

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650188

研究課題名（和文） 神経極性分子 SAD を介したリン酸化シグナル動態とその可視化

研究課題名（英文） Visualization and molecular mechanisms underlying neural polarity protein SAD kinase-mediated phosphorylation

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に存在し神経細胞の極性形成を制御するリン酸化酵素 SAD キナーゼがアクティブゾーン蛋白質をリン酸化することを見出した。リン酸化部位を特異的に認識する抗体を作製し、生体内でも SAD によるリン酸化がシナプスにおいて生じていることを確認した。得られた成果は、神経終末アクティブゾーンにおけるリン酸化シグナル伝達の可視化に繋がる成果と期待できる。

研究成果の概要（英文）：SAD kinase, a serine/threonine kinase associated with synaptic vesicles and active zones in the nerve terminals, has shown to phosphorylate an active zone protein specifically. An anti-phospho antibody against the phosphorylated sequence was produced and successfully used to detect endogenous phosphorylation of the active zone protein in vivo. These results will lead to more precise understanding of phosphorylation at the active zone and development of direct visualization of the phosphorylation network in synaptic structure and function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：細胞内情報伝達、シナプス

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は通常複数の樹状突起と 1 本の軸索を伸ばし、軸索の末端が樹状突起上にシナプスを形成する。この神経細胞の極性形成に関しては盛んに研究が展開されており、責任分子群も CRMP や GSK3・などいくつか同定されているが、その根本の分子メカニズムは明らかになっていない (Arimura N., 2007. *Nat. Rev. Neurosci.*)。最近、軸索形成のマスタータンパク質としてリン酸化酵素 SAD キナーゼが報告された (Kishi et al., 2005. *Science*)。SAD ノックアウトマウスでは通常 1 本の軸索が複数形成されてしまい、神経細胞の極性形成が破たんしていた。これは単一

遺伝子ファミリーのノックアウトで極性形成が破たんする最初の例であり、当該研究分野に大きなインパクトを与えた。一方、研究代表者の研究チームは成熟したシナプスのアクティブゾーンに局在する酵素として SAD を同定し、SAD がアクティブゾーンタンパク質 RIM1 をリン酸化し神経伝達物質の放出を制御していることを世界に先駆けて明らかにした (Inoue et al., 2006. *Neuron*)。アクティブゾーンは神経終末に存在する比較的電子密度の高い構造体で、神経伝達物質の放出の位置とタイミングを決定する重要な構造体である (Hirokawa et al., 1989. *J. Cell Biol.*; Landis et al., 1988. *Neuron*)。

これらの成果は、アクティブゾーンタンパク質の機能発現と極性形成に共通したシグナル伝達機構の存在を示唆する。したがって、SAD に焦点を当て軸索形成におけるリン酸化の代謝機構を解明することで、シナプス初期の極性形成を経てどのようにして成熟したシナプスが構築されるのか、そのシグナル伝達機構の解明が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、神経終末アクティブゾーンに存在し神経細胞の極性形成を制御する SAD キナーゼを足がかりに、軸索の伸長・成熟過程におけるアクティブゾーン蛋白質のリン酸化動態や SAD キナーゼの活性化動態を可視化、測定することで、軸索の成熟過程におけるリン酸化代謝制御機構の全貌を明らかにする。得られる成果は神経伝達物質の放出機構と軸索形成（極性形成）に共通したシグナル伝達機構の発見・解明につながることを期待できる。さらには、正常および疾患ごとの特異的なリン酸化動態のプロファイリングを行い、神経変性疾患・代謝疾患の原因究明と新たな治療法の開発につなげる。

3. 研究の方法

SAD によってリン酸化される既知および未知のアクティブゾーンタンパク質をリン酸化プロテオーム解析にて同定し、それらのリン酸化部位特異抗体を作製する。リン酸化部位に変異を導入した各種変異体を作成し、海馬・大脳皮質初代培養神経細胞に導入して軸索形成への影響を解析する。

(1) **SAD によってリン酸化されるアクティブゾーンタンパク質の同定**：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.*)、本画分はアクティブゾーンと 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、アクティブゾーンと 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する。分離した各フラクションを SAD のリン酸化アッセイに持ち込み、バンドの同定を行う。そして、同定したタンパク質のリン酸化部位を決定し、リン酸化部位特異的抗体を作製する。

(2) **リン酸化による神経軸索形成の制御機構の解明**：SAD ノックアウトマウスの海馬初代培養細胞をもちいて、既存のアクティブゾーン蛋白質によるレスキュー実験を行う。特に SAD が Munc13-1 以外の CAST (後述)、ELKS,

Bassoon, Piccolo を直接リン酸化することをすでに見出している (未発表データ)、これらのリン酸化状態を mimic するような変異体を作製し、海馬および交感神経培養細胞へ導入し、中枢・末梢神経系での軸索の形成を形態学的に詳細に解析する。神経細胞の初代培養と遺伝子導入に関しては十分な経験とデータの蓄積があり、実験を遂行する上で特に問題はない。

CAST は研究代表者の研究チームが見出した新規のアクティブゾーンタンパク質であり、アクティブゾーンの構築にかかわる重要な分子の一つである (Ohtsuka et al., 2002. *J. Cell Biol.*; Takao-Rikitsu et al., 2004. *J. Cell Biol.*)。すでに、SAD が CAST のアミノ末端のセリン残基をリン酸化することを明らかにしている (未発表データ)。そこで、CAST リン酸化の軸索形成への影響を個体レベルで解析するために、CAST リン酸化部位変異導入遺伝子改変マウスの作製を進める。すでにキメラマウスの作製に着手している。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、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。

< 24年度の計画 >

(1) **リン酸化動態の可視化**：アイソトープを用いたリン酸基の標識は、有効かつ簡便な方法であるが、細胞機能を調節するリン酸化反応の動態解析に適しているとは言いがたい (空間的な解析が困難である)。これまで、研究代表者は、アクティブゾーン蛋白質 ELKS のインシュリン放出時における動態を全反射蛍光顕微鏡を用いて、リアルタイムに可視化することに成功している (Ohara-Imaizumi et al., 2005. *Mol. Biol. Cell.*)。この際は、抗 ELKS 抗体を蛍光色素でラベルして (蛍光ラベル化抗体)、細胞に導入する方法を用いた (TAT システム: HTLV-I の膜蛋白質 TAT を融合させた蛍光ラベル抗体が細胞膜を通過する)。そこで、本研究では、まずラット海馬初代培養細胞を用いて①蛍光ラベル化した抗リン酸化抗体のマイクロインジェクションおよび②蛍光ラベル抗体の TAT システムによる導入を行う。画像解析の取得については、本学生命科学センターに導入予定の高速画像スキャンが可能な共焦点レーザー顕微鏡を用いる (Zeiss 510 DUO システムもしくはライカ TCS SP5)。こうして、神経細胞内におけるリン酸化の動態を可視化し、軸索形成時におけるリン酸化の動態を可視化する。また、基質のリン酸化の動態だけでなく、SAD キナーゼの活性化動態の解析についても同様の手法を用いる。今ひとつは、FRET シス

テムによる可視化である。FRET イメージングの最大のメリットは、シグナル伝達の時間的・空間的情報を取得できることにある。この場合の解析では、①リン酸化されることで基質の分子内構造が変化するもしくは②リン酸化された基質が別の蛋白質と結合することで、イメージングの取得が可能であると考えられる。さらに、国内には FRET イメージングに関して複数の世界でも有数の研究室があり、実際のイメージングの技術・条件検討については専門家の意見を参考にし、適宜進める。なお、イメージの取得そのものに関しては、上述の共焦点レーザー顕微鏡で可能である。また、FRET システムによる解析を可能にするためには候補となるタンパク質間の分子間相互作用解析が不可欠であるが、当該分野は研究代表者の専門分野でもあり、これまで分子量が大きいアクティブゾーンタンパク質についても十分な実績があり (Takao-Rikitsu et al., 2004. *J. Cell Biol.*)、問題はない。

(2) リン酸化プロファイリング: SAD 変異マウスについては上述の可視化技術により AZ 蛋白質のリン酸化動態パターンを野生型と比較・解析し、各変異マウスにおけるリン酸化動態のデータベース作製を行う。これによってアクティブゾーンにおけるリン酸化動態を個体レベルで計測することが出来る。同時に、国内外の研究機関と協力しアルツハイマー病などの神経変性疾患・糖尿病などに代表される代謝性疾患のモデルマウスを入手し、同様のリン酸化動態パターンのデータベース化を行う。その際は、神経内科医・代謝性疾患の専門医・遺伝学者とも密な連絡を取り、入手すべき疾患モデルマウスについては、慎重に検討する。これらについては、法令などを遵守することはもちろん、動物愛護の観点からも、実施に当たっては生命倫理や安全性などに十分配慮する。

4. 研究成果

神経終末アクティブゾーンにおけるリン酸化シグナル伝達の可視化・イメージングのために、ウサギで作製した抗リン酸化部位CASTポリクローナル抗体のチェックを行った。ウェスタンブロットには問題なく使用できるものの、組織染色ではシグナルの検出ができなかったため、新たにモルモットにて抗リン酸化部位CASTポリクローナル抗体を作製した。本抗体でも、タンパク質レベルでCASTがアクティブゾーンに存在することを確かめた。特に、海馬、小脳、大脳皮質にて広範囲の発現が確認できた。同時に、光学顕微鏡を用いて、マウスの組織切片ならびにラットの海馬初代培養神経細胞にてシグナルの検出に成功した。リン酸化のシグナルは内在性のCASTとすべてではないが多くが共局在していた。また、他

のアクティブゾーン特異的蛋白質である bassoonとも共局在した。抗リン酸化CAST抗体は、ファミリーメンバーであるELKSのリン酸化も検出するため、一致していないシグナルは内在性のELKSを反映していると考えられた。一方、免疫電顕法ではシグナルを検出できなかったが、内在性のCAST/ELKSの局在と一致するはずなので、今後のイメージング解析に支障はないと思われる。さらに、CASTのリン酸化部位に変異を導入した遺伝子改変マウスの作製も順調に進んでおり、cre発現マウスとの交配を開始した。

アクティブゾーンの形態と構造については多くの知見が蓄積されてきているが、シグナル伝達機構、特にリン酸化・脱リン酸化の機構については依然不明な点が多い。本研究成果によって、アクティブゾーン蛋白質のリン酸化機構の解明が一気に進展する可能性も期待できる。

24年度実績概要

24年度は、リン酸化されたCASTと相互作用する分子を同定するために、生化学的解析の条件検討を行った。CASTのリン酸化部位を含むN末をGST融合蛋白質として作製し、大腸菌で発現させ、精製した。精製したGST-CAST N末を、セリンスレオニンリン酸化酵素にて処理して、N末にリン酸基を導入させることに成功した。Stoichiometryもおおよそ1:1であった。GSTのみ、GST-CAST N(野生型)、およびGST-CAST N(リン酸化型)を用いたaffinity columnを作製し、ラット大脳シナプス可溶性画分をこれらカラムにアプライして、SDS-PAGEにて解析した。GST-CAST N(リン酸化型)のみに結合するバンドを複数同定できたので、質量分析にて解析のための溶出条件を検討中である。また、逆にGST-CAST N(野生型)のみに結合する蛋白質(リン酸化CASTからは遊離するものを想定)は、見出せなかった。これについては、アプライしたサンプル量が少なかった可能性もあり、columnのサイズとサンプルの量を調節して再検討予定である。

Cre マウスと交配させることで、リン酸化部位がアラニン残基に置き換わる条件付き変異マウスの脳を用いて、CASTのリン酸化の程度を確認したところ、野生型でもCASTの発現が著明に減少していることが判明した。おそらく、条件付き遺伝子改変用のベクター構成が、内在性のCASTの発現を抑制してしまうことが考えられた。そこで、最初の組み換えの段階ですでにリン酸化部位がアラニンに置換されている遺伝子改変マウスの作製を行った。ターゲティングベクターの作製が終了したので、ES細胞へのトランスフェクションの後、サザンハイブリダイゼーションにて陽性クローンのピックアップを引き続き行う予定である。

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 3 件)

1. Ohtsuka, T. CAST: functional scaffold for the integrity of the presynaptic active zone. **Neurosci. Res.** In press. PMID: 23517713
2013. 査読有

2. 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

3. 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

[学会発表] (計 2 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.

[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