

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2006—2008 年度

課題番号：18680032

研究課題名 (和文) 神経シナプス・アクティブゾーンの形成とその機能発現におけるリン酸化機構の解析

研究課題名 (英文) Phosphorylation mechanisms underlying the presynaptic active zone structure and function

研究代表者 大塚 稔久 (OHTSUKA TOSHIHISA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号：40401806

研究成果の概要：

神経終末アクティブゾーン(Active zone: AZ)に局在する SAD キナーゼが AZ たんぱく質である RIM1 のみならず、CAST をもリン酸化することを見出した。本リン酸化部位特異抗体による解析から、内在性の CAST もリン酸化されており、リン酸化された CAST も AZ に強く結合していることが明らかとなった。また、ラット上顎神経節細胞にリン酸化変異体を導入し、電気生理学的解析を行ったところ、

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2007 年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	23,300,000	6,990,000	30,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科：神経科学、細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：シナプス、アクティブゾーン、CAST、ELKS、RIM1

1. 研究開始当初の背景

アクティブゾーン(Active Zone; AZ)は、神経終末に存在する比較的電子密度の高い特殊な構造体で、神経伝達物質放出のための“特異的な場”であると考えられている。神経回路網の基盤をなすシナプスの成熟過程において、AZがどのような役割を担っているのかは、現在においてもほとんど明らかになっていない。本申請者は最近、古典的な生化学的手法と質量分析法を組み合わせた新たな手法を

用いて、新規のAZ特異的蛋白質を同定し、CAST(Cytomatrix at the AZ-associated Structural protein)と命名した (Ohtsuka et al., 2002. *J Cell Biol*)。これまでに数少ないながらも、AZ特異的蛋白質として、RIM, Bassoon, Piccolo, Munc13-1 などが知られていた。本申請者は、CASTが、これらのAZ蛋白質群と相互作用しAZにおいて巨大な蛋白質複合体を形成していることおよび神経伝達物質の放

出を制御していることを、世界に先駆けて明らかにした (Takao-Rikitsu et al., 2004. *J Cell Biol.*)。これらの発見により、長らく不明であったAZにおける分子レベルでの理解が一気に進み、“CASTを介した巨大な蛋白質複合体がAZという比較的電子密度の高い構造体の分子基盤である”という私共の新たな概念の提出に大きく貢献した。

シナプスの成熟過程におけるAZの役割を解析する過程で、私共は、シナプス小胞とAZの両方に局在するセリン・スレオニンキナーゼとしてSADキナーゼを同定した。このような特異的な局在を示すキナーゼはこれまで報告がなかった。私共は、SADキナーゼが非常に強くAZに結合しており、神経終末において神経伝達物質の放出を制御していること、およびSADキナーゼがAZ蛋白質であるRIM1を特異的にリン酸化することを見出した (Neuronに投稿し、コメントにしたがって改訂後、再投稿中)。

したがって、AZの形成・維持・機能発現において、SADキナーゼはきわめて重要な働きをしている可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究計画においては、シナプス小胞とAZに特異的に局在する新規セリン・スレオニンキナーゼSADに焦点をあて、分子レベルと個体レベルにおける知見を統合し、AZの形成とその機能発現において、SADキナーゼがいかなる役割を担っているのかを明らかにする。そして、これまでほとんど解析が進んでいないAZにおけるリン酸化シグナル伝達機構の全貌を明らかにすることを目指す。

1. 分子レベルからのアプローチ：

すでに、SADキナーゼがRIM1をリン酸化することは明らかにしているが (いまひとつのAZ蛋白質であるMunc13-1はリン酸化しな

い)、AZもしくはシナプス小胞において他の基質をリン酸化することが十分考えられる。そこで、分子生物学的・生化学的手法を用いて、神経終末におけるSADキナーゼの特異的な基質を同定する。さらに、リン酸化される基質の抗リン酸化基質抗体を作製し、それらの生理学的意義を明らかにする。

2. 個体レベルからのアプローチ：

SADキナーゼのノックアウトマウスはすでにJoshua Sanse博士らのグループにより報告されている (Kishi et al., 2005. *Science*)。その解析から、SADキナーゼはaxonとdendriteの極性形成を制御していることが明らかとなった。しかし、ノックアウトマウスではシナプスそのものが形成されず、マウスは生後すぐに死亡する。したがって、従来のノックアウトではaxonとdendriteが正常に分化した後のシナプスの形成・成熟については、SADキナーゼの関与を解析することは不可能である。本研究計画では、SADキナーゼのコンディショナルノックアウトマウスおよびドミナントネガティブ・ドミナントアクティブタイプのトランスジェニックマウスの作製を行い、SADキナーゼの個体レベルでの機能を明らかにする。さらに、同定した基質のリン酸化部位をアラニンに置換した変異体のノックインマウスの作製を行い、SADキナーゼにおけるAZ蛋白質リン酸化の生理的意義を個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

1. 分子レベルからのアプローチ (生化学的・細胞生物学的解析を含む)

SADキナーゼが関与する分子レベルでの機能を明らかにするために神経終末(シナプス小胞およびAZ)における基質と結合蛋白質の同定を試みる。

(1) 免疫沈降実験による結合蛋白質の同定：

本申請者はすでに、SAD キナーゼに対する数種類のポリクローナル・モノクローナル抗体を有している。これまでに確立した AZ の高度精製方法をさらに改良し（具体的には、界面活性剤の種類と変性剤の組み合わせや濃度を調整する）、これら特異的な抗体を用いて、ラットもしくはマウスのシナプス結合可溶性画分から SAD キナーゼの結合蛋白質の同定を行う。さらに、質量分析法を用いることで SAD が関与する AZ における蛋白質複合体のプロテオーム解析を行う。

また同様の試みをシナプス小胞の可溶性画分を用いて行う。

(2) Yeast-Two Hybrid 法および Pull down assay を用いた SAD キナーゼの C 末領域に結合する蛋白質の同定：

本申請者は、SAD キナーゼの C 末領域に種を超えて保存された領域が存在し、その領域が SAD キナーゼのシナプスへの局在と神経伝達物質の放出に重要な役割を果たしていることをすでに見出している（改訂版を *Neuron* に再投稿中）。したがって、その C 末領域に特異的に結合する蛋白質を同定しその機能解析を行う。

(3) シナプス小胞および AZ に存在する基質の同定：

SAD キナーゼのキナーゼドメイン内に位置する 63 番目のリジンをアルギニンに置換すると（K63R 変異体）、ATP 結合能が消失し、機能的にドミナントネガティブとして働くことをすでに見出している。さらに、この様な変異体は基質との結合能が高くなるのがこれまでの多くのセリン・スレオニンキナーゼの研究から明らかになっている。そこで、この K63R 変異体を用いて、Yeast-Two Hybrid およ

び

Pull down assay により、基質の同定を試みる。さらに、シナプス小胞画分およびシナプス結合画分

（AZ とポストシナプスを含んでいる）を可溶化したのち、SAD キナーゼを用いたリン酸化反応を行い、カラム操作で分離後、リン酸化された蛋白質をオートラジオグラフィー等で検出・同定する。

* 上記の生化学的実験を効率よく遂行するために、遠心機、液体クロマトグラフィーなどを申請機器として購入する。

2. 個体レベルからのアプローチ：

Axon/dendrite 分化後のシナプス成熟過程における SAD キナーゼの役割を明らかにするために、コンディショナルノックアウトマウスの作製を行う。さらに、SAD キナーゼのドミナントアクティブ・ネガティブタイプのトランスジェニックマウスの作製を行う。そのため、H18 年度は必要なベクター等の作製を行う。

<平成19年度以降>

1. 分子レベルからのアプローチ（生化学的・細胞生物学的解析を含む）

(1) **分子間ネットワークの解析：**得られた結合蛋白質の様々な SAD 結合能欠損変異蛋白質を作製し、SAD との相互作用を検討する。このような変異体は、SAD キナーゼが関与する新たな相互作用を明らかにするのみならず、候補分子群の生理機能の解析にも有用である。

(2) **SAD キナーゼ活性化のメカニズム：**すでに SAD キナーゼの自己リン酸化部位を同定しており、この部位の抗リン酸化抗体を作製する。神経初代培養細胞などにおけるシナプス形成・成熟時に、SAD キナーゼが時間的・空間的

にどのように活性化されるのかを明らかにする。得られる成果は、SADキナーゼの上流のシグナル伝達機構の解明に繋がることが期待できる。

(3) **基質のリン酸化の生理的意義**：得られた基質について、それぞれ抗リン酸化抗体を作製し、(2)同様の解析を行う。さらに、リン酸化がAZ蛋白質間の相互作用にいかなる影響を及ぼすかを生化学的に解析する。また、初代培養細胞を用いて、基質のリン酸化が神経伝達物質の放出およびシナプス形成に与える影響を解析する（東京医科大学、持田澄子教授との共同研究）。

2. 個体レベルからのアプローチ：

(1) **コンディショナルおよびトランスジェニックマウスの解析**：海馬スライス標本を用いた電気生理学的解析を、東大医科学研究所、真鍋俊也教授との共同研究で行う。具体的には、2発刺激増強、テタヌス後増強等のシナプス短期可塑性および、シナプス伝達が長期にわたり強化される長期増強（LTP）などのシナプス長期可塑性への影響を調べる。さらに、記憶学習試験（Morris水迷路・食餌報酬試験・恐怖条件付け試験など）および恐怖反応試験（明所忌避試験・驚愕反射試験・Porsolt強制水泳など）などにより、SAD遺伝子改変マウスの学習・行動・情動能力などの発達への影響を解析する。

同時に、リン酸化が亢進・低下している分子群のプロテオーム解析を行う。また、申請者の所属する部局で立ち上がっているGene chipによる解析も行う予定である。

(2) **SADキナーゼの個体レベルでの可視化**：自己発光能をもつ Green fluorescent protein(GFP)をコードする遺伝子を融合さ

せたSAD遺伝子をもちいて、トランスジェニックマウスを作製し、AZ蛋白質のリン酸化を時間的・空間的にモニターできる系を確立する。このような遺伝子改変マウスは各種の薬剤や外的環境がAZ形成に（最終的にはシナプス形成と神経回路網形成に）いかなる影響を及ぼすかをリアルタイムで解析できる系の確立につながる可能性がある。

(3) 1-(3)で解析するリン酸化変異体の中で、培養細胞レベルでシナプス形成や神経伝達物質の放出に異常を示すものについて、トランスジェニックマウスまたはノックインマウスを作製する。生化学、形態組織学、電気生理学的・行動学的解析を系統的に行い、野生型マウスとの比較検討を行う。

II：研究を遂行する上での工夫：CAST/ELKS以外のAZ蛋白質はすべて欧米の研究グループによって同定・解析されてきた。これらのラボはいずれもビックラボであり、本申請者のように独立したばかりの小規模な研究室では、テーマを広げすぎず、上述のごとく得意分野（蛋白質化学）からストラテジーを組み立てていくことが大切であると考えている。また、国内には電気生理学・行動学の分野で世界のトップレベルにある研究室があり、それらと密な共同研究を行い、分子から個体レベル、逆に個体から分子レベルのフィードバックを常に意識しながら研究を進める。その際、積極的に face to face の meeting などを行う（そのため旅費等の予算を多めに計上してある）。そのような取り組みは国内で立ち遅れているプレシナプス分野(AZ 分野も含む)で、世界をリードする学際的な研究の流れを構築することに大きく貢献することが期待できる。

4. 研究成果

アクティブゾーンに存在するリン酸化酵素 SAD キナーゼが、RIM1 だけでなく、他のアクティブゾーンたんぱく質である CAST, ELKS, Bassoon, Piccolo をリン酸化することを明らかにした（未発表データ）。たとえば、Bassoon および Piccolo に関しては少な

くともそれぞれ3箇所のリン酸化部位が存在する。また、CASTに関しては、アミノ末端のひとつのセリン残基がリン酸化されることが明らかとなった(未発表データ)。このリン酸化部位特異的な抗体を作製し、内在性のリン酸化についても検討したところ、生体内でもCASTがリン酸化されており、さらにリン酸化されたCASTも強くアクティブゾーンに結合していることが明らかとなった。さらに、リン酸化部位に変異を導入した各種変異体を作製し、ラット上顎神経節細胞の初代培養細胞に遺伝子導入を行い、電気生理学的解析を行った。リン酸化部位をアラニン残基に置換した変異体はシナプス伝達を著明に阻害した。このことから、アクティブゾーンに存在するリン酸化酵素SADキナーゼがアクティブゾーンたんぱく質CASTをリン酸化し、このリン酸化が神経伝達物質の放出において何らかの役割になっていることが示唆された。

このSADキナーゼによるCASTのリン酸化の生理的な意義を個体レベルで明らかにする目的で、リン酸化部位に変異を導入したノックインマウスの作製を行った。現在、ベクターの構築は終了し、すでに候補となるES細胞の採取も終了している。今後、キメラマウスの作製に入る。

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10件)

1. Yao, I., Takagi, H., Ageta, H., Kahyo, T., Sato, S., Hatanaka, K., Fukuda, Y., Chiba, T., Morone, N., Yuasa, S., Inokuchi, K., **Ohtsuka, T.**, MacGregor, G.R., Tanaka, K., Setou, M. 2007. SCRAPER-Dependent ubiquitination of active zone protein RIM1 regulates synaptic vesicle release. **Cell** 130: 943-957.

2. Kwan, E., Xie, L., Sheu, L., **Ohtsuka, T.**, and

Gaisano, H.Y. 2007. Interaction between Munc13-1 and RIM is Critical for Glucagon-like Peptide-1-mediated Rescue of Exocytotic Defects in Munc13-1-deficient pancreatic β -cells. **Diabetes** 56: 2579-2588.

3. Grigoriev, I., Splinter, D., Keijzer, N., Wulf, P., Demmers, J., **Ohtsuka, T.**, Modesti, M., Maly, I., Grosveld, F., Hoogenraad, C. C., and Akhmanova, A. 2007. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. **Dev. Cell** 13: 305-314.

4. Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J-P., Boudier, T., **Ohtsuka, T.**, Fejtov, A., Kao, H-T., Greengard, P., Gundelfinger, E.D., Triller, A., and Marty, S. 2007. Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix **J. Neurosci.** 27: 6868-6877.

5. Higa Onaga, S., Tokoro, T., Inoue, E., Kitajima, I., and **Ohtsuka, T.** 2007. The Active Zone Protein CAST Directly Associates with Ligand-of-Numb Protein X. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 354: 686-692.

6. Tokoro, T., Higa Onaga, S., Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Kitajima, I., and **Ohtsuka, T.** 2007. Localization of the Active Zone Proteins CAST, ELKS, and Piccolo at Neuromuscular Junctions. **NeuroReport** 18: 313-316.

7. Lansbergen, G., Grigoriev, I., Mimori-Kiyosue, Y., **Ohtsuka, T.**, Higa, S., Kitajima, I., Demmers, J., Galjart, N., Houtsmuller, A.B., Grosveld, F. and Akhmanova, A. 2006. CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5 β . **Dev. Cell** 11:21-32.

8. Inoue, E., Mochida, S., Takagi, H., Higa, S., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Yao, I., Takeuchi, K., Kitajima, I., Setou, M., **Ohtsuka, T.***, and Takai, Y. 2006. SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release. **Neuron** 50: 261-275. (*corresponding author)

9. Inoue, E., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Kitajima, I., **Ohtsuka, T.***, and Takai, Y. 2006. ELKS, a protein structurally related to the active zone protein CAST, regulates Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. **Genes Cells** 11: 659-672 (*corresponding

author)

10. Deguchi-Tawarada, M., Inoue, E., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Kitajima, I., **Ohtsuka, T.***, and Takai, Y. 2006. Active Zone Protein CAST is a Component of Conventional and Ribbon Synapses in Mouse Retina.

J. Comp. Neurol. 495: 480-496. (*corresponding author)

〔学会発表〕 (計 6 件)

1. 大塚稔久 公開シンポジウム
神経終末アクティブゾーンの分子解剖学：特定領域研究 公開シンポジウム「生体膜トランスポートゾーンの分子構築と生理機能」 東京 2008年3月22日

2. 大塚稔久 学会
神経シナプスアティブ・ゾーンの生化学：第30回日本分子生物学会年会 横浜 2007年12月11日-15日

3. 所 崇 吉田淑子 比嘉進 北島勲 大塚稔久, 学会
SAD キナーゼのマウス神経筋接合部における局在:Neuro2007 横浜 2007年9月10日-12日

4. Susumu Higa, 所 崇, 北島勲, 大塚稔久, SAD キナーゼによるアクチブゾーン特異蛋白質 Bassoon および Piccolo のリン酸化 Neuro2007 横浜 2007年9月10日-12日

5. 所崇 比嘉進 北島勲 大塚稔久 学会
マウス神経筋接合部におけるアクティブゾーン蛋白質 CAST/ELKS の局在：分子生物学の未来 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006年12月6日-8日

6. 比嘉進 井上英二 所崇 北島勲 大塚稔久 学会
The active zone protein CAST directly associates with the Ligand of Numb X：分子生物学の未来 日本分子生物学会 2006 フォーラム 名古屋 2006年12月6日-8日

(1) 研究代表者

大塚稔久 (OHTSUKA TOSHIHISA)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授
研究者番号：40401806

6. 研究組織