

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790057

研究課題名（和文） 神経プレシナプス形成のアダプター分子 SYD-2 による制御機構

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of presynaptic assembly by an adaptor protein SYD-2

研究代表者

多留 偉功 (TARU HIDENORI)

北海道大学・創成研究機構・特任助教

研究者番号：30533731

研究成果の概要（和文）：

シナプスと呼ばれる神経細胞間接着構造は、神経系が担う高度な情報処理機能の基本素子である。シナプス形成の分子機構の解明は脳科学の重要課題であり、記憶や学習などの脳高次機能や老化・疾患に伴う神経系異常を理解する基盤となる。本研究は、無脊椎動物である線虫を実験モデルとして、シナプス前構造の形成に重要な制御分子であるSYD-2の機能にはコイルドコイル構造を介した多量体の形成が重要であることを示した。さらにSYD-2と協調的にプレシナプス形成を担う因子の遺伝学的探索によって、プレシナプス形成に関わる修飾変異体群を同定した。

研究成果の概要（英文）：

Neuronal synapses are critical cell adhesion structures, which are specialized for intercellular signal transduction between neurons. To understand the molecular mechanisms of synaptic formation is one of the important challenges in neuroscience field and provides better understanding of higher brain function such as learning and memory and neurodegenerative diseases. An adapter protein SYD-2 is a key molecule for presynaptic assembly in nematode *C. elegans*. In this study, we showed that oligomerization is a critical step for the activation of SYD-2, and identified multiple modifier mutants, which may work together with SYD-2 for presynaptic assembly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：神経生物学

1. 研究開始当初の背景

脳は神経細胞が形作る高度な情報処理回路網であり、その基盤はシナプスと呼ばれる細胞間接着構造を介した一方向性の情報伝達である。プレシナプス部位（送信側）から

シナプス小胞に含まれた神経伝達物質が放出され、ポストシナプス部位（受信側）に存在するレセプターによって受容される。プレシナプスの“アクティブゾーン”と呼ばれる中心部位には、様々なアダプタータンパク

質と細胞骨格系分子とが網目状に密集し、伝達物質放出の場所やタイミングを制御している。プレシナプス形成過程では、まずそれらのアダプタータンパク質群がシナプス予定部位に局在・集積し、その基盤の上にシナプス小胞と伝達物質放出機構を持つ成熟シナプス構造が形成される、という概念が提唱されている。

そのアダプタータンパク質群の集積に中心的役割を果たすのが、線虫 *C. elegans* においてシナプス形成異常変異体から同定された SYD-2 である。SYD-2 はアダプター分子 Liprin-alpha ファミリーの一員で、N 末端側にはファミリー特有のコイルドコイル構造に富む領域、C 末端側には 3 つの SAM ドメイン、といった複数のタンパク質間相互作用ドメインを持つ分子量 13 万のタンパク質である。*syd-2* 機能欠失変異体では、プレシナプス構造が全く形成されない、あるいは形態・機能ともに異常なプレシナプスが不規則的に生じる、などの表現系が神経細胞種に応じて観察される。これまでの SYD-2 機能獲得変異体を利用した遺伝学的相互作用解析によって、神経細胞内の初期位置情報に基づいて SYD-2 が PDZ/C2/RhoGAP ドメインタンパク質 SYD-1 を介してプレシナプス予定部位に局在すること、そこで活性化した SYD-2 がアダプター分子 ELKS-1 などの下流分子を集積させて成熟プレシナプス構造の基盤となるアクティブゾーンの原型を誘導することなど、SYD-2 が関わるプレシナプス形成初期過程の分子経路の一部が明らかになっていた。

2. 研究の目的

本研究は、SYD-2 が関わるプレシナプス形成初期過程の分子機構に関して、SYD-2 の活性化の分子機構と下流標的分子および関連分子の解明という二つの重要課題に取り組んだ。

(1) プレシナプス形成における SYD-2 活性化の分子機構の解明：

プレシナプス形成過程において、SYD-2 分子状態の何らかの変化(“活性化”)によって、その下流のカスケード的な分子群の集積が誘導されることが示唆されているが、その活性化の実体は不明であった。哺乳類の SYD-2 ホモログである Liprin-alpha はオリゴマー形成能を持つことが報告されており、代表者らの予備的な解析とから、SYD-2 活性化にオリゴマー形成が関与する可能性が示唆された。そこで、本研究ではその仮説を検証し、SYD-2 活性化の分子機構を明らかにすることを第一の目的とした。

(2) プレシナプス形成における SYD-2 の下流標的分子の同定：

SYD-2 はアダプタータンパク質であり、下流分子と複合体を形成して機能すると考え

られる。現在までの遺伝学的相互作用の解析から、SYD-2 の結合分子の一つである ELKS-1 が下流標的因子として機能することが示唆されている。しかし、*elks-1* の機能欠失変異体それ自身は *syd-2* 変異体のような顕著なシナプス形成異常の表現系は示さないことから、SYD-2 の下流では未知の分子が冗長的に機能していることが予想されていた。そこで本研究は、プレシナプス形成における SYD-2 下流標的因子および関連因子を探索し同定することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ①SYD-2 タンパク質のオリゴマー特性の生化学的解析：

線虫 SYD-2 のオリゴマー形成能と、それに関与する領域を検討するため、線虫 SYD-2 各ドメインのリコンビナントタンパク質を調製し、生化学的なタンパク質間相互作用解析(プルダウン結合解析、化学的架橋法、ネイティブポリアクリルアミド電気泳動法)による解析を行った。オリゴマーの性状に関して、同定した領域の形成するオリゴマーの正常について、精製タンパク質の MALS (multi-angle laser light scattering) を用いた複合体分子量解析によって検討した。さらにヒト Liprin-alpha の相同な領域がオリゴマー形成能を有するかについて、精製タンパク質を用いた生化学的解析によって同様に検討した。さらにオリゴマー形成領域を欠損した Liprin-alpha タンパク質を神経系・非神経系培養細胞に発現することによって、オリゴマー形成領域の必要性とその役割を解析した。

②SYD-2 タンパク質のドメイン特性とシナプス誘導活性との相関：

線虫 *C. elegans* 実験モデル動物として、プレシナプス形成における SYD-2 のオリゴマー形成の必要性を、トランスジェニック法を用いて検討した。すなわち、プレシナプス形成不全を示す *syd-2* 機能欠失変異体において、オリゴマー形成領域を欠損した SYD-2 改変タンパク質を神経細胞特異的に発現させ、プレシナプス形成異常からの回復能を評価した。HSN とよばれる産卵行動を制御する神経細胞に着目し、産卵行動の異常とプレシナプスマーカーの局在異常を表現型の指標とした。生体内においてプレシナプス構造の形態を可視化するためのマーカーとして、シナプス小胞結合分子シナプトブレブリンの GFP 融合タンパク質を利用した。一方、SYD-2 のオリゴマー形成が SYD-2 の活性化に十分であるか否かを検証するため、プレシナプス形成不全を示す *syd-2* 機能欠失変異体および *syd-1* 機能欠失変異体において、SYD-2 オリゴマー形成領域を既知のオリゴマー形成モチーフ(GCN ペプチド)と置換したキメラ SYD-2 タンパク質

を発現させ、同様にプレシナプス誘導活性を評価した。

(2) プレシナプス形成における SYD-2 の下流標的分子および関連分子の遺伝学的探索：

SYD-2 の下流分子は、SYD-2 によってプレシナプス予定部位に集積されてシナプス形成に関与すると考えられる。そのような SYD-2 によって正に制御される下流分子に関して、その機能欠失変異体が SYD-2 機能過剰を抑制するサプレッサーとして同定されることが期待された。代表者らが樹立した、SYD-2 の機能獲得変異と SYD-1 の過剰発現を共に有する変異トランスジェニック系統においては、シナプス形成経路が過剰に活性化されて行動異常を呈する。そこでその系統において EMS を変異原として突然変異を誘発し、行動異常が改善された個体、すなわち SYD-2・SYD-1 経路の過剰な活性化が抑制された変異体の探索を行った。一方、SYD-2 下流因子の機能亢進あるいは下流抑制因子の機能欠損変異は、SYD-2 の機能獲得変異と同様の効果を示すと期待された。そこで、SYD-1 の過剰発現トランスジェニック系統において EMS 変異誘導を行い、SYD-2 機能獲得・SYD-1 過剰発現系統と同様の行動異常を示すエンハンサーの探索を行った。さらにこれらのスクリーニングの過程において、*syd-2* や *syd-1* の機能欠損変異体と類似のシナプス形成異常を示す変異体を単離した。これらの遺伝学的スクリーニングで得られた変異体について、プレシナプス形成に関する表現型を、主に産卵行動の異常、HSN 神経細胞におけるプレシナプスマーカーの局在、および SYD-1、SYD-2 タンパク質の局在の生体内観察によって、評価した。責任遺伝子座のマッピングを、既知の蛍光遺伝子挿入マーカーおよびハイワンシステム (CB4856) を用いた SNP マッピング法によって行った。

4. 研究成果

(1) ① SYD-2/Liprin-alpha の LH1 ドメインのダイマー形成：

線虫 SYD-2 の各領域の精製タンパク質についてプルダウンアッセイによるホモ相互作用の検討を行った結果、N 末端領域に存在する LH1 ドメイン (約 100 アミノ酸残基からなる進化的に保存されたコイルドコイル領域) がホモ結合活性を有することが明らかとなった。架橋剤を用いた解析と MALS による解析によってそのオリゴマーの性状を検討した結果、LH1 ドメインが濃度依存的にダイマーを形成することが明らかになった。さらにヒトにおける SYD-2 相同分子である Liprin-alpha について精製タンパク質を用いた解析を行った結果、ヒト LH1 同士のホモ結合が *in vitro* において観察されたことから、LH1 ドメインのダイマー形成能が進化的

に保存されていることが示唆された。

ヒト Liprin-alpha の N 末端断片を COS 細胞に一過的に発現しネイティブ電気泳動法によって複合体の形成を解析した結果、Liprin-alpha が多様な高分子複合体を形成して存在することが明らかとなった。一方、LH1 ドメインを欠失した Liprin-alpha では、その高分子複合体の形成は見られなかった。さらに神経系培養細胞である CAD 細胞においては、ヒト Liprin-alpha が神経突起の膜付近に点状に局在するのに対し、LH1 ドメインを欠失した Liprin-alpha は細胞質に広く分布した。

以上の結果から、SYD-2/Liprin-alpha の LH1 ドメインは、正常な細胞内局在と複合体の形成に重要であることが明らかとなった。② SYD-2/Liprin-alpha の LH1 ドメインの生理機能：

プレシナプス形成異常を示す *syd-2* 機能欠失変異体において、SYD-2 タンパク質を神経細胞特異的に発現するトランスジェニック動物ではプレシナプス形成の回復が観察された。一方、LH1 ドメインを欠失した SYD-2 タンパク質を同様に発現した動物においては、産卵行動異常およびプレシナプスマーカーの局在異常の両指標ともに *syd-2* 機能欠失変異体からの回復を示さなかった。次に蛍光タンパク質を用いて SYD-2 の神経細胞内局在を解析した結果、SYD-2 がプレシナプス部位へと局在したのに対し、LH1 欠失 SYD-2 ではその局在が損なわれていた。以上の結果から、LH1 ドメインがプレシナプス部位への局在とプレシナプス形成における機能に必須であることが明らかとなった。

代表者らは、SYD-2 の機能獲得変異体では LH1 ドメインにおける 1 アミノ酸の置換によって恒常的にプレシナプス形成の誘導能がオンになっており、また LH1 ドメインのみを神経細胞に過剰発現することでも同様の誘導がおこることを、これまでに見出しており、プレシナプス形成誘導能とオリゴマー形成との相関が強く示唆される。

さらに線虫 SYD-2 における LH1 ドメインのオリゴマー形成能の意義に関して、既知多量体形成ドメインとのキメラ分子を発現するトランスジェニック動物を作製し解析した結果、*syd-1* 機能欠損変異体における活性の回復が観察されたことから、ダイマー形成が LH1 ドメインの機能の一つとして重要であることが示された。

(2) 線虫 *C. elegans* における SYD-2 経路の修飾変異体の同定：

産卵行動異常の表現型、および HSN 神経細胞におけるプレシナプス形成異常の表現型を指標とし、SYD-2 機能獲得・SYD-1 過剰発現系統における 5 万ハプロイドゲノムスケールのスクリーニングを行った結果、表現型

の抑制が観察されるサブレッサー変異 *nq16*、*nq19* を単離した。また、*syd-1* 過剰発現トランスジェニック系統における 4 万ハプロイドゲノムスケールのスクリーニングを実施し、異常表現型の獲得が観察されるエンハンサー変異 *nq13* を単離した。これらはプレシナプス形成において SYD-1・SYD-2 の下流で正または負にはたらく分子の変異体である可能性が高い。マッピングの結果、*nq13* の責任遺伝子が 3 番染色体に存在することが明らかになった。

さらに新規プレシナプス形成機能遺伝子の候補として、これらのスクリーニングの過程において *syd-1*、*-2* 機能欠損変異体と類似したプレシナプス形成異常を呈する変異 *nq9-12* を同定した。これらの変異体は産卵行動の異常を示し、HSN 神経細胞においてプレシナプスマーカーの局在異常を示した。さらに、HSN 神経細胞における SYD-1、SYD-2 両タンパク質のプレシナプス部位への正常な集積が損なわれている可能性が示された。バッククロスの後、CB4856 系統の SNP を利用したマッピングを実施し、これらの変異が共に 5 番染色体の右鎖に位置することが明らかになった。

進化的に高度に保存された SYD-2/Liprin-alpha タンパク質は、プレシナプス形成・シナプス機能制御において重要な役割を持ち、その活性制御の解明は多くの研究者の注目を集めている課題である。これまで哺乳類において Liprin-alpha がオリゴマーを形成することは報告されていたが、特に LH1 とよばれるコイルドコイル領域を介したダイマー形成がプレシナプス形成に重要であることを示し、SYD-2/Liprin-alpha のオリゴマー形成の生理的意義を見出したのは本研究が初めてである。哺乳類 Liprin-alpha は、アルツハイマー病原因分子 APP の結合分子である X11-like の複合体とも相互作用して機能することが示されており、本研究の知見は神経変性疾患の発症分子機構を理解するうえでも有用であると考えられる。

プレシナプス形成における SYD-2 上流の分子機構に関しては、これまで複数のグループによる研究報告がなされている。一方、SYD-2 下流の分子標的に関してはタンパク質間相互作用の側面から候補となる分子群が指摘されているものの、一部を除き機能的な実証はなされていなかった。本研究は、遺伝学的相互作用の側面から SYD-2 下流機能因子・関連因子を探索した結果、プレシナプス形成において生理的に意味を持つ候補変異体の単離に成功している。今後の分子実体の解明と解析によって、プレシナプス形成分子機構の全貌の解明に貢献することが期待される。

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 1 件)

- ① Maho Kondo, Maki Shiono, Genzo Itoh, Norio Takei, Takahide Matsushima, Masahiro Maeda, Hidenori Taru, Saori Hata, Tohru Yamamoto, Yuhki Saito and Toshiharu Suzuki, Increased amyloidogenic processing of transgenic human APP in X11-like deficient mouse brain, *Molecular Neurodegeneration* 5, 35 (2010) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 多留偉功, Regulatory Interaction of SYD-1 in the specification of presynaptic sites in *C. elegans*, 第 33 回 日本分子生物学会、平成 22 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド
- ② 多留偉功, Regulatory mechanism of SYD-2/Liprin-alpha activity in synapse formation, 第 32 回日本分子生物学会、平成 21 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜
- ③ 多留偉功, 神経プレシナプス構造の部位決定機構の解析—線虫 SYD-1 とアダプター分子群の相互作用、The 1st Conference on Intracellular Logistics、平成 21 年 11 月 10 日、沖縄 ANA インターコンチネンタル万座
- ④ 多留偉功, 神経細胞のプレシナプス構造の再構成をめざして、細胞を創る研究会 2.0、平成 21 年 10 月 2 日、東京大学

[その他]

ホームページ等：

<http://www.cris.hokudai.ac.jp/taru/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多留 偉功 (TARU HIDENORI)
北海道大学・創成研究機構・特任助教
研究者番号：30533731

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし