

## 神経伝達トリガー分子の新たな局在制御機構を発見

～シナプス病の分子基盤理解に貢献～

### ポイント

- ・電位依存性カルシウムチャネルの神経プレシナプスへの局在機構を線虫シー・エレガンスから発見。
- ・二種類のシナプス足場タンパク質が冗長的（重複的）にはたらくユニークなメカニズムを解明。
- ・精神疾患や神経変性疾患などのシナプス病の分子基盤理解と治療薬探索への貢献に期待。

### 概要

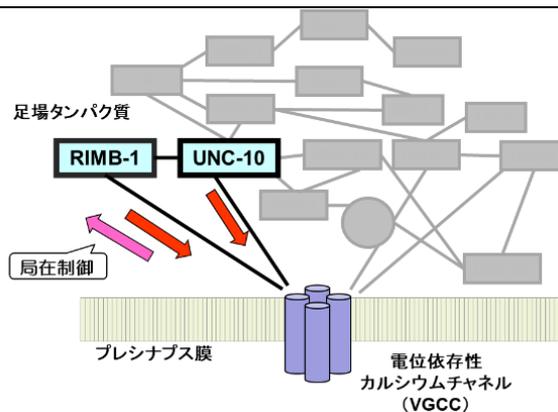
北海道大学大学院薬学研究院の多留偉功准教授らの研究グループは、神経伝達のトリガー分子である電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）の局在が、二種類の足場タンパク質によって冗長的（重複的）に制御される、という新たな分子機構を発見しました。

脳神経系の高度な情報処理機能の基盤は、シナプスと呼ばれる神経細胞間の接着構造を介した情報伝達です。出力側であるプレシナプス（シナプス前部）に伝達の引き金を引く VGCC が正確に集積・局在することが必須であり、その分子機構の全容解明は神経科学分野の重要課題の一つです。

研究グループは、無脊椎モデル動物である線虫シー・エレガンスにおいて機能未知であった RIMB-1 という分子を解析し、VGCC の足場としてのはたらきを見出しました。また、系統的な遺伝学的解析とスクリーニングによって、VGCC の局在制御には多数のプレシナプス足場タンパク質の中でも特に RIMB-1 と UNC-10 の二種類が必須であり、それらが重複した機能をはたすことを明らかにしました。さらに RIMB-1 と VGCC の局在が、双方向的な制御関係にあることを提唱しました。

これらのファミリー分子はヒトにも存在し、自閉症をはじめとした様々な精神・神経疾患への関与が示唆されています。本研究成果は、脳神経系の分子レベルでの理解に重要であるとともに、それらの疾患の分子的理解や治療薬開発への貢献が期待されます。

なお、本研究成果は 2019 年 9 月 17 日（火）公開の Journal of Neuroscience 誌に掲載されました。



研究成果の概念図。神経伝達を担うプレシナプスには、多数の機能分子や足場タンパク質（灰色）が複雑な相互作用（実線）を介して組織的に集積している。線虫において、電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）の集積・局在には二つの足場タンパク質 RIMB-1 と UNC-10 による重複的な制御（赤矢印）が重要であり、さらに RIMB-1 と VGCC が双方向的な制御関係にある（ピンク矢印）ことが明らかになった。

## 【背景】

脳神経系はその高度な情報処理機能によって、ヒトの思考や行動、生存を支えています。脳神経機能は、数千億個の神経細胞がシナプスとよばれる構造を介して互いに情報を伝達することによって発揮されており、その異常は“シナプス病”と総称される様々な精神・神経疾患の原因となります。したがって、シナプスの成り立ちを明らかにすることは脳神経系の理解に不可欠であり、シナプス病の治療法開発のための重要なステップです。

シナプスでは、情報の出力側であるプレシナプス（シナプス前部）が神経伝達物質を放出し、それを入力側であるポストシナプス（シナプス後部）へと受け渡します。プレシナプスには、神経伝達物質放出に関わる様々な機能分子とそれを支える複数の足場タンパク質が組織的に集積していることが知られていますが、その集積がどのように制御されているのかについての分子レベルでの理解は神経科学の大きな課題の一つです。

電位依存性カルシウムチャネル（VGCC）は、神経細胞の活性化に応じてカルシウムイオンを細胞内に流入させることで伝達物質の放出を引き起こす機能分子です。これは、いわば神経細胞間情報伝達の引き金を引くトリガー分子であり、プレシナプスに正確に集積して局在することが正常な神経伝達には必須です。VGCCには複数の足場タンパク質との結合が知られており、局在への関与が解析されています（1 ページ目図）、その局在制御機構の全体像は未だ明らかになっていません。

研究グループは、無脊椎動物である線虫シー・エレガンスの RIMB-1 という足場タンパク質に着目して研究を行いました。線虫シー・エレガンスは体長 1 mm 程度の小さな虫ですが、無脊椎モデル動物として広く生物学研究に活用されています。その神経系はわずか 302 個の神経細胞から成る単純なものです。シナプスの基本的な構造や機能、そこではたらく主要分子の多くはヒトやマウスと共通しています。線虫がもつ RIMB-1 は、VGCC と足場タンパク質 RIM の結合分子であるマウス RIM 結合タンパク質（RBP）の相同分子として、ゲノム配列情報から存在が予測されていた分子ですが、その分子実体や生理機能は不明でした。

## 【研究手法】

本研究では、研究材料として線虫シー・エレガンスを用いました。線虫は遺伝学的実験に長けたモデル動物として広く生物学研究に用いられています。その神経系はヒトやマウスに比べて非常に単純であるものの、プレシナプスの基本的な構造や機能、主要分子は良く保存されており、有用な実験モデルとして利用されています。本研究では RIMB-1 や VGCC などのタンパク質の局在を観察するために、GFP などの蛍光タンパク質を付加して特定の神経細胞に発現させたトランスジェニック線虫を作成・利用しました。これにより、各タンパク質の局在を蛍光顕微鏡によって生きたまま単一シナプスレベルで解析することが可能です（図 1）。

また、RIMB-1 や様々なシナプス関連遺伝子の機能欠損変異体のリソースを元に、トランスジェニック蛍光標識タンパク質を有する各種の多重変異体系統を交配によって作成し、表現型を解析しました。さらに、順遺伝学的スクリーニング、すなわちゲノム中にランダムに誘発した多数の変異から特定の表現型を生じる変異を探索する手法を活用し、RIMB-1 変異の作用を増強する変異を同定しました。

## 【研究成果】

研究グループは、まず線虫 RIMB-1 の発現様式を解析し、RIMB-1 が全身の神経細胞に広範に発現し、神経細胞内でプレシナプスに局在することを示しました。次に、その生理機能を探るため、RIMB-

1 の遺伝子に変異が入った機能欠損変異体を解析したところ、軽微なシナプス伝達異常を見出しました。プレシナプスの主要分子の局在には目立った異常は認められませんでした。神経細胞に RIMB-1 を過剰に発現させたトランスジェニック線虫では VGCC の局在が増加しており、RIMB-1 が VGCC のプレシナプス局在に関わる可能性が示唆されました。

プレシナプスでは、多数のタンパク質が複雑に相互作用して機能していることが知られており（1 ページ目図）、RIMB-1 についても類似の機能を果たす他のタンパク質が存在し、補うようにはたらいっている可能性が予想されました。そこで研究グループは、系統的な遺伝学的相互作用解析によってその可能性を検討しました。検討にあたり、プレシナプスの形成や機能に重要である 11 種類の主要なプレシナプスタンパク質を候補として、それらの機能欠損変異体と RIMB-1 変異体との二重変異体を作成し、様々な指標について表現型を解析しました。すると、それらの単独変異体、二重変異体の中で唯一、足場タンパク質 RIM のファミリー分子である UNC-10 と RIMB-1 との二重変異体においてのみ、プレシナプスにおける VGCC の集積に顕著な減少が認められました（図 2）。

この候補分子解析を補完するため、バイアスをかけない網羅的実験手法である順遺伝学的スクリーニングによって、RIMB-1 変異の効果を増強するエンハンサーと呼ばれる変異を探索しました。予め RIMB-1 変異を有する線虫にさらに突然変異を誘発して探索した結果、VGCC のプレシナプス局在を顕著に低下させる変異体が単離され、その責任遺伝子として UNC-10 が同定されました。すなわち、RIMB-1 と UNC-10 の両方が欠損したときのみ VGCC のプレシナプス局在が損なわれるという結果が、二つの独立の遺伝学的実験から共通に見出されました。この結果は VGCC のプレシナプス局在に、RIMB-1 と UNC-10 という異なる二つの足場タンパク質を持つ重複したはたらきが必須であることを示しています。

さらに研究グループは、RIMB-1 自身がプレシナプスに局在するためのメカニズムについて、候補変異体を用いて検討しました。その結果、VGCC の機能欠損変異体において、RIMB-1 はプレシナプスには正しく局在するものの、それ以外の部位にも異所的に集積することを見出しました（図 3）。このことから、VGCC は RIMB-1 をプレシナプスに限定的に局在させるために必要であると考えられ、チャンネル分子によってその足場タンパク質自体の局在が逆に調節を受けるチャンネル分子と足場タンパク質の双方向的局在制御という新たな仕組みが示唆されました。

## 【今後への期待】

本研究は、線虫で長年にわたる懸案課題であった VGCC プレシナプス局在制御の分子機構について、RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM という二つの異なる足場タンパク質による冗長的（重複的）な制御、という答えを提示しました。さらに、VGCC と足場タンパク質との双方向的な局在制御関係を初めて生体内で見出しました。最近、VGCC の局在や機能の制御における RBP 及び RIM ファミリーの関与がマウスやショウジョウバエにおいても報告され、その詳細な分子機構に関する研究が精力的に進められています。本研究成果は、神経科学の重要課題であるプレシナプスにおける分子局在機構解明の基盤となり、高等動物の複雑な神経系の理解にも大きく寄与するものです。

プレシナプス VGCC の先天的な遺伝子変異は、家族性偏頭痛 1 型、反復発作性失調症 2 型、脊髄小脳変性症など複数の遺伝性疾患の原因となることが知られています。また、近年の自閉症患者家系のゲノムワイド多型解析から、RBP 及び RIM の自閉症発症への関与が示唆されています。したがって、本研究の知見とそれに基づく今後の研究展開は、シナプス病の発症メカニズムの理解という面でも重要です。

さらに、本研究で用いた線虫 RIMB-1/RBP、UNC-10/RIM、VGCC に関する実験系はそれらの疾患

に対する創薬研究モデル系として応用できる可能性もあります。線虫は遺伝学的解析に長けた実験動物であり、最近では薬剤探索のプラットフォームとしての有用性も注目されています。遺伝学的手法を駆使した関連遺伝子探索による新たな創薬ターゲットの導出、あるいは薬剤スクリーニング系への活用によって、精神・神経疾患治療薬のシーズ発見に貢献することが期待されます。

## 論文情報

論文名 RIMB-1/RIM-binding protein and UNC-10/RIM redundantly regulate presynaptic localization of the voltage-gated calcium channel in *C. elegans* (線虫 RIMB-1/RIM 結合タンパク質と UNC-10/RIM は電位依存性カルシウムチャネルのプレシナプス局在を冗長的に制御する)  
著者名 榎引勇人<sup>1</sup>, 鈴木利治<sup>1</sup>, Yishi Jin<sup>2</sup>, 多留偉功<sup>1</sup> (<sup>1</sup>北海道大学大学院薬学研究院, <sup>2</sup>カリフォルニア大学サンディエゴ校)  
雑誌名 Journal of Neuroscience (神経科学の専門誌)  
DOI 10.1523/JNEUROSCI.0506-19.2019  
公表日 2019年9月17日(火) (オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院薬学研究院 准教授 多留偉功 (たるひでのり)

T E L 011-706-3916 F A X 011-706-4991 メール taru@pharm.hokudai.ac.jp

U R L [https://www.pharm.hokudai.ac.jp/lab\\_03.html](https://www.pharm.hokudai.ac.jp/lab_03.html)

## 配信元

北海道大学総務企画部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北8条西5丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimu.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

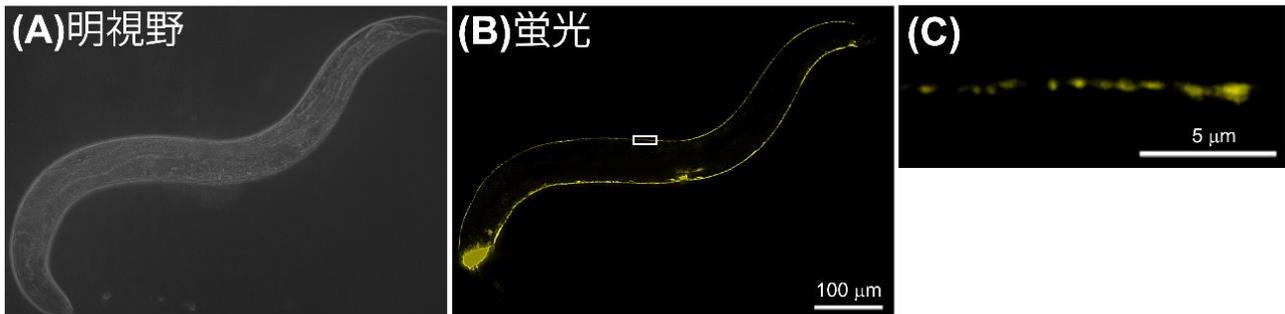


図 1. 線虫 *シー・エレガンス* におけるプレシナプスの蛍光観察。蛍光タンパク質標識したプレシナプス分子を発現させたトランスジェニック線虫 (A) では、生きたまま蛍光顕微鏡下で特定の神経細胞のプレシナプスが観察でき (B: 黄色輝点), 高倍率観察によって単一のプレシナプス構造 (C: 各黄色輝点) を可視化できる。

(A) 野生型 (B) RIMB-1変異 (C) UNC-10変異 (D) RIMB-1;UNC-10二重変異

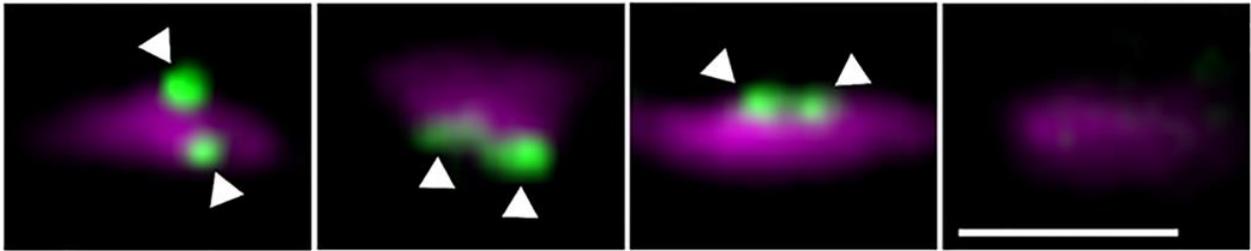


図 2. プレシナプスにおける VGCC の局在。野生型 (A), RIMB-1 変異体 (B), UNC-10 変異体 (C) において, VGCC (緑色) はプレシナプスの部位 (紫色) に局在する (白三角)。しかし, RIMB-1; UNC-10 二重変異線虫 (D) では, プレシナプス部位における VGCC 局在量が減少する。スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ 。

(A) 野生型 (B) VGCC変異

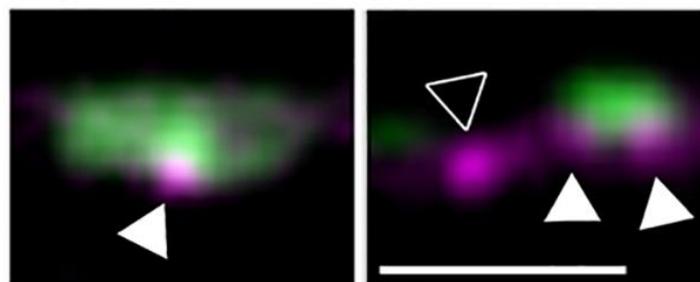


図 3. プレシナプスにおける RIMB-1 の局在。野生型 (A) では RIMB-1 (紫色) の局在がプレシナプス部位 (緑色) にのみ観察される (白三角)。一方, VGCC 変異線虫 (B) においては RIMB-1 の集積がプレシナプス部位 (白三角) 以外の領域にも認められた (黒三角)。スケールバー: 5  $\mu\text{m}$ 。