

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430068

研究課題名(和文) シナプス前終末形成における脆弱X精神遅滞タンパク質による局所翻訳機構の解明

研究課題名(英文) Role of local protein synthesis regulated by Fragile X Mental Retardation Protein during presynapse formation

研究代表者

佐々木 幸生 (SASAKI, Yukio)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：10295511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞のシナプス前終末形成時における局所翻訳の役割を検討する目的で、まず、シナプス前終末形成時に軸索に集積するタンパク質を同定した。そのうちの多くはRNA結合タンパク質である脆弱X精神遅滞タンパク質(FMRP)のターゲットであった。次に、これらのタンパク質のうちの一つ、Munc-18のシナプス前終末への局在を検討したところ、FMRPと相互作用するタンパク質であるArgonaute2(Ago2)の挙動と対応していた。従って、FMRP-Ago2複合体がMunc-18をシナプス前終末形成時に局所翻訳により制御する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To investigate to a role of local protein synthesis during presynapse differentiation in neurons, we identified proteins that accumulate in axons during presynapse differentiation. Most of the identified proteins are derived from the target mRNA for FMRP (Fragile X Mental Retardation Proteins), the RNA-binding protein. Among these proteins, we examined Munc-18 accumulation during the presynapse differentiation. The accumulation time-course of Munc-18 corresponded to that of Argonaute2 (Ago2), which interacts with FMRP. Thus, it is possible that FMRP-Ago2 complex regulate Munc-18 expression via local protein synthesis during presynapse differentiation.

研究分野：神経生物学

キーワード：横浜市 神経生物学 脆弱X症候群 シナプス プロテオミクス

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路形成において、軸索が適切な部位までガイドされ、そこでシナプスが形成される。我々は軸索ガイダンス過程における RNA 結合タンパク質による局所翻訳の重要性を示してきたが、次のステップであるシナプス前終末形成時の軸索での局所翻訳の役割は不明である。RNA 結合タンパク質である脆弱 X 精神薄弱タンパク質 (Fragile X Mental Retardation Protein: FMRP) は翻訳制御に関与し、それをコードする遺伝子 (*Fmr1*) の変異マウスにはシナプス前終末の形態と機能に異常がみられる。しかし、それが FMRP による局所翻訳の異常によるものであるかは不明であった。

## (1) FMRP とシナプスの構造・機能

脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome: FXS) は遺伝性の精神発達障害としては最も頻度の高い疾患であり (頻度: 1/1,500-2,500)、X 染色体上の *Fmr1* 遺伝子の変異によってもたらされる。その遺伝子産物である FMRP は mRNA と結合し翻訳を調節する。FXS の動物モデルである *Fmr1* ノックアウト (KO) マウスではシナプス後においてはスパインの形態が未成熟で長期抑圧などの神経可塑性に異常があり、これらの表現型と FXS の病態との関連が示唆されている。従って、主に樹状突起スパインにおける FMRP を介した局所翻訳調節の欠如が FXS の原因であると考えられてきた。それに対し、最近シナプス前終末の表現型として、活性帯 (active zone) の幅が *Fmr1*-KO で狭くなること、及び paired-pulse facilitation 等の短期可塑性の減弱が報告された。これらの報告は、FMRP は軸索上のシナプス前終末の適切な構造と機能の制御に関与することを示唆する。しかし、シナプス前終末形成過程自体に FMRP が関与し、それが局所翻訳調節を介するかどうかは全く不明である。

## (2) 神経軸索における局所翻訳調節と FMRP

神経細胞の軸索先端部は、遠く離れた細胞体からの指令なしに、局在した mRNA から細胞外環境の変化に応じて即座に翻訳を開始できる。軸索・成長円錐における特定の mRNA の局在と局所翻訳機構は、RNA 結合タンパク質を介して行われており、軸索先端部が自ら翻訳のタイミングを決定し環境変化に即座に対応するための必要不可欠な基盤を与えている。我々はここ数年、軸索及び成長円錐における RNA 結合タンパク質を介した局所翻訳が軸索ガイダンスにおいて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。FMRP に関しても我々は研究を進め、軸索ガイダンス分子であるセマフォリン 3A に対する成長円錐の応答が *Fmr1*-KO で減弱することを見いだした。同応答が局所翻訳依存的であることから、軸索ガイダンス時に FMRP を介した局所翻訳が重要であることが示唆された。従って、軸索ガイダンスの次のステップであるシナプス前終末形成にも FMRP

が関与することが十分に考えられる。2011 年、Darnell らはマウスの脳から FMRP に結合する mRNA を単離し、次世代シーケンサーでゲノムワイドに配列を決定した。その結果、842 種類の mRNA が同定され、そのうち、87 種類がシナプス前終末に局在するタンパク質をコードすることが明らかとなった。これらのタンパク質が実際にシナプス前終末形成時に局所翻訳されるかが注目される。また、近年、FMRP がマイクロ RNA (miRNA) 結合タンパク質である Argonaute2 (Ago2) と相互作用し、miRNA を介して翻訳を制御することが示唆されている。従って、Ago2 も FMRP を介した局所翻訳に関与する可能性がある。しかし、FMRP や Ago2 がシナプス前終末形成時に集積し、これらのタンパク質の翻訳を制御するかどうかは全く不明であった。

## 2. 研究の目的

当研究の目的は FMRP がシナプス前終末形成過程に翻訳調節を介して関与するか解明することである。そのために、(1) シナプス前終末形成時に軸索に集積するタンパク質を同定すること (2) シナプス前終末形成におけるこれらのタンパク質の集積と FMRP や Ago2 等の翻訳制御タンパク質との関連を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

## (1) ニューロンボール法を用いたプレシナプス形成

我々が独自に開発したニューロンボール法は高純度、高収率で軸索を回収できる培養法である (Sasaki et al, J Neurosci, 2010)。今回は、この方法を用いてプレシナプス形成を行った。胎生期 16 日目のマウス大脳皮質より細胞を単離し、ニューロンボールを作成する。この培養を 11 日行った後、シナプス前終末を誘導するタンパク質である Leucine-Rich Repeat Transmembrane Neuronal Protein-2 (LRRTM2) をコートしたプロテイン A ビーズを加える。一定時間後に固定後、抗シナプトフィジン (SYP) 及び vGlut1 抗体を用いて蛍光抗体法で染色し、シナプス前終末形成の時間的経過を観察した。さらに、プレシナプス活性帯タンパク質である抗 Munc18 (BD Biosciences)、Ago2 (Dr. Hobman (カナダ・アルバータ大学)より御供与) 抗体を用いて染色した。これらのサンプルは超解像度顕微鏡 (Nikon N-SIM システム) を用いて画像取得した。プレシナプス形成はビーズ上の軸索の蛍光強度をその周りの蛍光強度と比較し、数値化した。

## (2) プレシナプスタンパク質のプロテオミクス

ニューロンボールを 2,000 個調製し、LRRTM2 ビーズとコントロールの Fc ビーズ投与群に分け 16 時間培養する。それぞれ細胞体と軸索画分に分け、タンパク質を抽出し、トリブ

シン処理を行う。iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) 法を用いて、四通りの異なった分子量のタグを付加し、ナノ液体クロマトグラフを行った後、MALDI-TOF/TOF 法で質量分析を行う。この方法を用いて刺激/無刺激を異なったタグで区別し、タンパク質の量比を正確に算出することができる。

#### 4. 研究成果

プレシナプス形成に伴い集積するタンパク質を解析するために、純度のよいプレシナプスのサンプルを得る必要がある。そのために、LRRTM2 ビーズを用いた人工的シナプス形成法とニューロンボール培養法を組み合わせた。まず、試験的にこの方法を試したところ、LRRTM2 をビーズに付加し、ニューロンボール法で作成した大脳皮質神経細胞軸索上に添加することによりシナプス前終末様の構造を形成させることに成功した。このシナプス前終末様構造は興奮性シナプスマーカーである vGlut1 が集積しており、電位依存的に FM1-43 を取り込むことから、シナプス前終末の基本的な機能的を有することが示唆された。シナプス前終末形成に伴い軸索に集積するタンパク質を解析する目的で、ニューロンボールを用いてプロテオミクスを行った。約 2,000 個のニューロンボールを LRRTM2 刺激の有無の二群に分け、軸索と細胞体を分取し、iTRAQ 法を用いて、四通りの異なった分子量のタグを付加し、ナノ液体クロマトグラフを行った後、MALDI-TOF/TOF 法で質量分析を行った。この方法を用いて刺激/無刺激を異なったタグで区別し、タンパク質の量比を正確に算出することができた。その結果、LRRTM2 刺激により軸索で増加するタンパク質として Munc-18 等が同定された(表 1)。Munc-18 も含め、これらのうちの多くが FMRP のターゲット mRNA から合成されることから、FMRP がこれらのタンパク質の局所翻訳制御を行っている可能性がある。

順位	タンパク質名	iTRAQ比 (LRRTM2-Fc/Fc)		FMRP結合 mRNAのランク	GO term
		軸索	細胞体		
1	Axonal protein-001	1.324	N.D.	419	synaptic vesicle endocytosis
2	Axonal protein-002	1.269	0.917	-	nervous system development
3	Axonal protein-003	1.237	N.D.	13	phosphatase activity
4	Tubulin $\beta$ -2B	1.233	0.997	-	microtubule
5	ADP/ATP translocase 1	1.222	0.819	-	ATP-ADP antiporter activity
6	Munc-18	1.216	0.954	128	neurotransmitter secretion
7	Axonal protein-004	1.209	0.894	216	endocytosis
8	G-protein Gs $\alpha$	1.200	0.903	330	GTPase activity
9	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase subunit $\alpha$ -1	1.196	N.D.	496	ion transport
10	Axonal protein-005	1.195	1.000	-	response to calcium ion

表 1. LRRTM2 刺激で軸索に蓄積するタンパク質

LRRTM2 刺激後、iTRAQ 法にて軸索に局在するタンパク質の発現比 (LRRTM2-Fc/Fc:iTRAQ 比) を求めた。iTRAQ 比が高いほど LRRTM2 による発現の増加の程度が高いことを表している。FMRP 結合 mRNA のランクは次世代シーケンサーで読まれた配列数より求められており、配列数は FMRP に結合している数にほぼ比例する。FMRP に結合する mRNA は全 mRNA 中 4% 以下 (842 種) だが、高 iTRAQ 比のもの上位 10 位内のうち 6 つが FMRP に結合する mRNA にコードされている。"Axonal protein-00X" と記載されているものは今回はタンパク質名を未公表にさせていただきます。

次に、上記で同定したタンパク質のうち、Munc-18 についてシナプス前終末への集積を検討した。シナプス前終末の形成の程度を定量するために、LRRTM2 をビーズに付加し、大脳皮質を用いたニューロンボール培養法で軸索にシナプス前終末を形成させた。その時にビーズ直下の軸索に集積するタンパク質の染色の蛍光強度を超解像度顕微鏡で測定することにより、定量的に計測する方法を開発した。この方法を用いてシナプスに集積するタンパク質を定量したところ、シナプス小胞マーカーである SYP は刺激後 30 分から有意に集積を始め、4 時間後には既に 1 日後の集積の 70% の集積が見られた (図 1)。これに比べ、Munc-18 は 4 時間後の集積は半分以下であり、SYP の集積が Munc-18 の集積より早く起こることが明らかとなった。Munc-18 はシナプス小胞を放出するために必要な活性帯タンパク質であり、FMRP が Munc-18 の mRNA に結合することから、活性帯の形成に伴い局所翻訳調節を行う可能性がある。

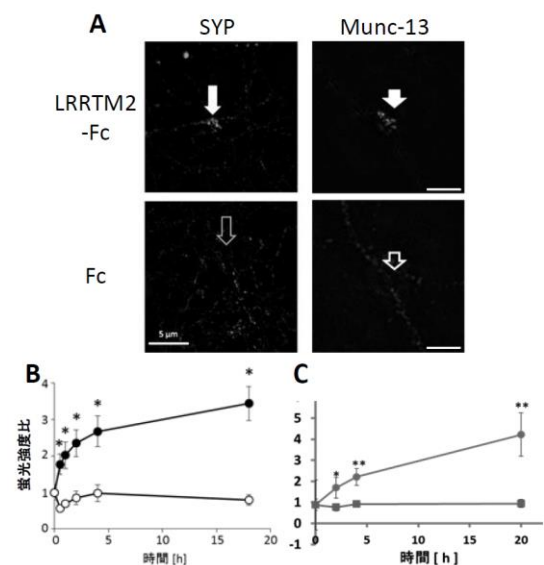
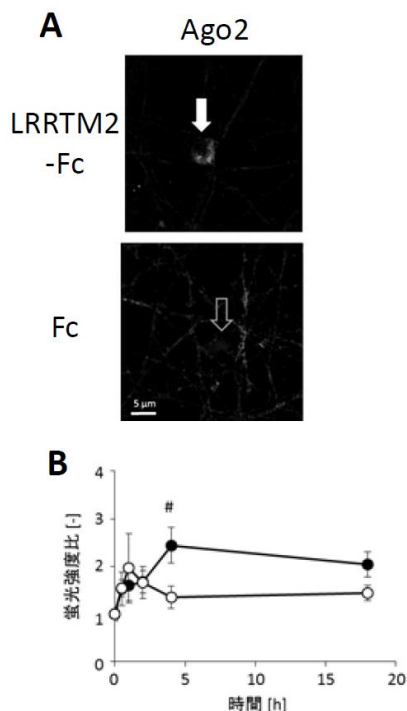


図 1. Munc-18 はプレシナプス形成に伴い集積する  
A. LRRTM2 ビーズに集積したシナプスフィジン (SYP) と Munc-18。LRRTM2-Fc ビーズとコントロールの Fc ビーズでニューロンボールを刺激し、1 日後固定し、それぞれの抗体を用いて免疫染色を行った。それぞれ、LRRTM2-Fc 刺激の時のみ集積が見られる。B. ビーズ刺激後の SYP の集積の時間的経過。LRRTM2 刺激 (●) により Fc (○) に比べて刺激後 30 分から有意に集積が観察された。N = 20, \*p < 0.005。C. ビーズ刺激後の Munc-18 の集積の時間的経過。LRRTM2 刺激 (●) により Fc (■) に比べて刺激後 2 時間から有意に集積が観察された。N = 20, \*p < 0.01, \*\*p < 0.05。

Munc18 の集積が FMRP を介した局所翻訳調節に関与するかを解析するには、FMRP の LRRTM2 ビーズ直下の軸索への集積を解析する必要がある。しかし、FMRP の集積は抗 FMRP 抗体のビーズ上のバックグラウンドが高く、解析が困難であった。そこで、FMRP と相互作用し、翻訳を調節する Ago2 の集積を解析した。その結果、LRRTM2 刺激により Ago2 の集積は形成後四時間でピークに達することが明らかになった (図 2)。シナプス小胞タンパ

ク質 SYP と活性帯タンパク質 Munc-18 の集積と比較すると、シナプス小胞の集積よりも活性帯の形成時の局所翻訳調節に Ago2 が関与する可能性がある。Munc-18 の mRNA は FMRP が結合すること、さらに、我々が同定した軸索に局在する miRNA (文献 1) の結合領域が存在することから、FMRP と Ago2 が共同し、miRNA を介して局所翻訳を調節する可能性がある。



**図 2. Ago2 はプレシナプ形成に伴い集積する**  
**A.** LRRTM2 ビーズに集積した Ago2。LRRTM2-Fc ビーズとコントロールの Fc ビーズでニューロンボールを刺激し、固定後、抗 Ago2 抗体を用いて免疫染色を行った。LRRTM2-Fc 刺激の時のみ集積が見られる。**B.** ビーズ刺激後の Ago2 の集積の時間的経過。LRRTM2 刺激 (●) により Fc (○) に比べて刺激後 4 時間をピークに集積が観察された。N = 20, \*p < 0.05。

本研究により明らかになったことは

(1) プロテオミクスにより、シナプス前終末形成時に軸索において発現が上昇するタンパク質を同定し、その多くが FMRP のターゲットであった。

(2) そのうちの一つである Munc-18 はシナプス前終末時に集積した。その集積の時間的経過から、FMRP と相互作用する Ago2 による局所翻訳の制御が示唆された。

Ago2 がシナプス前終末に局在する報告は現在まで知られておらず、miRNA と Ago2 による制御機構が注目される。我々は軸索に局在する miRNA を報告しており (文献 1)、これらの miRNA と Ago2、FMRP の関連を明らかにしていく予定である。

また、本研究では軸索のシナプス前終末の FMRP の局在を検討することが困難であったので、成長円錐内の FMRP の局在変化を検討した。その過程で、FMRP の局在がユビキチン

化で制御されることを示唆する知見を得た (未発表データ)。この知見を元に本年度から開始する基盤 C の研究を始めることが決定した。今後、FMRP のユビキチン化による翻訳制御がシナプス前終末形成に関与するかどうかも検討する予定である。

#### 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 2 件)

1. Sasaki Y<sup>\*,#</sup>, Gross C<sup>#</sup>, Xing L, Goshima Y, Bassell GJ\*. Identification of axon-enriched MicroRNAs localized to growth cones of cortical neurons. *Dev Neurobiol* 74: 397-406 (2014). (\*co-corresponding authors, #equal contribution) 査読有  
DOI: 10.1002/dneu.22113.
2. Yamashita N, Usui H, Nakamura F, Chen S, Sasaki Y, Hida T, Suto F, Taniguchi M, Takei K, Goshima Y. Plexin-A4-dependent retrograde semaphorin 3A signalling regulates the dendritic localization of GluA2-containing AMPA receptors. *Nat Commun* 5: 3424 (2014). 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms4424.

[学会発表] (計 7 件)

1. 高橋 徹、杉浦 侑、佐々木 幸生 シナプス前終末形成過程におけるマイクロ RNA 結合タンパク質 Argonaute2 の局在変化 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートピアアイランド(兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 3 日
2. 高島 将、五嶋 良郎、佐々木 幸生 セマフォリン 3A は脆弱 X 精神遅滞タンパク質のユビキチン化を誘導する 第 130 回日本薬理学会関東部会、星薬科大学 (東京都品川区)、2014 年 7 月 5 日
3. 高島 将、五嶋 良郎、佐々木 幸生 セマフォリン 3A による脆弱 X 精神遅滞タンパク質のユビキチン化 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場・神戸国際展示場(兵庫県神戸市)、2013 年 12 月 3 日
4. Sasaki Y, Ishikawa A, Kawakami T, Hirano H, Goshima Y. Proteomics of axons during presynapse formation using the novel culture method "neuron ball culture" 12th Human Proteome Organization Congress, Pacifico Yokohama (Yokohama, Kanagawa Pref.) (Sep 15, 2013)
5. 高島 将、五嶋 良郎、佐々木 幸生 セマフォリン 3A による脆弱 X 精神遅滞タンパク質の局在制御 第 15 回 RNA 学会年

会、愛媛県民文化会館（ひめぎんホール）（愛媛県松山市）、2013年7月24-25日

6. 佐々木 幸生 新規培養法「ニューロンボール法」を用いたシナプス前終末形成のプロテオーム解析 第35回神経組織培養研究会、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府吹田市）、2013年6月30日
7. 佐々木 幸生、高島 将、花岡 和則、五嶋 良郎 脆弱 X 精神遅滞タンパク質の軸索・成長円錐における局在はセマフォリン3Aにより制御される 第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会合同大会（Neuro2013）、国立京都国際会館（京都府京都市）、2013年6月21日

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 幸生 (SASAKI, Yukio)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授  
研究者番号：10295511

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

川上 隆雄 (KAWAKAMI, Takao)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・客員  
准教授  
研究者番号：40366117