しやすくなることを見出した。アクティブゾーン蛋白質が VDCC の活性化を制御するという初めての報告であり、成果は *The Journal of Biochemistry* 誌に採択された(文献リスト4)。アクティブゾーン蛋白質と VDCC の相互作用の研究分野は始まったばかりであり、本成果は当該研究分野において重要な発見といえる。

VDCC beta サブユニットは 1~4 までのファミリーメンバーが知られているが、CAST は特に beta4 と強い相互作用を示した。beta サブユニットファミリーは脳内で異なる発現を示しており、CAST との相互作用が脳内の異なる部位でそれぞれ調節されている可能性も高い。今後、脳の領域特異的に CAST がどのような VDCC ファミリーと結合しているかを明らかにすることで、脳内各部位(海馬や小脳など)における神経伝達物質放出の制御機構の違いを解明できる可能性がある。

24年度実績概要

網膜の神経視細胞にはリボンシナプスと呼ばれる特殊なアクティブゾーンが存在する。これまでの米国の先行研究からアクティブゾーン蛋白質 CAST は興奮性のシナプス伝達には関与せず、抑制性のシナプス伝達のみを制御すると考えられていた。しかし、CAST ノックアウトマウスの網膜シナプスの解析から、CAST が少なくとも網膜シナプスの興奮性伝達に関与していることを示唆するデータ

を得た。また、網膜視細胞のリボンシナプスの形態を各種のリボンシナプスマーカーで調べたところ、CAST ノックアウトマウスの網膜リボンシナプスはその長さが野生型に比べおおよそ半分になっていることを見出した。このサイズの減少に伴い、リボンシナプスにおける重要な機能分子であるカルシウムチャンネルのシグナルもおおよそ半分に減少していた。一方で、ファミリーメンバー ELKS の発現は約 2 倍に増加しており、CAST の欠損を補うべく相補的に発現が増加していると示唆された。このことにより、アクティブゾーンの形成・維持に CAST が関与していることが初めて明らかとなった。現在、この CAST ノックアウトマウスを用いて、海馬、小脳、大脳皮質のアクティブゾーンの微細構造を解析中である。さらに、CAST ノックアウトマウスでは、加齢に伴って異所性のシナプス形成が顕著に観察された。特に、通常はシナプスがほとんど存在しない outer nuclear layer に、突起の潜り込みが見られ、リボンシナプスマーカーである EIBEYE のシグナルが検出された。このような分子・細胞レベルの変化のみならず、マウス行動実験を用いることで、CAST ノックアウトマウスが視力障害を呈していることを見出した。これらの成果は、The journal of Neuroscience 誌に採択・掲載され、当該雑誌の表紙を飾った（文献リスト 3）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. Yoshioka, T., Hagiwara, A., Hida, Y., Ohtsuka, T. Vangl2, the planner cell polarity protein, is complexed with postsynaptic density protein PSD-95. **FEBS Lett.** In press. 2013. 査読有
2. Ohtsuka, T. CAST: functional scaffold for the integrity of the presynaptic active zone. **Neurosci. Res.** In press. 2013. 査読有
3. tom Dieck, S., Specht, D., Strenzke, N., Hida, Y., Krishnamoorthy, V., Inoue, E., Ishizaki, H., Tanaka-Okamoto, M., Miyoshi, J., Hagiwara, A., Brandstatter, JH., Gollisch, T., Ohtsuka, T.*, Moser, T*. Deletion of the presynaptic scaffold CAST reduces active zone size in rod photoreceptors and impairs visual processing. **J. Neurosci.** 32: 12192-12203, 2012. (*corresponding authors) 査読有

4. Kiyonaka, S., Nakajima, H., Takada, Y., Hida, Y., Yoshioka, T., Hagiwara, A., Kitajima, I., Mori, Y., Ohtsuka, T. Physical and Functional Interaction of the Active Zone Protein CAST/ERC2 and the β -subunit of the Voltage-dependent Ca^{2+} Channel. **J. Biochem.** 152: 149-159, 2012. 査読有
5. Hagiwara, A., Harada, K., Hida, Y., Kitajima, I., Ohtsuka, T.* Distribution of serine/threonine kinase SAD-B in mouse peripheral nerve synapse. **NeuroReport** 22: 319-325, 2011. (*corresponding author) 査読有
6. Hida, Y., Fukaya, M., Hagiwara, A., Deguchi-Tawarada, M., Yoshioka, T., Kitajima, I., Inoue, E., Watanabe, M., Ohtsuka, T.* Prickle2 is localized in the postsynaptic density and interacts with PSD-95 and NMDA receptors in the brain. **J. Biochem.** 149:693-700, 2011. (*corresponding author) 査読有
7. Hida, Y., Ohtsuka, T.* CAST and ELKS Proteins: Structural and Functional Determinants of the Presynaptic Active Zone. **J. Biochem.** 148:131-137, 2010. (*corresponding author) 査読有
8. Nogami, T., Beppu, H., Tokoro, T., Moriguchi, S., Shioda, N., Fukunaga, K., Ohtsuka, T., Ishii, I., Sasahara, M., Shimada, Y., Nishijo, H., Li, E., Kitajima, I. Reduced expression of the *ATRX* gene, a chromatin-remodeling factor, causes hippocampal dysfunction in mice. **Hippocampus** 21: 678-687, 2010. 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Toshihisa Ohtsuka “Structure and function of the presynaptic active zone” 24 年度国際シナプス研究会 Nov. 8th-9th, 2012. 岡崎.
2. Toshihisa Ohtsuka Role of CAST in the structure and function of ribbon synapses. Ribbon Synapses Symposium. Sept. 18, 2011. Goettingen, Germany.

3. 大塚稔久 “翻訳後修飾によるプレシナプス・アクティブゾーンの機能制御”
生理学研究所シナプス研究会「神経シナプス伝達の時空間ダイナミクス」
2012年11月27-28日
愛知県岡崎市
4. 大塚稔久 国立精神・神経医療研究センター合同シンポジウム 講演
「神経伝達物質の放出の動作原理とその破綻」2010年11月29日
東京都小平市
5. 大塚稔久 第24回山梨神経科学研究会
講演「神経伝達物質放出の分子構造基盤と回路制御」2010年11月24日山梨大学医学部

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 稔久 (OHTSUKA TOSHIHISA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：40401806

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし