

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04272

研究課題名(和文) CAST/ELKS蛋白質ファミリーによるアクティブゾーン機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular and cellular mechanisms of active zone structure and function by the CAST/ELKS protein family

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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：CASTとファミリーメンバーELKSに着目して、神経伝達物質の放出過程および回路形成における役割の解明を進めてきた。そこで、CASTがシナプス小胞のリサイクル過程を制御すること、CASTのリン酸化がプレシナプス性の短期可塑性・シナプス抑圧を制御していることを明らかにした。また遺伝子改変マウスの解析から、CASTとELKSが協調して網膜リボンシナプスの構築と維持、そこでのシナプス伝達を制御することを明らかにした。さらに、小脳ではシナプスの回路形成に顕著な異常が見出された。

以上の成果から、CAST/ELKSファミリーが基本的なシナプス伝達のみならず神経回路形成にも関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have attempted to uncover physiological roles of the presynaptic active zone proteins CAST and ELKS in basic neurotransmitter release, synaptic plasticity, and neural circuit formation. Then, we have demonstrated that CAST is involved in release probability of synaptic vesicle and its recycling with Rab6, and that SAD kinase-mediated phosphorylation of CAST controls active zone vesicle recycling for synaptic depression. CAST and ELKS ablation studies have also revealed that CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus, the size and ribbon synapse formation in the retina, and neural circuit formation in the cerebellum.

These results suggest that the CAST/ELKS protein control not only basic neurotransmitter release but also synaptic reorganization in the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 神経伝達物質・受容体 アクティブゾーン

1. 研究開始当初の背景

神経終末から放出される伝達物質は、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、神経伝達物質放出の位置とタイミングを決定する構造体：アクティブゾーンに着目した学際的研究を推進する。特に、アクティブゾーン構成分子 CAST の生理機能とその機能修飾メカニズムを分子、個体レベルで明らかにすることを旨とする。得られる成果は、前シナプスの視点から、精神神経疾患の発症機構と治療戦略に、新しい知見・方向性を示す可能性を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、アクティブゾーン蛋白質の生化学的な性状解析に加え、CAST および ELKS の欠損マウスを用いて、シナプスの微細構造や電気生理学的解析、さらには出力として表現される動物の行動までを一貫して解析する。対象とする行動パラメーターは、不安様行動、社会性行動、恐怖記憶、子育て行動などに着目する。ELKS 欠損マウスは胎生致死となり解析が困難であったため（未発表データ）、Cre-loxP システムを利用した ELKS の条件付き欠損マウス (ELKSloxP/loxP)、及び CAST^{-/-} の背景を持つ CAST^{-/-}; ELKSloxP/loxP マウスを作製し、本解析を進める準備を整えた。具体的には以下の項目を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CAST/ELKS の分子構造基盤とリン酸化シグナル伝達機構に着目すると同時に、これらの遺伝子改変マウスの生化学的プロファイリング、シナプス微細構造を含む形態学的解析、さらには個体レベルの機能解析・行動実験までを一貫して行う。

(1) 生化学的手法を用いて、CAST/ELKS の結合蛋白質と SAD キナーゼの基質の同定を行う

(2) CAST リン酸化の意義を神経初代培養細胞およびリン酸化部位変異導入マウスを作製し解析する

(3) 脳領域ごとの CAST/ELKS の役割を解明するため、部位特異的 Cre マウスを用いて脳領域特異的 CAST/ELKS KO マウスを作製・解析する

4. 研究成果

(1) pull down アッセイを用いてラットおよびマウス大脳画分からの同定を進めたが、バックが高く、特異的なタンパク質バンドの検出に至らなかった。また抗 CAST 抗体を用いた、免疫沈降実験も試みたが、免疫沈降される CAST の量が少なかったため、本方法でも特異的な結合タンパク質の同定には至らな

かった。今後、yeast Two Hybrid 法を用いた分子生物学的手法の導入も検討する必要がある。また、内在性の CAST の免疫沈降効率が低いため、GFP-CAST ノックインマウスを作成して、本マウスの組織または初代培養神経細胞から、タグに対する抗体をもちいた免疫沈降実験を試みる。ノックインベクターの構築は終了し、外部機関との共同研究にて当該マウスを作成する。

一方、これまで染色や生化学実験に用いてきた抗体はウサギのポリクローナル抗体であった。作成から、10年以上が経過しており在庫も少なくなっていることから、今後はモノクローナル抗体の作出を進める。現在、アクティブゾーン関連分子のモノクローナル抗体は Bassoon 抗体が広く使われている。アクティブゾーンに非常に特異的に局在する CAST のモノクローナル抗体は存在しておらず、当該モノクローナル抗体が作出できれば本研究領域で広く使用される可能性が高く、より詳細なアクティブゾーンの形態解析のマーカーとしての貢献が期待できる。

(2) アクティブゾーンタンパク質 CAST がリン酸化酵素 SAD によって直接リン酸化されることを見出し、その生理学的解析データを取りまとめ Cell Reports 誌に発表することができた。CAST のリン酸化部位は 45 番目のセリン残基で、ELKS は 55 番目のセリン残基であった。また、これらリン酸化部位を特異的に認識する抗リン酸化 CAST/ELKS 抗体の作出にも成功した。また、上述の CAST のリン酸化部位変異体 (45 番目のセリン残基をアラニン残基に置換) を分散培養したラット上顎神経節細胞に過剰発現させ、電気生理学的な解析を進めたところ、CAST 変異体の発現によって、シナプス抑圧が阻害されることを見出した。逆に、リン酸化されている CAST は (45 番目のセリン残基をアスパラギン酸に置換) シナプス抑圧を増強することが明らかとなった。これらの成果は、アクティブゾーンタンパク質のリン酸化が、シナプスの短期可塑性をコントロールすることを示すはじめての例であり、今後の当該分野の発展に大きく貢献すると考える。

SAD キナーゼについては、遺伝子改変マウスの機能解析を進めて、基本的なシナプス伝達および恐怖記憶行動における役割を明らかにした。具体的には、シナプス小胞の放出過程において、SAD キナーゼはリサイクリングステップを制御しており、特に、放出確率をコントロールしていることを明らかにした。さらに、マウス行動実験を行い、SAD キナーゼノックアウトマウスでは、音に対する恐怖記憶形成は正常であったが、場所による恐怖記憶形成・維持に異常が見出された。これらのデータから、SAD キナーゼは神経終末のシナプス関連タンパク質をリン酸化して、海馬依存性の恐怖条件付け学習に関与することが示唆された。これまでの生化学的な解析から、少なくともアクティブゾーンタンパ

ク質である CAST および RIM1 がリン酸化されることが明らかになっている。シナプスの複雑さ、多様性を考慮すると他にも SAD キナーゼによってリン酸化される基質の存在が考えられる。今後は、in vivo における他の基質を同定してそのリン酸化機序を解析することで、リン酸化によるシナプス機能発現の詳細なメカニズムが明らかになることが期待される。

(3) CAST/ELKS の遺伝子改変マウスの作成と機能解析を進めてきた。まず、海馬において、電気生理学的な解析を進めた。生化学的には、CAST 以外のシナプス関連タンパク質の発現量に変化は見出されなかった。一方で、CAST ノックアウトマウスの CA1 領域のシナプスにおいて、シナプス小胞の quantal content が増加していることを見出した。さらに、低分子量 G タンパク質 Rab6 の活性化型と CAST が直接結合することを明らかにした。電気生理学的にもシナプス小胞のリサイクリング機構に異常が見出されており、CAST が生体内において Rab6 と相互作用することでエンドサイトーシス以降のステップもコントロールしていることが明らかとなった。一方で、CA1 領域におけるシナプス長期増強 LTP には変化が見られなかった。

網膜については、すでに CAST ノックアウトマウスにおいてリボンシナプスの長さが短くなり、網膜視細胞 双極細胞間のシナプス伝達に異常があることを報告していた。次に、ファミリーメンバーの ELKS のリボンシナプス形成における役割は何か？さらに、CAST/ELKS ファミリーとしての統合的な機能は何か？といった重要な問いが出てきた。そこで、ELKS の遺伝子改変マウスの作成を始めたものの、グローバルノックアウトは胎生致死であったため、ELKS-flox マウスをまず作成した。次に、網膜特異的に ELKS を欠損させるために Crx-cre マウスとの交配を行った。生化学および形態学的な解析から、ELKS が網膜において特異的に欠損していることを確かめた。一方で、ELKS 欠損マウスの網膜では、CAST ノックアウトマウスで顕著に見られる異所性のシナプス形成が見られなかった。さらに、ERG にも顕著な変化は現れなかった。一方で、ELKS ノックアウト網膜では CAST の発現が顕著に増加しており、CAST が相補的に機能していることが示唆された。CAST ノックアウトマウスの網膜でも ELKS の発現が増加していたが、CAST 欠損を相補的に補うほどではないと考えられた。さらに、興味深いことに CAST/ELKS ダブルノックアウトマウス網膜では、ERG の異常が CAST ノックアウトよりもさらに増加し、異所性のシナプス形成も顕著に増加していた。このことは、CAST と ELKS がリボンシナプスの構造維持と機能発現を協調的に制御していることを示唆する。また、CAST/ELKS 結合タンパク質でもある RIM1 の発現が、CAST ノックアウトでは変化がないが、ELKS ノックア

ウトでおおよそ半分にまで低下していることを明らかにした。このことは、少なくとも ELKS が網膜リボンシナプスにおいて RIM1 タンパク質の恒常性維持に関与していることを示唆する。ところで、このダブルノックアウトマウスではすでに生後の早い段階で、CAST/ELKS が欠損している。そのため、発達段階で相補的なメカニズムが働いて CAST および ELKS の機能をマスクしている可能性も考えられた。そこで、生後 3 - 4 週目に CAST ノックアウト/ELKS-flox マウスの網膜に AAV-Cre をマイクロインジェクションして、すでにシナプス形成が終了したあとから、ELKS を欠損させた。すると、興味深いことに、視細胞が集まる層 (ONL) が顕著に薄くなることが明らかとなった。これは、視細胞の変性によるものと考えられ、今後、どのようなシグナル伝達経路の異常がこの視細胞変性に関与するのかを生化学的・形態学的に明らかにする必要がある。

小脳では、プルキンエ細胞に入力する顆粒細胞・平行線維のシナプス終末の超微形態を電子顕微鏡により観察した。通常の透過型電子顕微鏡法による 2 次元像の解析では、対照群とダブルノックアウトの間でシナプス密度やサイズに有意な差は見られなかった。そこで、収束イオンビーム型走査型電子顕微鏡を用いた 3 次元立体構築によりシナプス結合の接続様式の解析を試みた。その結果、対照群では 1 つの平行線維終末に 1 つのスパインが形成されていた (single spine bouton) のに対し、ダブルノックアウト群では複数個のスパインが 1 つの平行線維終末にシナプスを形成する multiple spine bouton が高頻度に見られた。また、アクティブゾーンの面積とシナプス小胞の数の相関が、ダブルノックアウトでは有意に低下していた。以上のことから、アクティブゾーンの主要構成分子である CAST/ELKS はシナプスの形成、並びに神経回路の構築に重要な役割を担っていることが示唆された。

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 9 件)

1. Yabe, I., Yaguchi, H., Kato, Y., Miki, Y., Takahashi, H., 外 20 名、20 番目 Mutations in bassoon in individuals with familial and sporadic progressive supranuclear palsy-like syndrome. *Sci. Rep.* 8: 819. 2018. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-19198-0.

2. Kaneda, M., Sakagami, H., Hida, Y., Ohtsuka, T., Satou, N., Ishibashi, Y., Fukuchi, M., Krysiak, A., Ishikawa, M., Ihara, D., Kalita, K., Tabuchi, A. Synaptic localisation of SRF coactivators,

MKL1 and MKL2, and their role in dendritic spine morphology. *Sci. Rep.* 8: 727. 2018. 査読有
DOI: 10.1038/s41598-017-18905-7.

3. Hamada, S., Ohtsuka, T. CAST: its molecular structure and phosphorylation-dependent regulation of presynaptic plasticity. *Neurosci. Res.* 127: 25-32. 2018. 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2017.12.005.

4. Minegishi, K., Hashimoto, M., Ajima, R., Takaoka, K., Shinohara, K., Ikawa, Y., Nishimura, H., McMahon, A., Willert, K., Sasaki, H., Fujimori, T., Ohtsuka, T., Yamaguchi, T., Shimono, A., Shiratori, H., Hamada, H.A. Wnt5 Activity Asymmetry and Intercellular Signaling via PCP Proteins Polarize Node Cells for Left-Right Symmetry Breaking. *Developmental Cell.* 40: 439-452, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.devcel.2017.02.010

5. Wang, Y., Fehlhauer, K.E., Sarria, I., Cao, Y., Ingram, N.T., Guerrero-Given, D., Thoresch, B., Baldwin, K., Kamasawa, N., Ohtsuka, T., Sampath, A.P., Martemyanov, K.A. The Auxiliary calcium channel subunit $\alpha 2\delta 4$ is required for axonal elaboration, synaptic transmission, and wiring of rod photoreceptors. *Neuron* 93: 1359-1374, 2017. 査読有 DOI: 10.1016/j.neuron.2017.02.021.

6. Mochida, S.*[†], Hida, Y., Tanifuji, S., Hagiwara, A., Hamada, S., Abe, M., Huan, M., Yasumura, M., Kitajima, I., Sakimura, K., Ohtsuka, T.*[†]. SAD-B Phosphorylation of CAST Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression. *Cell Reports* 16: 2901-2913, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.020.
(*corresponding authors)

7. Kobayashi, S., Hida, Y., Ishizaki, H., Inoue, E., Tanaka-Okamoto, M., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Fukaya, M., Kitajima, I., Takai, Y., Watanabe, M., Ohtsuka, T.*[†], Manabe, T.*[†]. The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 44: 2272-2284, 2016. 査読有
DOI: 10.1111/ejn.13331.
(*corresponding authors)

8. Uchigashima, M., Ohtsuka, T., Kobayashi, K., Watanabe, M. Dopamine synapse is a neuroligin-2-mediated contact between dopaminergic presynaptic and GABAergic

postsynaptic structures. *PNAS* 113: 4206-4211, 2016. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1514074113.

9. Watabe, A.M., Nagase, M., Hagiwara, A., Hida, Y., Tsuji, M., Ochiai, T., Kato, F., Ohtsuka, T. SAD-B kinase regulates presynaptic vesicular dynamics at hippocampal Schaffer collateral synapses and affects contextual fear memory. *J. Neurochem.* 136: 36-47, 2016. 査読有
DOI: 10.1111/jnc.13379.

〔学会発表〕(計 8件)

1. 萩原明、深澤有吾、河野まや、掛川渉、阿部学、崎村建司、柚崎通介、大塚稔久。「小脳・神経回路の形成におけるシナプス前終末タンパク質の形態学的機能解析」第123回日本解剖学会総会全国学術集会 2018.

2. Ohtsuka T. Integral system by the active zone proteins CAST and ELKS to control retinal synaptic transmission and photoreceptor remodeling. 第95回日本生理学会大会 2018.

3. Ohtsuka T. Molecular Mechanisms of Presynaptic Transmission. The first international symposium for frontend brain science: University of Yamanashi 2018.

4. Ohtsuka T. Integral system by CAST/ELKS protein family to regulate retinal photoreceptor development and maintenance. BRI International Symposium 2018.

5. 大塚稔久, CAST Phosphorylation in Control of Short-term Plasticity at the presynaptic Active Zones. 第40回日本神経科学大会, 2017.

6. Ohtsuka T. Decoding short-term synaptic plasticity: implication of CAST phosphorylation in control of synaptic plasticity at the excitatory synapses. The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses" 2016.

7. 大塚稔久, プレシナプス・キナーゼ SAD-B によるシナプス小胞ダイナミクスと可塑性制御の分子基盤, 生理学研究所研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」, 2015.

8. 大塚稔久, 「神経伝達物質の放出から捉える脳の高次機能とその破綻」第10回山梨

脳・血管セミナー，2015.

〔その他〕
ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bi
oche01/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bi
oche01/)

6．研究組織

(1)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