

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08223

研究課題名（和文）電位依存性カルシウムチャネルによる神経プレシナプス基盤構造の分子制御

研究課題名（英文）Regulation of neuronal adaptor molecules by voltage-gated calcium channels at presynaptic structures

研究代表者

多留 偉功 (Taru, Hidenori)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：30533731

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：神経細胞間の情報伝達を担うプレシナプス部位には、固有のアダプター分子群から成る基盤構造が存在し、電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）が伝達の引き金となる。本研究は、VGCCとアダプター分子RIMB-1/RIM-BPの關係に着目し、プレシナプスへの分子局在機構を解析した。無脊椎モデル動物である線虫*C. elegans*において、VGCCの局在には二つのアダプター分子RIMB-1とUNC-10による冗長的（重複的）な制御が主要な機構であり、さらにRIMB-1の局在にVGCCおよびエンドサイトーシス関連分子が重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、神経系がその情報処理機能を発揮するうえで重要なプレシナプス分子、電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）と基盤構造のアダプター分子RIMB-1について、その局在分子機構の特性を明らかにした。プレシナプスへの分子局在機構は神経科学の重要課題の一つであり、他のモデル動物での知見とともに、生物の脳神経系の理解に寄与するものである。これらのヒト相同分子は自閉症などの精神疾患や遺伝性の神経疾患に関与しており、本知見は発症分子機構理解や治療薬開発の基盤として重要である。

研究成果の概要（英文）：In neuronal presynaptic sites, neurotransmitter release is triggered by voltage-gated calcium channels (VGCC) and supported by unique basal structures with a group of adaptor proteins. In this study, we analyzed the molecular mechanism of protein localization to presynaptic sites focusing on the relationship between VGCC and the adaptor molecule RIMB-1/RIM-BP in *C. elegans*, an invertebrate model animal. We revealed that the localization of VGCC is mainly regulated by the redundant function of two adaptor molecules, RIMB-1 and UNC-10. Moreover, we identified the requirement of VGCC and endocytic proteins for the localization of RIMB-1.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス カルシウムチャネル アダプタータンパク質 線虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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要となる細胞間接着構造である。プレシナプスの中心部位に局在する電位依存性カルシウムチャネル(VGCC)の開口を引き金として、神経伝達物質がポストシナプスに向けて放出され、化学的な細胞間情報伝達がなされる。プレシナプスの中心部位では特徴的なアダプタータンパク質の一群が密に相互作用して基盤構造を形成し、その足場上で VGCC などのシナプス伝達を制御する分子が機能している。それらのアダプター分子や VGCC などの機能分子がどのようにプレシナプスに局在するのか、その分子機構の解明は神経科学の大きな課題であり、自閉症や統合失調症などのシナプス異常に起因する精神神経疾患を理解する上でも重要である。

RIM-BP はプレシナプスの基盤構造を構成するアダプター分子の一つであり、VGCC のチャネル本体サブユニット 1 と結合する。研究開始当初の段階で、マウスやショウジョウバエにおける生理機能解析や、線虫 RIM-BP ホモログ RIMB-1 に関する代表者らの研究から、RIM-BP が広く種を越えて VGCC の機能や局在に重要であることが示されていた。さらに RIM-BP 自身のプレシナプス局在分子機構に関して代表者らは、軸索輸送モーター分子および VGCC の補助サブユニットが線虫 RIMB-1/RIM-BP のプレシナプスへの限局に必要であることを見出していた。

2. 研究の目的

神経細胞のプレシナプスにおける VGCC の局在には、プレシナプス基盤構造の構成アダプター分子の一つである RIMB-1/RIM-BP が重要である。その一方で、RIMB-1/RIM-BP のプレシナプス局在に VGCC が関与する可能性が示されていた。そこで線虫プレシナプスにおける VGCC および足場タンパク質 RIMB-1 の局在に関して、(1) VGCC 局在の RIMB-1 による制御分子機構、(2) VGCC による RIMB-1 のプレシナプス局在制御、(3) RIMB-1 のプレシナプス局在に関わる分子経路、について明らかにすることを目指し、本研究を実施した。

3. 研究の方法

実験モデルとして、遺伝学的解析に長けた無脊椎動物である線虫 *C. elegans* を用いた。RIMB-1、VGCC 1 サブユニット UNC-2、シナプス小胞結合分子 RAB-3 などの各種のプレシナプス分子の神経細胞内局在に関して、蛍光タンパク質を融合して特定の神経細胞種(頭部感覚神経 AWC、体部運動神経細胞 DD・VD)に発現させたトランスジェニック線虫を利用し、蛍光顕微鏡を用いた生体内観察によって解析した。シナプス伝達機能について、培養プレート上ないし水中における運動能測定、および神経伝達物質の分解阻害剤(Aldicarb)に対する耐性を指標とした薬理解析によって評価した。各種候補遺伝子の関与を遺伝学的相互作用について、既存の機能欠損変異体およびそれら多重変異体における分子局在解析によって検討した。順遺伝学的スクリーニングとして、各トランスジェニック・変異系統に対してエチルメタンサルホン酸を用いた突然変異導入を行い、表現型を呈する個体を探索・単離、責任遺伝子を SNP 遺伝子座マッピング法と全ゲノム配列解析を用いて同定した。

4. 研究成果

(1) VGCC 局在の RIMB-1 による制御分子機構

RIMB-1 の順遺伝学的エンハンサースクリーニングによる UNC-10 の同定

VGCC プレシナプス局在の RIMB-1 による制御機構に関して、RIMB-1 の順遺伝学的エンハンサースクリーニングによって関連分子の検討を試みた。RIMB-1 機能欠損変異体にさらなる突然変異を導入し、UNC-2/VGCC 1 の局在異常を呈するエンハンサー変異体を探索・単離した。責任遺伝子変異のマッピングの結果、アダプター分子 UNC-10/RIM に終始コドンを導入するナンセンス変異 *nq47* を同定した (図 1)。UNC-10 の関与はこれまで候補分子の限定的な解析から見出されていたが、より網羅的・ノンバイアスな本スクリーニングにおける再同定によって、RIMB-1 と UNC-10/RIM による冗長的な制御が線虫プレシナプスにおける主要な VGCC 局在制御機構であることが強く示唆された。

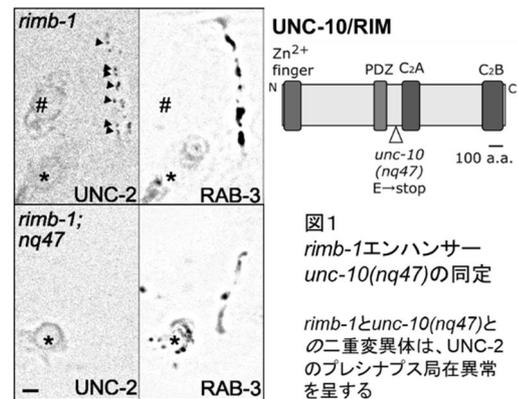


図1 *rimb-1*エンハンサー *unc-10(nq47)*の同定

*rimb-1*と*unc-10(nq47)*との二重変異体は、UNC-2のプレシナプス局在異常を呈する

RIMB-1 の VGCC 局在に関わる相互作用ドメインの同定

RIMB-1 は複数のタンパク質間相互作用ドメインを有するアダプタータンパク質であり、3つの SH3 と 2つの FN3 ドメインを持つ。UNC-2/VGCC 1 の局在制御機能に関わる RIMB-1 分子内領域を明らかにするため、各種ドメイン欠失コンストラクトを発現するトランスジェニック線虫を作成し、RIMB-1・UNC-10 二重変異体における UNC-2/VGCC 1 局在異常に対しての回復能を検討した (図 2)。その結果、RIMB-1 の C 末端側欠失、さらに最 C 末端側に位置する 3 つ目の SH3 ドメイン (SH3-III) を欠いたコンストラクトが回復能を喪失しており、RIMB-1 の機能に SH3-III が必須であることが明らかとなった。SH3-III は VGCC 1 の結合部位であり、RIMB-1 による UNC-2/VGCC 1 の局在制御が、両者のタンパク質間相互作用を介している可能性が高い。

(2) VGCC による RIMB-1 のプレシナプス局在制御

RIMB-1 のプレシナプス局在における VGCC 本体サブユニット 1 の関与 VGCC の補助サブユニット 2 が RIMB-1 プレシナプス局在に関与することが、予備的研究から示された。そこで VGCC 本体サブユニットである 1 ファミリーの各種分子 EGL-19、UNC-2、CCA-1、NCA-1、NCA-2 の関与について、各機能欠損変異体における RIMB-1 局在を検証した。その結果、P/Q 型 VGCC 1 である UNC-2 が欠損すると、RIMB-1 がプレシナプス以外に、軸索上のシナプス外領域への異常な分布を呈することが明らかとなった。UNC-2/VGCC 1 と足場タンパク質 RIMB-1 との間には、両者のプレシナプス局在に関して、双方向的な局在制御の関係があることが示された。

RIMB-1 のプレシナプス局在に必要な分子内領域の検討

RIMB-1 のプレシナプス局在に必要な分子内領域を明らかにするため、各種のドメイン欠失体に mCherry 蛍光タンパク質を融合して D 型運動神経細胞に発現するトランスジェニック線虫をそれぞれ作成し、その局在を解析した (図 2)。その結果、RIMB-1 の C 末端側半分を欠失したコンストラクトでは、プレシナプス内での集積が損なわれて拡散した分布が観察された。一方で、最 C 末端側の第 3 SH3 ドメイン (SH3-III) の欠失体は、全長と同様のプレシナプス局在様式を示した。すなわち RIMB-1 の正確なプレシナプス局在には

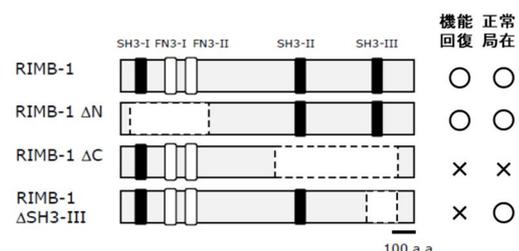


図2 RIMB-1の各種欠失体のVGCC 制御機能とプレシナプス局在能

RIMB-1 の C 末端側領域が必要であること、VGCC 局在制御には不可欠な SH3-III は RIMB-1 自身の局在においては必須ではないことが明らかとなった。

(3) RIMB-1 のプレシナプス局在に関わる分子経路

RIMB-1 局在関連分子の順遺伝学的探索

RIMB-1 局在制御に関するさらなる知見を得るため、RIMB-1 局在異常を呈する変異体の順遺伝学的スクリーニングを行った。D 型運動神経細胞に mCherry 融合 RIMB-1 を発現するトランスジェニック線虫に変異導入し、局在異常を呈する変異体を探索・単離した。責任遺伝子解析により、クラスリン依存的エンドサイトーシスの制御に関わるセリン・スレオニンキナーゼの機能低下型の変異が同定された。

RIMB-1 局在におけるエンドサイトーシス経路の関与

さらに RIMB-1 のプレシナプス局在における細胞内トラフィック各経路の関与について、エンドサイトーシスやリサイクリング等の各過程に異常をきたす機能欠失変異体における RIMB-1 局在を解析し、検討した。その結果、エンドフィリンおよび Rab GTPase 活性化因子ホモログ等の変異体において、RIMB-1 の局在異常が認められた。

これらの順遺伝学的探索および候補遺伝子変異体の解析から、RIMB-1 のプレシナプス局在にはエンドサイトーシス経路に関わる分子群が関与することが、明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kushibiki Yuto, Suzuki Toshiharu, Jin Yishi, Taru Hidenori	4. 巻 39
2. 論文標題 RIMB-1/RIM-Binding Protein and UNC-10/RIM Redundantly Regulate Presynaptic Localization of the Voltage-Gated Calcium Channel in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 8617 ~ 8631
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0506-19.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 櫛引 勇人、鈴木 利治、多留 偉功
2. 発表標題 線虫においてアダプタータンパク質RIM-binding proteinとRIMは冗長的に電位依存性Ca ²⁺ チャネルのプレシナプス局在を制御する
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 多留偉功
2. 発表標題 神経プレシナプス形成における階層的かつ冗長的なアダプター分子群の制御機能
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫛引勇人、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫C. elegans神経プレシナプスアダプター分子RIMB-1による電位依存性カルシウムチャネルの局在制御
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榑引勇人、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> アダプター分子RIMB-1 による電位依存性カルシウムチャネルの神経プレシナプス局在制御
3. 学会等名 日本遺伝学会第89回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榑引勇人、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫 <i>C. elegans</i> における神経プレシナプスアダプター分子RIMB-1による電位依存性カルシウムチャネルの局在制御
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榑引勇人、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 アダプター分子RIMB-1による電位依存性カルシウムチャネルのプレシナプス局在制御
3. 学会等名 第144回日本薬学会北海道支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuto Kushibiki, Toshiharu Suzuki, Hidenori Taru
2. 発表標題 Characterization of RIM-binding protein RIMB-1 in the presynaptic active zone
3. 学会等名 CeNeuro2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

発表論文機関リポジトリ：
<http://hdl.handle.net/2115/77754>

プレスリリース:神経伝達トリガー分子の新たな局在制御機構を発見～シナプス病の分子基盤理解に貢献～
<https://www.hokudai.ac.jp/news/2019/10/post-574.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----