

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21489

研究課題名(和文) 分泌性シナプス間隙タンパク質のシナプス局在化機構

研究課題名(英文) Mechanisms for synaptic localization of secreted synaptic cleft proteins

研究代表者

中山 実 (NAKAYAMA, Minoru)

東邦大学・理学部・博士研究員

研究者番号：40449236

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)：ショウジョウバエ中枢コリン作動性シナプスに局在する分泌性シナプス間隙タンパク質Hikaru genki (Hig)は、アセチルコリン受容体の局在制御を行う。Higのシナプスへの局在化はユニークで、細胞外へ分泌後に脳内を拡散してコリン作動性シナプスに特異的にトラップされる。本研究では、Higのシナプス局在を制御する新規分泌性シナプス間隙タンパク質Haspを同定した。Haspと相互作用する因子の網羅的探索を行った。また、HigとHaspがシナプス間隙の異なるコンパートメントに存在することを示した。以上により、シナプス間隙のマトリックス構造を構成する因子や構造・構築機構の一部が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Hikaru genki (Hig), a *Drosophila* secretory protein, specifically localizes to cholinergic synaptic clefts in the CNS and regulates the distribution of acetylcholine receptor (AChR). Hig diffuses extracellularly and is specifically captured at the synaptic clefts of cholinergic synapses. To reveal the mechanisms of synaptic localization of Hig, we identified novel synaptic cleft protein Hasp that is required for trapping of Hig at the synapses. Hasp is also secreted, diffused in the brain, and trapped by cholinergic synapses. Then we searched for Hasp-interacting proteins by LC-MS/MS analysis. High-resolution microscopy reveals that Hasp and Hig divide synaptic clefts into distinct compartments. These data provide insight into how Hasp and Hig construct the synaptic cleft matrix and regulate the differentiation of cholinergic synapses.

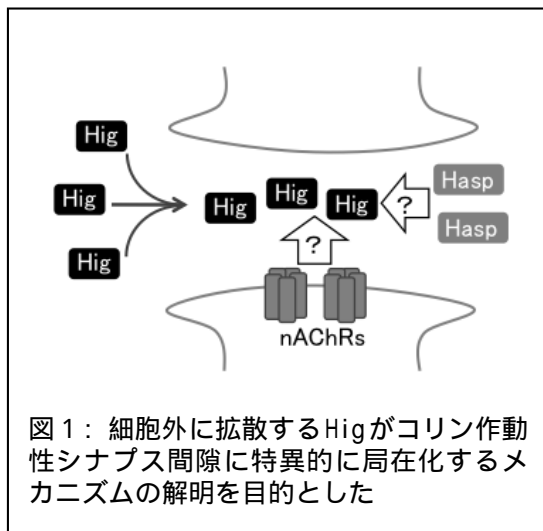
研究分野：神経科学

キーワード：シナプス間隙 分泌性タンパク質 シナプス発生 アセチルコリン受容体 コリン作動性シナプス ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

シナプスでの正常な神経伝達が行われるためには、シナプス後部における神経伝達物質受容体が正常に集積している必要がある。細胞内足場タンパク質がこれに関与する一方で、近年、細胞外シナプス間隙タンパク質による受容体等の膜タンパク質の局在制御に関する報告がなされている。シナプス前部や後部に局在する因子に対して、シナプス間隙タンパク質は比較的不明な部分が多く残されていたが、このようにシナプス間隙タンパク質の役割等について、光が当てられつつある状況にあった。

研究代表者は、ショウジョウバエ中枢神経系において、分泌性シナプス間隙タンパク質 Hikapu genki (Hig) がコリン作動性シナプスに特異的に局在し、アセチルコリン受容体(D6とD7)の集積を制御していることを示してきた。一方で、Hig タンパク質を含む、分泌性シナプス間隙タンパク質がどのようにシナプスに局在化するかについては多くが不明であった。研究代表者らの研究において、Hig のシナプス局在化メカニズムについて以下に記載するこれまでに知られていなかった現象が見られ、「分泌性シナプス間隙タンパク質のシナプス局在化機構」の解明という本研究テーマの着想に至った。



Hig はコリン作動性シナプスで機能するため、Hig の発現はコリン作動性ニューロンで必要であると考えられた。これを確認するために、*hig* 突然変異体を示す著しい活動性の低下や寿命の短縮などの表現型に対して、野生型 *hig* 遺伝子を特定の神経細胞で発現させて表現型の回復を見る救済実験を行った。すると意外なことに、検討した多くの発現ドライバー系統で救済が見られ、グリア細胞での *hig* 遺伝子の発現によっても表現型の救済が見られた。このため、Hig は分泌性タンパク質

であり、どの細胞で発現させても細胞外へ分泌後、脳内を拡散し必要とされるコリン作動性シナプスに局在化できるのだろうと考えた。この考えは、抗Hig抗体を用いた免疫組織染色によっても確かめられた。以上のデータから、「細胞外で拡散するHigをコリン作動性シナプスにトラップする機構」の存在が示唆された(図1)。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、コリン作動性シナプスにおいて、細胞外で拡散するHigをトラップする因子が存在する可能性が考えられた。そこで本研究は、Higのシナプス局在に必要な因子群の同定と、それらの役割を明らかにすることを目的とした。具体的には以下に挙げる内容についての解析を行った。

Higはアセチルコリン受容体(D6とD7)の集積を制御することを報告していたが、D6とD7の二重変異体においてHigのシナプス局在レベルが減少することをすでに見出していた。このため、Higのシナプス局在化にはアセチルコリン受容体が関与すると考えられた。D6とD7は、脊椎動物のアセチルコリン受容体7サブユニットと相同性の高いグループに属する。ショウジョウバエの7様受容体は他にD5が存在し、これらの受容体サブユニットによるHigのシナプス局在化への関与を調べることを目的の一つとした(図1)。

一方で、アセチルコリン受容体以外にも、Higのシナプス局在を制御する因子の存在が示唆されていた。研究代表者らのグループでは、Higのシナプス局在が完全に消失する突然変異体を一種類すでに同定していた(後にこの遺伝子を *hasp* と命名)。Haspは分泌性タンパク質であり、シナプス間隙に局在すると考えられた。このHaspとHigによるシナプス間隙のマトリックス構造の形成と、アセチルコリン受容体の集積における役割について、遺伝学的解析や、超解像顕微鏡を用いた単一シナプスの観察等により明らかにしていくことを、本研究のメインテーマとした。

また、Haspに関する研究から、Haspのシナプス局在を制御する因子がさらに存在すると考えられた。そこで、Haspと相互作用する因子の網羅的探索を行い、そこからHaspのシナプス局在化因子の同定を目指した。以上により、ショウジョウバエ・コリン作動性シナプスのシナプス間隙に局在する分子群を明らかにし、それらのシナプス局在化機構の解明を通して、分泌性シナプス間隙タンパク質を介したシナプス発生機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエ突然変異体の作出

シナプス間隙タンパク質 Hig のシナプス局在化に、アセチルコリン受容体 D 5 の関与が示唆されたため、D 5 の機能喪失型突然変異体の作出を行った。方法は、近年盛んに行われるようになった CRISPR/Cas9 法を用い、ゲノムへの Insertion/Deletion 挿入によるフレームシフト突然変異体の作出を行った。

(2) 免疫電顕を用いた Hasp の局在解析

新規に得られた Hig のシナプス局在化因子・Hasp は、シグナル配列を持つ分泌性タンパク質であり、遺伝学的解析などからもシナプス間隙タンパク質であると考えられた。これを示すために、抗 Hasp 抗体を用いた免疫電顕を行った。ショウジョウバエ脳凍結切片サンプル上で抗体染色、Nanogold 標識、HQ sliver 反応を行い、EPON 樹脂に包埋後、超薄切片を作製して電顕観察を行った。電顕は国立遺伝学研究所所有のものを用い、鈴木えみ子先生との共同研究にて行った。

(3) SIM を用いた単一シナプスの観察

シナプス前・後部膜の間は約 20nm 程度の狭い領域であり、通常の光学顕微鏡では分解能の限界により複数のシナプス局在分子を鮮明に表現することは難しい。そこで、超解像顕微鏡の一つである Structured Illumination Microscopy (SIM) を用いて、単一シナプスに局在するシナプス前部・シナプス間隙・シナプス後部タンパク質の観察を行った。SIM や STORM などの超解像顕微鏡は、サンプルのカバーガラス面近傍のみ観察可能のため、脳のホルマウント染色によるサンプルでは脳の内側に多く存在するシナプス領域の観察することは難しい。そこで凍結切片を作製し、APS コート処理を施したカバーガラスに切片を貼付け、カバーガラス上で抗体染色を行い、SIM による観察を行った。SIM は医薬基盤研究所所有のものを用い、角田慎一先生との共同研究にて行った。

(4) LC-MS/MS による Hasp 相互作用因子の探索

新たに同定したシナプス間隙タンパク質 Hasp が、どのような因子によってシナプスに局在化しているかを明らかにするために、抗 Hasp 抗体を用いた免疫沈降と、Hasp-HA を強制発現させたサンプルで HA 抗体による免疫沈降をそれぞれ行った。得られたサンプルを用いて、LC-MS/MS によるショットガン・プロテオミクスを行い、Hasp と相互作用する候補因子の探索を行った。LC-MS/MS 解析は、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク（略称包括脳ネットワーク）による支援を得て行った。

4. 研究成果

(1) 脳内を拡散する Hig のシナプス局在化に、7 様アセチルコリン受容体 (D 5, D 6, D 7) と新規シナプス間隙タンパク質 Hasp が必要であることを明らかにした

ショウジョウバエ中枢コリン作動性シナプスのシナプス間隙に局在する Hig は、細胞外へ分泌後、脳内を拡散してコリン作動性シナプスに特異的にトラップされる。シナプスにおける Hig は、アセチルコリン受容体 (D 6, D 7) のシナプスへの局在化に必要であることを先行論文で示している。一方で、本研究においては、アセチルコリン受容体 (D 5, D 6, D 7) の変異体において Hig のシナプス局在が減少することを示した。このことから、アセチルコリン受容体もまた Hig のシナプス局在に関与し、Hig と受容体両者はシナプス局在において相互依存の関係にあることがわかった (図 2)。

一方で、遺伝学的解析から Hig のシナプス局在が消失する突然変異体を分離し、これをコードする遺伝子を *hasp* (*Hig-anchoring scaffold protein*) と命名した。抗 Hasp 抗体染色により、Hasp はコリン作動性シナプスに局在することがわかり、免疫電顕により Hasp はシナプス間隙に局在することがわかった。*hasp* 突然変異体脳では、Hig のシナプス局在が消失するが、細胞体での Hig の発現に影響は見られず、Hasp はシナプスにおいて Hig を捉える役割があると考えられた。実際、Hasp は発生過程において、Hig と同時期もしくは先にシナプスに局在していた (図 2)。

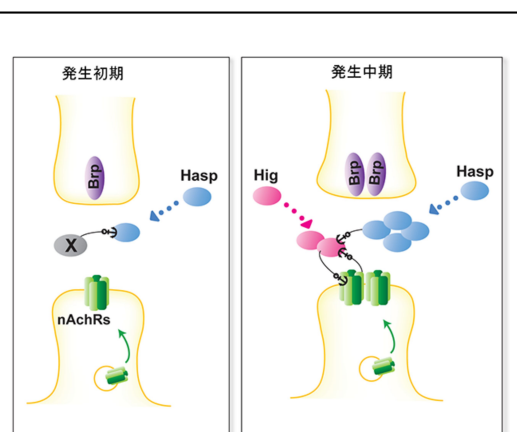


図 2: シナプス間隙タンパク質 Hig は、アセチルコリン受容体 (nAChRs) の集積に関与する一方で、nAChRs もまた Hig のシナプス局在に必要である。Hig のシナプス局在には分泌性シナプス間隙タンパク質 Hasp が必要である。発生初期に Hasp がシナプスに局在化し始めるが、このとき Hasp をシナプスに留めるための因子 (X) の存在が示唆されている。

hasp 突然変異体脳では、Hig のシナプス局在が消失しており、*hig* 変異体で見られるアセチルコリン受容体 (D 6, D 7) のシナプス局在レベルの低下が同様に見られた。上述のように、アセチルコリン受容体 (D 5, D 6, D 7) の変異体において Hig のシナプス局在レベルは減少するが、一方で、同変異体において Hasp のシナプス局在レベルには影響が見られなかった。このことから、受容体を直接制御しているのは Hig であり、Hasp は Hig のシナプス局在化を調節することで、間接的に受容体レベルの調節を行っていると考えられた (図 2)。

Hasp はコリン作動性シナプスでアセチルコリン受容体の局在レベルの調節に関与しているが、どのニューロンで Hasp が必要とされるかについて、GAL4-UAS 発現系を用いた *hasp* 変異体の救済実験を行った。*hasp* 変異体は著しい寿命の短縮を示すが、発現レベルが高いドライバー系統を用いて Hasp を発現させると、たとえグリア細胞で発現させたとしても *hasp* 変異体の寿命の短縮を救済した。この結果は、すでに報告している Hig のシナプス局在化メカニズムと同様で、分泌性タンパク質である Hasp は、細胞外へ分泌後、脳内を拡散してコリン作動性シナプスにトラップされると考えられた。この時、*hig* 変異体において Hasp のシナプス局在異常は見られないため、Hig 以外の別因子が Hasp をシナプスに安定化させていると考えられた (図 2)。

(2) 2つのシナプス間隙タンパク質 Hig と Hasp が、同一のシナプス間隙において異なる領域に存在することを示した

上述の実験により、Hig と Hasp はシナプス間隙において協調してアセチルコリン受容体の集積に関与することがわかった。そのため、2つのシナプス間隙タンパク質は、同一のシナプス上で局在が一致すると考えられた。ところが、単一シナプスレベルの観察では両者のシナプス局在は完全には一致せず、Hig と Hasp の二重染色による共焦点顕微鏡での観察では、両シグナルに微妙なズレが見られた。これをクリアに表現するために、超解像顕微鏡の一つである SIM を用いた観察を行った。SIM 顕微鏡の分解能では、Hig と Hasp の局在が完全に分離しているかどうかまではわからなかったが、少なくとも両者は完全には一致せず、Hig と Hasp はシナプス間隙の異なる領域を主に占有していることを示すことが出来た (図 3)。このことから、シナプス間隙には複数のコンパートメント構造が存在することが明らかになった (図 4)。以上の研究成果(1)と(2)については、The journal of neuroscience 誌に掲載された。

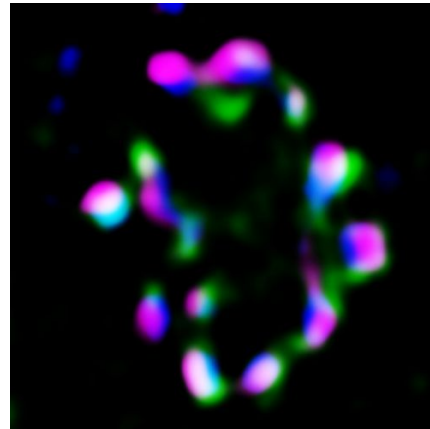


図 3：超解像顕微鏡 (SIM) による単一シナプスの観察。Hasp(緑)、Hig(紫)、Brp(青)の三重染色を行い、Mushroom body calyx のシナプス構造体 (Microglomerulus) を撮影した。アクティブゾーンを標識する Brp(青)の部分がシナプスであり、ここでは複数のシナプスが見られる。Brp 近傍に Hig と Hasp のシグナルが見られるが、これら二つのシナプス間隙タンパク質の局在は完全には一致していない。

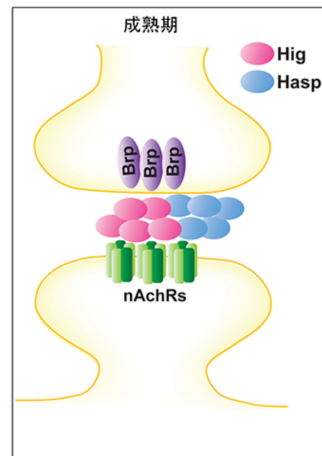


図 4：成熟期のショウジョウバエ・コリン作動性シナプスのモデル。超解像顕微鏡を用いた観察から、Hig と Hasp は同一シナプスのシナプス間隙において、異なる領域を主に占有していた。このため、シナプス間隙には複数のコンパートメント構造が存在すると考えられた。

(3) Hasp のシナプス局在を制御する新規因子 (の候補) を同定した

Hasp は Hig と同様に細胞外へ分泌後、脳内を拡散してコリン作動性シナプスにトラップされる。このとき Hasp のシナプス局在化に関与する因子を探索するために、抗 Hasp 抗

体を用いた免疫沈降と、Hasp-HA を強制発現させたサンプルで HA 抗体による免疫沈降をそれぞれ行い、LC-MS/MS によるショットガン・プロテオミクスを行った。これにより、Hasp と相互作用する候補因子が複数得られた。このうちの一つの遺伝子について、機能喪失型突然変異体を作出したところ、変異体脳において Hasp のシナプス局在レベルが低下していた。このとき、Hasp のシナプス局在は完全に消失することはなかったため、さらなる Hasp 局在化因子が必要であると考えられた。このように、シナプス間隙は複数の分子が協調して細胞外マトリックス構造を構成し、シナプス発生や機能調節に関与していると考えられる。

(4) 今後の展望

本研究により、分泌性シナプス間隙タンパク質のシナプス局在化機構の一部が解明された。しかしながら、新たに得られた Hasp のシナプス局在化機構については、そこに関わる分子等、新たな不明点が生じた。今後の研究において、Hasp の局在制御を行う因子群の同定とそれらの役割が明らかにされることで、分泌性シナプス間隙タンパク質を介したシナプス発生機構の全容が見えてくると期待される。また、単一シナプスの観察が可能となり、シナプス間隙タンパク質の局在の詳細がわかるようになった。シナプス間隙には特定のタンパク質が局在している領域・コンパートメントが存在していたが、その領域にどのような機能的役割が存在するのかを明らかにしていくことが今後の課題である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- (1) Nakayama M, Suzuki E, Tsunoda S, Hama C.
“ The Matrix Proteins Hasp and Hig Exhibit Segregated Distribution within Synaptic Clefts and Play Distinct Roles in Synaptogenesis. ”
J Neurosci. 2016 Jan 13;36(2):590-606.
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2300-15.2016.
査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- (1) Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, Chihiro Hama.
“ Clustering of acetylcholine receptor is modulated by the receptor subunits and synaptic cleft protein Hig. ”
第 39 回日本分子生物学会年会
2016 年 12 月 2 日
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

- (2) Minoru Nakayama, Osamu Nishimura, Shigehiro Kuraku, Masaki Sone, Chihiro Hama.
“ Regulation of Acetylcholine receptor clustering by synaptic cleft protein Hig and the receptor subunits ”
第 12 回日本ショウジョウバエ研究会 (JDRC12)
2016 年 9 月 11 日
立教大学 (東京都・豊島区)
- (3) Minoru Nakayama, Emiko Suzuki, Shin-ichi Tsunoda, Chihiro Hama. “ The matrix proteins Hasp and Hig play different roles in synaptogenesis and form distinct molecular compartments in synaptic clefts ”
第 38 回日本分子生物学会年会 (BMB2015)
2015 年 12 月 1 日
神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)
- (4) 中山 実, 浜 千尋
“ ショウジョウバエのシナプス間隙に局在するマトリックスタンパク質 Hig と Hasp が示すコンパートメント形成と機能 ”
平成 27 年度 生理学研究所 研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」
2015 年 6 月 19 日
生理学研究所 (愛知県・岡崎市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中山 実 (NAKAYAMA, Minoru)
東邦大学・理学部・博士研究員
研究者番号: 40449236