

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07046

研究課題名(和文) 神経プレシナプス電位依存性カルシウムチャネルの局在制御分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating the localization of presynaptic voltage-gated calcium channels

研究代表者

多留 偉功 (Taru, Hidenori)

北海道大学・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経系の情報処理機能の基盤となるシナプス伝達において、電位依存性カルシウムチャネルCav2がトリガー分子としてシナプス部位に正確に局在することが必須である。本研究では、神経シナプスへのCav2局在の分子機構について、線虫をモデル動物とした遺伝学的解析によって関連分子を探索し、新たに神経ペプチド成熟や糖鎖修飾調節に関わる酵素のはたらき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

神経シナプスへのCav2局在の分子機構は、その重要性にも関わらず不明な点が多い。本研究は遺伝学的な探索を基に、これまで予見されていなかったCav2局在に関わる分子・分子経路を新たに明らかにした点で、学術的に意義深い。Cav2やその局在制御分子の異常は、自閉症など様々な精神・神経疾患に深く関与しており、本研究の成果は、疾患の分子基盤解明と治療法開発につながるという観点から社会的な意義もある。

研究成果の概要(英文)：The nervous system processes information through communication between neurons at synapses. The precise localization of the voltage-gated calcium channel Cav2 as a trigger molecule at presynaptic sites is essential for synaptic transmission. In this study, using the nematode *C. elegans* as a model organism, we explored molecules involved in the localization of Cav2 through genetic analysis. We newly revealed that the functions of enzymes involved in neuropeptide maturation and glycosylation regulation are important for Cav2 localization at presynaptic sites.

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 線虫 順遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系の情報処理機能に重要な細胞間のシナプス伝達は、プレシナプスの中心部位アクティブゾーン (AZ) から開口放出される神経伝達物質によって行われる。電位依存性カルシウムチャネルである Cav2 は放出の引き金をひくトリガー分子として重要で、その先天的変異は各種の遺伝性神経疾患の原因となる。シナプス伝達には Cav2 のプレシナプス AZ への正確な局在が不可欠である。AZ では種を越えて保存されたアダプター分子の一群が密に相互作用して集積し、基盤構造を形成している。代表者らは、線虫 *C. elegans* を実験モデルとした AZ の分子機能解析を進めるなかで、アダプター分子 RIMB-1 と UNC-10 の冗長的な作用が Cav2 の AZ 局在制御に中心的な役割をはたすことを示してきた。これらの相同分子は、マウスやハエでも Cav2 の機能・局在制御に重要であり、ヒトでは自閉症など精神障害への関与が報告されている。この RIMB-1・UNC-10 による制御を含めた Cav2 局在分子機構の全体像の理解が研究開始当初の大きな課題であった。順遺伝学的探索は関連分子を明らかにする上で有用な解析手法であるが、RIMB-1・UNC-10 にも見られるような分子間の機能補償が問題となる。これらの冗長性をふまえた修飾変異体の順遺伝学的探索を試みることによる分子同定の進展が期待された。

2. 研究の目的

本研究は、神経シナプス伝達に重要な電位依存性カルシウムチャネル Cav2 のプレシナプス AZ への局在について、分子機構の理解を目指した。Cav2 の局在に重要な RIMB-1・UNC-10 による制御機構を検証し、それをふまえた順遺伝学的探索に基づく新たな関連分子群の同定と作用機序の解明を目的とした。

3. 研究の方法

Cav2 局在分子機構の理解に向けて、遺伝学的解析に長けた無脊椎動物である線虫 *C. elegans* を実験モデルとして用いた。線虫 Cav2/UNC-2 やシナプス小胞結合分子 RAB-3 などの各種プレシナプス分子について、蛍光タンパク質を融合させて頭部感覚神経 AWC に発現させたトランスジェニック系統あるいはシングルコピーゲノム挿入系統を用い、生体内蛍光顕微鏡観察によって単一の神経細胞種における局在を解析した。順遺伝学的探索では、各トランスジェニック・変異体系統にエチルメタンスルホン酸を用いて突然変異を導入し、表現型を示す個体を探索・単離した。一塩基多型遺伝子座マッピングと全ゲノム配列解析を組み合わせることで、表現型に関与する責任遺伝子を同定した。さらに関連遺伝子について機能欠損変異体における分子局在を解析し Cav2 局在への関与を検討した。

4. 研究成果

(1) Cav2 局在関連分子の順遺伝学的修飾変異体探索に基づく同定

Cav2 局在に関わるアダプター分子 RIMB-1・UNC-10 の変異系統に対して修飾変異体を探索することで、機能補償をふまえた Cav2 局在関連分子の同定を試みた。具体的に運動異常と AWC 神経 Cav2 局在異常の表現型を指標とし、RIMB-1 変異体もしくは UNC-10 変異体における表現型を増強させるエンハンサー変異のスクリーニング、さらには RIMB-1;UNC-10 二重変異体における表現型を抑制するサプレッサー変異体のスクリーニングを実施した。複数の候補変異体を単離し、それらの表現型解析および責任遺伝子の同定を行った。同定した変異体のうち、単

独で Cav2 局在異常を呈するプロプロテインコンバーターゼおよび糖鎖修飾関連酵素の変異にまず着目し、さらなる解析を行った。

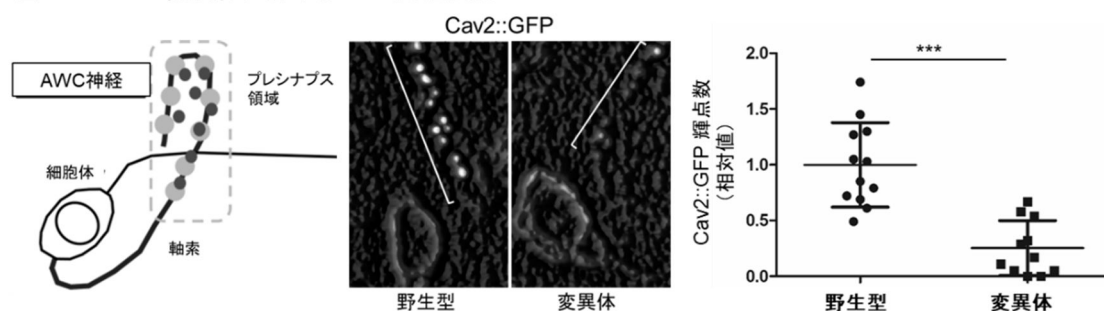
(2) Cav2 局在におけるプロプロテインコンバーターゼの機能

プロプロテインコンバーターゼタイプ2 (PC2) は神経ペプチド前駆体を活性型神経ペプチドに変換する酵素であり、神経ペプチドの成熟に必要である。野生型では AWC 神経に発現した GFP 融合 Cav2 (Cav2::GFP) はシナプス部位に輝点状に局在する。それに対して PC2 遺伝子機能欠損変異体では、Cav2::GFP の明瞭な輝点は減少し、周辺部位に拡散して観察された。シナプス小胞を標識する RAB-3 の局在には大きな異常は認められなかった。続いて神経ペプチド成熟過程に関わる他の酵素分子について Cav2 局在への関与を検討した。Cav2::GFP は、カルボキシペプチダーゼ E 遺伝子欠損変異体では野生型と同様の局在を示したが、7B2 シャペロン遺伝子欠損変異体で PC2 欠損変異体に類似した局在異常が見られた。プレシナプス AZ への Cav2 局在において、これらの酵素に関わる限定的な神経ペプチド成熟過程が重要であることが新たに示唆された。

(3) Cav2 局在における糖鎖修飾関連酵素の関わり

GDP マンノースピロホスホリラーゼ B (GMPPB) は、GTP とマンノース-1-リン酸から GDP マンノースの形成を触媒し、糖鎖生合成に重要な役割を果たす酵素である。GMPPB の完全機能欠失変異体は生育不全を示して幼虫期に成長を停止するのに対し、同定した GMPPB 変異体は重度の運動能の低下を呈するものの生育は可能であり、機能低下変異体であると考えられた。AWC 神経のシナプス部位における Cav2::GFP 局在を解析したところ、GMPPB 機能低下変異体では Cav2::GFP の輝点の減弱・減少が観察された (図1)。また神経突起の形態は野生型と同様である一方で、AZ アダプター分子 UNC-10 の局在にも異常が認められた。興味深いことに、GMPPB 機能低下変異体の表現型は加齢に伴って増強される傾向が観察された。Cav2 および関連分子の糖鎖修飾における GMPPB の寄与と、Cav2 局在および AZ 構築における役割について引き続き解析を進めている。

図1 GMPPB変異体におけるCav2局在異常



(4) 本研究の意義

本研究では Cav2 の神経プレシナプス AZ への局在制御機構について、線虫をモデルとした探索研究を基に、これまで示してきたアダプター分子 RIMB-1・UNC-10 に加えて新たな関連分子の存在を明らかにした。特に、神経ペプチド成熟や糖鎖修飾調節に関わる酵素群の重要性を示し、Cav2 局在機構の新たな側面を明らかにした。Cav2 は家族性片麻痺性片頭痛や反復発作性運動失調症などの神経疾患の原因分子として知られ、局在制御分子は自閉症などの種々の精神障害や遺伝性の運動失調症に関与する。本研究の知見は、これらの疾患の分子機構の解明と新規治療法の開発にも寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川健斗、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫の神経ペプチド分泌を介した寿命制御におけるシナプス伝達の役割
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中川健斗、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫の神経ペプチド分泌を介した寿命制御に対するSYD-2/Liprin- の補完的作用
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第151回例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中川 健斗、石川 智規、鈴木 利治、多留 偉功
2. 発表標題 線虫の神経ペプチド分泌を介した寿命制御に対するSYD-2/Liprin- の補完的作用
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮沢 桃子、中島 愛弓、鈴木 利治、多留 偉功
2. 発表標題 神経軸索形成制御因子DLKとモーター分子Kinesin-1の相互作用機序
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 榎引勇人、鈴木利治、多留偉功
2. 発表標題 線虫を用いたプレシナプス電位依存性Ca ²⁺ チャネル集積制御メカニズムの解析
3. 学会等名 第58回日本生化学会北海道支部例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関