



Title	電位依存性Ca ²⁺ チャネルのプレシナプスへの集積は足場タンパク質RIMB-1/RIM-binding proteinとUNC-10/RIMにより冗長的に制御される [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	櫛引, 勇人
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第13961号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77826
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuto_KUSHIBIKI_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏 名 櫛 引 勇 人

学 位 論 文 題 名

電位依存性 Ca^{2+} チャネルのプレシナプスへの集積は
足場タンパク質 RIMB-1/RIM-binding protein と UNC-10/RIM により冗長的に制御される

【序論】脳神経情報伝達を担うシナプス結合は情報の出力側であるプレシナプスと入力側であるポストシナプスから構成される。プレシナプスには多様な足場タンパク質が局在し、cytomatrix at active zone(CAZ)と呼ばれるマトリックス様の分子複合体を形成する。CAZ タンパク質は電位依存性カルシウムチャネル(voltage-gated Ca^{2+} channel, VGCC)をはじめとする機能分子やシナプス小胞(synaptic vesicle, SV)をプレシナプスに集積させ効率的なシナプス伝達を実現する。所属研究室ではモデル動物線虫 *C. elegans* を用いて CAZ タンパク質の生理機能を解析している。CAZ タンパク質 RIM-binding protein(RBP)は VGCC 結合タンパク質であり、キイロショウジョウバエにおいて VGCC のプレシナプスへの集積を制御することが知られている。線虫 RBP ホモログは *rimb-1* という遺伝子にコードされているが、詳細な生理機能は不明であった。私は本研究において、RIMB-1 の分子性状・生理機能を明らかにするとともに、これまで線虫において不明であった CAZ タンパク質による VGCC 局在制御メカニズムの解明を試みた。

【結果】まず RIMB-1 の発現組織を解析し、*rimb-1* プロモーター配列の神経組織特異的な活性を確認した。また、線虫 RNA を用いた RT-PCR により 2 種類の *rimb-1* mRNA スプライシングアイソフォームの存在を確認した。次に RIMB-1 の細胞内局在を明らかにするため、蛍光タンパク質融合 RIMB-1 を 1 細胞種レベルでトランスジェニック発現させ、プレシナプスタンパク質との共局在を解析した。その結果、RIMB-1 は SV タンパク質や CAZ タンパク質と共局在した。よって RIMB-1 は神経組織特異的に 2 種類のアイソフォームを発現し、プレシナプスに局在する CAZ タンパク質であるという発現様式および分子性状を明らかにした。

次に RIMB-1 の生理機能について、所属研究室で単離された *rimb-1* ナンセンス変異線虫(以下 *rimb-1* 変異線虫)を用いて解析した。*rimb-1* 変異線虫が野生型と比べ有意に運動能力が低下することを定量的に示した。さらに薬理行動解析によりシナプス伝達効率を解析し、*rimb-1* 変異線虫は野生型と比べ有意にシナプス伝達が低下することを示した。この運動能力とシナプス伝達の低下は神経特異的 RIMB-1 トランスジェニック発現により回復したため、RIMB-1 は神経組織においてシナプス伝達を担うと考えられる。CAZ タンパク質は SV や VGCC をはじめとする機能分子をプレシナプスに集積させることで機能する。しかし *rimb-1* 変異線虫では顕著な SV タンパク質や CAZ タンパク質、UNC-2/VGCC の局在異常は確認されなかった。一方、神経特異的 RIMB-1 トランスジェニック発現により、UNC-2 のプレシナプス局在が非トランスジェニック発現線虫と比べ優位に増加した。よって RIMB-1 は UNC-2/VGCC 局在を制御すると考えられる。

rimb-1 変異線虫では UNC-2 局在が正常であったため、別のタンパク質による局在制御の機能補償を想定した。そこで私は *rimb-1* とプレシナプスタンパク質をコードする遺伝子の二重変異体の解析や、順遺伝学的な *rimb-1* 変異の表現型を増強する遺伝子のスクリーニングを

行った。その結果、*rimb-1; unc-10* 二重機能低下型変異線虫において UNC-2 のプレシナプス局在異常が観察された。UNC-2/VGCC マーカーの定量的な解析および超解像顕微鏡解析により、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫では UNC-2 はプレシナプス内で拡散することが明らかとなった。そして構造機能相関解析を行い、UNC-2 プレシナプス局在制御を含む RIMB-1 の生理機能に C 末端側の SH3 ドメインが必要であることを明らかにした。

さらに RIMB-1 のプレシナプス局在に必要な遺伝子を探索した。その結果、UNC-10 とプレシナプスに局在する UNC-2 が正常な RIMB-1 局在に必要なことが示唆された。

【考察】本研究において CAZ タンパク質 RIMB-1/RBP が、同じく CAZ タンパク質である UNC-10/RIM と冗長的に UNC-2/VGCC プレシナプス局在を制御するという重要な生理機能を持つことを明らかにし、これまで不明であった線虫プレシナプスタンパク質による UNC-2 局在制御を解明した。また構造機能相関などの解析により、RIMB-1 はプレシナプスで UNC-2 を係留し、神経伝達に寄与することが示唆された。さらに RIMB-1 と UNC-2 が双方向的に局在を制御しあうことから、RIMB-1/RBP, UNC-10/RIM, UNC-2/VGCC が密接に互いの局在を制御し線虫プレシナプス形成の基盤となることを見出した。