

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830008

研究課題名(和文) 前シナプス分子基盤によるシグナル伝達場の構築及び神経回路網の調節機構

研究課題名(英文) Molecular basis analysis for the regulation of presynaptic terminal and neural network

研究代表者

萩原 明 (HAGIWARA, Akari)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：70402849

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)：脳機能の基本となる神経回路網は、その基本単位であるシナプスでの円滑な情報伝達に支えられている。本研究では前シナプス構成蛋白質(CAST/ELKSファミリー)を欠損させ、シナプス及び関連する脳機能を解析した。(1) ELKSのみの欠損では顕著な異常が認められず、ファミリー蛋白質間による相補作用が推測された(2) CAST/ELKS欠損では脳領域毎に異なる表現型が見出され、CAST/ELKSはシナプスや神経回路によって多様な作用機序を有することが分かってきた。

研究成果の概要(英文)：To understand neural network, it is indispensable to understand the process of synaptic transmission. In this project, I focused on the presynaptic terminal protein called CAST/ELKS, and analyzed brain function of deletion mutants through their synaptic neurotransmission. (1) The deletion mutant of ELKS had little phenotype, probably because its function was complementary supported by CAST. (2) The CAST/ELKS deletion mutants showed various phenotypes depending on the each deficient region of the brain. The results of this project suggested that CAST/ELKS have various mechanisms relating to their located synapse and neural network.

研究分野：神経科学

キーワード：アクティブゾーン シナプス 神経回路 脳機能 条件付き遺伝子欠損 Cre-loxP

1. 研究開始当初の背景

外的要因に誘起される様々な情報は脳に入力すると、複雑に張り巡らされた神経回路を経ることで統合され、その結果は行動として再び外界へと出力される。この神経回路はシナプスと呼ばれる構造を介してつながっており、神経系の正常な作用はその基本単位であるシナプスでの円滑な情報伝達に支えられている。シナプスは伝達物質を放出させるシナプス前部と、情報を受け取る側のシナプス後部から構成され、前部と後部は接着分子と呼ばれる蛋白質によって20-30 nmの距離で近接している。また、シナプス後部で情報を受け取る受容体は、シナプス後肥厚部(PSD)を形成する蛋白質群によって移動や滞留が制御され、シナプス後部の蛋白質群は接着分子と相互作用することでシナプスが維持されていることもわかってきた。しかしながら、シナプス前部において伝達物質が放出される場である開口放出部(Active zone, AZ)は、局在する蛋白質群が同定されているが、放出の場を制御する機構はほとんどわかっていない。そこで本研究ではシナプス前部の AZ 形成・維持に関する分子基盤の解明を目指した。

2. 研究の目的

開口放出部には AZ 構成蛋白質 (Cytomatrix at the AZ, CAZ) と呼ばれる蛋白質群が局在している(Fig. 1)。そのうち Munc-13 はシナプス小胞の膜融合に関与し、Rim1 は開口放出の調節を行っていることが分かってきたが、これらの蛋白質はシナプスや AZ の構造に顕著な影響を及ぼさなかった。一方、CAST はその欠損マウス等の解析から、開口放出の調節だけでなく、放出の場というシナプスの機能にとって重要な構造の形成・維持への関与が示唆されている(Kittel et al., 2006, *Science*, Wagh et al., 2006, *Neuron*, tom Dieck et al., 2012, *J. Neuroscience*)。しかしながら、そのファミリー蛋白質である ELKS は欠損マウスが胎生致

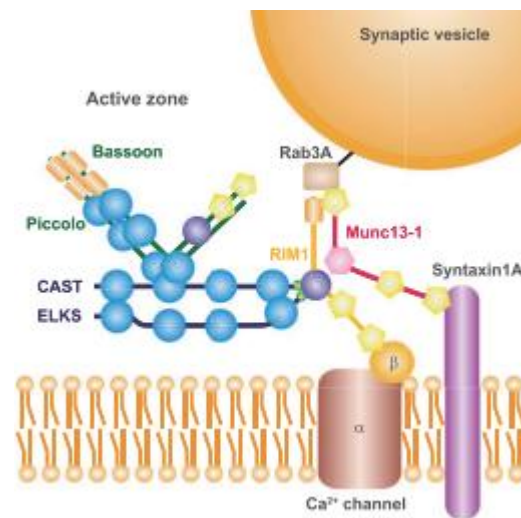


Fig. 1 前シナプス終末で開口放出部(AZ)に局在する AZ 構成蛋白質(CAZ)

Hida, Ohtsuka, 2010, *J Biochem* より引用

死になったため十分な解析が行われていなかった。そこで、本研究では ELKS の条件付き遺伝子欠損マウス及び CAST/ELKS 両遺伝子欠損マウスを作製し、ELKS や CAST の前シナプス構造の分子基盤としての機能に焦点を当て解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、CAST 及び ELKS の欠損マウスを用い、CAZ 蛋白質の生化学的な性質から、神経回路やシナプスの形態学的解析、さらに出力として表現される行動までを一貫して解析する。ELKS 欠損マウスは Cre-loxP システムを利用した条件付き欠損マウス(*ELKS^{fl/fl}*)を用い、さらに CAST 欠損 (*CAST^{-/-}*) の背景を持つ *CAST^{-/-}; ELKS^{fl/fl}* マウスによって両遺伝子欠損マウスを作製した。

(1) 初代培養細胞系を用いたシナプス形成・維持における CAST/ELKS の機能解析

ELKS^{fl/fl} マウスや *CAST^{-/-}; ELKS^{fl/fl}* マウスの大脳皮質から神経細胞の初代培養を作製し、ウイルスを用いて時期特異的に Cre を発現させ ELKS を欠損させる。生化学や形態学的な解析から、神経回路網の構築、特にシナプス前部の AZ の構造基盤としての役割を中

心に解析する。

(2) 脳機能と関連したシナプスの構造基盤としての CAST/ELKS の機能解析

CAST/ELKS 蛋白質の分子生物学的解析から、出力として表現される行動までを一貫して解析するため、脳の領域特異的に Cre を発現するマウスと掛け合わせた ELKS、CAST/ELKS 欠損マウスを作製する。欠損マウスは行動学的な解析を行うと同時に、脳サンプルを採取し、関連蛋白質の発現、脳の構造、シナプスの形態や生理学的解析を行うことで、CAST/ELKS の機能を明らかにしていく。

4. 研究成果

(1) 初代培養細胞を用いた CAST/ELKS の機能解析

生後 24 時間以内の $ELKS^{fl/fl}$ 又は $CAST^{-/-}$; $ELKS^{fl/fl}$ マウス的大脑から初代培養神経細胞を作製し、Cre によって ELKS や CAST/ELKS を欠損させた神経回路網を構築しその解析を行った。培養 4 日目の神経細胞に Cre のウイルスを感染させたところ、10 日後にはほぼ

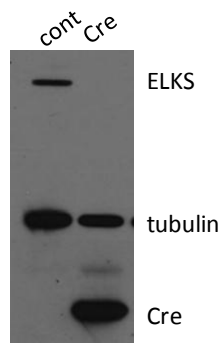


Fig. 2 $ELKS^{fl/fl}$ マウスから作製した初代培養神経細胞にウイルスによって Cre を発現させ、ELKS が消失することを確認した。

完全に ELKS が消失し、 $ELKS^{fl/fl}$ マウスに組み込まれた loxP システムに Cre が有効に働くことを確認した (Fig. 2)。Cre の発現に使用するウイルスの種類や、発現させる時期などの検討を重ね、培養初期に ELKS を欠損させても神経回路やシナプスの形成に顕著な影響を与えないことが分かった。また、CAST/ELKS の両ファミリー蛋白質を欠損させてもシナプス関連蛋白質の局在や神経回路網の構築等に大きく影響しないことが示唆された。

(2) 脳機能と関連したシナプスの構造基盤としての CAST/ELKS の機能解析

① 前脳特異的 CAST/ELKS 欠損マウス

前脳特異的な ELKS 欠損マウスでは顕著な異常はみられなかったが、CAST/ELKS 欠損マウスは生後 1 日で死亡した。生後数時間以内の CAST/ELKS 欠損マウスは同腹の他のマウスと識別できず呼吸や体温維持などに問題はないと推察された。しかし、母マウスの授乳後、通常仔マウスの胃がミルクで満たされるのが見えるが CAST/ELKS 欠損仔マウスでは内容物がほとんど確認されなかった。このことから、吸乳障害による栄養摂取不良が原因で死亡すると推定されたが、その根幹となる神経回路網の特定には至っていない。

② 小脳分子層特異的 CAST/ELKS 欠損マウス

脳の免疫組織染色の結果、ELKS は小脳の分子層で優位に発現していた。そこで、小脳で Cre を発現するマウスと交配させ、ELKS のみ又は CAST/ELKS 欠損マウスを作製し、形態や運動への影響を解析した。シナプスマーカー等を用いた免疫組織染色の観察から、小脳の層構造や神経回路網は正常に構築されていることが分かった。一方、回転棒試験による行動解析の結果、CAST/ELKS 欠損マウスは運動学習に遅れが生じていた。今後、シナプスの形態学的な解析と並行してシナプス伝達機構を生理学的に解析し、神経伝達や可塑性における CAST/ELKS 機能の解析を進めて行く。

③ 網膜特異的 CAST/ELKS 欠損マウス

網膜の光受容細胞に Cre を発現するマウスと交配させた網膜特異的 ELKS 欠損マウスでは異常は認められなかったが、CAST/ELKS 欠損マウスでは、成長曲線が有意に低下していた。また目が見えていないと推測される挙

動を示したため、反射性眼球運動をモニターしたところ、その動きが著しく低下し視力が十分に得られていないことが分かってきた。

さらに、CAST/ELKS のシナプスの形成・維持や AZ を支える構造基盤としての役割を解析するため、詳細な形態学的解析を行った。その結果、光受容細胞のシナプスは通常外網状層に限局して局在するのに対し、CAST や CAST/ELKS 欠損マウスでは光受容細胞が存在する外顆粒層にまで異所性に局在することが分かった。

今後、電子顕微鏡を用いた微細形態や分子生物学的手法による詳細な解析を進めることで、このような異所性シナプスと視機能の関係や CAST/ELKS の欠損によって異所性シナプスが形成されるメカニズムの解明を目指す。

<引用文献>

- ① Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ (2006) Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312:1051-1054.
 - ② Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrebeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E (2006) Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833-844.
 - ③ tom Dieck S, Specht D, Strenzke N, Hida Y, Krishnamoorthy V, Schmidt KF, Inoue E, Ishizaki H, Tanaka-Okamoto M, Miyoshi J, Hagiwara A, Brandstatter JH, Lowel S, Gollisch T, Ohtsuka T, Moser T (2012) Deletion of the Presynaptic Scaffold CAST Reduces Active Zone Size in Rod Photoreceptors and Impairs Visual Processing. *The Journal of neuroscience* 32:12192-12203.
 - ④ Hida Y, Ohtsuka T (2010) CAST and ELKS proteins: structural and functional determinants of the presynaptic active zone. *J Biochem* 148:131-137.
5. 主な発表論文等
- [雑誌論文] (計 0 件)
- [学会発表] (計 2 件)
- ① Akari Hagiwara, Manabu Abe, Wataru Kakegawa, Yamato Hida, Takahisa Furukawa, Michisuke Yuzaki, Kenji Sakimura, Toshihisa Ohtsuka
網膜における異所性シナプスの形成に対するアクティブゾーン構成タンパク質 CAST/ELKS の作用機序
Formation of ectopic synapses at retina in presynaptic active zone protein CAST/ELKS deletion mutant
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会
2015 年 3 月 21 日-23 日
神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
 - ② Akari Hagiwara, Manabu Abe, Yamato Hida, Naoko Sugiyama, Kei Moriya, Takahisa Furukawa, Kenji Sakimura, Toshihisa Ohtsuka
アクティブゾーン構成タンパク質 CAST および ELKS の網膜におけるシナプス構造とその機能に対する作用
The effect of the active zone protein

CAST/ELKS deletion on the structure and
function of retinal synapses and visual
system

第 37 回日本神経科学大会

2014 年 9 月 11 日-13 日

パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

[その他]

ホームページ等

山梨大学医学部 生化学講座第一教室

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/bioche01/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

萩原 明 (HAGIWARA, Akari)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：70402849