

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16104

研究課題名（和文）興奮性および抑制性シナプスにおける細胞骨格アセンブリの差異の機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the Mechanisms Underlying the Differences in Cytoskeletal Assembly at Excitatory and Inhibitory Synapses

研究代表者

一ノ瀬 聡太郎 (Ichinose, Sotaro)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80775768

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：興奮性シナプスと抑制性シナプスの両方に局在するテニューリン2が相互作用する細胞骨格について研究を行ったところ、テニューリン2は微小管と相互作用する可能性が示唆された一方で、アクチンと相互作用する強いデータを得ることができなかった。抑制性シナプスにはアクチンと微小管のどちらも存在するのに対し、興奮性シナプスは、スパインと呼ばれる、アクチンを主要な細胞骨格とする構造上に作られている。そこで、予定を変更し、テニューリン2による抑制性シナプス形成の詳細なメカニズムを追究したところ、End binding protein (EB)を介した微小管との相互作用が、受容体の集積を促進させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランス（E-Iバランス）は自閉症などの発達障害や統合失調症をはじめとする精神疾患との関連が指摘されており、近年盛んに研究されている。今回、われわれは新たなタンパク質相互作用による抑制性シナプス形成の詳細なメカニズムを解明した。今後、このタンパク質相互作用を変化させることのできる新薬を開発することで、シナプス形成を人為的にコントロールできるため、発達障害や精神疾患の治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Research on the cytoskeleton that interacts with Teneurin-2, which localizes to both excitatory and inhibitory synapses, suggested that Teneurin-2 may interact with microtubules, although we did not obtain strong data indicating interaction with actin. While both actin and microtubules are present at inhibitory synapses, excitatory synapses are formed on structures called spines, which primarily consist of actin cytoskeleton. Therefore, we shifted our focus to investigate the detailed mechanisms of inhibitory synapse formation mediated by Teneurin-2. It was found that the interaction with microtubules via End binding protein (EB) promotes receptor accumulation.

研究分野：神経解剖学・神経細胞生物学

キーワード：抑制性シナプス シナプトジェネシス 微小管 シナプスオーガナイザー キネシン 神経細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の中樞神経系シナプスは興奮性シナプスと抑制性シナプスに大別される。興奮性シナプスは主にグルタミン酸が神経伝達物質として機能し、シナプス前膜から放出されるとシナプス後細胞を脱分極させるのに対し、抑制性シナプスではグリシンや GABA 等が神経伝達物質として機能し、シナプス後細胞を過分極させる。興奮性シナプスと抑制性シナプスのバランス (E-I バランス) は自閉症などの発達障害や統合失調症をはじめとする精神疾患との関連が指摘されており、近年盛んに研究されている。

興奮性シナプスと抑制性シナプスには上記以外の違いも多数知られている。例えば、興奮性シナプスのシナプス後膜には様々なタンパク質が密集し、いわゆるシナプス後肥厚部 (postsynaptic density: PSD) が観察されるのに対し、抑制性シナプスのシナプス後膜におけるタンパク質の集積は顕著でない。さらに興奮性シナプスの大部分は樹状突起のスパイン上に形成されるのに対し、抑制性シナプスの大半は樹状突起のシャフトに形成される。これらの興奮性・抑制性シナプスにおけるシナプス後膜の構造的特徴は、シナプス後膜付近の細胞骨格と密接に関連していると考えられる。

テニューリンはシナプス前膜に局在する膜タンパク質であり、視覚系の発生やシナプス結合に関与することが知られている。テニューリンの N 末端側の細胞内領域には SH3 結合配列やカルシウムイオンが結合する EF-hand ドメイン等が存在し、C 末端側の細胞外領域には EGF ドメインや プロペラドメイン、YD ドメインなどが存在する。このうち プロペラドメインに 7 アミノ酸が挿入されるアイソフォームが存在するが、テニューリン 2 の 7 アミノ酸挿入型アイソフォーム (以下、テニューリン 2(+)) と 7 アミノ酸非挿入型アイソフォーム (以下、テニューリン 2(-)) の解析から、テニューリン 2(+) が抑制性シナプスを誘導し、テニューリン 2(-) が興奮性シナプスを誘導することが最近明らかとなった。このように同一分子の異なるアイソフォームが、それぞれ興奮性シナプスと抑制性シナプスを誘導することは、シナプス形成の分子メカニズムの観点から極めて興味深い知見である。

2. 研究の目的

本研究では興奮性および抑制性シナプス形成をそれぞれ誘導する細胞接着分子がどのようにしてこの細胞骨格の差異を生み出しているかを対比的に追究する。具体的には興奮性および抑制性シナプス形成に関与することが最近明らかにされたテニューリン 2 に着目し、テニューリン 2 のシナプス後膜における細胞骨格アセンブリに果たす役割について解明する。テニューリン 2 には 2 つのアイソフォームが存在し、それぞれ興奮性または抑制性のシナプスを誘導するという興味深い知見が得られていることから、両者のアイソフォームの興奮性および抑制性シナプスにおける役割の違いを対比的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抑制性シナプスにおけるテニューリン 2(+) 結合分子の解明

興奮性シナプス形成において、シナプス前膜に局在するテニューリン 2(-) がシナプス後膜のラトロフィリンおよびシナプス前膜に局在する FLRT と相互作用することが知られている。一方、テニューリン 2(+) は抑制性シナプスを誘導することが知られているものの、相互作用する分子は不明である。そこでテニューリン 2(+) と特異的に結合する分子を網羅的に同定し、抑制性シナプス形成における役割について明らかにする。

(2) 興奮性、抑制性シナプスのシナプス後膜での細胞骨格構築とテニューリン 2 との関係

テニューリン 2 の 2 つのアイソフォームがどのような分子メカニズムに基づき、最終的に興奮性および抑制性シナプスに特徴的なシナプス後部の細胞骨格構築を誘導するかについては不明である。申請者はテニューリン 2 の細胞内ドメインにおける EB 結合モチーフに着目し、テニューリン 2 によるシナプス後膜での細胞骨格制御機構の解明を目指す。

4. 研究成果

(1) 抑制性シナプスにおけるテニューリン 2(+) 結合分子の解明

テニューリン 2 の結合分子を免疫沈降と質量分析により検出するための実験系の構築を試みた。最初に、細胞内ドメイン 1 か所、細胞外ドメイン 3 か所をエピトープとしてそれぞれペプチド抗体を作成した。その結果、いずれも免疫細胞染色法においてシナプスマーカーと共局在したことや、ノックダウンベクターを導入した神経細胞での抗体反応が低下したことから、抗体そのものは完成した。しかしながら、免疫沈降を行ってもテニューリン 2 が得られなかった。そこで、次に内在性のテニューリン 2 の C 末端に 3×HA タグを挿入したノックインマウスを遺伝子編集にて作成した。このマウスの脳組織抽出液と抗 HA タグ抗体を用いて免疫沈降を試みたが、やはり十分な量のテニューリン 2 が得られなかった。今後、テニューリン 2(+) 結合分子の解明のためには、ほかの手段を検討する必要がある。

(2) 興奮性、抑制性シナプスのシナプス後膜での細胞骨格構築とテニューリン 2 との関係

細胞骨格関連分子との相互作用の検出

テニューリン 2 の細胞内ドメインを用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、チューブリンを検出できた一方で、アクチンや関連分子であるスペクトリンを検出できなかった。興奮性シナプスは主にスパイン上に形成されるが、スパインはアクチンを主体とした細胞骨格により形成されている一方で微小管はほとんど進入することがない。このことを踏まえると、テニューリン 2 のシナプス形成への寄与は興奮性シナプスと抑制性シナプスで同レベルというわけではなく、微小管がシナプス直下に存在している抑制性シナプスの方が大きいと考え、この後の研究を「興奮性シナプスと抑制性シナプスの対比」から、「抑制性シナプス形成の詳細なメカニズム解明」へ変更した。

抑制性シナプスにおける微小管ダイナミクスの解明

抑制性シナプスの直下において微小管が存在することは、過去にほかの研究グループの電子顕微鏡観察の結果等から示唆されていたが、ダイナミクスに関して十分な情報がなかった。そこで、微小管のプラス端に結合する End binding protein (EB) を用いてライブイメージングを行ったところ、微小管のプラス端は抑制性シナプスの位置で、伸長が停止することがわかった。このことは、抑制性シナプスに伸長を停止させるメカニズムが存在することを示唆している (図 1)。

テニューリン 2 が局在する抑制性シナプスの分類

抑制性シナプスに伸長を停止させるメカニズムとして、膜タンパク質と微小管の相互作用を検討することにした。最初に抑制性シナプスを主要な細胞骨格分子であるアクチンとチューブリン (チューブリンは微小管の構成分子) の量により分類したところ、A) アクチンもチューブリンも少ないシナプス、B) アクチンが多いシナプス、C) チューブリンが多いシナプス、の 3 つに分類できることがわかった。このうち、テニューリン 2 は、C) チューブリンの多いシナプスに局在する傾向があることも観察された。

EB を介したテニューリン 2 と微小管の相互作用

テニューリン 2 には EB との結合モチーフである Sx P と LxxPTP (x は I/L/V のいずれか、x は任意のアミノ酸) を持つことから、EB と相互作用する可能性が高いことが示唆されていた。しかしながら、全長のテニューリン 2 や細胞内ドメイン全体の配列を細胞に発現させても共同存在しなかった。そこで、2 つの EB 結合モチーフをもつ短い領域だけに絞った配列を用いて細胞に発現させたところ、微小管上での共同存在を観察できた。また、GST プルダウンアッセイでは全長テニューリン 2 と GST-EB の結合も検出できた。これらの実験結果は EB を介してテニューリン 2 と微小管が相互作用することを示唆している。また、細胞内では全長テニューリン 2 が EB と共同存在しなかったことから、細胞内では結合解離のための厳密なシグナル制御が存在することも示唆された。このシグナル制御の解明に関しては、今後の継続研究課題の 1 つである。

テニューリン 2 のシナプス形成への寄与

テニューリン 2 のシナプス形成への寄与を確認するために、海馬初代培養細胞でテニューリン 2 をノックダウンしたところ、抑制性シナプス形成の低下が観察された。また、テニューリン 2 陽性のシナプスでは、テニューリン 2 陰性のシナプスに比べて、受容体の表面発現量が低下していることも、受容体のライブイメージングにより観察された。これらのことは、テニューリン 2 が受容体の表面発現を何らかの方法で促進することでシナプス形成を促進することを示唆している。

テニューリン 2 - EB - 微小管相互作用のシナプス形成への寄与

では、 のテニューリン 2 の機能は、微小管との相互作用により変化するだろうか。これを追究するために、ドミナントネガティブ体のテニューリン 2 を海馬初代培養細胞に発現させた。EB はドミナントネガティブ体に優先的に結合してしまうため、内在性のテニューリン 2 は EB との相互作用による機能を発揮することができない。すると、 で観察された抑制性シナプスにおける微小管の伸長の停止や、 で観察されていたシナプスへの受容体の局在が観察される割合が下がっていた。これらの実験結果から、テニューリン 2 - EB - 微小管相互作用が抑制性シナプス形成を促進していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ichinose Sotaro, Susuki Yoshihiro, Hosoi Nobutake, Kaneko Ryosuke, Ebihara Mizuho, Hirai Hirokazu, Iwasaki Hirohide	4. 巻 12
2. 論文標題 Interaction between Teneurin-2 and microtubules via EB proteins provides a platform for GABAA receptor exocytosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.83276	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 Jiang Xuguang, Ogawa Tadayuki, Yonezawa Kento, Shimizu Nobutaka, Ichinose Sotaro, Uchihashi Takayuki, Nagaike Wataru, Moriya Toshio, Adachi Naruhiko, Kawasaki Masato, Dohmae Naoshi, Senda Toshiya, Hirokawa Nobutaka	4. 巻 24
2. 論文標題 The two step cargo recognition mechanism of heterotrimeric kinesin	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202356864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tajika Yuki, Ishii Nobukazu, Morimura Yoshihiro, Fukuda Kyosuke, Shikada Mitsuaki, Murakami Tohru, Ichinose Sotaro, Yoshimoto Yuhei, Iwasaki Hirohide	4. 巻 98
2. 論文標題 Correlative microscopy and block-face imaging (CoMBI): a 3D imaging method with wide applicability in the field of biological science	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anatomical Science International	6. 最初と最後の頁 353 ~ 359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-023-00705-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwasaki Hirohide, Ichinose Sotaro, Tajika Yuki, Murakami Tohru	4. 巻 16
2. 論文標題 Recent technological advances in correlative light and electron microscopy for the comprehensive analysis of neural circuits	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2022.1061078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihara Shogo, Jiang Xuguang, Morikawa Momo, Ogawa Tadayuki, Ichinose Sotaro, Yabe Hirooki, Kakita Akiyoshi, Toyoshima Manabu, Kunii Yasuto, Yoshikawa Takeo, Tanaka Yosuke, Hirokawa Nobutaka	4. 巻 35
2. 論文標題 Betaine ameliorates schizophrenic traits by functionally compensating for KIF3-based CRMP2 transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108971 ~ 108971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108971	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 Ichinose Sotaro, Susuki Yoshihiro, Kaneko Ryosuke, Iwasaki Hirohide	4. 巻 -
2. 論文標題 Teneurin-2 at the Synapse Construction Site is a Signpost for Cargo Unloading from Motor Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.09.13.507723	査読の有無 無
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14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 一ノ瀬聡太郎, 岩崎広英
2. 発表標題 接着分子と細胞骨格分子による抑制性シナプス形成機序の解析
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 海老原瑞穂, 一ノ瀬聡太郎, 鈴木美博, 岩崎広英
2. 発表標題 接着分子テニューリン2の海馬における分子局在
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 X. Jiang, T. Ogawa, K. Yonezawa, N. Shimizu, S. Ichinose, T. Uchihashi, W. Nagaike, T. Moriya, N. Adachi, M. Kawasaki, N. Dohmae, T. Senda, N. Hirokawa
2. 発表標題 The two-step cargo recognition and binding mechanism of heterotrimeric kinesin
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 Interaction Between Teneurin-2 and Microtubules via EB Proteins Provides a Platform for GABAARceptor Exocytosis
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Yoshihiro Susuki, Ryosuke Kaneko, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 The interaction of Teneurin-2 with microtubules through end-binding proteins facilitates the accumulation of proteins at inhibitory postsynapses
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Yoshihiro Susuki, Ryosuke Kaneko, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 The interaction of Teneurin-2 with microtubules through end-binding proteins facilitates the accumulation of proteins at inhibitory postsynapses
3. 学会等名 The 49th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 一ノ瀬 聡太郎, 岩崎 広英
2. 発表標題 Teneurin-2 at synapse construction site is a signpost for protein accumulation
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 海老原 瑞穂, 一ノ瀬 聡太郎, 鈴木 美博, 岩崎 広英
2. 発表標題 抑制性シナプスの多様性解析
3. 学会等名 第110回 日本解剖学会 関東支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一ノ瀬 聡太郎, 岩崎 広英
2. 発表標題 シナプス構築部位におけるテニューリン2はタンパク質集積のための標しである
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一ノ瀬 聡太郎, 岩崎 広英
2. 発表標題 抑制性シナプスの多様性解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 The roles of teneruin-2 in neuron
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 Teneurin-2 at Synapse construction site is a signpost for protein accumulation
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 The roles of teneruin-2 in neuron
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sotaro Ichinose, Hirohide Iwasaki
2. 発表標題 Role of microtubules on inhibitory synapse formation
3. 学会等名 日本神経科学大会（国際学会）
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
研究協力者	岩崎 広英 (Iwasaki Hirohide) (30342752)	群馬大学・大学院医学系研究科機能形態学・教授 (12301)	
研究協力者	平井 宏和 (Hirai Hirokazu) (70291086)	群馬大学・大学院医学系研究科脳神経再生医学・教授 (12301)	
研究協力者	金子 涼輔 (Ryosuke Kaneko) (40390695)	大阪大学・大学院生命機能研究科心生物学・准教授 (14401)	
研究協力者	細井 延武 (Hosoi Nobutake) (90543570)	群馬大学・大学院医学系研究科脳神経再生医学・准教授 (12301)	

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