

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09769

研究課題名（和文）シナプスタンパク質CAST/ELKSの欠損による網膜変性の作用機序解析

研究課題名（英文）Analysis of the retina degeneration mechanism in the absence of synaptic protein CAST/ELKS

研究代表者

萩原 明（Hagiwara, Akari）

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：70402849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：外界からの光情報を感知する網膜において、視細胞リボンシナプスの異所性局在は視覚機能の低下に相関することが示唆されている。本研究ではプレシナプスタンパク質CASTやELKSを網膜または水平細胞特異的に欠損するマウスを作製し解析した。その結果、リボンシナプスの異所性局在などの変性は見られず、視細胞や水平細胞に発現しているCASTは変性の直接的な要因ではないことが示唆された。一方、視細胞のシナプスでCASTを急性的に欠損させると、視細胞が変性し、CASTは視細胞やシナプスの維持に重要な役割を担っていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜機能が障害される網膜変性症では、視細胞が変性し夜盲や視野狭窄といった症状がみられ、視細胞の脱落が進行すると失明にいたることもある。若年性の網膜変性症から多岐にわたる原因遺伝子が同定されてきたが、孤発性の多くは特定の遺伝子異常がないため発症や進行の作用機序がわからず、効果的な治療法も確立されていない。本研究は、視覚機能の低下に相関する視細胞リボンシナプスの異所性局在において、プレシナプスタンパク質の作用機序を明らかにすることで、網膜変性疾患の原因解明や治療法開発に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：In the retina, which senses optical information from the external environment, the ectopic localization of photoreceptor ribbon synapses has been found to be associated with decreased visual function. In this study, we generated mice lacking the presynaptic proteins CAST and ELKS specifically in retinal or horizontal cells. In contrast to the previous analysis using global knockout of CAST, the immunohistochemical analysis revealed no signs of degeneration such as ectopic localization of ribbon synapses, indicating that CAST expression in photoreceptor and horizontal cells alone does not directly cause the retinal degeneration. However, when CAST was depleted after the synapse formation, it led to the degeneration of photoreceptor cells. Therefore, CAST plays an important role in maintaining the integrity of photoreceptor cells and their synapses.

研究分野：シナプス伝達を基盤とした脳神経科学

キーワード：網膜変性疾患 リボンシナプス プレシナプス 視細胞 水平細胞 異所性局在

1. 研究開始当初の背景

外の世界を「見る」器官である眼球の中でも網膜は、光情報を脳へと伝達する重要な神経器官である。薄さ数百 μm の組織の中では、光を感知し神経情報へと変換する視細胞を含め5種類の神経細胞によって層構造が構成されている(Fig. 1A)。この網膜が障害される網膜変性症では光センサーである視細胞が変性し、暗いところで見えにくい夜盲や、視界が狭くなる視野狭窄といった症状がみられ、視細胞の脱落が進行すると失明にいたることもある。これまでに若年性の網膜変性症から多岐にわたる原因遺伝子が同定されているが、孤発性の多くは特定の遺伝子異常がないため発症や進行の作用機序がわからず、効果的な治療法も確立されていない。

本研究の申請者らは、シナプスタンパク質 CAST や ELKS を欠損させたマウスにおいて、視覚機能の低下と視細胞リボンシナプスの異所性局在が相関すること (Fig. 1B)、また、後天的に ELKS を欠損させると、視細胞の脱落が起きることを報告している (tom Dieck et al., 2012, *J Neurosci*, Hagiwara et al., 2018, *J Cell Biol.*)。しかしながら、CAST/ELKS が関与するシナプス伝達と視細胞変性による異所性局在の因果関係や、視細胞脱落のメカニズムは未だよくわかっていない。

2. 研究の目的

神経回路は、神経細胞がシナプスと呼ばれる接合部において情報を伝達することを基盤とし、プレシナプスでは開口放出部(アクティブゾーン, AZ)に伝達物質を内包するシナプス小胞が集積する。視細胞のリボンシナプスは、伝達物質の放出を制御する重要な役割を果たしており、夜盲症の原因遺伝子欠損マウスや老齢マウスでは、リボンシナプスが視細胞層(ONL)に異所性に局在し、視機能低下と関連する形態変化であると考えられている。このような異所性局在は、CAST/ELKS 欠損マウスをはじめ、他の AZ タンパク質である Bassoon の欠損マウスでも報告されており (2007, *Eur J Neurosci*)、また AZ タンパク質の RIM は網膜変性疾患の原因遺伝子の一つとして同定されている。すなわち、シナプス伝達が、リボンシナプスの異所性局在や視機能低下に関連していることが示唆されているが、関連タンパク質との因果関係は未だよくわかっていない。本研究では、CAST/ELKS の欠損マウスにおいて、リボンシナプスの異所性局在が形成される要因や増加する過程を解析し、視細胞が変性する作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

<網膜特異的な CAST/ELKS 欠損マウスを用いた、異所性局在と網膜変性の解析>

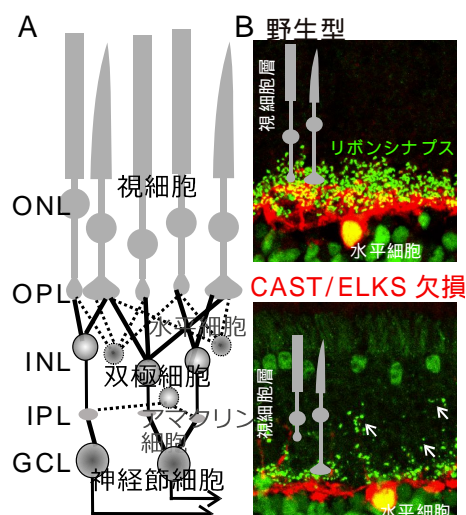


Fig. 1 リボンシナプスの異所性局在
A. 網膜の層構造と神経細胞種。点線は抑制性細胞
B. 視細胞リボンシナプスは野生型では OPL に集積しているが、CAST/ELKS 欠損では ONL に異所性に局在 (矢印) していた

外界の光情報は視細胞で神経シグナルに変換され、双極細胞への興奮性シナプス伝達は、水平細胞による側方抑制を受けることでコントラストの調節などが行われている。申請者らは、先の解析において電子顕微鏡・3次元立体再構築を行い、CAST/ELKS 欠損マウスでは水平細胞の分岐が顕著に低下していることを見出した (Fig. 2)。本研究では、水平細胞と異所性局在の因果関係を明らかにするため、水平細胞特異的な CAST/ ELKS 欠損マウスを作成し、形態学的な解析を行う。

水平細胞特異的な欠損マウスは、CAST flox マウス、ELKS flox マウス、または CAST/ELKS double flox マウスを、水平細胞特異的 Cre マウス (Cx57-Cre; 2013, *PLoS ONE*, Cx57-CreERT2; 2017, *Scientific Reports*) との交配により作成する。これらのマウスから得られた網膜を免疫組織化学染色によってリボンシナプスを標識し、網膜層構造や異所性局在の形成を検証する。

<網膜神経細胞の動態観察>

網膜神経細胞の神経伝達を観察するため、視細胞や双極細胞、また水平細胞特異的な標識法を確立する。まず、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いて蛍光タンパク質を発現させ、免疫組織化学染色法により各種神経細胞への特異性を評価する。その後、蛍光カルシウムセンサーや、蛍光膜電位センサー (ArcLight, Ave-mNeonGreen, VARNAM など) の発現系に応用させる。CAST や ELKS の欠損マウスにおいて、リボンシナプスの異所性局在と、光刺激依存的な神経伝達様式を比較し、視細胞変性におけるシナプス伝達の作用機序を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 網膜特異的な CAST/ELKS 欠損マウスの解析

本研究では、CAST を組織または細胞特異的に欠損させため、新潟大学の阿部教授らとの共同研究により作製された CAST flox マウスを用いることとした。このマウスでは、CAST 遺伝子のエクソン 14 をはさむ形で loxP 配列が組み込まれており、Cre 組み換え酵素によってフレームシフトが起こり、不完全な CAST が翻訳されてくる。また、この CAST flox マウスを、既存の ELKS flox マウスと交配させ CAST/ELKS dflox マウスを作製し、Cre マウスの系統と交配させることで、CAST/ELKS の条件付き遺伝子欠損マウスを作製した。

まず、CAST/ELKS dflox マウスを Crx-Cre マウスと交配し、網膜視細胞の CAST/ELKS 欠損マウスで、リボンシナプスの異所性局在を解析することとした。ウェスタンブロッティング法で CAST や ELKS の発現が消失していることを確認したが、リボンシナプスの異所性局在は見られず、視細胞に発現している CAST の欠損は異所性シナプスの直接的な要因で

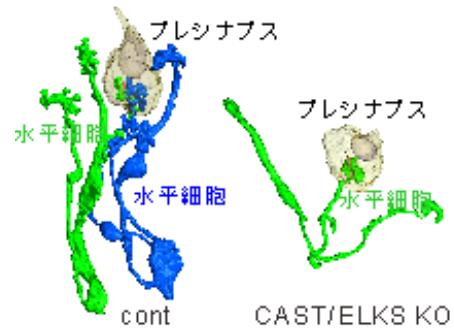
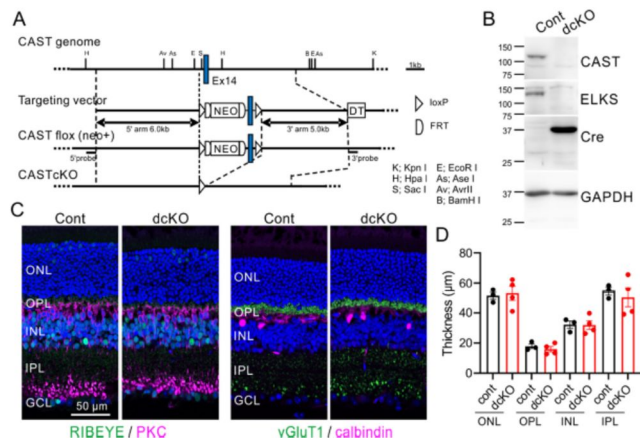
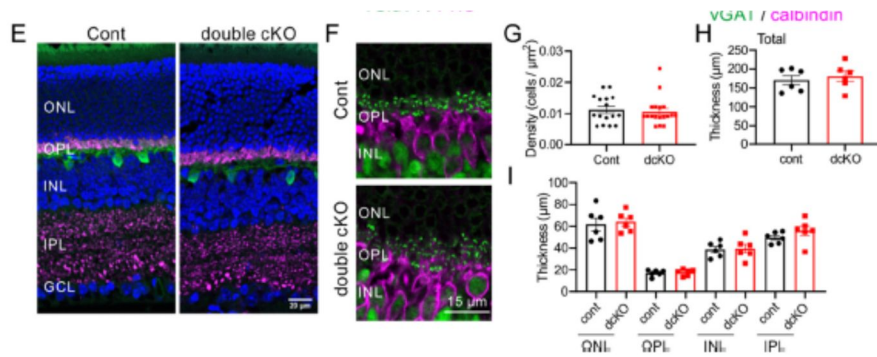


Fig.2 網膜水平細胞の形態変化
CAST/ELKS 欠損マウスでは水平細胞の分岐が激減し、1本の側枝によって調節されるプレシナプスが増えていた。(J. Cell Biology. 2018)



はないことが示唆された。

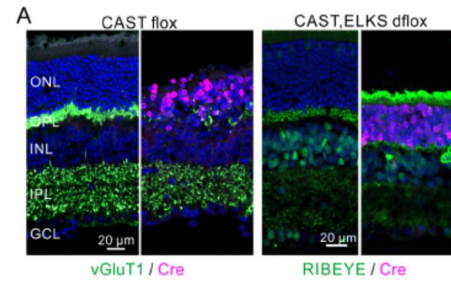


次に、各種 Flox マウスに水平細胞特異的に Cre を発現する Cx57-Cre マウスを交配し、水平細胞における CAST/ELKS の欠損と異所性

局在を検証することとした。その結果、CAST/ELKS の両遺伝子を水平細胞から欠損させても、層構造の異常やリボンシナプスの異所性局在は見られず、水平細胞の CAST/ELKS も、従来の CAST 欠損マウスで見られた網膜変性の直接的な要因ではないことがわかった。

(2) 成熟した網膜における CAST 欠損と網膜変性に関する解析

一方、CAST flox マウスにアデノ随伴ウイルスベクターで Cre を発現させ、成熟した視細胞のシナプスにおいて CAST を急性的に欠損させると、視細胞の変性が起きることが分かった。これらの結果から、形成されたシナプスにおいて CAST は、視細胞からのシナプス伝達やその維持に重要な役割を担っていることが分かった。



<引用文献>

Hagiwara A*, Mizutani A, Kawamura S, Abe M, Hida Y, Sakimura K, Ohtsuka T*, Critical Role of the Presynaptic Protein CAST in Maintaining the Photoreceptor Ribbon Synapse Triad. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023; 24(8), 7251

(3) 網膜神経細胞の動態観察

視細胞からの神経伝達に關与する、視細胞、双極細胞、水平細胞をそれぞれ標識するため、AAV ベクターのセロタイプやプロモーターに関する検討を行った。

- 視細胞特異的な標識には、AAV セロタイプの一つである AAV5 が有用であることを確認した。
- 双極細胞特異的な標識には、mGluR6 のプロモーター領域を用いた AAV ベクターを開発したが、発現効率が弱く今後さらなる改良が必要である。
- 水平細胞特異的な標識には、Cre 依存的な FLEX 型 AAV を作成し、Cx57-Cre マウスに導入することで効率的に標識できる。また、AAV セロタイプのうち、PHPeB 型は水平細胞に導入できるため、AAV ベクターを眼球内に直接注入せず、静脈投与することで、網膜を傷つけない非侵襲的な標識が可能である。

今後、これらの標識法を用いて神経細胞の活動を解析するシステムを構築し、異所性のリボンシナプスの神経伝達様式の詳細な解析から、視機能低下のメカニズムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hamada Shun, Nagase Masashi, Yoshizawa Tomohiko, Hagiwara Akari, Isomura Yoshikazu, Watabe Ayako M., Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 4
2. 論文標題 An engineered channelrhodopsin optimized for axon terminal activation and circuit mapping	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01977-7	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 -

1. 著者名 Hagiwara Akari, Mizutani Ayako, Kawamura Saki, Abe Manabu, Hida Yamato, Sakimura Kenji, Ohtsuka Toshihisa	4. 巻 24
2. 論文標題 Critical Role of the Presynaptic Protein CAST in Maintaining the Photoreceptor Ribbon Synapse Triad	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7251 ~ 7251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24087251	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川村早紀、飛田耶馬人、大塚稔久、萩原明
2. 発表標題 網膜・視細胞シナプスの形成における水平細胞LKB1の作用機序の解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 水谷紋子、飛田耶馬人、大塚稔久、萩原明
2. 発表標題 Retinal morphology analysis of mice deficient in synaptic scaffolding protein CAST
3. 学会等名 日本顕微鏡学会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 水谷紋子、萩原明
2. 発表標題 シナプス足場タンパク質CAST欠損マウスの網膜形態解析
3. 学会等名 パラレル脳センシング技術研究部門 第2回 公開シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村早紀、萩原明
2. 発表標題 水平細胞及び視細胞シナプス形成における水平細胞LKB1の作用機序の解析
3. 学会等名 パラレル脳センシング技術研究部門 第2回 公開シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村 早紀、大塚 稔久、飛田 耶馬人、萩原 明
2. 発表標題 AAV標識システムを用いた LKB1の網膜水平細胞リモデリングに関する形態学的検討
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川村早紀、萩原明
2. 発表標題 Liver Kinase B1を欠損させた網膜水平細胞の形態解析
3. 学会等名 東京理科大・パラレル脳センシング・公開シンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 萩原 明	4. 発行年 2021年
2. 出版社 東京理科大学	5. 総ページ数 5
3. 書名 科学フォーラム「心・意識を科学する～神経科学」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京理科大学創域理工学部・生命生物科学科HP News and Topics https://www.bs.noda.tus.ac.jp/news_more.html 萩原研究室HP News https://www.rs.tus.ac.jp/ahagiwar/news.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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------