

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460058

研究課題名(和文) 線虫セロトニン作動性神経細胞HSNにおけるプレシナプス形成分子機構の全体像

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of presynaptic assembly in serotonergic neurons HSN in *C. elegans*

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞のプレシナプス構造には、神経伝達物質の放出に関わる機能分子がCAZと総称されるアダプター分子群を基盤として局在している。本研究は、線虫*C. elegans*のセロトニン作動性神経細胞HSNを主なモデルとして、プレシナプス形成制御分子SYD-1のRhoGAP様ドメインを介したGTPase抑制的制御とその機能、CAZ分子RIMB-1による電位依存性カルシウムチャネルの局在制御など、プレシナプス形成に関わる新たな分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：At presynaptic structures in neurons, Cytomatrix at the Active Zone (CAZ)”, a group of unique adapter proteins, assembles and organizes functional molecules specialized for synaptic transmission. This project addressed the molecular mechanisms of presynaptic assembly mainly in serotonergic neurons HSN in nematode *C. elegans*: SYD-1, a key regulator of presynaptic assembly, negatively regulates GTPase through the binding of RhoGAP-like domain; RIMB-1, previously uncharacterized CAZ protein, regulates the localization of voltage-gated calcium channels at presynaptic structures.

研究分野：医歯薬学

キーワード：神経細胞 シナプス セロトニン作動性

## 1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経系の情報処理機能の基本素子となる細胞間接着構造である。プレシナプス(シナプス前部)は、神経活動に応じたポストシナプス(シナプス後部)への神経伝達物質の放出を担う。プレシナプスでは、神経伝達物質を含んだシナプス小胞がプールされ、放出中心部位であるアクティブゾーンには Cytomatrix at the Active Zone (CAZ) と総称される固有のアダプタータンパク質の一群が集積し、その基盤をもとに SNARE タンパク質や電位依存性カルシウムチャネル、細胞接着因子など神経伝達に関わる多くの機能分子が局在している。このプレシナプスの基本構造は下等動物からヒトまで共通で、主要な構成分子は種を越えて保存されている。

プレシナプス構造は、細胞体から伸長した軸索上の予定部位に、構成分子群やシナプス小胞前駆体が小胞輸送によって運ばれて集積し、安定化・組織化されることで形成される。この分子機構の理解には、無脊椎モデル動物を用いた遺伝学的解析が大きく寄与してきた。線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) では、プレシナプス形成の制御にアダプタータンパク質である SYD(Synapse Defective) -1、SYD-2 が主要な役割をはたす。代表者らは、産卵運動制御を担うセロトニン作動性神経細胞 HSN に着目し、まず SYD-1 が位置情報をもとに局在し、その下流で SYD-2 が ELKS-1 と結合・クラスタリングすることが、プレシナプスにおける構成分子の集積・安定化のキーステップであることを示してきた。

しかしプレシナプス形成分子機構の全体像を理解する上で、(1)SYD-1・SYD-2 の作用分子機構の詳細、(2)SYD-1・SYD-2 以外の形成制御経路、(3)SYD-1・SYD-2 下流における機能分子群の局在・集積の分子機構、といった多くの未解明問題が残されている。(1)の課題として、SYD-1・SYD-2 の各種ドメイン、特に SYD-1 RhoGAP 様ドメインの作用機構が挙げられる。SYD-1 は PDZ、C2 および RhoGAP 様ドメインを有し、線虫からヒトまで保存された分子である。しかし線虫 SYD-1 の RhoGAP 様ドメインは GAP 活性に必要な残基を持たず、その作用機構が不明であった。(2)について、代表者は SYD-1・SYD-2 機能欠損のプレシナ

プス形成不全を抑制する変異体の順遺伝学的スクリーニングにおいて、非典型的カドヘリン FMI-1 の機能欠損変異体を同定した。主要制御分子 SYD-1・SYD-2 の非存在下でプレシナプス形成を誘導する代替経路がはたらく可能性が示唆されたが、その分子実体は不明であった。(3)について、機能分子群の局在・集積の理解には、各 CAZ タンパク質の固有の機能と相補的な機能の双方に関して包括的な解析が求められていた。代表者らは CAZ 分子である RIM 結合タンパク質 RBP の線虫ホモログ RIMB-1 について解析を進めていたが、その機能は未解明であった。

## 2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* のプレシナプス形成に関して、セロトニン作動性 HSN 神経細胞を主なモデルとして、(1)中核制御分子 SYD-1・SYD-2 の動作機序、特に SYD-1 RhoGAP 様ドメインの機能と作用分子機構、(2)抑制的制御分子 FMI-1 の作用分子機構、(3) CAZ タンパク質 RIMB-1 の機能とプレシナプス機能分子局在における CAZ 分子群の作用分子機構、を明らかにし、プレシナプス形成分子機構の全体像の理解を目指す。

## 3. 研究の方法

実験モデル動物として遺伝学的解析に長けた線虫 *C. elegans* を用いた。産卵運動を制御するセロトニン作動性 HSN 神経細胞におけるプレシナプス構造を主要な解析対象とし、さらに GABA 作動性運動神経細胞、コリン作動性運動神経細胞、AWC および AIY 頭部感覚神経、RIA グルタミン酸作動性頭部介在神経を適宜解析した。

蛍光タンパク質を融合したプレシナプスマーカー分子(シナプス小胞結合分子 SNB-1、RAB-3、アクティブゾーン局在タンパク ELKS-1、GIT-1)によって、単一神経細胞種のプレシナプス構造が可視化されたトランスジェニック線虫を用い、蛍光顕微鏡を用いた生体内観察によってプレシナプス形成を評価した。さらに産卵運動の表現型をもとにプレシナプス機能を評価した。

各研究目的に対してそれぞれ(1) SYD-1 RhoGAP 様ドメイン欠損変異体の表現型解析と抑制変異体の順遺伝学的探索、SYD-1 と Rho・Rac ファミリーGTPase の遺伝学的・生

化学的な相互作用解析、(2) FMI-1 の細胞種選択的トランスジェニックを用いた細胞自律性の検証、FMI-1 の下流シグナル分子および代替的プレシナプス誘導 CAZ 関連分子に関する候補遺伝子の遺伝学的検討と順遺伝学的探索、(3)について RIMB-1 機能欠損変異体・トランスジェニックを用いた発現および機能解析、CAZ タンパク質群の多重変異体の作製と表現型解析、を主な研究方法・方針として解析を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1)中核制御分子 SYD-1 の RhoGAP 様ドメインの機能と作用分子機構

プレシナプス形成における SYD-1 RhoGAP 様ドメインの寄与と細胞種特異性

SYD-1 は線虫において神経細胞の種類を問わずプレシナプス形成に重要な分子であるが、細胞種ごとに RhoGAP 様ドメインの必要性には異なる。SYD-1 の RhoGAP 様ドメインを欠失した変異体について、これまで検討した HSN 神経細胞、GABA 作動性運動神経とともに、コリン作動性運動神経細胞、体部の運動神経の他、頭部感覚神経および頭部介在神経におけるプレシナプス形成を解析・比較した結果、HSN 以外の神経細胞種において RhoGAP 様ドメイン欠失による明確なプレシナプス異常が認められた。SYD-1 RhoGAP 様ドメインは線虫プレシナプス形成制御に重要であるが、例外的に HSN 神経細胞では必須の領域ではないことが明らかとなった。

HSN 神経軸索ガイダンスにおける SYD-1 RhoGAP 様ドメインによる Rac ファミリー GTPase MIG-2 の抑制的制御

SYD-1 RhoGAP 様ドメインについて Rho および Rac ファミリー GTPase の候補分子との相互作用を生化学的に検討し、Rac ファミリー GTPase である MIG-2 との結合能を明らかにした。Wisconsin 大学 Quinn 博士らと共に、SYD-1 が HSN 神経細胞において軸索ガイダンス受容体 UNC-40/DCC、SAX-3/Robo と相互作用し、さらに RhoGAP 様ドメインの結合を介して MIG-2 を抑制することによって、プレシナプス形成に先立つ軸索の伸長を制御する、という SYD-1 の新たな生理機能と作用分子機構を見出し報告した。

SYD-1 のプレシナプス形成制御における Rho・Rac ファミリー GTPase の寄与

SYD-1 による MIG-2 の新たな抑制制御メカニズムのプレシナプス形成における役割について、検証した。*mig-2* の機能欠損、機能低下、活性化の各変異体、および *syd-1* との二重変異体について、HSN 神経および GABA 作動性運動神経におけるプレシナプス形成の表現型を解析したところ、いずれも *syd-1* と関連するプレシナプス形成に関する表現型は呈さなかった。さらに SYD-1 RhoGAP 様ドメイン欠失変異体において、順遺伝学的スクリーニングにより GABA 作動性運動神経プレシナプス形成異常を抑制する変異体を探索したが、サブレッサー変異体の同定には至っていない。生化学的解析では MIG-2 以外の GTPase も SYD-1 RhoGAP 様ドメインの結合分子として見出されており、今後それらのプレシナプス形成制御における寄与を検証することが重要である。

##### (2)プレシナプス形成の抑制的制御分子 FMI-1 の作用分子機構

FMI-1 抑制的プレシナプス形成制御の細胞自律性

HSN 神経細胞選択的なプロモーター下で FMI-1 を発現するトランスジェニック線虫を作製し、*syd-1; fmi-1* の二重変異体における作用を解析した。その結果、HSN プレシナプス形成不全および産卵運動不全を呈する個体の増加が認められたことから、FMI-1 による HSN プレシナプス形成の抑制的制御が細胞自律的な作用であることが示唆された。

プレシナプス形成における FMI-1 関連シグナル分子の関与

FMI-1 は Flamingo タンパク質ファミリーの一員である。Flamingo タンパク質のシグナル伝達に関わる細胞内平面極性制御関連分子、Wnt シグナル経路分子の線虫ホモログについて、FMI-1 プレシナプス形成制御における寄与を検証した。*syd-1* と各候補遺伝子との二重変異体を作製し、候補変異が *fmi-1* 変異と同様のプレシナプス形成不全回復作用を示すか検討した。さらに *syd-1*、*fmi-1* と各候補遺伝子の三重変異体を作製し、*fmi-1* 変異による回復が候補変異によって打ち消されるかについても検討を行った。その結果、いずれの候補も HSN プレシナプス形成に関して *syd-1*、*fmi-1* との遺伝学的相互作用を呈さないことが明らかとなった。プレシナプス形成

制御における FMI-1 下流のシグナル伝達は、Flamingo ファミリーに関わる既知の経路を介さないものである可能性が示唆される。

FMI-1 機能欠損変異体のプレシナプス形成における CAZ タンパク質の関与

FMI-1 機能欠損変異体においては SYD-1・SYD-2 非存在下でも、それ以外の分子によってプレシナプス形成が代替的に誘導される。そこで SAD-1、UNC-10、RIMB-1 等の未解析の CAZ 関連分子の関与について、*syd-1*・*fmi-1* との三重変異体を作製し検討した。いずれの三重変異体も、HSN プレシナプス形成において *fmi-1* 欠損の作用を打ち消す表現型は示さなかった。さらに *syd-1*;*fmi-1* 二重変異体の表現型を抑制する変異体の順遺伝学的な探索を行ったが、候補変異体の同定には至っていない。FMI-1 下流の代替的なプレシナプス形成制御には複数の CAZ 関連分子が冗長的に作用する可能性が示唆される。

(3) CAZ タンパク質 RIMB-1 の機能とプレシナプス機能分子局在における CAZ 分子群の作用分子機構

RIM 結合タンパク質線虫ホモログ RIMB-1 の機能

線虫 RIMB-1 の発現と局在について、蛍光タンパク質レポーターを用いたトランスジェニック線虫を作製して解析し、RIMB-1 が神経細胞全般に発現すること、アクティブゾーン局在分子である SYD-2 や UNC-10 と共局在することを明らかにした。線虫 RIMB-1 が、マウスやショウジョウバエの RIM 結合タンパク質と同様、プレシナプスのアクティブゾーンに局在する CAZ 分子としての性質を有することが示された。

次に RIMB-1 の生理機能を明らかにするため、*rimb-1* 機能欠損変異体についてシナプス機能およびシナプス構造を解析した。*rimb-1* 変異体は、産卵運動については顕著な異常を呈さなかったものの、全般的な運動能の低下を示し、さらにアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を用いた解析からシナプス伝達効率の低下が示唆された。一方で、シナプス小胞やアクティブゾーンタンパク質の局在パターンはほぼ正常であった。

さらにプレシナプス機能分子の局在について、RBP との相互作用が報告されている電位依存性カルシウムチャンネルに着目し、解析

を行った。チャンネル本体サブユニットの一つである UNC-2 に GFP を融合し局在を観察した結果、UNC-2 は *rimb-1* 変異体でも野生型と同様にプレシナプス部位に局在した。一方、RIMB-1 を過剰発現したトランスジェニック線虫では、野生型に比較してプレシナプス部位における UNC-2 タンパク質局在の増加が認められた。RIMB-1 は UNC-2 の局在に必須ではないものの、それを正に制御しうる分子である可能性が示唆された。

電位依存性カルシウムチャンネル局在に関わる CAZ 分子群の遺伝学的相互作用

CAZ 分子はアクティブゾーンにおいて互いに密に相互作用しており、相補的な機能も有することが予想される。そこで *rimb-1* と各 CAZ 分子との二重変異体を作製し、表現型の解析を行った。運動能、産卵行動およびプレシナプスマーカー局在について評価した結果、いずれの変異体においても *rimb-1* との間に顕著な遺伝学的相互作用は認められなかった。一方で、電位依存性カルシウムチャンネル UNC-2 の局在については、*rimb-1* との二重変異体において顕著な異常を呈するものが認められた。*rimb-1* が電位依存性カルシウムチャンネルのプレシナプス部位への局在に重要であり、その制御には CAZ 分子が相補的に機能することが明らかになった。

RIMB-1 のプレシナプス局在制御機構

RIMB-1 のプレシナプスアクティブゾーンへの局在は機能に重要である。局在制御の分子機構を明らかにするため、各種の機能分子変異体における蛍光タンパク質標識 RIMB-1 の局在を解析した。まず *syd-2* 機能欠損変異体で RIMB-1 の局在異常が認められたことから、正常なプレシナプス形成の誘導が RIMB-1 の局在には必要であることが示された。またチャンネル補助サブユニットの変異体においても RIMB-1 局在異常が認められた。さらに神経細胞でプレシナプス部位への順行性能動輸送を担うモーター分子が、RIMB-1 の局在に重要であることが明らかとなった。これら RIMB-1 局在異常を呈する輸送モーター分子変異体においても、電位依存性カルシウムチャンネルはプレシナプス部位に局在しうる。したがって RIMB-1 は、電位依存性カルシウムチャンネルとは別途プレシナプス部位へ輸送された後、アクティブゾーンにおいてチャンネルを係留してその局在を制御する、という分

子機構が示唆された。

プレシナプス形成誘導における CAZ 分子の遺伝学的相互作用の解析

CAZ 分子のうち単独の機能欠損変異体が HSN 神経細胞における顕著なプレシナプス形成不全を示すのは *syd-1*, *syd-2* のみである。他の CAZ 分子のプレシナプス形成誘導における寄与とその冗長性を明らかにするため、で検討した *rmb-1* の二重変異体の他、*syd-1*・*syd-2* 以外の CAZ 分子 *unc-10*, *elks-1*, *rmb-1*, *git-1* について様々な組み合わせで多重変異体を作製し、プレシナプス形成誘導能の評価を行った。その結果、いずれの多重変異体も *syd-1* や *syd-2* 変異体で見られる顕著なプレシナプス形成不全を示さないことが明らかとなった。本研究で見出した RIMB-1 による電位依存性カルシウムチャネルの局在制御の例に見るように、*syd-1*・*syd-2* の下流において他の CAZ 分子は、プレシナプス全体の形成誘導ではなく、特定の機能分子ごとの局在制御を担う可能性が高いと考えられる。

神経プレシナプスの基本構造や主要な分子は種を越えて保存されており、ヒトにおけるその異常は精神疾患の病態との関連が深い。よって以上のプレシナプス形成分子機構に関する本研究の成果は、基礎神経科学の見地から重要であるとともに、プレシナプス異常が関与する脳神経疾患の病態分子機構理解および治療法開発に向けた基盤的知見として有用である。

#### 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6件)

Yan Xu, Hidenori Taru, Yishi Jin and Christopher C. Quinn  
SYD-1C, UNC-40 (DCC) and SAX-3 (Robo) Function Interdependently to Promote Axon Guidance by Regulating the MIG-2 GTPase  
PLoS Genetics  
2015; 11(4):e1005185. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pgen.1005185.

Maike Kittelmann, Jan Hegemann, Alexandr Goncharov, Hidenori Taru, Mark H. Ellisman, Janet Richmond, Yishi Jin, Stefan Eimer

Liprin-alpha/SYD-2 determines the size of dense projections in presynaptic active zones in *C. elegans*  
Journal of Cell Biology  
2013;203(5):849-63. 査読有  
doi:10.1083/jcb.201302022

[学会発表](計5件)

Yuto Kushibiki, Toshiharu Suzuki and Hidenori Taru  
Characterization of RIM-binding protein RIMB-1 in the presynaptic active zone  
CeNeuro2016  
2016年7月27日 名古屋大学(愛知県名古屋市)

Hidenori Taru and Toshiharu Suzuki  
Negative regulation of presynaptic assembly by a non-classical cadherin in serotonergic neurons in *C. elegans*  
8th FENS Forum of Neuroscience  
2014年7月7日 ミラノ(イタリア)

Hidenori Taru  
Identification of a cell adhesion molecule involved in negative regulation of presynaptic assembly in *C. elegans*  
Experimental Biology 2013  
2013年4月22日 ボストン(アメリカ)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者

多留 偉功 (TARU, Hidenori)  
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：30533731

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )