

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 5 月 24 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790070
 研究課題名（和文） プレシナプス形成における SYD-1・SYD-2 の機能と神経細胞内輸送制御
 研究課題名（英文） Roles of SYD-1 and SYD-2 proteins and neuronal trafficking in presynaptic formation
 研究代表者
 多留 偉功（TARU HIDENORI）
 北海道大学・創成研究機構・特任助教
 研究者番号：30533731

研究成果の概要（和文）：神経系が機能する上での基本素子となるのが、シナプスと呼ばれる神経細胞間接着構造である。線虫 *C. elegans* のプレシナプス構造形成の制御因子として、SYD (SYnapse Defective) -1 と SYD-2 が重要である。本研究は、遺伝学的な修飾変異体の探索に基づき、プレシナプス形成が SYD-1・SYD-2 の制御下で正確に遂行される上で、偶発的な構成分子の集積が細胞接着タンパク質依存的な経路によって抑制されている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Neuronal synapses are cell adhesion structures, which are fundamental units for functions of neuronal system. In nematode *C. elegans*, SYD (SYnapse Defective) -1 and SYD-2 have been identified as central regulators of presynaptic formation. Based on a large scale modifier screen and genetic analysis, we proposed a possibility that presynaptic components are precisely assembled by SYD-1/SYD-2 pathway under negative regulation involving a cadherin-like cell-adhesion molecule.

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	3400000	1020000	4420000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学

1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経系の情報処理機能の基盤となる細胞間接着構造であり、その形成分子機構の解明は神経科学の大きな課題である。神経細胞のプレシナプス（シナプス前部）の中心領域“アクティブゾーン”には Synapse Defective (SYD)-2/Liprin-alpha や ELKS-1 などのアダプター蛋白質が細胞骨格と共に網目状に密集しており、その基盤の上にエキソサイトーシスやエンドサイトーシス、イオンチャネル、細胞間接着分子などの神経伝達に関わる様々な機能分子群が組織化されてい

る。

モデル動物である線虫 *C. elegans* における順遺伝学的スクリーニングをもとに、プレシナプス形成に関わる機能分子 SYD-2 および SYD-1 が同定された。GABA 作動性の D 型運動神経において、*syd-2* の機能欠損変異体 (*syd-2(lf)*) はアクティブゾーンの構造異常を生じ、*syd-1* の機能欠損変異体 (*syd-1(lf)*) はプレシナプス構造の異所的形成を生じる (Zhen and Jin, *Nature* 1999, Hallam et al., *Nat. Neurosci.* 2002)。さらに、産卵運動の制御に関わるセロトニン作動性 HSN 神経細胞

では、*syd-2(1f)*と*syd-1(1f)*いずれの変異体においても、プレシナプス形成が不全となる。SYD-1とSYD-2の作用機序に関して、初期位置情報に基づいてシナプス予定部位にSYD-1とSYD-2が局在し、ELKS-1と共に多量体・複合体を形成することで、プレシナプス構成分子群を集積するという機構が示されてきた(Dai et al., *Nat. Neurosci.* 2006, Patel et al., *Nat. Neurosci.* 2006, Taru and Jin, *J. Neurosci.* 2011)。

研究開始当初における第一の課題は、SYD-1・SYD-2を核としたプレシナプス形成の下流分子機構とその制御に関わる因子の同定であった。この課題に対して代表者らは、順遺伝学的手法を用いて、プレシナプス形成におけるSYD-1・SYD-2の関連分子の探索を試みてきた。

第二の課題は、SYD-1・SYD-2タンパク質の詳細な作用分子機序の理解であった。SYD-1はPDZ、C2、RhoGAPドメインを有するタンパク質であるが、プレシナプス形成における各ドメインの役割の詳細は不明である。SYD-2はN末端側にcoiled-coil構造、C末端側に3つのSAM(Sterile-alpha motif)ドメインを有するアダプタータンパク質であり、HSN神経のプレシナプス形成にはN末端領域が必須である(Taru and Jin, *J. Neurosci.* 2011)。SAMドメインについては膜貫通型フォスファターゼPTP-3/LARなどのタンパク質との相互作用が報告されている(Ackley et al., *J. Neurosci.* 2005)。加えて近年、SYD-2がモーター分子キネシン-3に結合して神経軸索中の能動輸送を調節することが報告された(Wagner et al., *PNAS* 2009)。プレシナプス形成における神経細胞内輸送の役割が指摘されるなかで、線虫シナプス形成に関わるMAPキナーゼ経路分子DLKのショウジョウバエ相同分子がキネシン-1による神経軸索輸送を制御する報告もあり(Horiuchi et al., *Curr Biol.* 2007)、SYD-2によるプレシナプス形成制御との関連が論じられていた。

2. 研究の目的

線虫における神経プレシナプス形成の分子機構に関して、

(1) SYD-1・SYD-2によるプレシナプス形成誘

導の下流分子あるいは制御因子を同定し、その分子機構を明らかにする

(2) SYD-1・SYD-2自身の作用分子機序に関して、プレシナプス形成における各タンパク質ドメインの役割を検討するとともに、神経細胞内輸送制御の関与を検証する。

3. 研究の方法

[線虫におけるプレシナプス形成の評価]

線虫 *C. elegans* のセロトニン作動性 HSN 神経細胞あるいは GABA 作動性 D 型運動神経細胞におけるプレシナプス構造を蛍光標識プレシナプスマーカーによって可視化し、プレシナプス形成を生体内観察によって評価した。プレシナプスマーカーとして、シナプス小胞分子であるシナプトブレビン SNB-1、シナプス小胞結合分子 RAB-3、プレシナプス局在性細胞質タンパク GIT 等を用いた。両神経がそれぞれ関与する産卵運動と後退運動の表現型から、各シナプスの機能を評価した。

[SYD-1 修飾変異体の順遺伝学的スクリーニングとマッピング]

プレシナプスマーカーSNB-1::GFPをHSN細胞に恒常的に発現させた *syd-1(1f)* 変異体において、EMSを用いて突然変異を誘発し、F1およびF2世代において、*syd-1(1f)*の表現型を抑制する個体(サプレッサー)を、産卵運動異常とプレシナプスマーカーの局在異常の回復を指標として探索した。サプレッサーの責任遺伝子座について、ハワイアン系統(CB4856)のSNPを利用したマッピング法を中心とした解析によって、領域の絞り込みを行った。サプレッサー変異体のゲノムDNAを調製し、次世代シーケンス法による全ゲノム配列解析を行った。責任遺伝子候補分子について、トランスジェニック法を用いた回復実験等の検証を行い、関連分子との遺伝学的相互作用解析を行った。

[SYD-1・SYD-2の作用分子機序に関する解析] Million mutation project (Moerman and Waterston Lab)において同定されたSYD-1、SYD-2の変異体群を検討し、SYD-1のRhoGAPドメイン、SYD-2のSAMドメインをそれぞれ欠損する二種類の新規変異体について、戻し交配後、表現型の詳細な解析を行った。神経細胞内輸送系の関与に関して *syd-1*、*syd-2*

の機能欠損および機能獲得各変異体と、分子モーターキネシン-3(*unc-104*)、キネシン-1(*unc-116*)、MAP キナーゼ経路分子 *dlk-1* および 上流のシナプス形成制御因子 *rpm-1* の各機能欠損変異体を用い、プレシナプス形成異常に関して遺伝学的相互作用を検討するとともに、SYD-1 および SYD-2 の輸送・局在に及ぼす作用を検討した。

4. 研究成果

(1)SYD-1 修飾変異体の同定に基づく新規プレシナプス形成調節機構の解析

①SYD-1 サプレッサーの順遺伝学的探索と責任遺伝子の同定

SYD-1 によるプレシナプス形成誘導における下流因子あるいは制御因子を明らかにする目的で、線虫 HSN 神経細胞をモデルとして、*syd-1(1f)*におけるプレシナプス形成異常の表現型を抑制するサプレッサーの順遺伝学的探索を行った。産卵運動異常の回復とプレシナプス形成不全の回復を指標として、八千ハプロイドゲノム相当のスクリーニングを行った結果、*syd-1(1f)*のサプレッサー*nq23*を単離した。SNP を利用したマッピングによって、責任遺伝子座を5番染色体上の領域に絞り込んだ。次世代シーケンサーによる解析により候補遺伝子を同定し、最終的にカドヘリン様ドメインを有する膜タンパク質をコードする遺伝子上に *nq23* 変異をマップした(以下、サプレッサー遺伝子または *sup* と標記)。*nq23* 変異はサプレッサー遺伝子中のグアニンがアラニンに置換された点変異で、それによって細胞外ドメイン中に終止コドンを生ずる機能欠損変異である。*syd-1(1f);sup(nq23)*に *sup* 遺伝子をトランスジェニック法によって導入することによって、表現型の回復が確認された。

さらにサプレッサー遺伝子の既知の機能欠損変異について、*syd-1(1f)*との二重変異体の表現型を解析した結果、*nq23* 変異と同様のプレシナプス異常回復が認められ、*syd-1(1f)*を抑制することが確認された。また、シナプス小胞タンパク質シナプトレビン SNB-1 の局在に加えて、シナプス小胞結合細胞質タンパク質 RAB-3 およびプレシナプス局在性の細胞質タンパク質 GIT の局在につい

ても GFP 標識マーカーを用いて検討した。その結果、いずれのプレシナプスマーカーについても *syd-1(1f)*における局在異常が、サプレッサー変異によって回復することが明らかとなった。

次にサプレッサーによる *syd-1(1f)*産卵行動異常の抑制効果が、HSN 神経細胞におけるプレシナプス機能回復を反映したものかを確認するため、HSN 神経細胞分化に必須の転写因子 EGL-5 の機能欠損 *egl-5(1f)*に対するサプレッサーの効果を検証した。二重変異体の解析の結果、*egl-5(1f)*における産卵運動異常に対して、サプレッサー変異は抑制効果を示さなかった。

以上の解析から、膜タンパク質をコードするサプレッサー遺伝子の機能欠損によって、HSN 神経細胞における SYD-1 機能不全に起因するプレシナプス形成異常が抑制されることが明らかとなった。

その一方で、*syd-1(1f)*で生じる GABA 作動性 D 型運動神経細胞のシナプス異所的形成とそれに伴う後退運動の異常の表現型に対しては、サプレッサー変異による回復作用は見られなかった。サプレッサー遺伝子の機能が、セロトニン作動性 HSN 神経細胞におけるシナプス形成の情報伝達経路に特徴的であることが示唆された。

②プレシナプス形成制御因子との遺伝学的相互作用解析

HSN 神経細胞においては、SYD-1 の下流で SYD-2 がプレシナプス形成制御に機能しており、*syd-2(1f)*では、*syd-1(1f)*と同様のプレシナプス形成の異常とそれによる産卵運動異常の表現型が認められる。そこで、サプレッサー変異が、*syd-2(1f)*の表現型も抑制しうるかについて検討を行った。その結果、サプレッサー変異は *syd-1(1f)*に対する抑制効果よりは弱いものの、*syd-2(1f)*の産卵運動異常を抑制した。またプレシナプス形成に関しても、シナプス小胞マーカーの局在の部分的な回復を生じた。この結果は、サプレッサー変異が部分的ではあるが *syd-2(1f)*を抑制することを示しており、*syd-2* 機能欠損によるプレシナプス形成異常を回復させる変異として初めての知見となる。

次に、HSN のプレシナプス形成において、

SYD-1・SYD-2 と協調的に働くアダプター分子である ELKS-1 との関係を検証した。*elks-1* 機能欠損変異体 (*elks-1(1f)*) は単独では *syd-1(1f)* や *syd-2(1f)* のような異常は示さない。しかし、*syd-2* 遺伝子の機能獲得変異体 *syd-2(ju487gf)* が、*syd-1(1f)* による異常を回復させ、さらに *elks-1(1f)* 共存下でその回復が損なわれることが知られている (Dai et al. *Nat. Neurosci.* 2006)。そこで、サブレッサー変異 *sup(1f)* による *syd-1(1f)* 表現型の回復効果に対して、*elks-1(1f)* の作用を検証した。その結果 *syd-2(ju487gf)* とは異なり、*elks-1(1f)* 変異を含む三重変異体 *sup(1f);syd-1(1f);elks-1(1f)* においては産卵運動異常、プレシナプス異常の回復阻害は限定的であった。このことから、サブレッサーは SYD-1・SYD-2・ELKS-1 の機能不全自体を直接的に回復するものではないことが示唆された。

本研究より、「プレシナプス形成が SYD-1・SYD-2 による正の調節機構下で厳密に遂行されうるには、一方で自発的なプレシナプス構成分子の集積が細胞接着タンパク質依存的な機構によって抑制されることが重要である」、という可能性が考えられ、プレシナプス形成の分子機構における新たなモデルとして今後の検証を進めていく。

(2) プレシナプス形成における SYD-1 および SYD-2 の作用分子機序の解析

① プレシナプス形成における SYD-1 GAP ドメインおよび SYD-2 SAM ドメインの役割

プレシナプス形成における SYD-1・SYD-2 の作用機序に関して、機能ドメインの新規欠損変異体を用いた表現型解析を行った。

SYD-1 GAP 欠損変異体に関して表現型の詳細な解析を行った結果、まず D 型運動神経におけるプレシナプス異所的形成とそれに起因する後退運動異常が、*syd-1* 機能不全変異体と同様に生じることが明らかとなった。一方で HSN 神経細胞においては、多くの個体においてプレシナプスマーカーのシナプス予定部位への正常な局在が認められ、顕著な産卵運動異常も観察されなかった。すなわち *syd-1* 機能不全変異体とは異なり、GAP 欠損変異体においては HSN のプレシナプス形成が

正常である可能性が高い。このことは、細胞種によってプレシナプス形成制御における SYD-1 の GAP ドメインの必要性が異なることを示唆しており、プレシナプス形成分子機構の細胞特異性を理解する上で重要な知見である。

syd-2 の SAM ドメイン欠損変異体については、*syd-2* 機能不全変異体で観察されたような前進後退運動異常と産卵運動異常が認められ、さらには D 型運動神経におけるプレシナプス形成異常および HSN 神経細胞におけるプレシナプス形成不全も同様に観察された。このことは SAM ドメインのみの欠損によってもプレシナプス形成における SYD-2 の機能が顕著に損なわれることを示している。HSN 神経細胞のプレシナプス形成には、*syd-2* の N 末端領域の働きが必須であることが過剰発現実験の結果から示されていたが、本解析によって、C 末端の SAM ドメインも正常な機能に必要であることが明らかとなった。

② SYD-1・SYD-2 機能における神経細胞内輸送系の関与の検討

まず HSN 神経細胞における SYD-1 および SYD-2 の輸送・局在に重要な神経細胞内輸送モーターについて検討したところ、既存の報告のとおり、キネシン-1 (*unc-116*) が必須の役割を果たしており、キネシン-3 (*unc-104*) の関与は小さいことが明らかとなった。また MAP キナーゼ経路分子 DLK-1、および上流のシナプス形成制御分子 RPM-1 の機能欠損変異体において、HSN 神経細胞プレシナプスへの SYD-1・SYD-2 の輸送・局在をそれぞれ検証した結果、いずれも正常であることが明らかとなった。さらに、HSN 神経細胞のプレシナプス形成に対する、*syd-1* または *syd-2* と *dlk-1* または *rpm-1* との関係について、詳細な二重変異体の解析を行ったが、顕著な遺伝学的相互作用は見られなかった。

以上の結果から、HSN 神経細胞のプレシナプス形成制御においては、SYD-2 や DLK の分子機能の一つとして示唆されている神経細胞内輸送制御の役割は必須ではなく、これまで代表者らが示してきたような SYD-1・SYD-2・ELKS-1 のプレシナプス部位におけるタンパク質間相互作用が重要な役割を果たすと考えられる。

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) Yi Piao, Satomi Urano, Ayano Kimura, Yuhki Saito, Hidenori Taru, Saori Hata and Toshiharu Suzuki

Cleavage of Alcadeins by γ -secretase at the γ -site is determined by a mechanism
PLoS One 8, e62431 (2013)

DOI:10.1371/journal.pone.0062431

査読有

(2) Hidenori Taru and Yishi Jin

The Liprin homology domain is essential for the homomeric interaction of SYD-2/Liprin- α protein in presynaptic assembly.

J. Neuroscience 31, 16261-16268 (2011)

DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0002-11.2011

査読有

(3) Yuhki Saito, Mayu Akiyama, Yoichi Araki, Akio Sumioka, Maki Shiono, Hidenori Taru, Tadashi Nakaya, Tooru Yamamoto, and Toshiharu Suzuki

Intracellular trafficking of the amyloid beta-protein precursor (APP) regulated by novel function of X11-like

PLoS One 6, e22108 (2011)

DOI: 10.1371/journal.pone.0022108

査読有

[学会発表] (計4件)

(1) Hidenori Taru

Identification of a cell adhesion molecule involved in negative regulation of presynaptic assembly in *C. elegans*

Experimental Biology 2013

2013年4月22日 ボストン国際会議場(USA)

(2) 星野 裕子、多留 偉功

線虫 (*C. elegans*) DD ニューロンのプレシナプス除去に関わる遺伝子の探索

第85回日本生化学会大会

2012年12月15日 福岡国際会議場

(3) Hidenori Taru

Identification of mutants involved in SYD-1-mediated presynaptic assembly in *C. elegans*

8th FENS Forum of Neuroscience

2012年7月15日 バルセロナ国際会議場(スペイン)

(4) Hidenori Taru and Yishi Jin

The Liprin Homology Domain is Essential for the Homomeric Interaction of SYD-2/Liprin- α Protein in Presynaptic Assembly

The American Society for Cell Biology, Annual Meeting

2011年12月4日 デンバー国際会議場(USA)

[その他]

ホームページ等

<http://www.cris.hokudai.ac.jp/taru/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多留 偉功 (TARU HIDENORI)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号: 30533731

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: