HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	電位依存性Ca2+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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77828
Type	doctoral thesis
File Information	Yuto_KUSHIBIKI.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士学位論文

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

櫛引　勇人

北海道大学大学院生命科学院

生命科学専攻　生命医薬化学コース

神経科学研究室

2020 年 3 月

目次

1. 略語一覧・注記 p.2

2. 序論 p.3-5

3. 実験結果 p.6-22

4. 考察 p.23-32

5. 実験手法 p.33-37

6. 参考文献 p.38-46

7. 図表 p.47-74

8. 謝辞 p.75

略語一覧・注記

略語

SV: synaptic vesicle
CAZ: cytomatrix at the active zone
VGCC：voltage-gated calcium channel
RIM：Rab3-interacting molecule
RBP：RIM-binding protein
SH3：Src homology 3
FN3：Fibronectin 3
tag: temporarily assigned gene name
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
GABA: gamma-aminobutyric acid
DD: dorsal D
VD: ventral D
AchE: acetylcholinesterase
Ach: acetylcholine
PDZ: PSD-95 (a 95 kDa protein involved in signaling at the post-synaptic density), DLG (the Drosophila melanogaster Discs Large protein) and ZO-1 (the zonula occludens 1 protein involved in maintenance of epithelial polarity)
PRM: proline-rich motif
PBM: PDZ domain-binding motif
FHM1: familial hemiplegic migraine type 1
EA2: episodic ataxia type 2

注記

遺伝子名および遺伝型は小文字イタリック体で表記し、タンパク質名は大文字で表記する。
ex) *rimb-1*：遺伝子名
RIMB-1:タンパク質名

序論

脳神経系は多数の神経細胞から構成されている。ヒトでは数百億個もの神経細胞が存在すると推測されており、これらの秩序だった情報伝達により、我々の生存が支えられている。シナプス結合は情報伝達に特化した細胞間接着構造であり、神経細胞と神経細胞あるいは他種細胞との間に形成される。シナプス結合は情報の出力側であるシナプス前部（プレシナプス）と入力側であるシナプス後部（ポストシナプス）から構成される。

シナプス結合における情報伝達は以下のように行われる。まず神経伝達物質を内包したシナプス小胞(synaptic vesicle, SV)がプレシナプスに貯留される。これらの SV は細胞膜の脱分極に応じて、アクティブゾーンと呼ばれる局所的な細胞膜領域で膜融合し、神経伝達物質を放出する。そして放出された神経伝達物質はポストシナプス膜状の受容体と結合し、ポストシナプスへ情報が伝達される(Fig. 1A)。

機能的なシナプスの形成・維持は脳神経系の情報伝達ひいては個体の生存に必要であり、シナプスの形成・維持メカニズムの分子レベルでの理解は神経科学の重要な課題である。さらにシナプス形成・機能異常は学習障害や発達障害、そしてシナプス病と総称される神経疾患の原因とされるため、神経疾患治療法の確立においても分子メカニズムの理解は大きな重要性をもつ。

プレシナプスアクティブゾーンには多種多様な足場タンパク質群が局在し(Südhof, 2012)、これらは cytomatrix at the active zone (CAZ)と呼ばれる分子マトリックスを形成する(Fig. 1B)。これら CAZ タンパク質群は分子間相互作用によりシナプス小胞や機能タンパク質をアクティブゾーンに集積させ、効率的かつ恒常的なシナプス伝達を実現する(Fig. 1B, Dresbach *et al.*, 2001; Schoch and Gundelfinger, 2006; Südhof, 2012; Ackermann *et al.*, 2015)。したがって個々の CAZ タンパク質がどのように機能し、かつこれらがどのようにプレシナプスへ局在するか明らかにすることがプレシナプス機能を分子レベルで理解するうえで必須である。我々の所属研究室ではモデル動物線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた遺伝学的手法により CAZ タンパク質をはじめとするシナプスタンパク質の生理機能を明らかにしてきた(Dai *et al*, 2006; Taru and Jin, 2011)。

CAZ タンパク質によりアクティブゾーンに集積する重要な機能タンパク質の一つとして電位依存性カルシウムチャネル（voltage-gated calcium channel, VGCC）が知られている。VGCC は Ca^{2+}イオン透過性の主サブユニットα1 と補助サブユニットα2δ, β, γから構成されるヘテロ多量体である(Fig. 1B)。プレシナプスに局在する VGCC はα1 サブユニットとして P/Q 型 Cav2.1 と N 型 Cav2.2 を持ち、細胞膜の脱分極に応じて開口する。流入した Ca^{2+}イオンは SV の膜融合を誘導し、神経伝達物質の放出を駆

動する。Ca^{2+}イオンは濃度依存的に放出を制御するため、VGCC による開口放出は即時的かつ局所的に行われる（Fig. 1B, Simms and Zamponi, 2014）。したがって、VGCC のアクティブゾーンへの集積は正常なプレシナプスの機能および神経情報伝達に必須である。

これまで VGCC 結合 CAZ タンパク質として Rab3-interacting molecule(RIM)(Kaeser *et al.*, 2011), ELKS (Kiyonaka *et al.*, 2012), CASK, X11/Mint (Maximov *et al.*, 1999), RIM-binding protein (RBP) (Hibino *et al.*, 2002)が同定されており、VGCC α1 の開口やそれに伴う神経伝達物質の放出、そしてプレシナプスへの局在に関与することが明らかにされている(Kittel *et al.*, 2006; Kaeser *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Graf *et al.*, 2012; Davydova *et al.*, 2014)。しかしながら CAZ タンパク質がどのように VGCC 局在を制御するのか詳細な制御メカニズムは不明であった。

線虫において Cav2 は *unc-2* という遺伝子にコードされ、神経伝達に必要とされる(Schafer and Kenyon, 1995; Mathews *et al.*, 2003)。これまでの報告から UNC-2 がプレシナプスアクティブゾーンに局在すること、線虫を用いた順遺伝学的スクリーニングによって UNC-2 の細胞体からの輸送に *unc-36*/VGCCα2δや小胞体タンパク質 *calf-1* が必要とされることが明らかにされている(Saheki and Bargmann, 2009)。しかしながら、*unc-10*/RIM をはじめとする CAZ タンパク質の単独機能低下型変異線虫において UNC-2 は正常にプレシナプスへ局在し(Saheki and Bargmann, 2009)、UNC-2 局在に必要な線虫プレシナプスタンパク質は同定されていなかった。

VGCC 結合 CAZ タンパク質のひとつである RIM-binding protein（RBP）は CAZ タンパク質 RIM の結合分子として同定された(Wang *et al.*, 2000)。RBP ファミリーは線虫から哺乳類まで一次構造が高度に保存されており、いずれも複数の Src homology 3(SH3)ドメインと Fibronectin 3(FN3)ドメインを持つ。マウス RBP は RIM のほか、SH3 ドメインを介して Cav2 と直接結合することが知られている(Fig. 1C, Hibino *et al.*, 2002; Kaeser *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014)。これまでキイロショウジョウバエを用いた生理機能解析により、RBP が神経筋接合部の形成や cacophony/Cav2 のプレシナプスへの局在に関与(Liu *et al.*, 2011)し、シナプス伝達の恒常性を担うことが明らかにされていた(Müller *et al.*, 2015)。線虫において RBP ホモログをコードする遺伝子として *rimb-1* という遺伝子の存在が予測されていたが、詳細な分子性状や発現様式、生理機能は未解明であった。

そこで私は本研究において、線虫 RBP ホモログ RIMB-1 の分子性状や発現様式、生理機能の解明を目的として研究を行った。その結果 RIMB-1 が UNC-2 のプレシナプスへの局在を制御する CAZ タンパク質であり、同じく CAZ タンパク質である UNC-10/RIM と冗長的（重複的）に UNC-2 のプレシナプス局在を制御することが明

らかになった。さらに、RIMB-1 のプレシナプス局在について分子機構を解析した結果、RIMB-1 のプレシナプスへの限定的な局在に UNC-2 のプレシナプスへの局在が必要であることが明らかとなった。

実験結果

RIMB-1 は神経系に汎く発現するプレシナプスタンパク質である

rimb-1 は以前 *tag-168* という遺伝子名が与えられていた。トランスクリプトーム解析から *rimb-1*/*tag-168* の神経系での発現が予測されており(https://wormbase.org)、*rimb-1*/*tag-168* CDS の上流ゲノム領域は神経系の発現プロモーター配列として用いられている(Macosko *et al.*, 2009)。私は *rimb-1* の発現組織を明らかにするため、*rimb-1* CDS の 5.1 kb 上流のゲノム配列の制御下で mCherry を発現するトランスジェニック線虫を作成、mCherry タンパク質のシグナルを観察した(Fig.2A)。その結果、mCherry のシグナルが全身の神経細胞で観察された。しかし、腸や筋肉など他の組織では mCherry シグナルは観察されなかった（Fig.2B)。さらに神経組織における mCherry シグナルの発現を詳細に観察した結果、感覚神経や介在神経が集まる頭部神経節(Fig.2C)、尾部神経節（Fig.2D)、そして運動神経が存在する背側および腹側の神経束（Fig.2E）のいずれにおいても mCherry シグナルが観察された。以上より *rimb-1* の遺伝子発現は神経特異的であり、全身の神経細胞で *rimb-1* 遺伝子が発現することが明らかとなった。

次に RIMB-1 の分子性状について解析した。これまで RIMB-1 の mRNA 配列が NCBI データベースに登録されており、2 種類のアイソフォームの存在が予測されていた（NM_065058.1, NM_065058.3)。そこで野生型 Bristol N2 線虫のトータル RNA を鋳型とし、RIMB-1 の mRNA 各アイソフォームを特異的に認識するプライマーを用いて RT-PCR を行い、cDNA をサブクローニングした(Fig. 3A)。cDNA 配列を確認し、２種類のアイソフォームの mRNA がいずれも発現していることを明らかにした(Fig. 3A)。単離した 2 種類のスプライシングアイソフォームをそれぞれ *rimb-1a*, *rimb-1b* と名付けた(現行の NCBI データベース上では *rimb-1a* : NM_065058.4, *rimb-1b* : GenBank MK431866 として登録されている)。公開されている RNA シーケンスデータベースをもとに各アイソフォームの遺伝子発現を比較すると、*rimb-1a* は *rimb-1b* より発現量が多く、主要に発現するアイソフォームであると考えられる(Fig. 3A, https://wormbase.org)。*rimb-1a* と *rimb-1b* がコードするタンパク質は一次構造がほぼ同様であるが、C 末端のアミノ酸配列がわずかに異なっていた（Fig.3A)。いずれの RIMB-1 タンパク質も 3 つの SH3 ドメインと 2 つの FN3 ドメインをもつ。1 つ目の SH3 ドメイン（SH3-I）は N 末端に存在し、続けて 2 つの FN3 ドメインが（FN3-I, FN3-II)、そして C 末端側に 2 つの連続した SH3-III ドメインが位置する（SH3-II, SH3-III）(Fig.3A)。この機能ドメインの構成は、マウスやキイロショウジョウバエに発現する RBP ファミリータンパク質と類似する(Fig. 1C)。配列の相同性を解析したところ、*C. elegans* RIMB-1 はマウス RBP2, *Drosophila* RBP (RBP)と、それぞれ 34%、33%の配列相同性を持つことが明らかとなった。マウス RBP は SH3 ドメインを介

し、Cav2 と結合するが、特に 3 番目の SH3 ドメイン(SH3-III)が最も結合親和性が高い(Fig.1C, Hibino *et al.*, 2002)。RIMB-1 と RBP2 の SH3-III ドメインのみの配列相同性は 61%であり、全長同士を比較した場合よりも高い配列相同性を示していた。

次に RIMB-1 タンパク質の神経細胞内での局在について、1 細胞レベルで解析した。モデル細胞として D 運動神経（以下 D 神経）を用いた。D 神経は GABA 作動性運動神経の一群であり、腹側に存在する細胞体が、軸索を腹側あるいは背側に投射し、筋細胞との間に神経筋接合部と呼ばれるシナプス結合を形成、筋弛緩により正常な運動の一端を担う(White *et al.*, 1986)。D 神経は軸索の投射が背側か腹側化によって 2 つのサブタイプに分類され、それぞれ dorsal D(DD)神経と ventral D (VD)神経と呼ばれる。いずれのサブタイプも軸索に沿ってプレシナプスを形成する（Fig.3B)。私は RIMB-1 の D 神経における局在を解析するため、*unc-25*/GAD1 プロモーター(Jin *et al.*, 1999)制御下で GABA 作動性神経特異的に mCherry 融合 RIMB-1a, RIMB-1b を発現するトランスジェニック線虫を作成した。その結果、mCherry-RIMB-1a、mCherry-RIMB-1b はいずれも腹側、背側の軸索に小さな輝点として分布した(Fig. 3C)。次に RIMB-1 輝点が細胞内のどの領域に局在するか解析した。マウスやキイロショウジョウバエの RBP はプレシナプスアクティブゾーンに局在する(Hibino *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014)。そこで RIMB-1 もプレシナプスに局在するか検証するため、*unc-25*/GAD1 プロモーター制御下で GABA 作動性神経特異的にｍCherry-RIMB-1 とプレシナプスマーカーである SV タンパク質 GFP 融合 SNB-1/VAMP2 を共発現するトランスジェニック線虫を作成、輝点の共局在を検証した。観察の結果、このトランスジェニック線虫において、mCherry-RIMB-1a、 mCherry-RIMB-1b のほぼ全ての輝点は SNB-1-GFP の輝点と共局在することを明らかにした（Fig.3D, F)。次に RIMB-1 がアクティブゾーンに局在するか検証した。アクティブゾーンマーカーとして使用される CAZ タンパク質 UNC-10/RIM と SYD-2/ Liprin-α は DD 神経軸索上で細かい輝点として分布する(Zhen and Jin, 1999; Koushika *et al.*, 2001; Yeh *et al.*, 2005)。ｍCherry-RIMB-1 と UNC-10-GFP あるいは SYD-2-GFP を *unc-25* プロモーター制御化で共発現するトランスジェニックにおける輝点の共局在を観察した。このトランスジェニック線虫においてほぼすべての mCherry-RIMB-1 の輝点は UNC-10-GFP および SYD-2-GFP の輝点と共局在した(Fig.3E, G, H)。以上の結果は RIMB-1a, RIMB-1b がいずれもプレシナプスアクティブゾーンへ局在することを示す。

CAZ タンパク質である UNC-10 は軸索上だけでなく、樹状突起上にも局在しうる(Patricia *et al.*, 2013)。そこで RIMB-1 も樹状突起上に局在しうるか解析した。線虫の L1 幼虫期では D 神経のうちＤＤ神経のみが形成され、腹側に軸索、背側に樹状突起がそれぞれ形成される（Kurup and Jin, 2016)。そこで、GABA 作動性神経特異的に

mCherry- RIMB-1 と SNB-1-GFP を共発現するトランスジェニック線虫のＬ１幼虫期において DD 神経の軸索、樹状突起における輝点の分布を解析した。その結果、mCherry-RIMB-1a、mCherry-RIMB-1b は腹側に輝点として観察され、SNB-1-GFP と共局在した(Fig.3I, K)。さらに、mCherry-RIMB-1a、mCherry-RIMB-1b のシグナルは背側にも観察された。この領域では SNB-1-GFP のシグナルは観察されなかった(Fig.3J, K)。したがって、L1 幼虫期において RIMB-1a, RIMB-1b は軸索だけでなく、樹状突起にも局在しうると考えられる。

以上より、RIMB-1 は神経特異的かつ全身の神経細胞において発現し、遺伝子産物として少なくとも２種類のアイソフォームを産生、プレシナプスアクティブゾーンへの局在に加え、樹状突起にも局在しうるという発現様式が明らかとなった。さらに一次構造を解析し、RIMB-1a、RIMB-1b のいずれのアイソフォームも他生物種に発現する RBP ファミリーと同様の機能ドメインから構成されるという分子性状を明らかにした。

RIMB-1 の機能低下は軽度の神経機能低下を示す

次に RIMB-1 の生理機能を明らかにするため、*rimb-1* 遺伝子変異線虫の解析を行った。この変異線虫がもつ対立遺伝子 *gk452845* は SH3-I が存在するエキソンの中に未成熟終止コドンが出現するナンセンス変異であり、RIMB-1 の機能欠損が起こると予想される（Fig.3A)。*rimb-1(gk452845)*変異線虫は身体の形状や成長に大きな異常が観察されなかった。

unc-2/Cav2 や *unc-13*/Munc13 のように神経伝達に必須な遺伝子の機能低下型変異線虫は顕著な不動化を示す（Mathews *et al.*, 2003; Richmond JE *et al.*, 1999)。しかし、*rimb-1* 変異線虫は培地上で明確な行動異常を示さなかった。次に RIMB-1 が正常な運動機能に必要であるか、*rimb-1* 変異線虫の運動能力の定量解析により検証した。線虫は水中で体の折り曲げ運動を行うため、この屈折運動を指標として運動能力を定量化した。解析の結果、*rimb-1* 変異線虫は野生型と比べ有意に少ない屈折頻度を示したため(Fig. 4A: *rimb-1*)、*rimb-1* 変異線虫は運動能力が低下しており、RIMB-1 が正常な運動能力を制御すると考えられる。次に、RIMB-1 が神経系において正常な運動機能を制御するか検証するため、*rgef-1*/RASGRP3 プロモーター(Altun-Gultekin *et al.*, 2001)の制御下で N 末端 FLAG 融合 RIMB-1b を神経特異的に発現させたトランスジェニック線虫の運動能力を解析した。RIMB-1 発現トランスジェニック線虫は、非トランスジェニック線虫同様の行動を培地上で示した。水中の行動にも違いは見られず、屈折頻度に有意差が認められなかった(Fig.4A: *Ex[RIMB-1]*)。一方、RIMB-1 過剰発現により、*rimb-1* 変異線虫で見られた屈折頻度の減少は回復し、野生型と同程度になった(Fig. 4A: *rimb-1;Ex[RIMB-1]*)。よって *rimb-1(gk452845)*変異は RIMB-1 の

機能低下により軽度の運動異常を起こすと考えられ、RIMB-1 は神経系において個体の正常な運動に必要であると考えられる。

次に RIMB-1 がシナプス伝達に関与するか検証するため、*rimb-1* 変異線虫のシナプス伝達能を薬理学的に検証した。アセチルコリンエステラーゼ（acetylcholinesterase, AchE）阻害剤アルジカルブを用いることで線虫のシナプス伝達能を解析できる (Nguyen *et al.*, 1995)。神経伝達物質アセチルコリン(acetylcholine, Ach)はシナプス間隙に放出されたのち AchE により分解される。AchE 阻害剤であるアルジカルブの投与により Ach はシナプス間隙に蓄積し、線虫は急性の麻痺症状を示し、死亡する（Fig. 4B)。一方、コリン作動性神経でのシナプス伝達が低下する遺伝子変異線虫はアルジカルブ処理後、長時間生存する(Nguyen *et al.*, 1995)。*rimb-1* 変異線虫のアルジカルブ処理の行動を解析した結果、野生型と比べ生存時間が有意に延長した(Fig. 4C: *rimb-1*)。よって *rimb-1* 変異線虫ではアセチルコリン作動性神経におけるシナプス伝達が低下していると考えられる。しかし、プレシナプスからの神経伝達物質の放出が著しく減少する *unc-10* 機能欠損型変異線虫や *unc-2* 機能欠損型変異線虫と比べ、*rimb-1* 変異線虫のアルジカルブ処理後の生存時間の延長の程度は小さかった(Fig. 4D, 6E)。よって、*rimb-1* 変異線虫におけるシナプス伝達の低下は軽微であることが示唆された。次に RIMB-1 が神経系でシナプス伝達を制御するか検証するため、*rgef-1* プロモーター制御化で神経特異的に RIMB-1 を過剰発現するトランスジェニック線虫のアルジカルブ処理後の行動を解析した。その結果、RIMB-1 発現トランスジェニック線虫はアルジカルブ処理後の生存時間が有意に短縮した(Fig. 4C: *Ex[RIMB-1]*)。また RIMB-1 の過剰発現により、*rimb-1* 変異線虫におけるアルジカルブ処理後の生存時間の延長が回復した。また、RIMB-1 を過剰発発現させた野生型線虫と、RIMB-1 を過剰発発現させた *rimb-1* 変異線虫は、アルジカルブ処理後の生存時間が同程度であった (Fig. 4C: *rimb-1;Ex[RIMB-1]*)。よって、神経特異的な RIMB-1 の過剰発現によりシナプス伝達が亢進し、*rimb-1* 変異線虫におけるシナプス伝達の低下が回復すると考えられる。以上より、RIMB-1 は神経系において、影響は小さいが、シナプス伝達を制御することが示された。

CAZ タンパク質 *unc-10* の機能欠損型変異線虫では SV の膜融合が損なわれる (Koushika *et al.*, 2001)。そこで RIMB-1 によるシナプス伝達制御と UNC-10 による制御機構の関係性を検証するため、RIMB-1 を神経特異的に過剰発現する *unc-10* 機能欠損型変異線虫を作成し、アルジカルブ処理後の生存時間への影響を解析した。*unc-10* 変異線虫は野生型と比べアルジカルブ処理後の生存時間は顕著に延長した(Fig. 4D: *unc-10*)。そして RIMB-1 の過剰発現により *unc-10* 機能欠損型変異線虫の生存時間が有意に短縮した(Fig. 4D: *unc-10; Ex[RIMB-1]*)。よって、UNC-10 の機能欠損により SV 膜融合が損なわれた場合でも、RIMB-1 過剰発現によりシナプス伝達が亢進すると

考えられる。

RIMB-1 はプレシナプスタンパク質の細胞内局在を制御しうる

CAZ タンパク質はプレシナプスへの SV の貯留や CAZ の形成を担い、正常なプレシナプス形成に寄与する(Südhof, 2012)。そこで、RIMB-1 も同様の生理機能を持つか検証するため、*rimb-1* 変異線虫における SV タンパク質や CAZ タンパク質の局在を解析した。*unc-25* プロモーター制御下で SV タンパク質 SNB-1-GFP、CAZ タンパク質 SYD-2-GFP を GABA 作動性神経特異的に発現するトランスジェニック線虫を用いて、DD 神経軸索上のプレシナプスタンパク質の分布を解析した。その結果、軸索上の分布は SNB-1-GFP、SYD-2-GFP、UNC-10-GFP のいずれの輝点も、野生型と *rimb-1* 変異線虫の間に大きな違いが観察されなかった(Fig. 4E-G)。また SNB-1-GFP の輝点数を定量解析したが、野生型と *rimb-1* 変異線虫の間に有意差は認められなかった(Table 1)。

そこで、私は *rimb-1(gk452845)*ナンセンス変異線虫において RIMB-1 機能が完全に喪失していない可能性を考え、*rimb-1* 配列が完全欠損した変異線虫を用いて解析した。*gkDf40* という巨大欠失変異により、*rimb-1* を含む 28 タンパク質をコードする 200 kbp のゲノム領域が欠損する。*gkDf40* 変異線虫は *rimb-1* ナンセンス変異線虫同様、身体の形状や成長、培地上の行動は正常であった。また、DD 神経軸索における SV タンパク質 SNB-1-GFP の分布も野生型と同様であり、大きな異常は観察されなかった(Fig. 5E, Table 1)。以上より、*rimb-1* 機能欠損線虫において SV タンパク質や CAZ タンパク質の分布に大きな異常が観察されず、SV のプレシナプスへの貯留や CAZ の形成に大きな異常が生じないと考えられる。

CAZ タンパク質をはじめ、プレシナプスタンパク質は複雑な分子間相互作用により互いに密に結合するため(Südhof, 2012)、重複的（冗長的）に機能することが予想される。そこでプレシナプス形成に重要な機能を持つ主要な 11 種のプレシナプスタンパク質と RIMB-1 の機能の冗長性を検証した。解析した 11 種のプレシナプスタンパク質は、CAZ タンパク質(SYD-2/Liprin-α、UNC-10/RIM、 UNC-13/Munc13、ELKS-1/ELKS/CAST)、プレシナプス形成制御因子（RhoGAP-like protein SYD-1, ubiquitin E3 ligase RPM-1, Serine/Threonine kinase SAD-1)、シナプス伝達制御タンパク質(UNC-2/Cav2、SNARE 複合体制御因子 UNC-18/Munc18)、マウス VGCC 結合タンパク質のホモログ(MAGUK proteins LIN-2/CASK、LIN-10/Mint)である。これらの遺伝子と *rimb-1* の二重機能低下型変異線虫を作成、表現型を解析し、冗長性を解析した。

まず培地上の行動を観察したところ、単独機能低下変異型線虫と比べ、行動に大きな違いがみられた二重変異線虫はなかった。

次に DD 神経における SV タンパク質 SNB-1-GFP の分布を解析した。解析に用いた単独変異線虫の中で、*syd-1, syd-2, rpm-1, sad-1* の単独機能低下型変異線虫では SNB-1-GFP の分布が顕著に異常になる(Fig. 5G, I, K, M, Hallam SJ *et al.*, 2002; Zhen and Jin; Zhen M *et al.*, 2000; Crump JG *et al.*, 2001)。しかし、単独変異線虫と比べ、分布に顕著な違いが観察された二重変異線虫はなかった(Fig. 5C, D, G-Z)。輝点の数について定量的に解析した結果、*unc-13; rimb-1* 二重変異線虫、*rimb-1; rpm-1* 二重変異線虫、*rimb-1; sad-1* 二重変異線虫、*rimb-1; unc-18* 二重変異線虫、*rimb-1; lin-2* 二重変異線虫において単独機能低下線虫よりも有意に輝点の数が少ないことが示された(Table 1)。以上より、*rimb-1* 変異により単独遺伝子変異線虫の SV タンパク質の分布異常が、わずかながらであるが、増強されたことが示された。よって、RIMB-1 は他プレシナプスタンパク質と冗長的に正常なプレシナプス形成を制御すると考えられる。

RBP はキイロショウジョウバエにおいて cacophony/Cav2 のプレシナプス局在を制御する(Liu *et al.*, 2011)。そこで、線虫においても RIMB-1/RBP が UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を制御するか検証した。*unc-25* プロモーター制御下で GFP-UNC-2 と SV タンパク質 mCherry-RAB-3 を GABA 作動性神経特異的に発現するトランスジェニック線虫では、DD 神経軸索上で GFP-UNC-2 は軸索に沿って細かい輝点として観察され、mCherry-RAB-3 と共局在し、主にプレシナプスに局在することが知られている（Fig. 6A, Saheki and Bargmann, 2009)。そこで UNC-2 のプレシナプスへの局在に RIMB-1 が必要であるか検証するため、*rimb-1* 変異線虫の DD 神経軸索上における GFP-UNC-2 局在を観察した。まず、*rimb-1(gk452845)*ナンセンス変異線虫における GFP-UNC-2 の輝点を観察したが、野生型同様、軸索上に細かい輝点として観察され、mCherry-RAB-3 と共局在し、大きな分布の異常は観察されなかった(Fig. 6B)。GFP-UNC-2 の輝点数を定量したが、野生型と *rimb-1(gk452845)*ナンセンス変異線虫の間に有意差はなかった(Fig.6D)。次に *rimb-1* 遺伝子を完全に欠損した *gkDf40* 変異線虫における GFP-UNC-2 の輝点を観察したが、野生型同様、軸索にわたって細かい輝点として観察され、mCherry-RAB-3 と共局在し、大きな分布の異常は観察されなかった（Fig. 8I, J)。以上より、*rimb-1* 機能低下により UNC-2/Ca_v2 のプレシナプス局在に大きな異常が生じないと考えられる。

更に RIMB-1 の発現量増加による UNC-2 プレシナプス局在への影響を検証するため、*rgef-1* プロモーター制御下で神経特異的に RIMB-1 を発現するトランスジェニック線虫における UNC-2 局在を観察した。その結果、RIMB-1 発現トランスジェニック線虫においても GFP-UNC-2 は DD 神経軸索上で細かい輝点として分布し、mCherry-RAB-3 と共局在した(Fig. 6C)。しかしながら RIMB-1 の過剰発現により、GFP-UNC-2 の輝点数は有意に増加した(Fig. 6D)。よって神経系における RIMB-1 の

発現量増加により UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在が増加することが示され、RIMB-1 が UNC-2 プレシナプス局在を正に制御することが示された。

神経特異的に RIMB-1 を発現するトランスジェニック線虫は、アルジカルブ処理後の生存時間が短縮し、シナプス伝達が亢進していると考えられる(Fig. 4C, D: *Ex[RIMB-1]*)。そこで、RIMB-1 発現トランスジェニック線虫のシナプス伝達の亢進が UNC-2 に依存するか検証した。方法として *unc-2* 機能欠損型変異線虫に *rgef-1* プロモーター制御下で RIMB-1 が神経特異的に過剰発現させ、アルジカルブ処理後の生存時間を測定した。*unc-2* 機能欠損線虫は、既に報告されているように、野生型線虫と比べアルジカルブ処理後の生存時間が顕著に延長する（Fig. 6E: *unc-2*, Miller *et al.*, 1996)。また野生型線虫に RIMB-1 を過剰発現すると、アルジカルブ処理後の生存時間が有意に減少する(Fig. 6E: *Ex[RIMB-1]*)。しかしながら、*unc-2* 機能欠損型変異線虫に RIMB-1 を過剰発現しても、RIMB-1 非過剰発現 *unc-2* 機能欠損型変異線虫と同様のアルジカルブ処理後の生存時間を示し、有意な生存時間の短縮は見られなかった(Fig. 6E: *unc-2; Ex[RIMB-1]*)。したがって RIMB-1 発現トランスジェニック線虫が示すアルジカルブ処理後の生存時間の短縮には、UNC-2 が必要であり、RIMB-1 は UNC-2/Cav2 を介しシナプス伝達を制御することが示唆された。

また、GFP-UNC-2 と FLAG-RIMB-1 を発現するトランスジェニック線虫を用いて免疫染色をしたところ、軸索上で GFP-UNC-2 由来の輝点と FLAG-RIMB-1 由来の輝点が共局在することを確認した(Fig. 6F)。この結果から RIMB-1 が生体内で UNC-2 の足場として働くことが示唆された。

以上の結果から、*rimb-1* 機能低下により SV タンパク質、CAZ タンパク質、UNC-2/Cav2 の細胞内局在に大きな異常が生じないことが示された。しかしながら二重機能低下型線虫の解析や RIMB-1 トランスジェニック線虫の解析から、他プレシナプスタンパク質の機能低下による SV タンパク質の局在異常が *rimb-1* 機能低下により増強すること、RIMB-1 の過剰発現により UNC-2 のプレシナプス局在が増加することが示された。よって RIMB-1 はプレシナプスタンパク質の正常な局在に関与し、機能的なプレシナプス形成に寄与すると考えられる。

RIMB-1 と UNC-10/RIM は UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を冗長的に制御する

上記の解析から、*rimb-1* 機能低下により UNC-2/Cav2 の局在に大きな異常が生じないが、RIMB-1 過剰発現により UNC-2 のプレシナプス局在が増加することを明らかにしている。そこで私は RIMB-1 が他のプレシナプスタンパク質と冗長的に UNC-2 プレシナプス局在を制御する可能性を想定し、プレシナプスタンパク質をコードする遺伝子と *rimb-1* の二重機能低下変異線虫における UNC-2 局在を観察し、局在異常が現れる二重変異線虫を探索した。解析した二重変異線虫は *rimb-1* と CAZ タンパク質

(SYD-2、UNC-10、 UNC-13、ELKS-1)およびプレシナプス形成制御因子（SYD-1, RPM-1, SAD-1)、シナプス伝達制御タンパク質(SNARE 複合体制御因子 UNC-18)、マウス VGCC 結合タンパク質ホモログ（LIN-2、LIN-10)をコードする遺伝子との二重機能低下型変異線虫である。UNC-2 局在解析には AWC 神経をモデルとして用いた。AWC 神経は頭部神経節の側方に位置する感覚神経細胞であり、軸索に沿ってプレシナプスを形成する(Fig.7A, White *et al.*, 1986)。AWC 神経に GFP-UNC-2 と SV タンパク質 mCherry-RAB-3 するトランスジェニック線虫において、GFP-UNC-2 は軸索に沿って複数の細かい輝点として集積し、mCherry-RAB-3 と共局在する(Fig. 7B, Saheki and Bargmann, 2009)。これまで AWC 神経における GFP-UNC-2 を指標とした順遺伝学的スクリーニングにより UNC-2 局在制御遺伝子が同定されてきた(Saheki and Bargmann, 2009)。

しかしながら、プレシナプスタンパク質の単独機能低下型線虫では GFP-UNC-2 局在が正常であることが報告されている（Saheki and Bargmann, 2009)。私は二重変異線虫の解析の前に、*rimb-1* を含むプレシナプスタンパク質の単独機能低下型線虫において GFP-UNC-2 局在異常が生じるか確認した。まず *rimb-1* 機能低下型変異線虫の AWC 神経における UNC-2 局在を解析したところ、*rimb-1(gk452845)*ナンセンス変異線虫と *rimb-1* 遺伝子を完全に欠損した *gkDf40* 変異線虫のいずれにおいても、GFP-UNC-2 は野生型と同様に、AWC 神経軸索上で細かい輝点として分布、mCherry-RAB-3 と共局在した(Fig. 7C, F)。10 種のプレシナプスタンパク質(UNC-10, SYD-2, UNC-13, ELKS-1, SYD-1, RPM-1, SAD-1, UNC-18, LIN-2, LIN-10)の単独機能低下型変異線虫においても、GFP-UNC-2 は軸索上で輝点として分布し、mCherry-RAB-3 と共局在した(Fig. 7D, H, J, L, N, P, R, T,V, X)。これらの単独変異線虫の AWC 神経軸索における UNC-2 局在を定量的に解析した(Table 1)。定量解析には軸索上の GFP-UNC-2 および SV タンパク質 mCherry-RAB-3 輝点の総面積を指標として用いた。まずmCherry-RAB-3 の輝点総面積を解析したところ、*gkDf40* 変異線虫、*unc-10* 変異線虫、*elks-1* 変異線虫、*rpm-1* 変異線虫、*unc-18* 変異線虫において野生型と比べ有意差な増加が認められた(Table 1)。しかしながら、UNC-2-GFP 輝点の総面積に野生型の間に有意差が認められた変異線虫はなかった(Table 1)。以上より、*rimb-1* を含むプレシナプスタンパク質の単独機能低下型線虫において、GFP-UNC-2 の顕著な局在異常が生じないことが確認された。

次に、RIMB-1 が他プレシナプスタンパク質と冗長的に UNC-2 局在を制御するか検証した。そのために *rimb-1* と上記 10 種のプレシナプスタンパク質の二重機能低下型変異線虫を作成し、AWC 神経軸索における GFP-UNC-2 のプレシナプス局在を観察した。観察の結果、*rimb-1(gk452845); unc-10* 二重機能低下型変異線虫において、mCherry-RAB-3 の輝点は軸索上に観察されたものの、軸索上の GFP-UNC-2 の輝点は著しく減少した(Fig. 7E)。また、*gkDf40; unc-10* 二重変異線虫においても同様に

GFP-UNC-2 の軸索上の輝点が顕著に減少した(Fig. 7G)。したがって、RIMB-1 と UNC-10 が UNC-2 の正常な局在を担うことが明らかとなった。解析に使用した *unc-10(md1117)*変異は機能欠損型変異であり、*rimb-1* を完全に欠損した *gkDf40* 変異同様、単独変異線虫において GFP-UNC-2 プレシナプス局在は正常であった。したがって *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫で UNC-2 局在異常が観察されたのは、RIMB-1 と UNC-10 による UNC-2 プレシナプス局在制御が冗長的であることを意味する。他の二重変異体では GFP-UNC-2 は軸索上で輝点として観察され、mCherry-RAB-3 と共局在し、GFP-UNC-2 のプレシナプス局在の著しい消失は観察されなかった（Fig. 7I, K, M, O, Q, S, U, W, Y)。

定性的な解析に加え、二重機能低下型変異線虫の AWC 神経軸索上における GFP-UNC-2、mCherry-RAB-3 の定量解析を行った。まずmCherry-RAB-3 輝点の総面積を解析したところ、*rimb-1; syd-1* 二重変異線虫および *rimb-1; lin-2* 二重変異線虫で、野生型および単独変異線虫と比べ、有意な増加が認められた(Table1)。一方、GFP-UNC-2 輝点の総面積は、*rimb-1(gk452845); unc-10* 二重変異線虫および *gkDf40; unc-10* 二重変異線虫においてのみ、野生型および単独変異線虫と比べ、有意な減少が認められた。これらの二重変異線虫において GFP-UNC-2 の総面積は野生型と比べ 90%以上減少した(Fig. 7B', Table1)。よって解析した遺伝子変異の中で *unc-10* 変異のみが *rimb-1* 変異の GFP-UNC-2 プレシナプス局在の表現型を増強することが定量的に示された。また *rimb-1(gk452845); unc-10* 二重変異線虫および *gkDf40; unc-10* 二重変異線虫では軸索上の GFP-UNC-2 の輝点は顕著に減少したが、軸索上の mCherry-RAB-3 輝点の総面積は野生型と比べ有意に増加した。したがって *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫における GFP-UNC-2 の輝点の減少は、プレシナプスの形成不全による副次的な作用によらないと考えられる。また、いずれの二重変異線虫においても細胞体での GFP-UNC-2 の蛍光シグナルは野生型と同様であり、輝度の減少など顕著な異常は認められなかった(Fig. 7E, G, Table1)。よって、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫における GFP-UNC-2 局在異常は GFP-UNC-2 の発現量低下によらないと考えられる。

さらに網羅的に *rimb-1* と冗長的に働く遺伝子を探索するため、*rimb-1* 変異線虫の AWC 神経における GFP-UNC-2 局在異常の増強を指標とした順遺伝学的なスクリーニングを行った。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫など UNC-2 プレシナプス局在異常を示す遺伝子変異線虫はいずれも、培地上での *unc-2* 機能欠損線虫様の不動化など、顕著な運動能力の低下を示す（Fig. 8H, Saheki and Bargmann, 2009)。そこで私は *rimb-1* 変異線虫に変異源であるメタンスルホン酸エチルを処理し、突然変異を導入した変異線虫の中から、一次スクリーニングとして培地上で顕著な運動機能の低下を示す線虫を拾い、二次スクリーニングとして GFP-UNC-2 局在異常を示す変異線虫を探索することで、スクリーニング系の効率化を図った。約 5,000 ハプロイド相当の突然変異

線虫をスクリーニングし、潜性変異 *nq47* を単離した。*rimb-1; nq47* 二重変異線虫は *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫と同様の行動異常を示し、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫と同様に GFP-UNC-2 の軸索上の輝点が顕著に減少した(Fig.7Z)。遺伝学的連鎖解析や相補性検定により対立遺伝子 *nq47* が *unc-10* の機能低下型変異であることを明らかにした。さらに詳細に *unc-10(nq47)*の分子性状を解析するため、*nq47* 変異線虫のゲノム配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。その結果、*unc-10* CDS の中央に未成熟終止コドンが存在することが確認されたため、*nq47* は *unc-10* のナンセンス変異であり、*nq47* 変異線虫において UNC-10 は機能低下すると考えられる (Fig.7A')。

rimb-1; unc-10 二重変異線虫において AWC 軸索上の GFP-UNC-2 輝点総面積が減少したが(Fig. 7E, G, Z, B')、どのような局在異常が生じているのか明らかにするため、より詳細な解析を行った。まず GFP-UNC-2 輝点の数や平均の大きさを解析したところ、野生型と *rimb-1(gk452845)*単独変異線虫および *unc-10* 単独変異線虫の間に有意差がなかったが、*rimb-1(gk452845); unc-10* 二重変異線虫は野生型、単独変異線虫と比べ有意な減少がみられた(Fig. 7C', D')。次に、軸索上での GFP-UNC-2 の発現量について、GFP の蛍光輝度量を指標に定量解析した。その結果、GFP の総蛍光輝度量は野生型、単独変異線虫、二重変異線虫の間に有意差は認められなかった。よって軸索上における GFP-UNC-2 の発現量は *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫において減少していないことが示された(Fig. 7E')。さらに軸索上の GFP-UNC-2 蛍光の 3D プロットを作成した。野生型では顕著なピークが確認された(Fig.7F': wild type)が、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫では明瞭なピークは観察されず、軸索全体に一様な低輝度のシグナルが確認された(Fig. 7F': *rimb-1; unc-10*)。以上の解析結果から、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫では GFP-UNC-2 が細領域に集積できず、軸索上に拡散して局在することが示唆された。

さらに超解像顕微鏡を用いて AWC 神経軸索における GFP-UNC-2 の分布を解析した。その結果、野生型、*rimb-1* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫では GFP-UNC-2 のシグナルは細かい輝点として観察され、これらの輝点は mCherry-RAB-3 と共局在した(Fig. 7G', H', I')。一方、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫では GFP-UNC-2 のシグナルは細かい輝点として観察されず、より大きな低輝度の輝点として分布した。しかしながら、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫においても GFP-UNC-2 のシグナルは mCherry-RAB-3 と共局在した(Fig. 7J')。

以上の結果をまとめると、線虫における UNC-2 のプレシナプス局在は RIMB-1 と UNC-10 によって冗長的に制御され、RIMB-1 と UNC-10 は UNC-2 をプレシナプス内の細領域に集積させることで局在を制御する。GFP-UNC-2 の輝点はプレシナプス内のアクティブゾーンと呼ばれる細領域に局在する(Saheki and Bargmann, 2009)た

め、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫では UNC-2 のアクティブゾーンへの集積が損なわれ、アクティブゾーン外を含めプレシナプス全体に拡散すると考えられる(Fig. 7K')。

ここまで私は RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM の二重欠損により UNC-2/Cav2 局在が異常になることを明らかにしてきた。近年、マウスの解析により、CAZ タンパク質 RIM と ELKS の多重機能欠損により Cav2 のプレシナプス局在が顕著に減少することが示されている(Wang *et al.*, 2016)。そこで線虫においても *elks-1*/ELKS と *unc-10*/RIM の二重機能欠損により、UNC-2/Cav2 局在が損なわれるか検証した。*elks-1; unc-10* 二重機能欠損型変異線虫の AWC 神経軸索における GFP-UNC-2 を観察したところ、GFP-UNC-2 は軸索上に輝点として観察され、顕著な局在異常が認められなかった(Fig. 7L')。よって、線虫はマウスと異なり、UNC-10/RIM と ELKS-1/ELKS の多重機能欠損により UNC-2/Cav2 局在の顕著な異常が生じないことが示された。

次に他神経細胞種においても、RIMB-1 と UNC-10 が UNC-2 プレシナプス局在を冗長的に制御するか検証した。*unc-25* プロモーター制御下で GABA 作動性神経特異的に GFP-UNC-2 と mCherry-RAB-3 を共発現するトランスジェニック線虫を用いて、野生型、*rimb-1* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の DD 神経軸索における GFP-UNC-2 局在を観察した。その結果、野生型や *rimb-1* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫と比較して、*rimb-1; unc-10* 二重変異体において GFP-UNC-2 の輝点数が顕著に減少した。一方、SV タンパク質 mCherry-RAB-3 の分布は、野生型、各単独変異線虫、二重変異線虫の間に大きな違いが観察されなかった(Fig.8A-D)。定量解析の結果、GFP-UNC-2 の輝点数は野生型、単独変異線虫の間に有意差が認められなかったが、*rimb-1; unc-10* 二重変異体において有意な減少が認められた。また、*rimb-1; unc-10* 二重変異体における GFP-UNC-2 輝点数は、野生型と比べ、約 60%減少した(Fig. 8G)。また、*gkDf40; unc-10* 二重変異線虫も *rimb-1(gk452845); unc-10* 二重変異線虫と同様の GFP-UNC-2 分布パターンを示し、野生型、*gkDf40* 変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫より顕著に GFP-UNC-2 輝点数が少なかった。一方、mCherry-RAB-3 の分布は二重変異線虫において大きな変化が観察されなかった（Fig. 8K)。以上より、DD 神経軸索においても RIMB-1 と UNC-10 が UNC-2 プレシナプス局在を冗長的に制御することが示された。

次に私は RIMB-1 の神経特異的発現が、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の GFP-UNC-2 輝点の減少を回復するか検証した。*rgef-1* プロモーター制御化で RIMB-1a、RIMB-1b を神経特異的に発現するトランスジェニック線虫を用いて、DD 神経軸索上の GFP-UNC-2 局在への影響を観察した。その結果、RIMB-1 の神経特異的な発現により、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫における GFP-UNC-2 輝点の減少は回復した。なお、RIMB-1a, RIMB-1b のいずれの過剰発現によっても回復することが確認された

(RIMB-1a: Fig. 8E, G, トランスジェニック 7 ライン中 7 ラインで回復、RIMB-1b: Fig. 10E, トランスジェニック 2 ライン中 2 ラインで回復)。さらに RIMB-1 による局在制御が細胞自律的であるか検証した。*unc-25* プロモーター制御下で GABA 作動性神経特異的に mCherry-RIMB-1a を発現するトランスジェニック線虫を作成、DD 神経軸索上の GFP-UNC-2 局在への影響を観察したところ、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の GFP-UNC-2 輝点の減少は回復した(Fig. 8F)。よって、RIMB-1 は細胞自律的に UNC-2 局在を制御することが示された。

RIMB-1 と UNC-10 は運動神経の UNC-2 プレシナプス局在を冗長的に制御する(Fig. 8A-D)。そこで運動機能も冗長的に制御するのか検証するため、水中の屈折運動を指標とした定量解析をおこなった。*rimb-1* 単独機能低下変異線虫は、野生型と比べ有意に水中の屈折運動が減少する（Fig. 8H: *rimb-1*)。*unc-10* 単独欠損変異線虫は SV 膜融合が損なわれ、神経伝達が低下するが(Koushika *et al.*, 2001)、水中の屈折運動も野生型と比べ有意に減少した（Fig. 8H: *unc-10*)。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫は *rimb-1* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫と比べ、いずれも有意に屈折頻度が減少し、二重変異により行動異常が増強することを確認した（Fig. 8H: *rimb-1; unc-10*)。よって、RIMB-1 と UNC-10 は運動機能も冗長的に制御することが明らかになった。また *unc-2* 単独機能欠損線虫は、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫より有意に屈折頻度が減少したため(Fig. 8H: *unc-2*)、*unc-2* 単独機能欠損線虫は、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫よりも運動機能が低下していることが示された。

また私はこれまでの解析から、プレシナプスタンパク質の機能低下による SV タンパク質の DD 神経における分布異常が、*rimb-1* 変異により増強することを明らかにしている(Fig. 5, Table 1)。そこで UNC-2 も DD 神経において *rimb-1* 変異による局在異常の増強がみられるか検証した。その結果、SV タンパク質局在異常が増強した Serine/Threonine kinase *sad-1*, *unc-13*/Munc13, *unc-18*/Munc18, ubiquitin E3 ligase *rpm-1* の二重機能低下線虫においても、GFP-UNC-2 は DD 神経軸索上で輝点として観察され、mCherry-RAB-3 と共局在し、顕著な局在異常が観察されなかった(Fig. 9A-D)。さらに、マウス VGCC 結合タンパク質ホモログ *lin-2*/CASK、*lin-10*/X11 と *rimb-1* の二重機能低下変異線虫における DD 神経軸索上の GFP-UNC-2 局在を観察した。しかし、いずれの二重変異線虫においても GFP-UNC-2 の顕著な局在異常は観察されなかった(Fig. 9E, F)。以上の結果は DD 神経においても、RIMB-1 と UNC-10/RIM が UNC-2 局在制御に中心的な役割を担うプレシナプスタンパク質であることを示唆する。

以上、*rimb-1* と候補遺伝子の遺伝学的相互作用解析と、順遺伝学的スクリーニングという独立した 2 つの遺伝学的解析により、2 種類の CAZ タンパク質 RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM が UNC-2/Ca_V2 のプレシナプスへの集積を担う主要なプレシナプス

タンパク質であり、冗長的に局在制御することが共通して明らかとなった。

C 末端部の SH3 ドメインが RIMB-1 の機能に必須である

RIMB-1 は 3 つの SH3 ドメインと 2 つの FN3 ドメインから構成される多機能ドメイン足場タンパク質である。そこで各機能ドメインが RIMB-1 の生理機能および局在に果たす役割を明らかにするため、機能ドメイン欠損 RIMB-1 コンストラクトを作成し、構造機能相関解析を行った。作成したコンストラクトは、1 番目の SH3 ドメインと 2 つの FN3 ドメインを含む N 末端を欠損した RIMB-1ΔN、2 - 3 番目の SH3 ドメインを含む C 末端側の半分を欠損した RIMB-1ΔC、C 末端にある 3 番目の SH3 ドメインを欠損した RIMB-1ΔSH3-III である(Fig.10A)。

まずこれらのコンストラクトの生理機能活性を検証するため、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫に、各 RIMB-1 コンストラクトを *rgef-1* プロモーター制御下で神経系に発現させ、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫が示す表現型のレスキュー能を解析した。レスキュー能の検証には複数のトランスジェニックラインを用いた。まず行動における表現型を解析した。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫は培地上で明確な行動異常を示すが、RIMB-1 全長、RIMB-1ΔN を発現する全てのトランスジェニックラインで回復した。一方、RIMB-1ΔC、RIMB-1ΔSH3-III を発現する全てのトランスジェニックラインでは行動異常は回復しなかった(Fig. 10A)。水中屈折頻度を指標とした運動能力の定量解析においても、RIMB-1 全長, RIMB-1ΔN の発現により運動能力の低下は回復した。一方、RIMB-1ΔC、RIMB-1ΔSH3-III の発現による回復は認められなかった(Fig. 10B)。次に *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の UNC-2/Ca_V2 の局在異常について、各 RIMB-1 コンストラクトによるレスキュー能を検証した(Fig. 10A, C–H)。レスキュー能の検証には、*unc-25* プロモーター制御下で発現させた GFP-UNC-2 の DD 神経軸索における輝点の分布を指標とした。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の GFP-UNC-2 輝点数の減少は RIMB-1 と RIMB-1ΔN の発現により回復し、野生型よりも多くの輝点を示す個体も現れた(Fig. 10E, F)。一方、RIMB-1 ΔC および RIMB-1 ΔSH3-III の発現は、GFP-UNC-2 輝点数の減少を回復しなかった(Fig. 10G, H)。以上より RIMB-1 による行動および UNC-2 プレシナプス局在の制御に SH3-III ドメインが必須であることが示された。

mCherry-RIMB-1 はプレシナプスに局在し、細かい輝点として観察される(Fig. 10 I)。そこで RIMB-1 の正常な局在に必要な機能ドメインを同定するため、*unc-25* プロモーター制御下で GABA 作動性神経特異的に mCherry 融合 RIMB-1 コンストラクトと SV タンパク質 SNB-1-GFP を共発現させ、DD神経軸索における共局在を解析した(Fig. 10I-L)。mCherry- RIMB-1ΔN は mCherry-RIMB-1 同様、小さな輝点として軸索上に分布し、SNB-1-GFP と共局在した(Fig. 10 J)。しかし、mCherry-RIMB-1 ΔC は、mCherry-RIMB-1 と異なり、軸索上で部分的に SNB-1-GFP と共局在する拡散様

のシグナルを示した(Fig. 10K)。したがって RIMB-1 のC末端側の領域が正常な局在に必要であることが示された。最後に mCherry-RIMB-1 ΔSH3-III の局在を解析した。mCherry-RIMB-1 ΔSH3-III は、野生型と同様に、細かい輝点として軸索上に分布し、SNB-1-GFP と共局在した（Fig. 10L)。よって RIMB-1 ΔSH3-III は正常にプレシナプスに局在し、SH3-III ドメインは RIMB-1 の局在に必須でないと考えられる。

上記の結果から RIMB-1 の複数の機能ドメインが局在や生理機能に異なる役割を担うことが明らかになった。中でも RIMB-1 配列のC末端に位置する SH3-III ドメインは RIMB-1 の局在に必須でないが、UNC-2/Ca_V2 のプレシナプス局在制御に必須であることが明らかになった。

RIMB-1 のプレシナプスへの正常な局在に UNC-2/Ca_V2 が必要である

CAZ タンパク質は分子間相互作用を介して機能タンパク質や SV をプレシナプスに集積させるので、CAZ タンパク質の正常な機能発現にプレシナプスへの局在が必須である。そこで私は RIMB-1 の局在制御メカニズムを明らかにするため、正常な局在に必要な分子の同定を試みた。方法として候補遺伝子機能欠損変異線虫に *unc-25* プロモーター制御化で GABA 作動性神経特異的に mCherry-RIMB-1b と SV タンパク質 SNB-1-GFP を共発現させ、DD 神経軸索における局在を野生型と比較した(Fig. 11)。

まず線虫においてプレシナプスタンパク質集積の主要制御分子である SYD-2/Liprin-α (Zhen and Jin, 1999; Ackley *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006) の影響を検証した。*syd-2* 機能低下線虫においてプレシナプス構造は異常になり、SV タンパク質 SNB-1-GFP の分布も乱れることが知られている(Figs. 5I, 11B, Zhen and Jin, 1999)。また、SYD-2 は様々な CAZ タンパク質と結合し、UNC-10/RIM や ELKS-1/ELKS という複数の CAZ タンパク質の正常な局在に関与することが示されてきた(Ackley *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006)。*syd-2* 機能欠損変異線虫における mCherry-RIMB-1 シグナルを観察したところ、mCherry-RIMB-1 は野生型と同様に、細かい輝点として軸索上に分布し、SNB-1-GFP と共局在した(Fig. 11B)。したがって *syd-2* 機能欠損変異線虫においても、RIMB-1 はプレシナプスに局在し、SYD-2 は RIMB-1 のプレシナプス局在に必須でないと考えられる。

マウス RBP は RIM の結合タンパク質として同定され、Cav2 と結合することが知られている(Wang *et al.*, 2000; Hibino *et al.*, 2002; Kaeser *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014)。さらにこれまでの解析から、私は RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM が UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を制御することを明らかにしており、この 3 つの分子の間に強い遺伝学的相互作用が存在することを見出している（Figs. 6-8)。そこで RIMB-1 のプレシナプス局在に UNC-10 と UNC-2 が必要であるか、遺伝子機能欠損型変異線

虫を用いて検証した。その結果、*unc-10* と *unc-2* のいずれの機能欠損変異線虫においても、野生型同様、mCherry-RIMB-1 は細かい輝点として軸索上に分布し、SNB-1-GFP と共局在することを確認した（Fig. 11 C, D:白矢頭）。よって UNC-10 や UNC-2 の機能が喪失しても RIMB-1 はプレシナプスに局在できることが明らかとなった。しかしながら、*unc-2* 機能欠損線虫の中に、SNB-1-GFP と共局在しない mCherry-RIMB-1 の輝点を数多く示す個体が確認された(Fig. 11D:黒矢頭、Fig.11G: 19 個体中、15 個体(=79%))。よって UNC-2/Ca_V2 は RIMB-1 がプレシナプスへ限定的に局在するために重要であることが見いだされた。また *unc-10* 機能欠損線虫においても SNB-1-GFP と共局在しない mCherry-RIMB-1 の輝点を示す個体が現れた(Fig.11G: 13 個体中、3 個体(=23%))。よって UNC-10 も UNC-2 同様、RIMB-1 の局在をプレシナプスに限定させるうえで重要な分子であると考えられる。一方、*syd-2* 変異線虫においては SNB-1-GFP と共局在しない mCherry-RIMB-1 輝点を示す個体は現れなかった(Fig. 11G: 11 個体中、0 個体(=0%))。よって SYD-2 は RIMB-1 の局在をプレシナプスに限定させるうえで重要でないと考えられる。

UNC-2 のプレシナプスへの局在には CALF-1 という小胞体タンパク質が必要とされる。CALF-1 は UNC-2 が小胞体から出芽するために必要とされ、*calf-1* 機能低下型変異線虫では UNC-2/CaV2 は神経突起へ輸送されず、細胞体に留まり、プレシナプスに局在できない(Saheki and Bargmann, 2009)。そこで、UNC-2 のプレシナプス局在が RIMB-1 の正常な局在に必要であるか検証するため、*calf-1* 変異線虫における mCherry-RIMB-1 局在を観察した。*calf-1* 変異線虫において mCherry-RIMB-1 は SNB-1-GFP と共局在する輝点(Fig. 11E:白矢頭）に加え、*unc-2* 変異線虫と同様の SNB-1-GFP と共局在しない輝点として観察された(Fig. 11E:黒矢頭)。よって UNC-2 のプレシナプス局在が RIMB-1 局在のプレシナプスへの限定化に必要であると考えられる。さらに *unc-2* 変異線虫では 79%の個体で SNB-1-GFP と共局在しない mCherry-RIMB-1 の輝点が観察されたが、*calf-1* 変異線虫では全ての個体で SNB-1-GFP と共局在しない mCherry-RIMB-1 の輝点が観察された(Fig. 11G: 41 個体中、41 個体(=100%))。したがって CALF-1 による RIMB-1 局在制御メカニズムには UNC-2 と独立な経路が存在する可能性が示唆された。また、*calf-1* 変異体では UNC-2 の細胞体からの輸送が異常になり、DD 神経軸索に GFP-UNC-2 は局在できない(Saheki and Bargmann, 2009)が、mCherry-RIMB-1 は軸索上に輝点として分布した(Fig. 11E)。よって、プレシナプスへの輸送過程が RIMB-1 と UNC-2 で異なることが示唆された。

次に UNC-10 と UNC-2 による RIMB-1 局在制御に冗長性が存在するか検証した。*unc-2; unc-10* 二重機能欠損線虫を作成し、RIMB-1 の局在を観察し、単独機能欠損線虫における分布と比較した。*unc-2; unc-10* 二重変異線虫では mCherry-RIMB-1 は DD 軸索上に輝点として局在した。*unc-2* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫と同様に、mCherry-RIMB-1 は SNB-1-GFP と共局在する輝点に加え(Fig.11F:白矢頭)、

SNB-1-GFP と共局在しない輝点(Fig.11F: 黒矢頭)として観察された。*unc-2* 単独変異線虫と *unc-10* 単独変異線虫では、共局在しない mCherry-RIMB-1 の輝点を示す個体の割合はそれぞれ 79%、23%であったが、*unc-2; unc-10* 二重変異線虫では全ての個体において共局在しない輝点が観察された(Fig. 11G, 20 個体中、20 個体(=100%))。以上より、*unc-2* 機能欠損型変異と *unc-10* 機能欠損型変異の二重変異により RIMB-1 局在異常が増強したため、UNC-2 と UNC-10 は一部冗長的に RIMB-1 局在を制御することが示唆された。

以上の結果から RIMB-1 がプレシナプスに限定的に局在するために、UNC-2 のプレシナプスへの局在や、UNC-10 が必要であることが示された。私はこれまでの解析から RIMB-1 による UNC-2 プレシナプス局在制御を明らかにしている(Figs. 7,8)。これらの結果を合わせて、RIMB-1/RBP と UNC-2/Cav2 が双方向的にプレシナプス局在を制御すると考えられる。さらに UNC-10 は UNC-2 と RIMB-1 の局在を制御するため(Figs. 7, 8, 11C)、UNC-10/RIM を含めたこれら 3 つのタンパク質が互いの局在に強い関係性を持つことが示唆された。

新規 UNC-2/Ca_V2 局在制御遺伝子変異 *nq45, nq49*

これまでの解析から、私は UNC-2 プレシナプス局在制御分子として RIMB-1 と UNC-10 を同定した。しかしながら、線虫においてこれまで同定された UNC-2 局在制御分子は RIMB-1、UNC-10 のほかには、UNC-36/VGCCα2δ、CALF-1 のみであり、未知の局在制御分子の存在が予想されていた。

私は *rimb-1* 変異のエンハンサースクリーニングにおいて、UNC-2 プレシナプス局在が著しく減少する遺伝子変異線虫を複数単離した(Fig. 12)。これらの変異線虫がもつ対立遺伝子をそれぞれ *nq45, nq49* と名付けた（Fig. 12B, C)。*nq45, nq49* 変異線虫はいずれも培地上で顕著な行動異常を示した。さらに、*nq45* 単独変異線虫、*nq49* 単独変異線虫は、それぞれの *rimb-1* との二重変異線虫と同様の GFP-UNC-2 のプレシナプス局在の減少を示したため、*unc-10* 変異と異なり、*rimb-1* 変異のエンハンサー変異でない。そして AWC 神経軸索上の GFP-UNC-2 輝点の領域を定量した結果、*nq45* 単独変異線虫では野生型比約 75%の減少(Fig. 12D)、*nq49* 単独変異線虫では約 65%の減少を示した(Fig. 12E)。

また、SNP マッピングにより責任遺伝子の遺伝子座を解析した結果、*nq45* は IV 染色体、*nq49* は V 染色体にそれぞれ位置していた。さらに、*unc-36*、*calf-1* という UNC-2 局在に必須な遺伝子の機能欠損型変異線虫を用いた遺伝的相補性の解析を行い、*nq45, nq49* はいずれの機能低下型変異でないことを確認した。よって、*nq45*、*nq49* の責任遺伝子はいずれも新規 UNC-2/Cav2 局在制御遺伝子であることが示された。なお、次世代シーケンスによる全ゲノム解析や別の対立遺伝子における GFP-

UNC-2 局在の観察、レスキュー実験により *nq49* の変異位置を既に同定している。今後これらの遺伝子線虫を用いた解析を行うことで、新規局在制御メカニズムが解明できると考えられる。

考察

シナプスにおける情報伝達は、多様なプレシナプスタンパク質によって協調的に制御される。CAZ タンパク質群は分子間相互作用により機能分子の集積を制御する重要な分子群であり、個々の CAZ タンパク質の生理機能を解明することはプレシナプス機能制御メカニズムを分子レベルで理解するうえで必須である。本研究において、私は CAZ タンパク質 RBP 線虫ホモログ RIMB-1 の生理機能を遺伝学的な手法を用いて解析し、UNC-10/RIM と冗長的に UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を制御することを明らかにした（Fig.14A)。本章では近年報告されている RBP ファミリータンパク質の生理機能との関連を含め本研究の結果を考察する。

RIMB-1/RBP による UNC-2/Ca_V2 プレシナプス局在制御

本研究の *rimb-1* 遺伝子変異線虫や多重変異線虫の解析により、UNC-2/Cav2 局在制御という RIMB-1/RBP の重要な生理機能が明らかにされた。

正常な神経伝達には VGCCα1 Cav2 のプレシナプス局在が必須である（Simms and Zamponi, 2014)。これまでの CAZ タンパク質の機能欠損動物を用いた解析から、哺乳類では RIM(Kaeser *et al.*, 2011)、Bassoon（Davydova *et al.*, 2014）が、キイロショウジョウバエでは RBP(Liu *et al.*, 2011)、RIM(Graf *et al.*, 2012)、Fife/RIM-Piccolo homolog (Bruckner *et al.*, 2016)、Bruchpilot/ELKS-like protein(Kittel *et al.*, 2006)が、Cav2 の正常なプレシナプス局在に関与することが知られている。しかし線虫 *C. elegans* では、多くの CAZ タンパク質が保存されているものの、UNC-10/RIM などの CAZ タンパク質をはじめ、プレシナプスタンパク質の単独機能欠損線虫において UNC-2/Cav2 プレシナプス局在は正常であり、UNC-2/Cav2 局在に必要なプレシナプスタンパク質は同定されていなかった(Saheki and Bargmann, 2009）。

そこで私はこれまで生理機能が不明であった RIMB-1 の UNC-2 局在制御能を解析した。*rimb-1* 単独機能欠損線虫において UNC-2 プレシナプス局在に明確な異常は観察されなかった(Figs. 6B, 7C)。一方、RIMB-1 の発現量を増加させたトランスジェニック線虫において、UNC-2 プレシナプス局在の有意な増加が認められた(Fig. 6C, D)。よって、線虫 RIMB-1 が UNC-2/Cav2 局在を制御しうることが見いだされ、線虫においても CAZ タンパク質が Cav2 局在を制御することがはじめて明らかにされた。

私は *rimb-1* とプレシナプスタンパク質の二重機能低下変異線虫の解析をおこない、*rimb-1; unc-10* 二重機能欠損変異線虫において UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在が顕著に減少することを、D 運動神経、AWC 感覚神経いずれにおいても観察した(Figs., 7E, 8D)。一方、*rimb-1* および *unc-10* 単独変異体では明確な異常は観察されなかった(Figs.7C, D, 8B, C)。したがって、RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM が冗長的に UNC-

2/Cav2 局在を制御すると考えられる。この結果により、長らく不明であった線虫の UNC-2/Cav2 局在を制御する主要なプレシナプスタンパク質が同定され、また複数の CAZ タンパク質ファミリーが協調性をもって Cav2 局在を制御することが、あらゆる動物種においてはじめて明確に示された。先に述べたように、RIMB-1 を過剰発現するトランスジェニック線虫において UNC-2/Cav2 プレシナプス局在量が増加し(Fig. 6C,D)、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の UNC-2 局在異常が回復した（Figs. 8E, G, 10E)。よって、RIMB-1 は UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を正に制御する分子である。RIMB-1 の神経特異的過剰発現は *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の行動異常も回復し（Fig. 10B)、RIMB-1 と UNC-10 は運動機能も冗長的に制御することから(Fig. 8H)、RIMB-1 と UNC-10 は UNC-2 局在制御を介して神経機能を制御することが示唆された。また RIMB-1 と UNC-10 は神経系で広く発現し(Fig.2, Koushika *et al.*, 2001)、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の感覚神経細胞と運動神経細胞いずれにおいても UNC-2 局在異常が観察されたため、様々な神経細胞において RIMB-1 と UNC-10 は UNC-2 局在を制御する重要な CAZ タンパク質であると考えられる。

さらに私は RIMB-1 と UNC-10 が UNC-2 局在をどのようなメカニズムで制御するのか明らかにするため、GFP-UNC-2 蛍光シグナルの定量解析や超解像顕微鏡観察を行い、表現型の詳細な解析を行った（Fig.7B'-J')。その結果、UNC-2 は野生型、*rimb-1* 単独変異線虫、*unc-10* 単独変異線虫ではプレシナプス内の細領域に集積するが、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫ではプレシナプス全体に拡散して局在することがわかった。また、定量解析には野生型と同程度の GFP-UNC-2 輝点の総面積、大きさ、個数を指標として用いた。よって、*rimb-1; unc-10* 二重変異体において GFP-UNC-2 輝点のいずれの指標においても顕著な減少がみられたのは、一定領域に存在する GFP-UNC-2 量の輝度が低いという表現型が反映されたためと考えられる。*rimb-1; unc-10* 二重変異体の SV タンパク質 mCherry-RAB-3 の軸索上の総面積は野生型と比べ、有意に増加した(Fig. 7E, Table1)。よって、二重変異線虫における UNC-2 のプレシナプス局在の減少はプレシナプスの構造異常に起因する副次的な現象ではないことが示唆された。RIMB-1 と UNC-10 がプレシナプスに局在し(Fig. 3D-H, Koushika *et al.*, 2001)、RIMB-1 と UNC-2 が共局在すること(Fig. 6F)や、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫において細胞体での GFP-UNC-2 発現量が減少しないこと(Fig. 7E)、RIMB-1 が細胞自律的に UNC-2 局在を制御すること(Fig. 8F)を合わせて考えると、RIMB-1 と UNC-10 はプレシナプスに輸送された UNC-2 をプレシナプス内の細領域に集積させることで正常な局在を担うと考えられる(Fig. 7K')。UNC-2/Cav2 はプレシナプスアクティブゾーンに局在することで、シナプス伝達を駆動できる(Saheki and Bargmann, 2009; Simms and Zamponi, 2014)。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫においては、UNC-2 がプレシナプス全体に拡散するため、相対的にアクティブゾーンへの局在量が減少し、効率的な神経伝達制御が損なわれると考えられる（Fig. 7K')。これは *rimb-1;*

unc-10 二重変異線虫が顕著な運動能力の低下を示し、神経伝達が著しく損なわれていることと一致する（Fig. 8H）。

また RIMB-1 構造機能相関解析により三番目の SH3 ドメイン(SH3-III)が UNC-2 局在制御など生理機能に必要であることが示された（Fig. 10）。マウス RBP は SH3 ドメインを介して Cav2 と直接結合し、特に 3 番目の SH3 ドメインが最大の結合親和性を示す(Hibino *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2019)。またマウス RIM も Cav2 と直接結合し、Cav2 のプレシナプス局在を正に制御する(Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011)。以上より局在制御メカニズムの最もシンプルな解釈は、RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM という 2 種類の CAZ タンパク質が UNC-2/Cav2 をプレシナプスに係留することで、集積の安定化を担うというものであり、本研究結果もこれと矛盾しない(Fig. 14A, B)。

マウス RBP は RIM、Cav2 と結合し、RIM も Cav2 と結合する(Wang *et al.*, 2000; Hibino *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011)。*in vitro* の実験から RBP、RIM、Cav2 は三量体を形成することが示されている（Wu *et al.*, 2019)。線虫においても個々の分子の結合ドメインが保存されているため(Figs. 1C, 13)、同一の複合体内で RIMB-1 と UNC-10 が 1 つの UNC-2 の足場として働き、UNC-2 局在を冗長的に制御する可能性が考えられる(Fig. 14C)。しかしながら、私が作成したトランスジェニック線虫を用いた免疫染色の結果から、RIMB-1 と UNC-2 の共局在が部分的であり(Fig. 6G)、また、内在性レベルの RIMB-1 と UNC-2 の共局在も部分的であることが超解像顕微鏡を用いた微細構観察により示されている(Kurshan *et al.*, 2018)。よって RIMB-1 がすべての UNC-2 の足場として働かず、UNC-10 と異なる複合体を形成する可能性も否定できない(Fig. 14C)。今後、内在性タンパク質の超解像顕微鏡解析などにより、生体内における RIMB-1-UNC-10-UNC-2 複合体について解析を進めることで、RIMB-1 と UNC-10 による UNC-2 局在制御の冗長性がどのように生まれるのか明らかにできると考えられる。

VGCC は RBP、RIM に加えて他のプレシナプスタンパク質と結合することが知られている(Maximov *et al.*, 1999; Kiyonaka *et al.*, 2012)。本研究の系統的な *rimb-1* 二重変異線虫の解析では、LIN-2/CASK, LIN-10/X11, ELKS-1/ELKS という VGCC 結合タンパク質のホモログとの二重機能欠損による UNC-2/Cav2 の局在異常はみられなかった(Fig. 7, Table 1)。また、順遺伝学的スクリーニングにより、*rimb-1* 変異線虫の GFP-UNC-2 プレシナプス局在減少を生じる変異として *nq47* を同定し、*nq47* は *unc-10* のナンセンス変異であることを確認している(Fig. 7Z, A')。また、定量的な解析により、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の AWC 神経において UNC-2 プレシナプス局在が野生型比約 90%の減少をすることを明らかにした(Fig. 7B', Table 1)。以上の結果を合わせると、RIMB-1 と UNC-10 は多様なプレシナプスタンパク質の中で、線虫の UNC-2 プレシナプス局在化に中心的な役割を担うと考えられる。

しかしながら、本研究の解析結果は他のプレシナプスタンパク質の関与を排除する

ものではない。例えば、DD 神経において *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫の GFP-UNC-2 輝点の減少は約 60%に留まった(Fig. 8G)。この結果から、神経細胞種によって局在制御に必要なタンパク質が異なり、RIMB-1 と UNC-10 以外の局在制御タンパク質が存在する可能性が考えられる。さらに、本研究では GFP-UNC-2 を過剰発現するトランスジェニック線虫を用いて解析を行っているため、内在性の UNC-2 局在への影響を検証することはできなかった。今後、Cav2 結合タンパク質の線虫ホモログによる局在への関与について、系統的な二重変異線虫の解析およびエンハンサースクリーニング、そして内在性 UNC-2 のプレシナプス局在解析を行うことで、新たな局在制御メカニズムを明らかにできる可能性がある。

多くのプレシナプスタンパク質は細胞体において遺伝子発現・合成されたのち、モーター分子によってプレシナプスへ輸送される。その後、結合タンパク質により係留され、プレシナプスに安定的に局在する。これまで UNC-2/Cav2 の細胞体からの出芽に UNC-36/VGCC α2δ、CALF-1 が必要であり、これらの機能低下型変異線虫では UNC-2 は小胞体に留まることが示されていた(Saheki and Bargmann, 2009)。本研究からプレシナプスにおいて UNC-2 局在を担う足場タンパク質として RIMB-1/RBP, UNC-10/RIM が同定された。しかし、現在までのところ UNC-2 プレシナプス局在制御分子として上記の分子が同定されているのみである。本研究のスクリーニングから単離された *nq45, nq49* (Fig. 12)の責任遺伝子は新規 UNC-2 局在遺伝子であることを確認している。今後モーター分子など局在制御の過程で働く重要なタンパク質に着目した解析や、*nq45, nq49* の責任遺伝子の解析を行うことで、新たな UNC-2 局在制御メカニズムが解明できるだろう(Fig. 14D)。

RBP 機能の進化的保存性

本研究における RIMB-1 の生理機能解析により、RBP が線虫において UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在制御に重要であることが明らかとなった。一方、近年、他生物種において RBP が複数の機能を持つことが報告されている。

まず RBP の Cav2 局在制御について、線虫と哺乳類、キイロショウジョウバエにおける機能を考察する。キイロショウジョウバエでは RBP の単独機能欠損により cacophony(Cac)/Cav2 プレシナプス局在量が減少する(Liu *et al.*, 2011)。一方、マウスでは RBP は Cav2 のプレシナプスアクティブゾーン内での局在を微調整し、効率的なシナプス伝達を実現することが示されている(Acuna *et al.*, 2015; Grauel *et al.*, 2016)。本研究により線虫 RIMB-1 が UNC-2 プレシナプス局在を制御することが明らかとなったため、線虫、キイロショウジョウバエ、マウスいずれの生物種においても RBP はプレシナプスにおける Cav2 局在を制御することが明らかとなった。本研究の解析では、マウス RBP と同様に、線虫 RIMB-1 が UNC-2/Cav2 局在を微調整するか明らかにできなかったが、今後超解像顕微鏡を用いて微細領域における局在の詳細な解析を

することで明らかにできるだろう。

しかしながら、個々のプレシナプスタンパク質の Cav2 局在への寄与は、生物種間で異なると考えられる。例えば、キイロショウジョウバエでは RIM 単独欠損により Cac/Cav2 のプレシナプス局在が減少し（Graf et al., 2012)、マウスでも RIM の欠損がプレシナプスの Cav2 局在を減少させる(Kaeser et al., 2011)。しかしながら線虫において UNC-10/RIM の単独欠損線虫は正常な UNC-2 局在を示した(Figs. 7, 8)。さらに、ショウジョウバエでは RIM と RBP のほか Fife/RIM-Piccolo homolog (Bruckner *et al.*, 2016)、Bruchpilot/ELKS-like protein(Kittel *et al.*, 2006)の単独変異体ではすべてプレシナプス部における Cac/Cav2 の集積量が減少する。それに対し線虫では、*rimb-1* を含め、単独機能欠損によって顕著な UNC-2/Cav2 局在異常を呈するプレシナプスタンパク質は認められなかった(Fig. 7, Saheki and Bargmann, 2009)。また、マウスでは RIM と ELKS の多重機能欠損によりプレシナプスにおける Cav2 局在が顕著に減少する（Wang *et al.*, 2016)。しかし、線虫では *elks-1*/ELKS と *unc-10*/RIM の二重機能低下型変異線虫で UNC-2 の局在異常は観察されなかった(Fig. 7L')。したがって線虫では他生物種と比べ、Cav2 プレシナプス局在制御における RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM の重要性は高く、また冗長性をもって UNC-2 プレシナプス局在を強固に支えると考えられる。しかしながら、本研究では GFP-UNC-2 を過剰発現するトランスジェニック線虫を用いて局在を解析したため、*rimb-1* をはじめとするプレシナプスタンパク質の単独変異線虫や *rimb-1; unc-10* 二重変異線虫以外の二重変異線虫において、内在性の UNC-2 プレシナプス局在が損なわれている可能性は否定できない。

次に RBP による Cav2 以外のプレシナプスタンパク質の局在制御を考察する。マウスやショウジョウバエでは、RBP の機能欠損はプレシナプスへのタンパク質局在の減少をきたす。RBP 欠損変異ショウジョウバエは CAZ タンパク質の顕著な局在異常や神経筋接合部の構造異常が観察される(Liu *et al.*, 2011)。またマウスでは、RBP の欠損のみではプレシナプス構造は正常であるが(Acuna *et al.*, 2015; Grauel *et al.*, 2016)、RBP と RIM の多重変異マウスでは CAZ タンパク質のシナプス発現量が減少し、さらにプレシナプス部における密なタンパク質集積を表す dense projection が減少する(Acuna *et al.*, 2016)。一方、*C. elegans* では、*rimb-1* ナンセンス変異や *rimb-1* 配列を完全に欠損した *gkDf40* のいずれの単独変異線虫においても、DD 神経軸索において、SV タンパク質や CAZ タンパク質は正常に分布した(Figs. 4E-G, 5E)。しかしながら、本研究の解析はプレシナプスタンパク質を過剰発現したトランスジェニック線虫を用いた観察であり、内在性の局在への影響を排除することはできない。また RBP 欠損変異ショウジョウバエの CAZ タンパク質の顕著な局在異常や神経筋接合部の構造異常は超解像顕微鏡を用いた微細構造の観察により明らかにされている(Liu *et al.*, 2011)。今後超解像顕微鏡を用いた内在性プレシナプスタンパク質の局在解析により、

線虫においても RIMB-1 がプレシナプスタンパク質の局在に必須であるか検証できるだろう。

最近の報告では、*rimb-1* 変異線虫のコリン作動性神経軸索において SV タンパク質や有刺小胞タンパク質がわずかに分布の異常を示すことが観察されており、RIMB-1 がプレシナプスタンパク質の分布に関与することが示唆されている(Edwards *et al.*, 2018; Morrison *et al.*, 2018)。これは、本研究の二重変異体の解析において *rimb-1* 変異が *unc-13*/Munc13, *unc-18*/Munc18, ubiquitin E3 ligase *rpm-1*, Serine/Threonine kinase *sad*-1 変異による SV タンパク質の分布異常を増強し、RIMB-1 が他のプレシナプスタンパク質と協調的に SV タンパク質の分布を制御するという結果と一致する（Table1)。しかし、いずれの二重変異線虫においても、SV タンパク質の分布異常が弱く、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫における UNC-2 局在異常のような顕著な表現型を示さなかった。したがって、線虫 RIMB-1/RBP は、SV や CAZ タンパク質の集積に比べ、UNC-2/Cav2 の集積により必要とされることが考えられる。

最後に RBP のシナプス伝達への寄与を考察する。*rimb-1* 単独変異線虫は運動能力が低下し、アルジカルブ処理後の生存時間が延長した（Fig. 4A, C)。対照的に神経特異的な RIMB-1 の過剰発現は *rimb-1* 変異体の運動能力を回復させ、アルジカルブ処理後の生存時間を短縮させた(Figs. 4A, C)。よって RIMB-1 はシナプス伝達に関与することが示唆された。また RIMB-1 過剰発現によるアルジカルブ処理後の生存時間の短縮は、*unc-2* 機能欠損型変異線虫において消失したため(Fig. 6E)、RIMB-1 は UNC-2/Cav2 を介してシナプス伝達を制御しうることが示された。*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫は、*unc-10* 単独変異線虫より有意に運動機能が低下したが(Fig. 8H)、これは *unc-10* 単独変異線虫で正常であった運動神経の UNC-2 プレシナプス局在が減少したことによる、運動機能の低下を反映したと考えられる。そして DD 運動神経を用いた解析から、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫において運動神経の GFP-UNC-2 プレシナプス局在は野生型比 4 割程度に減少したものの、完全に消失しないことを確認している。よって、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫において、プレシナプスに局在できた UNC-2 によりシナプス伝達が行われるため、*rimb-1; unc-10* 二重変異線虫は *unc-2* 変異線虫より高い運動能力を示したと考えられる(Fig. 8H)。以上の結果から RIMB-1 は UNC-2 局在制御を介してシナプス伝達を制御することが示唆された。

一方、近年の電気生理学的解析の報告では、*rimb-1* 機能低下型変異線虫において即時的な神経伝達物質の放出に大きな異常がみられないことが示されている(Liu *et al.*, 2018)。したがって、*rimb-1* 変異線虫において生じる UNC-2 を介したシナプス伝達の低下は小さいと考えられる。そのため、RIMB-1 は UNC-2 の局在安定化だけでなく、他の分子メカニズムを介しシナプス伝達に寄与する可能性がある。キイロショウジョウバエにおいて RBP は神経伝達物質放出の恒常性を保ち、シナプス伝達を安定化する

(Müller *et al.*, 2015)。またマウスでは RBP は Ca^{2+}流入とシナプス伝達を繋げるだけでなく(Acuna *et al.*, 2016)、Ca^{2+}依存的カリウムチャネルである BK チャネルと VGCC の近接化を担う(Sclip A *et al.*, 2018)。BK チャネルは活動電位の持続時間を調節し、VGCC の開口や活動電位毎の神経伝達物質放出の調整を担う（Fakler and Adelman, 2008; Contet *et al.*, 2016; Griguoli *et al.*, 2016)。このようなキイロショウジョウバエとマウスにおける RBP のシナプス伝達メカニズムは、いずれも線虫において保存されている可能性がある。線虫において BK チャネルは SLO-1 として保存されており、神経筋接合部における神経伝達物質の放出を調節することが報告されており(Wang ZW *et al.*, 2001)、電気生理学的な解析を含め、RIMB-1 との関係について更なる解析が求められる。

RIM ファミリー分子は Cav2 と直接結合し、プレシナプス局在や機能を制御するほか(Han *et al.*, 2011; Kaeser *et al.*, 2011; Graf *et al.*, 2012)、神経伝達物質の放出及び CAZ の形成に重要である(Wang *et al.*, 1997; Acuna *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016)。線虫においても、UNC-10 は SV のアクティブゾーンにおける局在や膜融合に必要である(Koushika *et al.*, 2001; Stigloher *et al.*, 2011)。RIMB-1 過剰発現によるアルジカルブ処理後の生存時間短縮は、*unc-10* 機能欠損線虫においてもみられたため(Fig. 4D)、RIMB-1 過剰発現によるシナプス伝達の亢進は、UNC-10 の機能が欠損した線虫においても起こると考えられる。よって、RIMB-1 は UNC-10 非依存的なメカニズムによってシナプス伝達を制御しうることが示されたが、UNC-2 局在制御との関係性を含め、本研究の解析からは詳細なメカニズムを明らかにすることはできなかった。

また mCherry-RIMB-1 発現 L1 幼虫を用いた解析により RIMB-1 は軸索だけでなく樹状突起にも局在しうることが示された(Fig.3 I-K)。CAZ タンパク質は主に軸索上に分布し、プレシナプスに局在するが、UNC-10/RIM は樹状突起にも分布しうることが報告されており(Patricia et al., 2013)、マウス RIM も特定のアイソフォームはポストシナプスに局在し、神経発生を制御することが知られている(Liang F et al., 2007; Alvarez-Baron E et al., 2013)。近年マウス RBP2 が有毛細胞リボンシナプスにおいて L 型 VGCCα1 Cav1.3 の局在量を制御することが報告されている(Krinner S et al., 2017)。L 型 VGCCα1 はポストシナプスに主に局在し(Zhang H et al., 2005; Jenkins MA at al., 2010)、線虫において *egl-19* という遺伝子にコードされている(Lee RY et al., 1997)。今後 RIMB-1 の樹状突起やポストシナプスにおける局在や、ポストシナプスにおける生理機能について解析を進めることで、EGL-19/Cav1.3 のポストシナプス局在の制御など、RIMB-1 の新たな機能を発見できるだろう。

RIMB-1 局在の制御分子メカニズム

RIMB-1 は主にプレシナプスに局在し、CAZ タンパク質と共局在する(Fig. 3D-H)。他の生物種においても RBP はプレシナプスアクティブゾーンに局在する（Hibino *et*

al., 2002; Liu *et al.*, 2011; Davydova *et al.*, 2014)。しかし、RBP のプレシナプス局在に必要なメカニズムは不明であった。そこで本研究において、私は機能欠損線虫を用いて RIMB-1 局在に必要な遺伝子を探索した。

まず、プレシナプス形成主要制御分子である SYD-2/ Liprin-αの寄与を解析した。SYD-2 は SV タンパク質や CAZ タンパク質 UNC-10/RIM や ELKS-1/ELKS の正常な局在に必要とされることが知られている(Zhen and Jin, 1999; Ackley *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006)。しかし本研究において、*syd-2* 機能欠損型変異線虫における RIMB-1 の顕著な局在異常は観察されなかったため(Fig. 11B)、SYD-2 は RIMB-1 のプレシナプスへの局在には必須でないと考えられる。しかしながら、*syd-2* 機能低下変異線虫において CAZ タンパク質 UNC-10 や ELKS-1 の局在部位の間隔が広くなり、発現量が減少する(Ackley *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2006)ことが知られており、より詳細な解析をすることで、SYD-2 が RIMB-1 の局在に必須であるか検証できるだろう。

次に UNC-10/RIM と UNC-2/Cav2 の RIMB-1 局在への寄与を検証した。*unc-2* 機能欠損線虫において、RIMB-1 は正常にプレシナプスへ局在したほか、プレシナプス外へも局在した(Fig. 11D, G)。さらに *unc-10* 機能欠損線虫においても、低い浸透度ではあるが、同様の RIMB-1 のプレシナプス外への局在が観察された(Fig.11G)。また *unc-2; unc-10* 二重変異線虫において、RIMB-1 のプレシナプス外への局在を示す個体の割合は増加した (Fig. 11F, G)。以上より、RIMB-1/RBP のプレシナプスへの限定的な局在に UNC-2/Cav2 と UNC-10/RIM が必要であり、これらは一部冗長的に RIMB-1 局在を制御しうることが明らかとなった。さらに、UNC-2 のプレシナプス局在が損なわれる *calf-1* の機能欠損線虫においても、RIMB-1 のプレシナプス外への局在が観察されたことから(Fig. 11E, G, Saheki and Bargmann, 2009)、UNC-2 のプレシナプス局在が RIMB-1 の正常な局在に必要であることが示唆された。

以上より、RIMB-1 と UNC-2/Cav2 はプレシナプスにおいて双方向的に局在を制御し合うことが示唆された。RIMB-1 と UNC-10 による冗長的な UNC-2 局在制御も踏まえると、RIMB-1-UNC-10-UNC-2 という 3 つのタンパク質は、互いの局在に密接な関係性をもち、この関係性が線虫プレシナプス基盤構造形成に重要であると考えられる。

近年の *in vitro* 解析の報告から、RBP と RIM は液-液相分離を示す密な複合体を形成し、Cav2 の集積に寄与すること、そして Cav2 が RBP-RIM の密な集積を促進することが明らかにされている(Wu *et al.*, 2019)。RBP と RIM は、RBP の SH3 ドメインと RIM の PRM モチーフを介して結合し(Wang *et al.*, 2000)、また RBP の SH3 と、RIM の PRM および disorder 配列が液-液相分離に必要である(Wu *et al.*, 2019)。そ s て Cav2 は細胞質の C 末端領域(C tail)中の PRM モチーフを介して RBP SH3 ドメインと、PBM モチーフを介して RIM PDZ ドメインと結合し(Hibino *et al.*, 2002; Kaeser

et al., 2011)、Cav2 C tail の RBP、RIM 結合領域は、RBP と RIM の液-液相分離を促進する(Wu *et al.*, 2019)。線虫 RIMB-1、UNC-10、UNC-2 C tail においても結合ドメインや disorder 配列が保存されている(Fig. 13, https://iupred2a.elte.hu)。よって RIMB-1/RBP-UNC-10/RIM-UNC-2/Cav2 が、線虫生体内でも動的な分子間相互作用を示し、UNC-10 や UNC-2 による RIMB-1 局在制御に関与する可能性もある。しかしながら、RIMB-1 と UNC-10 による UNC-2 の局在制御は、RIMB-1 と UNC-10 による冗長性が明らかにされているため、液-液相分離の寄与は少ないと考えられる。

本研究の解析からは UNC-2 による RIMB-1 局在制御メカニズムの詳細を明らかにすることができなかったが、予想される制御メカニズムを考察する。マウス RBP は複数の SH3 ドメインを介し、Cav2 PRM モチーフと結合する(Hibino *et al.*, 2002)。これらの結合配列は線虫においても保存されており(Fig. 13A, C, D, F)、プレシナプスにおいて UNC-2 と RIMB-1 が結合すると考えられる。本研究で用いた *unc-2* 機能欠損型線虫はナンセンス変異であり、正常な UNC-2 タンパク質の発現がされないと予想される。よって、*unc-2* 機能欠損線虫において、UNC-2 との結合が消失したため、RIMB-1 の局在異常を生じた可能性が考えられる（Fig. 11D, G)。このメカニズムのほかにいくつかのメカニズムが予想できる。例えば、神経細胞において Ca^{2+}シグナリングは遺伝子発現や神経樹状突起の形成制御を担い(Hoogenraad *et al.*, 2007)、VGCC の細胞外補助サブユニットα2δは、分子間相互作用によりプレシナプス形成を担う(Eroglu *et al.*, 2009)。線虫においても、UNC-2 が Ca^{2+}シグナリング構成分子 UNC-43/CaMKII を介して SV タンパク質の局在に関与し(Caylor *et al.*, 2013)、UNC-36/VGCCα2δとポストシナプスタンパク質 NRX-1/Neurexin の相互作用によりシナプス形成が制御される(Tong *et al.*, 2017)。今後、UNC-2/Cav2 以外の Ca^{2+}チャネルや UNC-43/CaMKII などの Ca^{2+}シグナリング構成分子の RIMB-1 局在への関与を検証することで、UNC-2 による RIMB-1 局在制御メカニズムを解明できるだろう。

また *calf-1* 変異線虫において UNC-2 は軸索に分布できないが(Saheki and Bargmann, 2009)、RIMB-1 は分布した(Fig. 11E)。この結果は、RIMB-1 と UNC-2 の細胞体からの輸送過程が異なることを示唆している。RIMB-1 と UNC-2 の結合が、プレシナプスへ局在するまでのどの過程で生じるのかに関して、今後解析を進める必要があるだろう。

構造機能相関解析の結果からは、２つの SH3 ドメインを含む C 末端側の配列が RIMB-1 のプレシナプスへの局在に必要であることが明らかとなっている（Fig. 10K)。RBP は Cav2 や RIM の他にも、Bassoon や APLIP1/DJIP-1 など多様なタンパク質と結合することがマウスやショウジョウバエの解析から明らかになっている(Davydova *et al.*, 2014; Siebert *et al.*, 2015)。したがって線虫 RIMB-1 も同様に、単独あるいは複数の結合タンパク質との結合によって正常な局在が保たれる可能性が考えられる。RIMB-1 の局在制御メカニズムの解明は UNC-2 局在メカニズムを明らかにす

るうえで有用である。今後 RIMB-1/RBP の局在に必要な遺伝子の順遺伝学的なスクリーニングや、RIMB-1 の C 末端側との結合分子の探索を行うことで、RIMB-1 および UNC-2 局在制御メカニズムのさらなる解明が期待される。

RIMB-1/RBP と UNC-10/RIM による UNC-2/Cav2 局在制御メカニズムと神経疾患との関連

本研究において RIMB-1 が UNC-10/RIM と冗長的に機能し、UNC-2/Cav2 のプレシナプス局在を制御することが明らかになったほか、RIMB-1 と UNC-2/Cav2 が双方向的に局在を制御することを見出した。

RBP と RIM について、自閉症家系エキソン変異のゲノムワイド解析により自閉症との関連が見出されている(Bucan *et al.*, 2009; Krumm *et al.*, 2015)。また Cav2.1 をコードする遺伝子である *CACNA1A* の遺伝子変異は家族性片側片頭痛 I 型(familial hemiplegic migraine type 1, FHM1)や反復性運動失調(episodic ataxia type 2, EA2)をはじめとする家族性神経疾患の原因となることが知られている(Heyes *et al.*, 2015)。Cav2 は FHM1 の家族性変異により機能亢進し、EA2 の家族性変異により機能低下する(Guida *et al.*, 2001; Tottene *et al.*, 2009)。さらに、神経疼痛治療薬が Cav2 のプレシナプス発現量を調節することで薬効を示すと考えられている(Patel and Dickenson, 2016)。以上より、RBP, RIM, Cav2 の機能解析は神経疾患発症メカニズムを解明するうえで重要であり、また Cav2 のプレシナプス局在制御メカニズムの理解は新たな神経疾患治療薬の開発に必須であると考えられる。しかしながら、神経疾患に関連した足場タンパク質と Cav2 の複合体の詳細な解析は未だなされていない。よって RBP-RIM-Cav2 複合体の神経疾患との関連を解析することで、新たな疾患メカニズムを明らかにできる可能性がある。

近年、FHM1 家族性変異を模する *unc-2*/Cav2 変異線虫が作成され、UNC-2 のプレシナプス機能が亢進することが示されており(Huang *et al.* 2019)、線虫が Cav2 関連家族性疾患の解析に有用である可能性が見いだされた。今後、*C. elegans* などのモデル動物を用いて、RBP、RIM、VGCC が構成する複合体の制御メカニズムの全体像や新規 UNC-2、RIMB-1 局在制御メカニズムの解明を進め、神経疾患との関連を検証することで臨床への貢献が大いに期待される。

実験手法

線虫株

C. elegans Bristol N2 やその変異線虫は *E. coli* OP50 が播種された NGM プレート上で培養した(Brenner, 1974)。全ての解析には 20℃で培養した成虫 1 日目の雌雄同体を用いた。二重変異線虫やトランスジーン発現線虫は掛け合わせによって作成した。目的の遺伝型を持つことは、線虫の表現型や対立遺伝子のゲノム配列を指標に確認した。

本研究で使用した変異遺伝子並びに対立遺伝子、ゲノムに挿入されたトランスジーンを以下に示す: *lin-10(e1439)I, unc-13(e450)I, syd-1(ju2)II, rimb-1(gk452845)III, rimb-1(gkDf40)III, elks-1(js816)IV, nq45 IV, calf-1(ky867)V, rpm-1(js410)V, nq49 V, lin-2(e1309)X, sad-1(ky289)X, syd-2(ok217)X, unc-2(e55)X, unc-10(md1117)X, unc-10(nq47)X, unc-18(e81)X, hpIs61[Punc-25-UNC-10-GFP]II, juIs1[Punc-25-SNB-1-GFP]IV, hpIs5[Punc-25-SYD-2-GFP]X, kyIs442[Podr-3-GFP-UNC-2, Podr-3-mCherry-RAB-3], kyIs479[Punc-25-GFP-UNC-2, Punc-25-mCherry-RAB-3], and vaIs33[Punc-2-UNC-2-GFP]*。

分子生物学

rimb-1 転写レポーターコンストラクトを作成するために、N2 野生型のゲノム DNA を Wizard SV Genomic DNA purification system (Promega)を用いて精製、これを鋳型として 1st ATG の 5.1 kb 上流のゲノム領域をプライマーYJ4630 と TO201 を用いた PCR で増幅した。合成イントロンが挿入された mCherry と *unc-10* 3'UTR を含む DNA フラグメントはプラスミド pCZGY411 をテンプレートとしてプライマーTO203 と TO111 を用いた PCR で増幅した。6.3 kb の *Primb-1-mCherry-unc-10* 3'UTR フラグメントはオーバーラップ PCR により作成した。

RIMB-1 cDNA は ISOGEN (Nippongene, Tokyo, Japan)で精製した N2 のトータル RNA を用いて PrimeScriptII RT-PCR Kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan)と PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Bio)により作成した。RIMB-1a cDNA (NM_065058_3) はプライマーTO372 と TO382 を用いて増幅した。RIMB-1b cDNA は predicted *tag-168* coding sequence (NM_065058_1)の両端を増幅するように設計した nested PCR により増幅した。1 次反応にはプライマーTO223 と TO224 を、二次反応にはプライマーTO227 と TO228 を用いた。これらの PCR 産物は EcoRI 切断された Gateway entry vector pCR8 vector に Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs) あるいは In-Fusion HD Cloning System (Takara Bio)を用いてサブクローニングし、pTR259 (pCR8-RIMB-1a) 、pTR179 (pCR8-RIMB-1b)とした。RIMB-1b CDS 全長は TO372 と TO380 により増幅し、NCBI データベースに登録した(GenBank MK431866)。

RIMB-1 の欠損コンストラクトのエントリークローンは pTR179 をもとに以下のように作成した。pTR255 (pCR8-RIMB-1ΔSH3-III)は pTR179 を SacI で切断し、セルフライゲーションにより作成した。pTR256 (pCR8-RIMB-1ΔC)は Sac I と Sac II で切断し、T4 DNA polymerase (Nippongene)により平滑化、セルフライゲーションにより作成した。pTR254 (pCR8-RIMB-1ΔN)は pTR179 をテンプレートとして、TO363 と TO364 を用いた PCR により作成したフラグメントと、pTR179 の XbaI 切断により産生された 2.9 kb のフラグメントを Gibson assembly により結合させた。

以上の cDNA と DNA コンストラクトは 3130xl Genetic Analyzer と BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)によりシーケンスを確認した。

発現ベクターは Gateway LR Clonase II Enzyme mix (Thermo Fisher Scientific)を用いてエントリークローンから作成した。デスティネーションベクターとして N 末端 mCherry タグ付きタンパク質を *unc-25* プロモーター制御下で D モーター神経に発現させるための pCZGY396 と、N 末端 FLAG タグ付きタンパク質を *rgef-1* プロモーター制御下で神経系に発現させるための pCZGY60 を用いた(Taru and Jin, 2011)。

使用プライマー配列

YJ4630 (5'-tgccggtttttgggac-3')
TO111 (5'-gttaatatttaaatgtttcggtattaattc-3')
TO201 (5'-cttcacccttgagaccatgccataggaggatgcgggggg-3')
TO203 (5'-atggtctcaaagggtgaagaagataac-3')
TO223 (5'-tatggcatggtgccaggcccgtcgacctcgttcac-3')
TO224 (5'-ttccggcgatttatcgatttacccacggattatcg-3')
TO227 (5'-agcaggctccgaattcggcatggtgccaggcccgt-3')
TO228 (5'-aagctgggtcgaattcttatcgatttacccacgga-3')
TO363 (5'-atcatcatgcctcctctagacc-3')
TO364 (5'-gatgcgactgcggctctagagcgagaattgggtctcgaacg-3')
TO372 (5'-agcaggctccgaattcggcatgctgggcggtctgtcg-3')
TO380 (5'-aagctgggtcgaatttaaattatcgatttacccacggattatcg-3')
TO382 (5'-aagctgggtcgaatttaaattatccttttttctttgcaccgg-3')

トランスジェニック

トランスジェニック動物は以前報告されたマイクロインジェクション法により作成した(Mello et al., 1991)。複数のトランスジェニックラインを作成し、解析した。インジェクションした DNA 溶液と染色体外アレイの番号は以下の通りである。*Primb-1*-mCherry の発現のため、7.8 ng/μL の *Primb-1*-mCherry-*unc-10* 3'UTR PCR フラグメントと 40 ng/μL の 共発現マーカー pRF4 をインジェクションし、*nqEx62* とし

た。神経系特異的 RIMB-1 コンストラクトの発現のため、各プラスミド 10 ng/µl と 90 ng/µl の共発現マーカー *Pttx-3*-GFP 或いは *Pttx-3*-RFP を *rimb-1(gk452845); unc-10(md1117); kyIs479* にインジェクションした。pTR1001 (*Prgef-1*-FLAG-RIMB-1b) から *nqEx63*, pTR1011 (*Prgef-1*-FLAG-RIMB-1a) から *nqEx89*, pTR1002 (*Prgef-1*-FLAG-RIMB-1bΔN) から *nqEx76*, pTR1004 (*Prgef-1*-FLAG-RIMB-1bΔC) から *nqEx80*, pTR1003 (*Prgef-1*-FLAG-RIMB-1bΔSH3-III) から *nqEx79* をそれぞれ作成した。D 神経における mCherry-RIMB-1 コンストラクトの発現のため、各プラスミド 20 ng/µl と 50 ng/µl の共発現マーカー *Pttx-3*-GFP を N2 あるいは *juIs1* にインジェクションした。pTR1012 (*Punc-25*-mCherry-RIMB-1a)から *nqEx84*, pTR185 (*Punc-25*-mCherry-RIMB-1b) から *nqEx41*, pTR1007 (*Punc-25*-mCherry-RIMB-1bΔN) から *nqEx71*, pTR1009 (*Punc-25*-mCherry-RIMB-1bΔC) から *nqEx72*, pTR1008 (*Punc-25*-mCherry-RIMB-1bΔSH3-III) から *nqEx82* をそれぞれ作成した。他の解析のために、*nqEx63*, *nqEx41*, *nqEx84* は様々な変異体やトランスジェニック線虫に掛け合わせにより導入した。

rimb-1 変異のエンハンサー遺伝子変異の遺伝学的スクリーニング

rimb-1(gk452845); kyIs442 にエチルメチルスルホン酸を用いた突然変異を導入した (Brenner, 1974)。F2 動物に中で顕著な運動失調を示す個体の中から AWC 神経において異常な GFP-UNC-2 局在を示す個体を探索した。約 5000 ハプロイドゲノムの変異体の中から、GFP-UNC-2 局在異常が著しく亢進した対立遺伝子を *nq47* とした。遺伝的連鎖と遺伝的相補性の解析から、*unc-10* を *nq47* により影響を受ける遺伝子として同定した。*unc-10* 遺伝子の 9.5 kb の領域を PCR により増幅し、BGISEQ-500 (BGI Genomics, China)で配列を解読した。

蛍光観察

生きた線虫を 5%アガーパッド上に置き、D 神経観察のため 1% 1-phenoxy-2-propanol (Wako, Osaka, Japan) in M9 buffer (22 mM KH2PO4, 41 mM Na2H PO4, 9 mM NaCl, 19 mM NH4Cl)中で、AWC 神経観察のため 1 mM levamisole (Wako, Osaka, Japan) in M9 buffer 中で麻酔をかけた。全ての画像は倒立蛍光顕微鏡(Keyence, Osaka, Japan; BZ-X710)を用いて、シナプスタンパク質観察のために 60 x N.A. 1.20 水浸対物レンズ (Nikon, Tokyo, Japan; Nikon CFI Plan Apochromat VC)あるいは 100 x N.A. 1.45 油浸対物レンズ(Nikon CFI Plan Apochromat Lambda)を、転写レポーターの観察のために 20 x N.A. 0.45 対物レンズ (Nikon CFI S Plan Fluor ELWD)と 60 x 対物レンズを用いた。蛍光シグナルは BZ-X filter GFP OP-87763 と TRITC OP-87764 (Keyence)を用いて取得し、Haze Reduction application (Keyence)で画像処理した。蛍光輝度プロファイルは、神経突起に沿った各ピクセルにおける蛍光輝度を Keyence アプリケーショ

ン Line-Profile (Keyence)により取得し、Microsoft Excel を用いて描画した。超解像 Airyscan 蛍光観察は Airyscan ユニット搭載検出器搭載共焦点レーザー顕微鏡 ZEISS LSM 880 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) で行った。撮影した画像は ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, MD)を用いて画像処理した。

蛍光マーカーの定量

AWC 神経軸索上の GFP-UNC-2 と mCherry-RAB-3 の定量は以下のように行った。100 x 対物レンズを用いて各個体 2 焦点の画像を撮影し、プレシナプス領域の Z 方向の深度をカバーし、それぞれ Haze Reduction で画像処理した。ImageJ (US National Institutes of Health)を用いて、閾値を設定し、GFP-UNC-2 および mCherry-RAB-3 の輝点を抽出した。この処理はまず野生型でパイロット的に解析を行った後、各種変異体に同様の処理を施した。そして、Analyze Particle により輝点の total area, number, average size を計測した。mCherry-RAB-3 で標識された軸索領域における GFP 領域を計測し、軸索の長さで平均化した。GFP-UNC-2 の軸索上の全輝度測定と 3D ヒートマップの作製は以下のように行った。まず元画像の Line-Profile から背景輝度を測定し、Keyence の Black Balance により背景輝度を除いた。そして軸索上の GFP 輝度を Integrated Density で測定し、ImageJ プラグイン Interactive 3D Surface Plot でヒートマップを作製した。各個体 2 焦点の平均値を求め、野生型を基準とした割合で数値化、統計処置に用いた。

D 神経における GFP-UNC-2 と SNB-1-GFP の定量は以下のように行った。GFP-UNC-2 の画像は 100 x 対物レンズを用いて撮影し、Haze Reduction で画像処理した。SNB-1-GFP の画像は 60 x 対物レンズを用いて撮影した。単一焦点における画像の中で 40 µm 以上のプレシナプス領域に焦点が合っている画像を用いて解析した。GFP-UNC-2 および SNB-1-GFP は目視により計測した。計測した輝点数は 100 µm あたりの輝点数に換算し、統計解析に用いた。

免疫染色

vaIs33[Punc-2-UNC-2-GFP]; nqEx63[Prgef-1-FLAG-RIMB-1b]の全組織標本染色は Finney‐Ruvkun's protocol (Finney and Ruvkun, 1990)を基本とし、固定に 2 % formaldehyde を使用した。サンプルは 4° Cで AbA バッファー中O／Nで 1 次抗体反応、室温で AbA バッファー中 4 時間、2 次抗体反応した。抗 FLAG マウスモノクローナル抗体 M2 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; F1804)は 1 µg/mL、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体(MBL, Nagoya, Japan; 598)は 1:1000 希釈で使用した。二次抗体 Alexa 647-conjugated ヤギ 抗マウス IgG (Abcam, Cambridge, England; A-21235) and Alexa 488-conjugated ロバ 抗ウサギ IgG (Abcam; A-21206)は 1 µg/mL で使用した。染色した線虫は 5%アガーパッド上に載せ、背側神経束を倒立蛍光顕微鏡(BZ-X710;

Keyence)で 100 x N.A. 1.45 油浸対物レンズ（Nikon CFI Plan Apochromat Lambda)、BZ-X フィルター GFP OP-87763 と Cy5 OP-87766 (Keyence)を使用して撮影した。

行動解析

水泳運動解析は若い成虫（L4 幼虫から 24 時間培養、各ストレイン 9-20 匹解析）を NGM 培地に乗せた M9 バッファーの水滴に入れ 30 秒おき、2 分間の屈折運動回数を測定した。アルジカルブアッセイは 80 匹の若い成虫（L4 幼虫から 24 時間培養）を 1 mM aldicarb (AccuStandard, Inc. New Haven, CT)含有 OP50 塗布 NGM 培地 2 枚に 40 匹ずつ移し、40 分おきに 8 時間にわたり麻痺した線虫の数を計測した。プレートから逃げ出した虫は解析からのぞいた。いずれのアッセイも各ストレインを二重盲検で並行して解析し、独立した 2 回の試行により再現性を確認した。

実験デザイン・disorder 予測解析・統計解析

すべての解析は *C. elegans* Bristol N2 とそれに由来する株の雌雄同体の若い成虫を用いて行った。全ての定量データは Mean ± SD で表し、n は解析に使用した個体数を表す。disorder 予測は IUPred2A(Mészáros *et al.*, 2018; https://iupred2a.elte.hu)を用いて行った。One-way ANOVA は水泳運動解析や蛍光観察に適用し、post *hoc* テストとして以下のような解析を行った。Tukey-Kramer test を Figs. 6D, 8G、Table 1 中 SNB-1-GFP 定量に、Tukey test を Figs. 4A, 7B'-E', 8H、Table 1 中 GFP-UNC-2 と mCherry-RAB-3 定量に、Dunnett test を Fig. 10B に適用した。Two-tailed Student's *t*‐test を野生型と *rimb-1* 変異体における SNB-1-GFP 輝点の定量および Fig. 12D, E に適用した。Log-rank test を Figs. 4C, D, 6E に適用し、*p* 値を Bonferroni correction により補正した。全ての統計解析は JMP (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina)で行い、すべてのグラフは Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California)で作成した。すべての *t* 値、 *F* 値、*p* 値は Table2 にまとめている。

参考文献

Ackley BD, Harrington RJ, Hudson ML, Williams L, Kenyon CJ, Chisholm AD, Jin Y (2005) The two isoforms of the Caenorhabditis elegans leukocyte-common antigen related receptor tyrosine phosphatase PTP-3 function independently in axon guidance and synapse formation. J Neurosci 25: 7517-7528

Ackermann F, Waites CL, Garner CC (2015) Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. EMBO Rep 16:923–938.

Acuna C, Liu X, Gonzalez A, Südhof TC (2015) RIM-BPs mediate tight coupling of action potentials to Ca^{2+}-triggered neurotransmitter release. Neuron 87:1234–1247.

Acuna C, Liu X, Südhof TC (2016) How to make an active zone: Unexpected universal functional redundancy between RIMs and RIM-BPs. Neuron 91:792–807.

Altun-Gultekin Z, Andachi Y, Tsalik EL, Pilgrim D, Kohara Y, Hobert O (2001) A regulatory cascade of three homeobox genes, ceh-10, ttx-3 and ceh-23, controls cell fate specification of a defined interneuron class in C. elegans. Development 128: 1951-1969

Alvarez-Baron E, Michel K, Mittelstaedt T, Opitz T, Schmitz F, Beck H, Dietrich D, Becker AJ, Schoch S (2013) RIM3γ and RIM4γ are key regulators of neuronal arborization. J Neurosci 33: 824-839

Brenner S (1974) The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics 77:71–94.

Bruckner JJ, Zhan H, Gratz SJ, Rao M, Ukken F, Zilberg G, O'Connor-Giles KM (2017) Fife organizes synaptic vesicles and calcium channels for high-probability neurotransmitter release. J Cell Biol 216:231–246.

Bucan M et al. (2009) Genome-wide analyses of exonic copy number variants in a family-based study point to novel autism susceptibility genes. PLoS Genet 5:e1000536.

Caylor RC, Jin Y, Ackley BD (2013) The Caenorhabditis elegans voltage-gated calcium channel subunits UNC-2 and UNC-36 and the calcium-dependent kinase UNC-43/CaMKII regulate neuromuscular junction morphology. Neural Dev 8:10.

Coppola T, Magnin-Lüthi S, Perret-Menoud V, Gattesco S, Schiavo G, Regazzi R (2001) Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca2+ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. J Biol Chem 276:32756–32762.

Crump JG, Zhen M, Jin Y, Bargmann CI (2001) The SAD-1 kinase regulates presynaptic vesicle clustering and axon termination. Neuron 20: 115-129.

Dai Y, Taru H, Deken SL, Grill B, Ackley B, Nonet ML, Jin Y (2006) SYD-2 Liprin-alpha organizes presynaptic active zone formation through ELKS. Nat Neurosci 9: 1479-1487.

Davydova D, Marini C, King C, Klueva J, Bischof F, Romorini S, Montenegro-Venegas C, Heine M, Schneider R, Schröder MS, Altrock WD, Henneberger C, Rusakov DA, Gundelfinger ED, Fejtova A (2014) Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca2+ channels via RIM-binding protein. Neuron 82:181–194.

Dresbach T, Qualmann B, Kessels MM, Garner CC, Gundelfinger ED (2001) The presynaptic cytomatrix of brain synapses. Cell Mol Life Sci 58:94–116.

Edwards SL, Morrison LM, Manning L, Stec N, Richmond JE, Miller KG (2018) Sentryn acts with a subset of active zone proteins to optimize the localization of synaptic vesicles in Caenorhabditis elegans. Genetics 210:947–968.

Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. Cell 139: 380-392

Finney M, Ruvkun G (1990) The unc-86 gene product couples cell lineage and cell identity in C. elegans. Cell 63:895–905.

Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A (2012) RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the Drosophila neuromuscular junction. J Neurosci 32:16586–16596

Grauel MK, Maglione M, Reddy-Alla S, Willmes CG, Brockmann MM, Trimbuch T, Rosenmund T, Pangalos M, Vardar G, Stumpf A, Walter AM, Rost BR, Eickholt BJ, Haucke V, Schmitz D, Sigrist SJ, Rosenmund C (2016) RIM-binding protein 2 regulates release probability by fine-tuning calcium channel localization at murine hippocampal synapses. Proc Natl Acad Sci 113:11615–11620

Guida S, Trettel F, Pagnutti S, Mantuano E, Tottene A, Veneziano L, Fellin T, Spadaro M, Stauderman K, Williams M, Volsen S, Ophoff R, Frants R, Jodice C, Frontali M, Pietrobon D (2001) Complete loss of P/Q calcium channel activity caused by a CACNA1A missense mutation carried by patients with episodic ataxia type 2. Am J Hum Genet 68: 759-764.

Hallam SJ, Goncharov A, McEwen J, Baran R, Jin Y (2002) SYD-1, a presynaptic protein with PDZ, C2 and rhoGAP-like domains, specifies axon identity in C. elegans. Nat Neurosci 5: 1137-1146

Han Y, Kaeser PS, Südhof TC, Schneggenburger R (2011) RIM determines Ca2+ channel density and vesicle docking at the presynaptic active zone. Neuron 69:304–316.

Heyes S, Pratt WS, Rees E, Dahimene S, Ferron L, Owen MJ, Dolphin AC (2015) Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. Prog Neurobiol 134:36–54.

Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Vologodskaia M, Hudspeth AJ, Lesage F (2002) RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca2+ channels. Neuron 34:411–423.

Hoogenraad CC, Feliu-Mojer MI, Spangler SA, Milstein AD, Dunah AW, Hung AY, Sheng M (2007) Liprin alpha 1 degradation by calcium/calmodulin-dependent

protein kinase II regulates LAR receptor tyrosine phosphatase distribution and dendrite development. Dev Cell 12: 587-602.

Huang YC, Pirri JK, Rayes D, Gao S, Mulcahy B, Grant J, Saheki Y, Francis MM, Zhen M, Alkema MJ (2019) Gain-of-function mutations in the UNC-2/CaV2α channel lead to excitation-dominant synaptic transmission in Caenorhabditis elegans. 8: e45905

Jenkins MA, Christel CJ, Jiao Y, Abiria S, Kim KY, Usachev YM, Obermair GJ, Colbran RJ, Lee A (2010) Ca2+-dependent facilitation of Cav1.3 Ca2+ channels by densin and Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II. J Neurosci 30: 5125-5135

Jin Y, Jorgensen E, Hartwieg E, Horvitz HR (1999) The Caenorhabditis elegans gene unc-25 encodes glutamic acid decarboxylase and is required for synaptic transmission but not synaptic development. J Neurosci 19: 539-548

Kaeser PS, Deng L, Wang Y, Dulubova I, Liu X, Rizo J, Südhof TC (2011) RIM proteins tether Ca2+ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. Cell 144:282–295.

Krinner S, Butola T, Jung S, Wichmann C, Moser T (2017) RIM-Binding Protein 2 Promotes a Large Number of CaV1.3 Ca2+-Channels and Contributes to Fast Synaptic Vesicle Replenishment at Hair Cell Active Zones. Front Cell Neurosci 11: 334

Kurup N, Jin Y (2016) Neuronal circuit rewiring: insights from DD synapse rewiring. Worm

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.

Kiyonaka S, Nakajima H, Takada Y, Hida Y, Yoshioka T, Hagiwara A, Kitajima I, Mori Y, Ohtsuka T (2012) Physical and functional interaction of the active zone protein CAST/ERC2 and the β-subunit of the voltage-dependent Ca2+ channel. J Biochem 152:149–159.

Koushika SP, Richmond JE, Hadwiger G, Weimer RM, Jorgensen EM, Nonet ML (2001) A post-docking role for active zone protein Rim. Nat Neurosci 4:997–1005.

Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, Raja A, Coe BP, Stessman HA, He Z-X, Leal SM, Bernier R, Eichler EE (2015) Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. Nat Genet 47:582–588.

Kurshan PT, Merrill SA, Dong Y, Ding C, Hammarlund M, Bai J, Jorgensen EM, Shen K (2018) γ-Neurexin and Frizzled mediate parallel synapse assembly pathways antagonized by receptor endocytosis. Neuron 100:150–166.e4.

Lee RY, Lobel L, Hengartner M, Horvitz HR, Avery L (1997) Mutations in the alpha1 subunit of an L-type voltage-activated Ca2+ channel cause myotonia in Caenorhabditis elegans. EMBO J 16: 6066-6076

Liang F, Zhang B, Tang J, Guo J, Li W, Ling EA, Chu H, Wu Y, Chan YG, Cao Q (2007) RIM3gamma is a postsynaptic protein in the rat central nervous system. J Comp Neurol 503: 501-510

Liu H, Li L, Wang W, Gong J, Yang X, Hu Z (2018) Spontaneous vesicle fusion is differentially regulated at cholinergic and GABAergic synapses. Cell Rep 22:2334–2345.

Liu KS, Siebert M, Mertel S, Knoche E, Wegener S, Wichmann C, Matkovic T, Muhammad K, Depner H, Mettke C, Bückers J, Hell SW, Müller M, Davis GW, Schmitz D, Sigrist SJ (2011) RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. Science 334:1565–1569.

Macosko EZ, Pokala N, Feinberg EH, Chalasani SH, Butcher RA, Clardy J, Bargmann CI (2009) A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behaviour in C. elegans. Nature 458:1171–1175.

Mathews EA, Garcia E, Santi CM, Mullen GP, Thacker C, Moerman DG, Snutch TP (2003) Critical residues of the Caenorhabditis elegans unc-2 voltage-gated calcium channel that affect behavioral and physiological properties. J Neurosci 23:6537–6545.

Maximov A, Südhof TC, Bezprozvanny I (1999) Association of neuronal calcium channels with modular adaptor proteins. J Biol Chem 274:24453–24456.

Mello CC, Kramer JM, Stinchcomb D, Ambros V (1991) Efficient gene transfer in C. elegans: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. EMBO J 10:3959–3970.

Mészáros B, Erdos G, Dosztányi Z (2018) IUPred2A: context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. Nucleic Acids Res. 46(W1): W329-W337

Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB (1996) A genetic selection for Caenorhabditis elegans synaptic transmission mutants. Proc Natl Acad Sci 93:12593–12598.

Morrison LM, Edwards SL, Manning L, Stec N, Richmond JE, Miller KG (2018) Sentryn and SAD kinase link the guided transport and capture of dense core vesicles in Caenorhabditis elegans. Genetics 210:925–946.

Müller M, Genç Ö, Davis GW (2015) RIM-binding protein links synaptic homeostasis to the stabilization and replenishment of high release probability vesicles. Neuron 85:1056–1069.

Nguyen M, Alfonso A, Johnson CD, Rand JB (1995) Caenorhabditis elegans mutants resistant to inhibitors of acetylcholinesterase. Genetics 140:527–535.

Patel MR, Lehrman EK, Poon VY, Crump JG, Zhen M, Bargmann CI, Shen K. (2006) Hierarchical assembly of presynaptic components in defined C. elegans synapses. Nat Neurosci 9:1488–1498.

Patel R, Dickenson AH (2016) Mechanisms of the gabapentinoids and α 2 δ-1 calcium channel subunit in neuropathic pain. Pharmacol Res Perspect: 4: e00205

Patricia R. Goodwin, Peter Juo (2013)The Scaffolding Protein SYD-2/Liprin-α Regulates the Mobility and Polarized Distribution of Dense-Core Vesicles in C. elegans Motor Neurons. PLOS ONE 8: e54763

Richmond JE, Davis WS, Jorgensen EM (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in C. elegans. Nat Neurosci 2: 959-964

Saheki Y, Bargmann CI (2009) Presynaptic CaV2 calcium channel traffic requires CALF-1 and the α2δ subunit UNC-36. Nat Neurosci 12:1257–1265.

Schafer WR, Kenyon CJ (1995) A calcium-channel homologue required for adaptation to dopamine and serotonin in Caenorhabditis elegans. Nature 375:73–78.

Schoch S, Gundelfinger ED (2006) Molecular organization of the presynaptic active zone. Cell Tissue Res 326:379–391.

Sclip A, Acuna C, Luo F, Südhof TC (2018) RIM-binding proteins recruit BK-channels to presynaptic release sites adjacent to voltage-gated Ca^{2+}-channels. EMBO J 37:e98637

Siebert M et al. (2015) A high affinity RIM-binding protein/Aplip1 interaction prevents the formation of ectopic axonal active zones. Elife 4.

Simms BA, Zamponi GW (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function, and dysfunction. Neuron 82:24–45.

Stigloher C, Zhan H, Zhen M, Richmond J, Bessereau JL (2011) The presynaptic dense projection of the Caenorhabditis elegans cholinergic neuromuscular junction localizes synaptic vesicles at the active zone through SYD-2/Liprin and UNC-10/RIM-dependent interactions. J Neurosci 31:4388–4396.

Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. Neuron 75:11–25.

Taru H, Jin Y (2011) The Liprin homology domain is essential for the homomeric interaction of SYD-2/Liprin-α protein in presynaptic assembly. J Neurosci 31:16261–16268

Tong XJ, López-Soto EJ, Li L, Liu H, Nedelcu D, Lipscombe D, Hu Z, Kaplan JM (2017) Retrograde Synaptic Inhibition Is Mediated by α-Neurexin Binding to the α2δ Subunits of N-Type Calcium Channels. Neuron 95: 326-340.e5

Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Pietrobon D (2009) Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in $Ca_v2.1$ knockin migraine mice. Neuron 61: 762-773

Wang SSH, Held RG, Wong MY, Liu C, Karakhanyan A, Kaeser PS (2016) Fusion Competent Synaptic Vesicles Persist upon Active Zone Disruption and Loss of Vesicle Docking. Neuron 91:777–791.

Wang Y, Okamoto M, Schmitz F, Hofmann K, Südhof TC (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. Nature 388:593–598.

Wang Y, Sugita S, Südhof TC (2000) The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins: Interactions with Rab3 and a new class of Src homology 3 domain proteins. J Biol Chem 275:20033–20044.

Wang ZW, Saifee O, Nonet ML, Salkoff L (2001) SLO-1 potassium channels control quantal content of neurotransmitter release at the C. elegans neuromuscular junction. Neuron 6: 867-881.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S (1986) The structure of the nervous system of the nematode Caenorhabditis elegans. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 314:1–340.

Wu X, Cai Q, Shen Z, Chen X, Zeng M, Du S, Zhang M (2019) RIM and RIM-BP Form Presynaptic Active-Zone-like Condensates via Phase Separation. Mol Cell:1–14.

Yeh E, Kawano T, Weimer RM, Bessereau JL, Zhen M (2005) Identification of genes involved in synaptogenesis using a fluorescent active zone marker in Caenorhabditis elegans. J Neurosci 25: 3833-3841

Zhang H, Maximov A, Fu Y, Xu F, Tang TS, Tkatch T, Surmeier DJ, Bezprozvanny I (2005) Association of CaV1.3 L-type calcium channels with Shank. J Neurosci 25: 1037-1049

Zhen M, Jin Y (1999) The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in C. elegans. Nature 401:371–375.

Zhen M, Huang X, Bamber B, Jin Y (2000) Regulation of presynaptic terminal organization by C. elegans RPM-1, a putative guanine nucleotide exchanger with a RING-H2 finger domain. Neuron 26: 331-343

図表

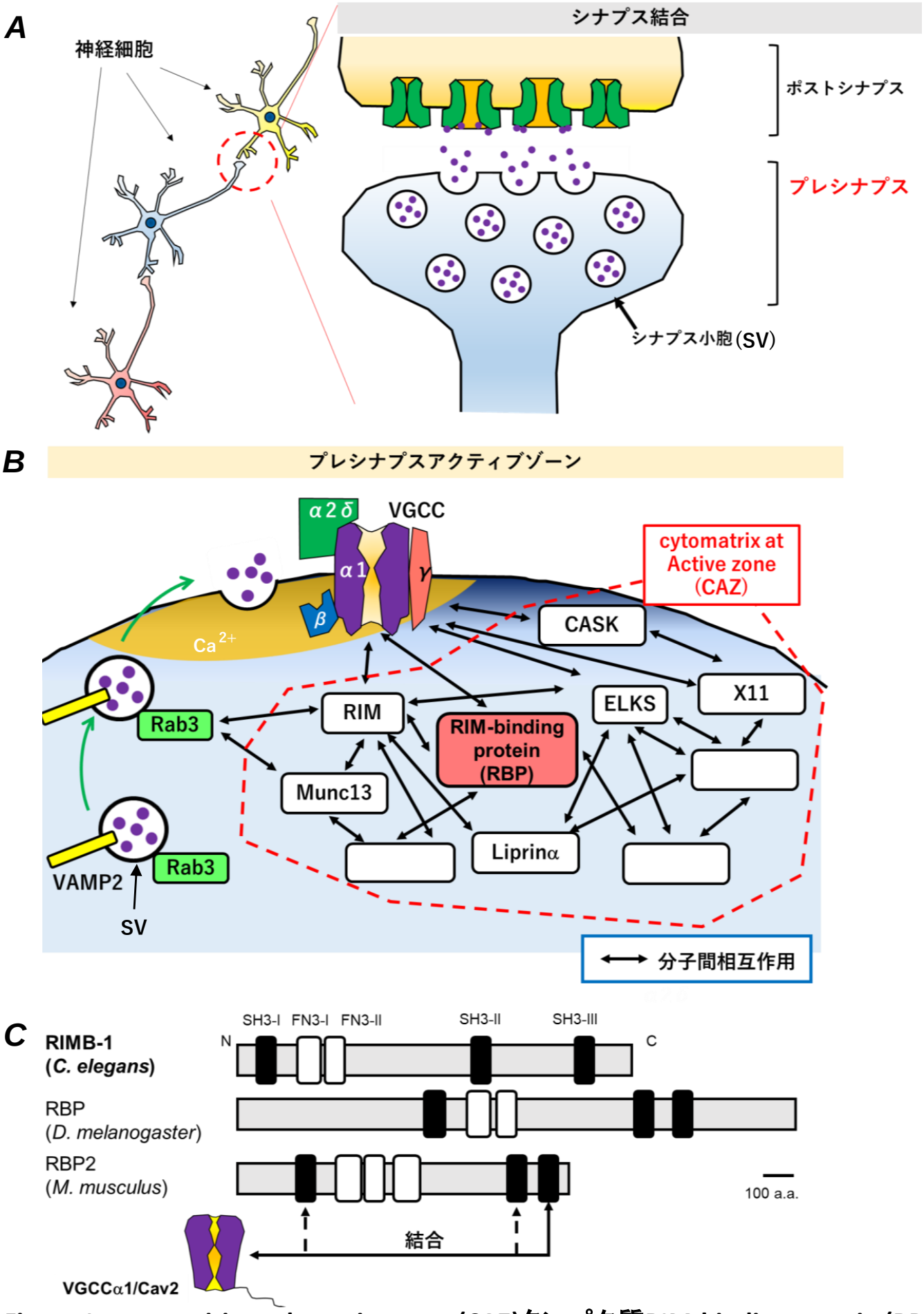


Figure 1. cytomatirix at the active zone (CAZ)タンパク質RIM-binding protein (RBP)

A.神経細胞間接着構造シナプス結合の模式図。プレシナプスから放出された神経伝達物質はポストシナプスの膜上受容体を介して、ポストシナプスへ情報を伝達をする。

B. CAZタンパク質は電位依存性カルシウムチャネル(voltage-gated calcium channel, VGCC)やシナプス小胞(synaptic vesicle, SV)タンパク質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。

C. RBPファミリータンパク質。RBPファミリーは機能ドメインとしてSH3、FN3ドメインが保存されている。マウスRBP2はSH3ドメインを介して、VGCCα1 Cav2と結合する。特に3番目のSH3ドメインの結合親和性が高い。

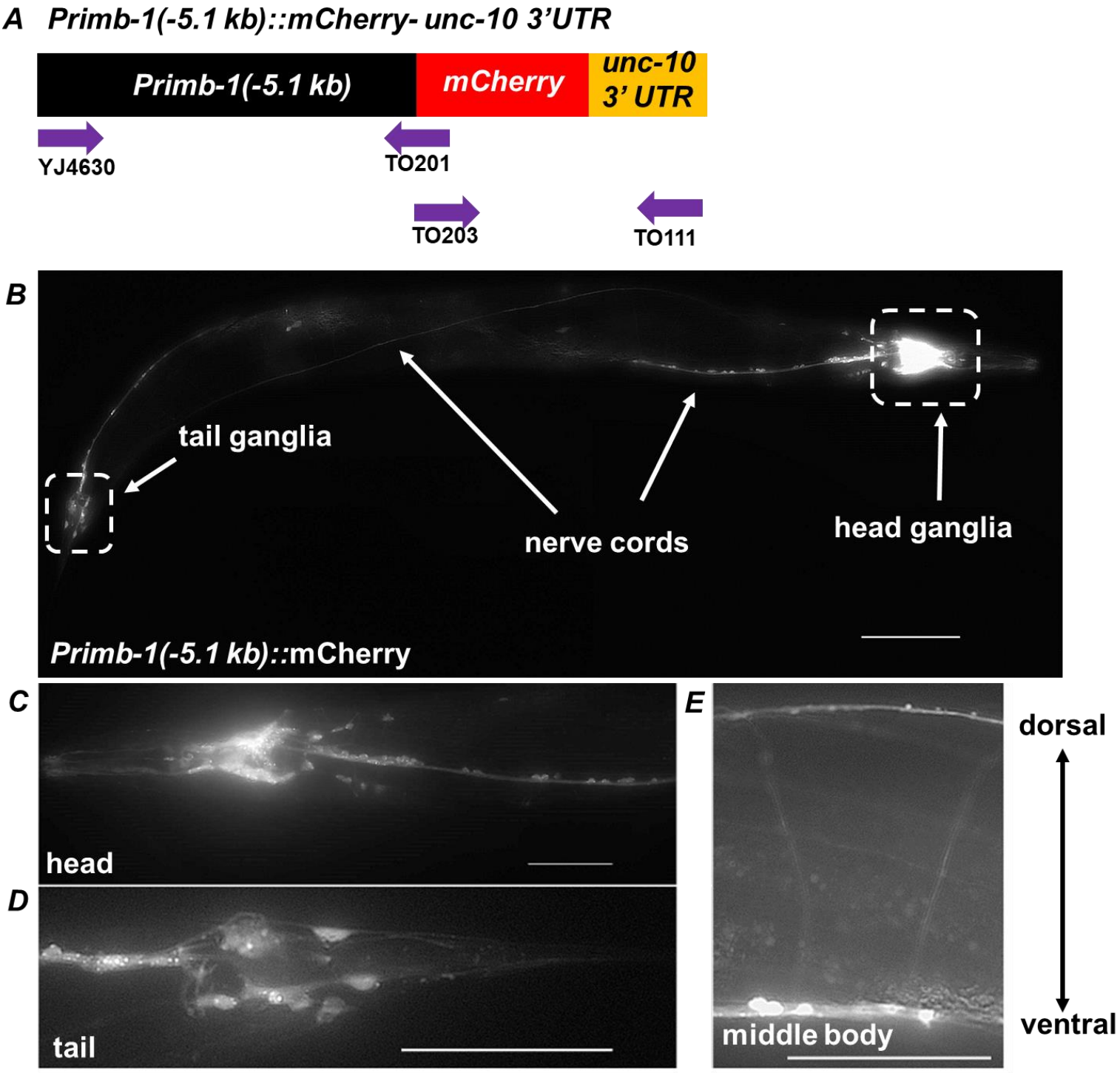
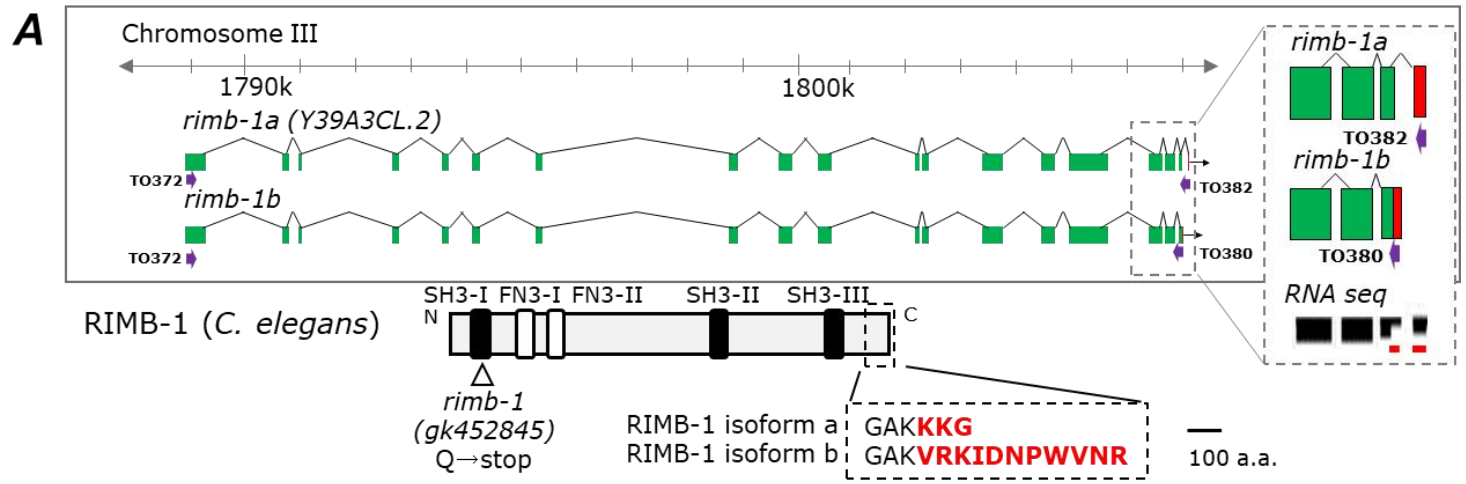
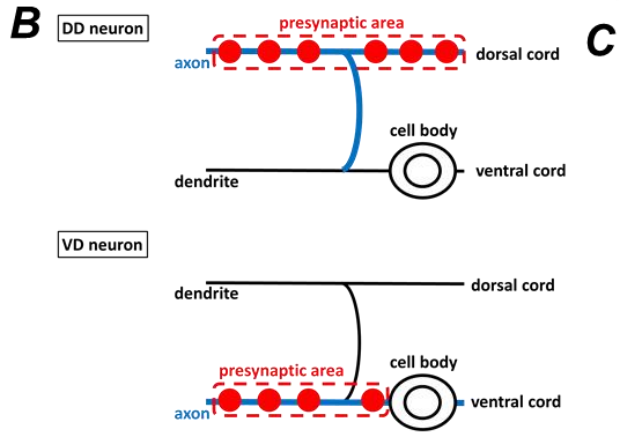


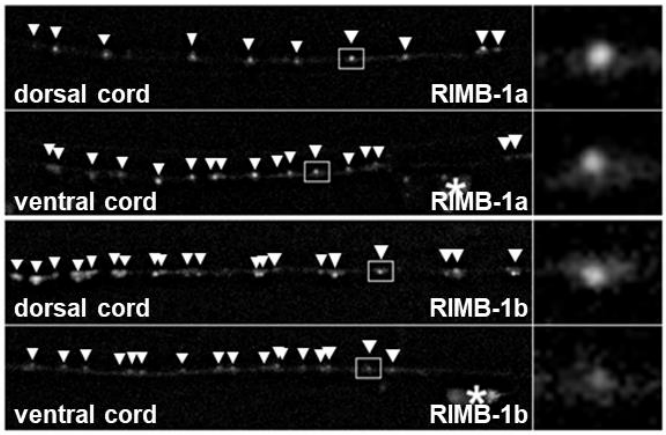
Figure 2. 神経組織における*rimb-1*発現

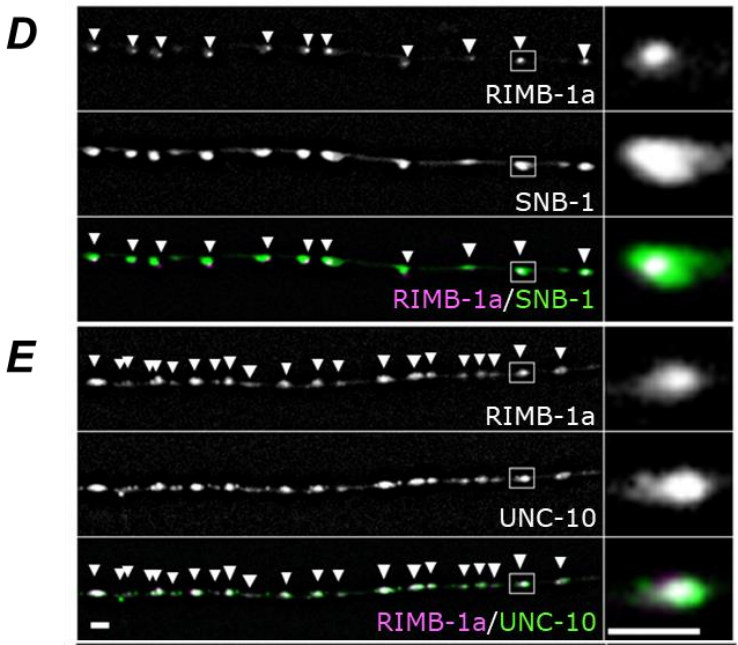
A. *rimb-1*転写レポーターの模式図。*rimb-1* CDSの5.1 kb上流のゲノム配列(*Primb-1(-5.1 kb)*)の下流に*mCherry-unc-10 3'UTR*を繋いだ。増幅に用いたプライマーは紫矢印で表した。

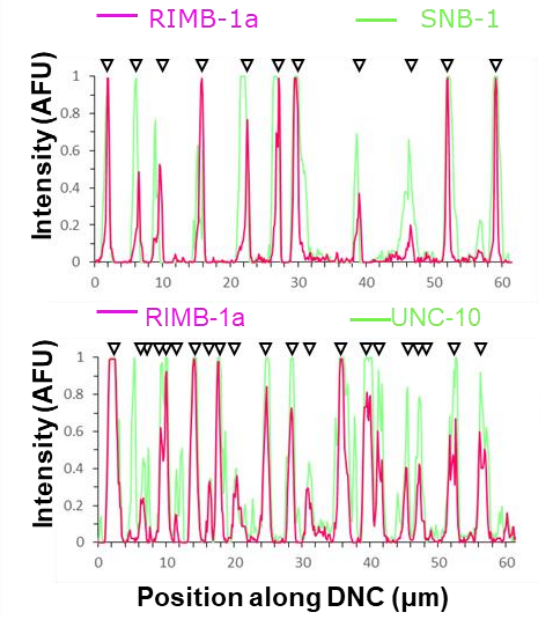
B–E. *rimb-1*転写レポーターの発現パターン。*rimb-1*プロモーター配列制御下でmCherryを発現するトランスジェニック線虫の蛍光イメージを示す。mCherryシグナルは頭部神経節(B:head ganglia、C)、尾部神経節(B: tail ganglia、D)、神経束(B: nerve cord, (背側(E: 白矢印)、腹側(E:白矢頭))から構成される全身の神経系で広く検出された。スケールバー:50 µm。

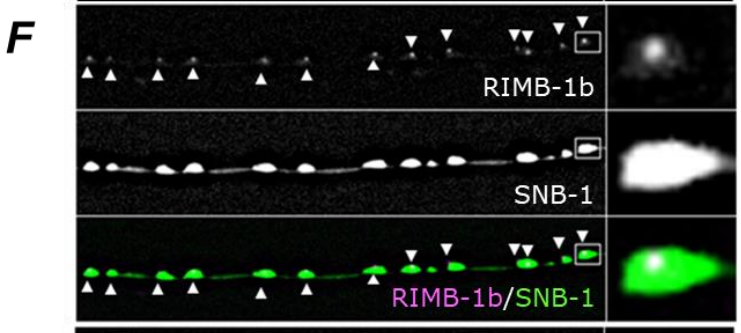

A
Chromosome III
1790k
1800k
rimb-1a (Y39A3CL.2)
TO372
rimb-1b
TO372
TO382
TO380
rimb-1a
TO382
rimb-1b
TO380
RNA seq
RIMB-1 (C. elegans)
SH3-I FN3-I FN3-II SH3-II SH3-III
N
C
rimb-1
(gk452845)
Q→stop
RIMB-1 isoform a GAKKKG
RIMB-1 isoform b GAKVRKIDNPWVNR
100 a.a.

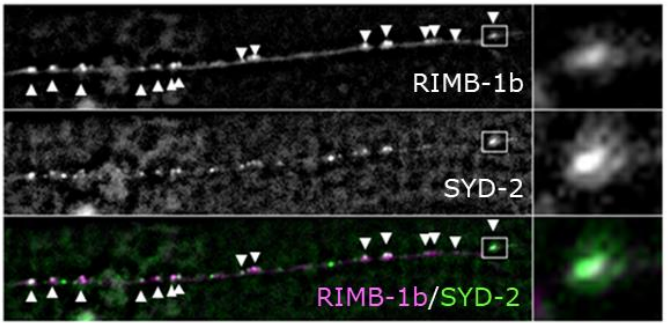

B
DD neuron
presynaptic area
axon
dorsal cord
cell body
dendrite
ventral cord
VD neuron
dendrite
dorsal cord
presynaptic area
cell body
axon
ventral cord


C
dorsal cord
RIMB-1a
ventral cord
RIMB-1a
dorsal cord
RIMB-1b
ventral cord
RIMB-1b


D
RIMB-1a
SNB-1
RIMB-1a/SNB-1
E
RIMB-1a
UNC-10
RIMB-1a/UNC-10


RIMB-1a
SNB-1
Intensity (AFU)
RIMB-1a
UNC-10
Intensity (AFU)
Position along DNC (µm)


F
RIMB-1b
SNB-1
RIMB-1b/SNB-1


G
RIMB-1b
SYD-2
RIMB-1b/SYD-2

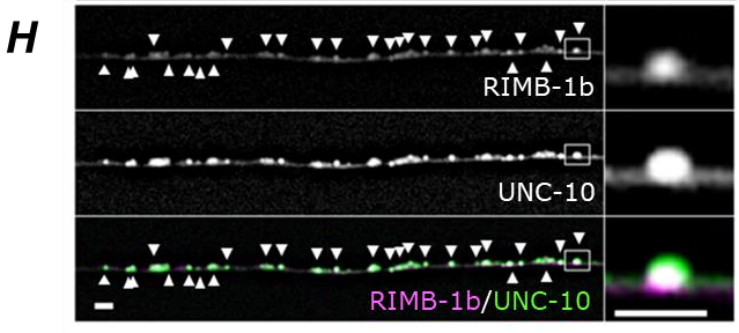

H
RIMB-1b
UNC-10
RIMB-1b/UNC-10

Figure 3

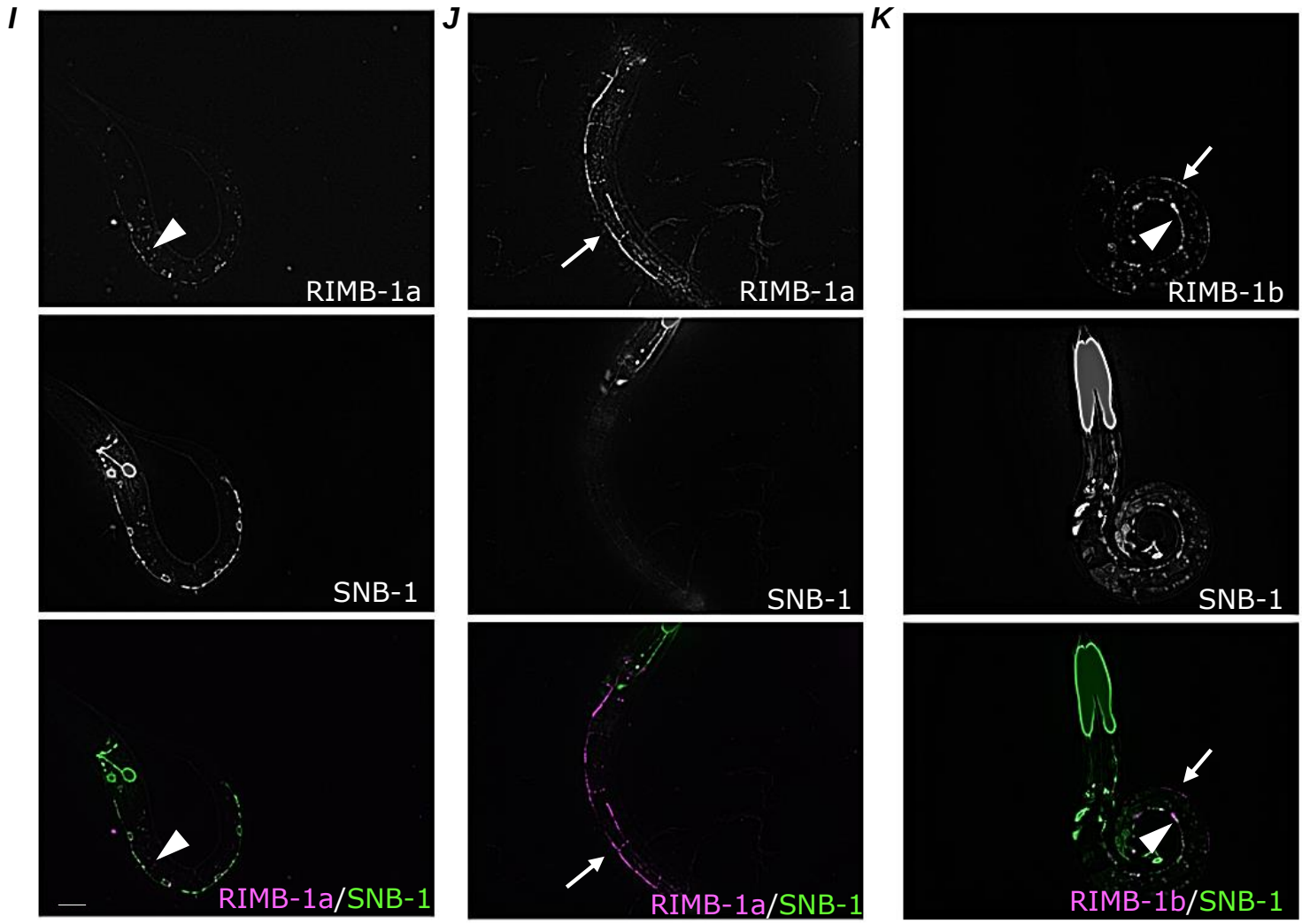


Figure 3. RIMB-1の一次構造と神経細胞内局在

A. ゲノム上における*rimb-1* とRIMB-1タンパク質の各アイソフォームの模式図。*rimb-1*の遺伝子座はIII番染色体に位置し、CDSは18~19のエキソンから構成されている。*rimb-1a, rimb-1b*は最終エキソンにおけるスプライシングが異なる。RNA sequenceの結果から*rimb-1a* 最終エキソンの発現は*rimb-1b*の発現よりも多いことが分かった (https://wormbase.org, 赤下線部)。各アイソフォームのサブクローニングに用いたプライマーは紫矢印で、異なるスプライシングサイトは赤いエキソンボックスで示した。

RIMB-1タンパク質はいずれのアイソフォームも3つのSH3(黒長方形)、2つあるいは3つのFN3(白長方形)ドメインをもつ。RIMB-1の各アイソフォームはC末端に異なるアミノ酸配列を持つ（赤太字）。*rimb-1(gk452845)*アリルはSH3-Iの中に未成熟終止コドンが出現するナンセンス変異である(矢頭)。

B. 背側D(dorsal D, DD)運動神経、腹側D(ventral D, VD)運動神経の模式図。DD、VD神経いずれも細胞体(cell body)を腹側に形成する。DDは背側に、VDは腹側に軸索(axon)を投射する。いずれも軸索に沿ってプレシナプス（presynaptic area, 赤丸）を形成する。

C. D神経軸索におけるmCherry-RIMB-1a, mCherry-RIMB-1bの分布。背側神経軸索(dorsal cord)、腹側神経軸索(ventral cord)の蛍光画像（左パネル）と1輝点を拡大した画像（右パネル）を示す。＊: 細胞体。スケールバー: 2 µm。mCherry-RIMB-1は軸索上に輝点として分布した(白矢頭)。

D, E. DD神経軸索におけるmCherry-RIMB-1aと共発現したGFP融合SVタンパク質SNB-1/VAMP2(D)、CAZタンパク質UNC-10/RIM（E）の局在。DD神経軸索の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(mCherry-RIMB-1a:マゼンタ、SNB-1-GFP/UNC-10ーGFP:緑)（右パネル）を示す。スケールバー: 2 µm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。mCherry-RIMB-1a輝点(白矢頭)はプレシナプスタンパク質の輝点と共局在した。

F-H. DD神経軸索におけるmCherry-RIMB-1bと共発現したGFP融合SVタンパク質SNB-1/VAMP2(F)、AZタンパク質SYD-2/Liprin-α(G)、UNC-10/RIM（H）の局在。背側神経突起の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（右パネル）を示す。スケールバー: 2 µm。mCherry-RIMB-1b輝点(白矢頭)はプレシナプスタンパク質の輝点と共局在した。

I-K. L1幼虫期におけるDD軸索および樹状突起上のmCherry-RIMB-1a, mCherry-RIMB-1bとSNB-1-GFPの分布。スケールバー: 10 µm。mCherry-RIMB-1a, mCherry-RIMB-1bはいずれもSNB-1-GFPと共局在する腹側のシグナル(I, K:白矢頭)と共局在しない背側のシグナル(J, K:白矢印)として観察された。

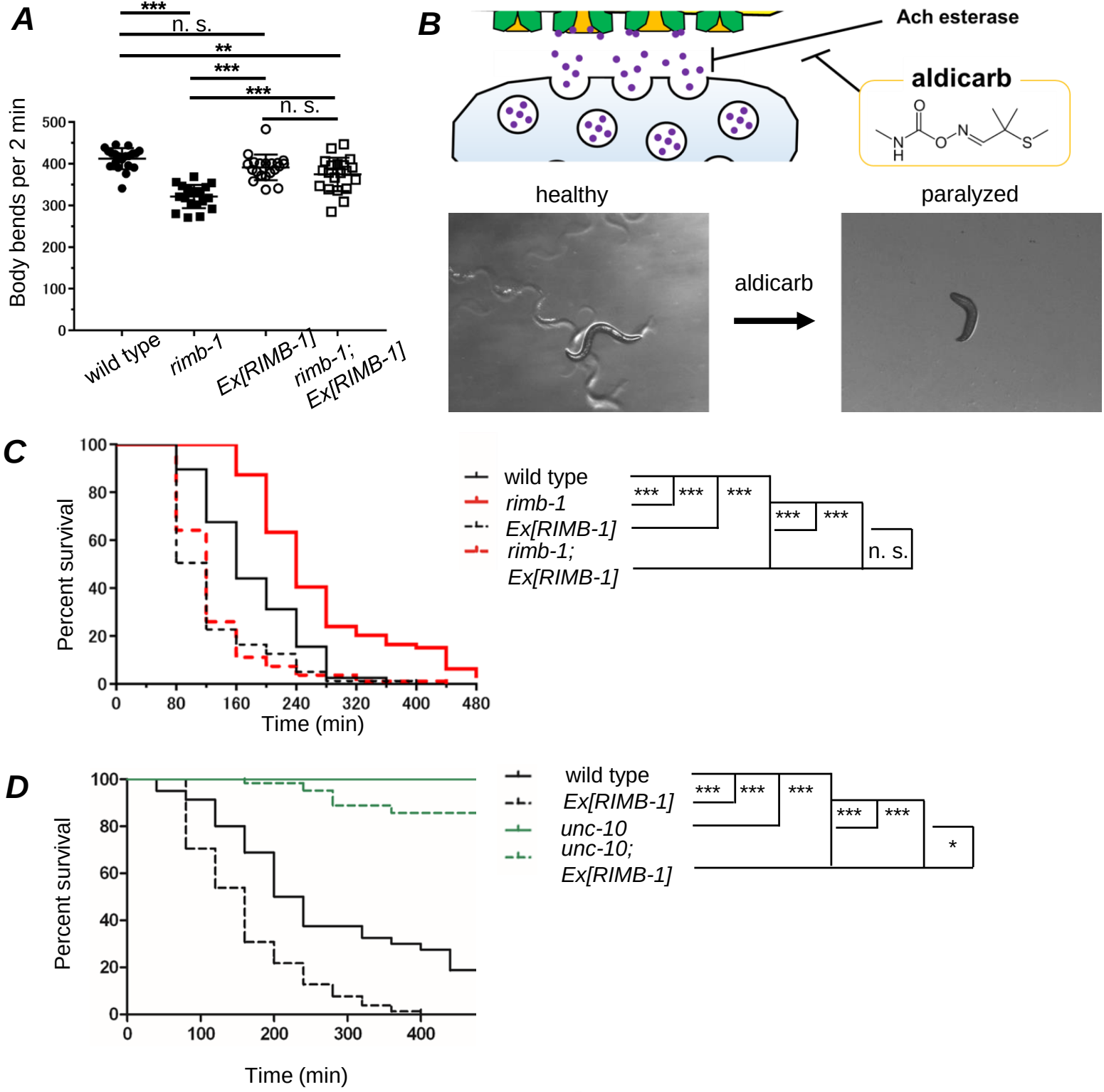

A
***
n. s.
**
***
***
n. s.
Body bends per 2 min
500
400
300
200
100
0
wild type
rimb-1
Ex[RIMB-1]
rimb-1; Ex[RIMB-1]
B
Ach esterase
aldicarb
healthy
paralyzed
aldicarb
C
Percent survival
100
80
60
40
20
0
0
80
160
240
320
400
480
Time (min)
wild type
rimb-1
Ex[RIMB-1]
rimb-1; Ex[RIMB-1]
***
***
***
***
***
n. s.
D
Percent survival
100
80
60
40
20
0
0
100
200
300
400
Time (min)
wild type
Ex[RIMB-1]
unc-10
unc-10; Ex[RIMB-1]
***
***
***
***
***
*
E
wild type
SNB-1
rimb-1
SNB-1
F
wild type
SYD-2
rimb-1
SYD-2
G
wild type
UNC-10
rimb-1
UNC-10

Figure 4

Figure 4. RIMB-1のシナプス伝達制御能とプレシナプスタンパク質局在制御能の解析

A. *rimb-1*変異線虫と神経特異的RIMB-1b過剰発現トランスジェニック線虫(*Ex[RIMB-1]*)の水中屈折頻度。*rimb-1*変異線虫は少ない屈折頻度を示し、RIMB-1過剰発現により屈折頻度の減少は回復した。Mean ± SD, n = 20。one-way ANOVA後Tukey test: n.s. $p \geq 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$。

B. アルジカルブの作用機序モデルとアルジカルブ処理前後の線虫の見かけ上の変化。コリン作動性神経において放出されたアセチルコリン（Ach, 紫丸）はAch esteraseにより分解されるが、アルジカルブはAch esteraseによるAchの分解を阻害する（上パネル）。健康な虫（左下パネル）はアルジカルブ処理後、麻痺症状を示す(右下パネル)。

C, D. アルジカルブ処理後時間における生存率。*rimb-1*変異線虫(C)、*unc-10*変異線虫(D)はアルジカルブ処理後生存時間の延長を示し、RIMB-1過剰発現により、野生型(C, D: (wild type vs *Ex[RIMB-1]*))および*rimb-1*変異体(C: *rimb-1* vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*), *unc-10*変異線虫(D: *unc-10* vs *unc-10; Ex[RIMB-1]*)のアルジカルブ処理後の生存時間が短縮した。n = 70–80。Bonferroni補正Log-rank test: n.s. $p \geq 0.05$,$^{*}p<0.05$, $^{***}p < 0.001$。

E-G. 野生型、*rimb-1*変異線虫のDD神経軸索におけるGFP融合SVタンパク質SNB-1(E)、CAZタンパク質SYD-2/Liprinα (F), UNC-10/RIM（G）の分布。スケールバー：2 μm。いずれのプレシナプスタンパク質も*rimb-1*変異線虫において明確な分布の異常を示さなかった。

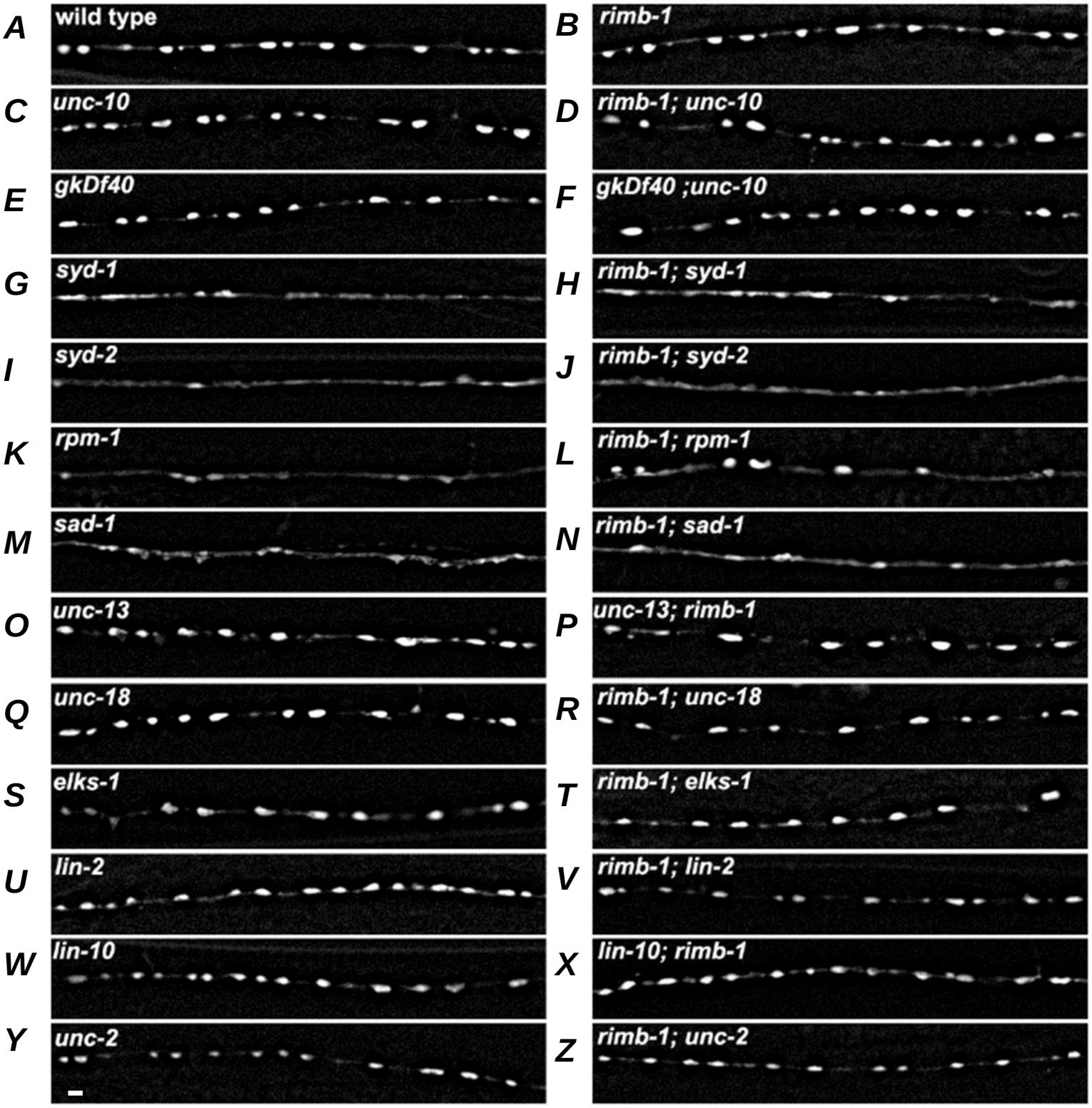


Figure 5. *rimb-1*とプレシナプスタンパク質二重変異線虫における SVタンパク質SNB-1-GFPの分布

野生型およびプレシナプスタンパク質単独変異線虫、*rimb-1*とプレシナプスタンパク質二重変異線虫のDD神経軸索におけるGFP融合SVタンパク質SNB-1の分布。スケールバー：2 µm。SNB-1-GFPの分布は、プレシナプスタンパク質単独変異線虫の内、*syd-1*変異線虫(G),*syd-2*変異線虫(I), *rpm-1*変異線虫(K), *sad-1*変異線虫(M)において、野生型と比べ、明確な異常が観察された。全ての*rimb-1*とプレシナプスタンパク質二重変異線虫は単独変異線虫と比べ、定性的な分布の違いが観察されなかった。

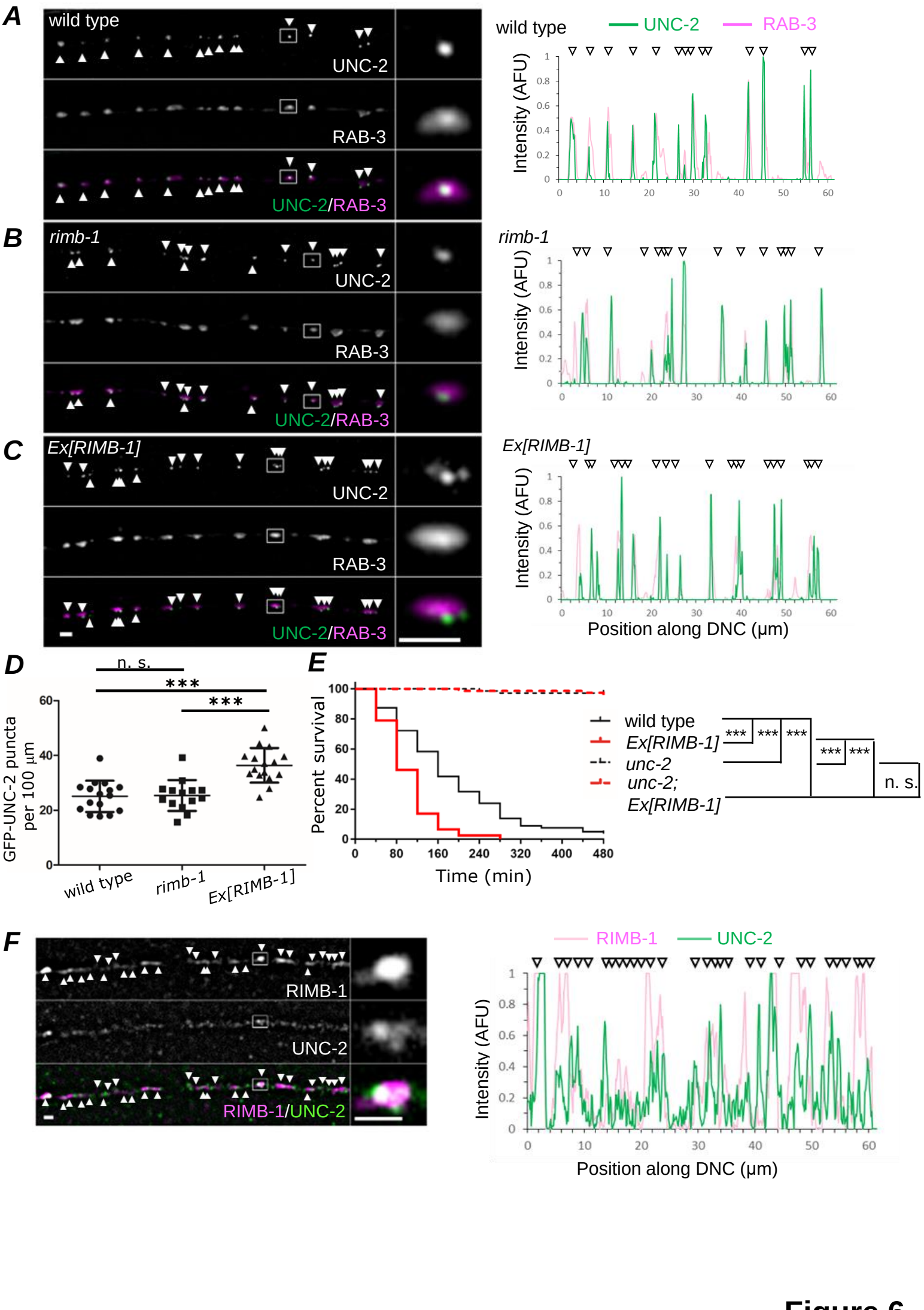

A
wild type
UNC-2
RAB-3
UNC-2/RAB-3
wild type
UNC-2
RAB-3
Intensity (AFU)
B
rimb-1
UNC-2
RAB-3
UNC-2/RAB-3
rimb-1
Intensity (AFU)
C
Ex[RIMB-1]
UNC-2
RAB-3
UNC-2/RAB-3
Ex[RIMB-1]
Intensity (AFU)
Position along DNC (μm)
D
n. s.
***
***
GFP-UNC-2 puncta per 100 μm
wild type
rimb-1
Ex[RIMB-1]
E
Percent survival
Time (min)
wild type
Ex[RIMB-1]
unc-2
unc-2; Ex[RIMB-1]
***
***
***
***
***
n. s.
F
RIMB-1
UNC-2
RIMB-1/UNC-2
RIMB-1
UNC-2
Intensity (AFU)
Position along DNC (μm)

Figure 6

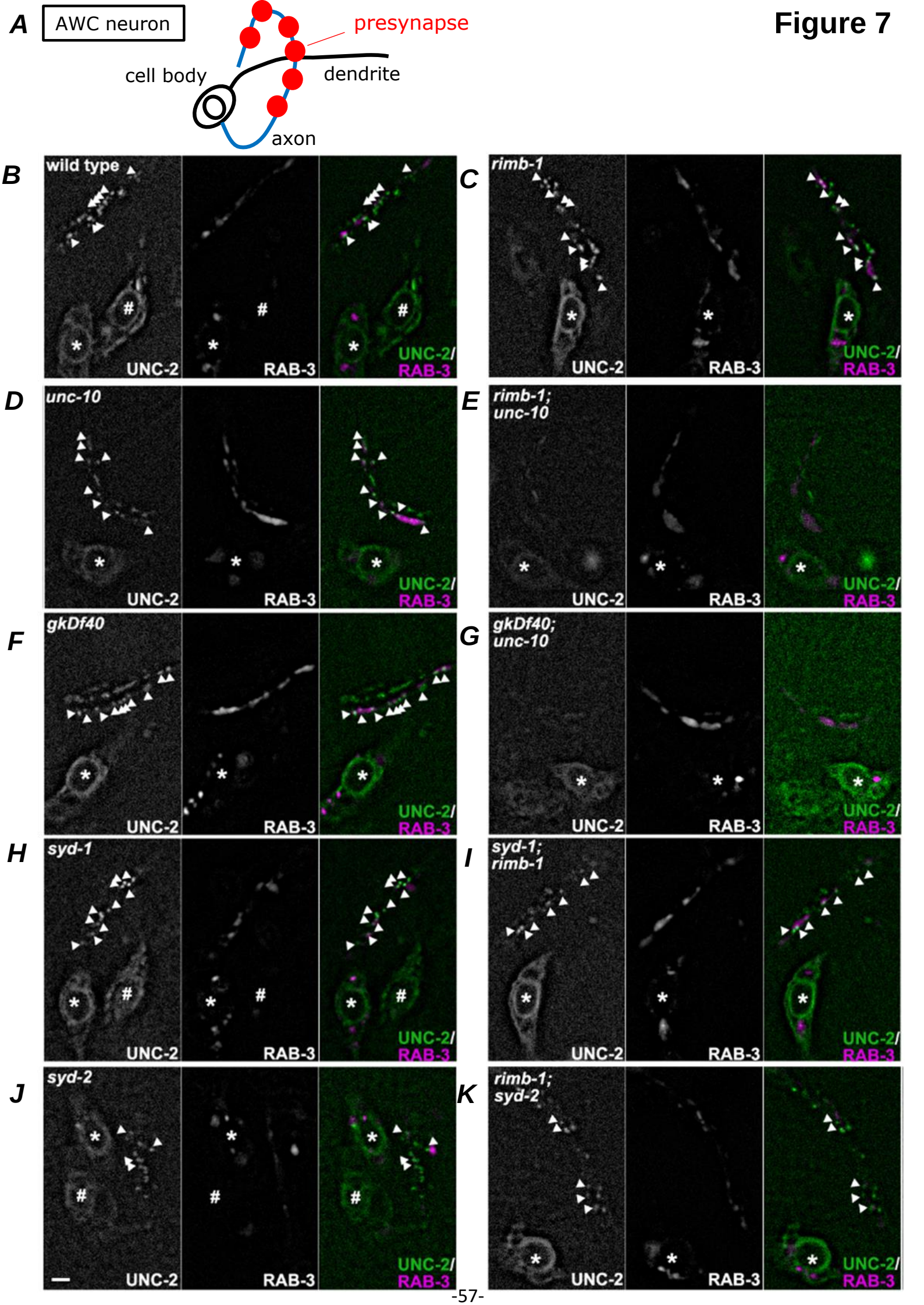
Figure 6.RIMB-1によるUNC-2/Cav2局在制御およびシナプス伝達制御のUNC-2依存性の解析

A-C. GFP-UNC-2と共発現したmCherry-RAB-3のDD神経軸索における局在。野生型(A)、*rimb-1*変異線虫(B)、RIMB-1発現トランスジェニック線虫(C)。DD神経軸索の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(GFP-UNC-2:緑、mCherry-RAB-3:マゼンタ)（右パネル）を示す。スケールバー: 2 µm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。いずれの遺伝型においてもGFP-UNC-2は小輝点（白矢頭）として観察され、mCherry-RAB-3と共局在した。

D. DD神経軸索におけるGFP-UNC-2輝点数の定量結果。RIMB-1発現トランスジェニック線虫*(Ex[RIMB-1])*は野生型、*rimb-1*変異線虫と比べGFP-UNC-2輝点数が有意に多かった。Mean ± SD, n = 14–16。one-way ANOVA後Tukey-Kramer test: n.s. $p \geq 0.05$, ***$p < 0.001$。

E. アルジカルブ処理による生存率。RIMB-1過剰発現により野生型と比べアルジカルブ処理後の生存時間が短縮した(wild type vs *Ex[RIMB-1]*)。しかし、*unc-2*変異線虫ではRIMB-1過剰発現によるアルジカルブ処理後の生存時間の短縮は見られなかった(*unc-2* vs *unc-2; Ex[RIMB-1]*)。n = 70–80。Bonferroni補正Log-rank test: n.s. $p > 0.05$, ***$p < 0.001$。

F. 神経特異的にFLAG-RIMB-1とUNC-2-GFPを発現するトランスジェニック線虫の免疫染色図。背側神経突起の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(FLAG-RIMB-1:マゼンタ、UNC-2-GFP:緑)（右パネル）を示す。スケールバー: 2 µm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。FLAG-RIMB-1のシグナル(白矢頭)はUNC-2-GFPのシグナルと共局在した。


A
AWC neuron
presynapse
cell body
dendrite
axon
B
wild type
C
rimb-1
D
unc-10
E
rimb-1;
unc-10
F
gkDf40
G
gkDf40;
unc-10
H
syd-1
I
syd-1;
rimb-1
J
syd-2
K
rimb-1;
syd-2
UNC-2
RAB-3
UNC-2/
RAB-3

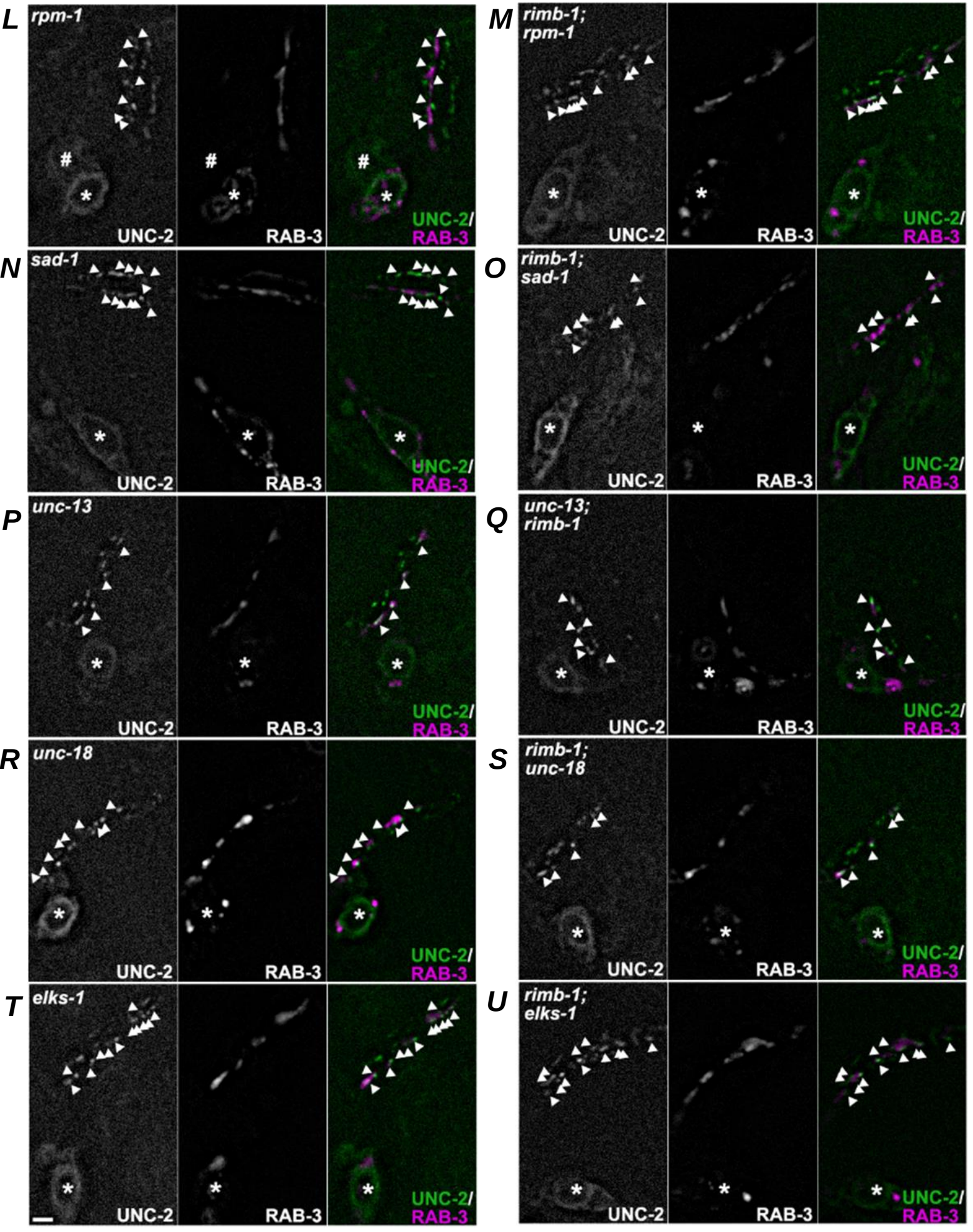
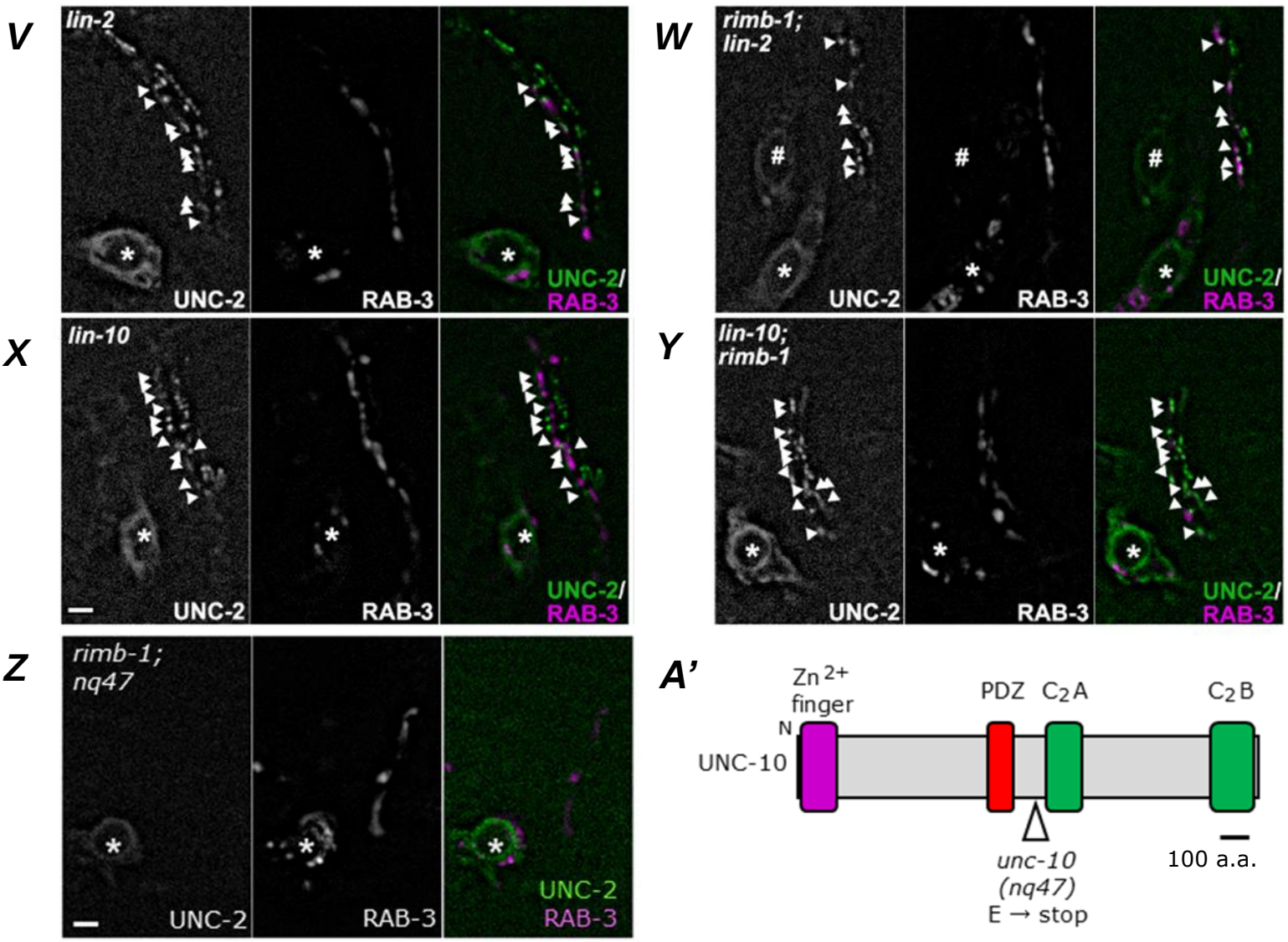
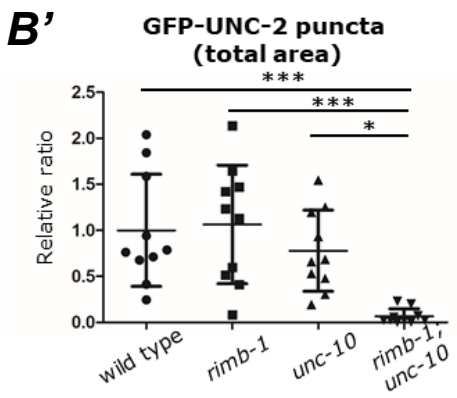
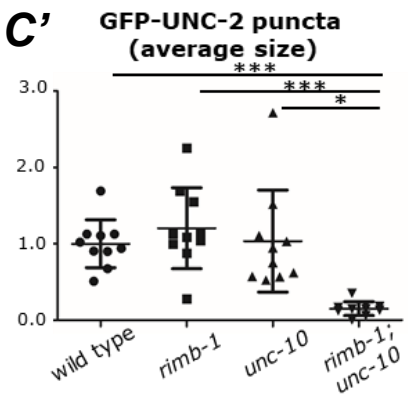
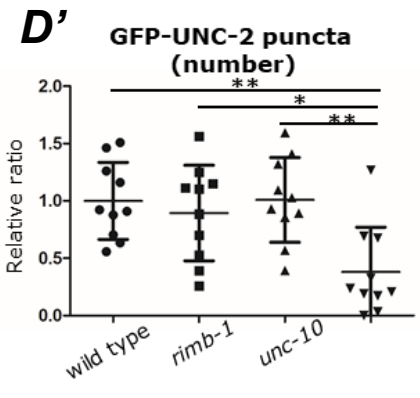

L
rpm-1
UNC-2
RAB-3
UNC-2/
RAB-3
M
rimb-1;
rpm-1
N
sad-1
O
rimb-1;
sad-1
P
unc-13
Q
unc-13;
rimb-1
R
unc-18
S
rimb-1;
unc-18
T
elks-1
U
rimb-1;
elks-1

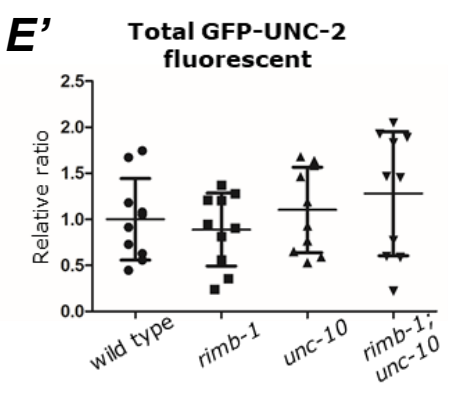
Figure 7


V
lin-2
UNC-2
RAB-3
UNC-2/
RAB-3
W
rimb-1;
lin-2
X
lin-10
Y
lin-10;
rimb-1
Z
rimb-1;
nq47
A'
Zn 2+
finger
N
PDZ
C2A
C2B
UNC-10
unc-10
(nq47)
E → stop
100 a.a.


B'
GFP-UNC-2 puncta
(total area)
Relative ratio
wild type
rimb-1
unc-10
rimb-1;
unc-10


C'
GFP-UNC-2 puncta
(average size)


D'
GFP-UNC-2 puncta
(number)
Relative ratio


E'
Total GFP-UNC-2
fluorescent
Relative ratio

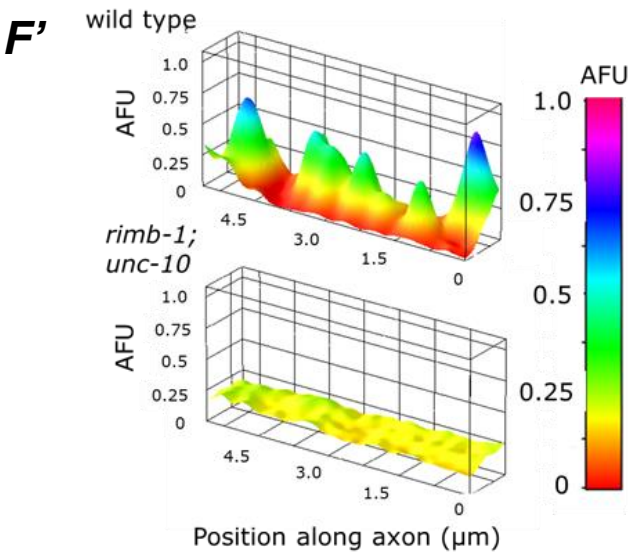
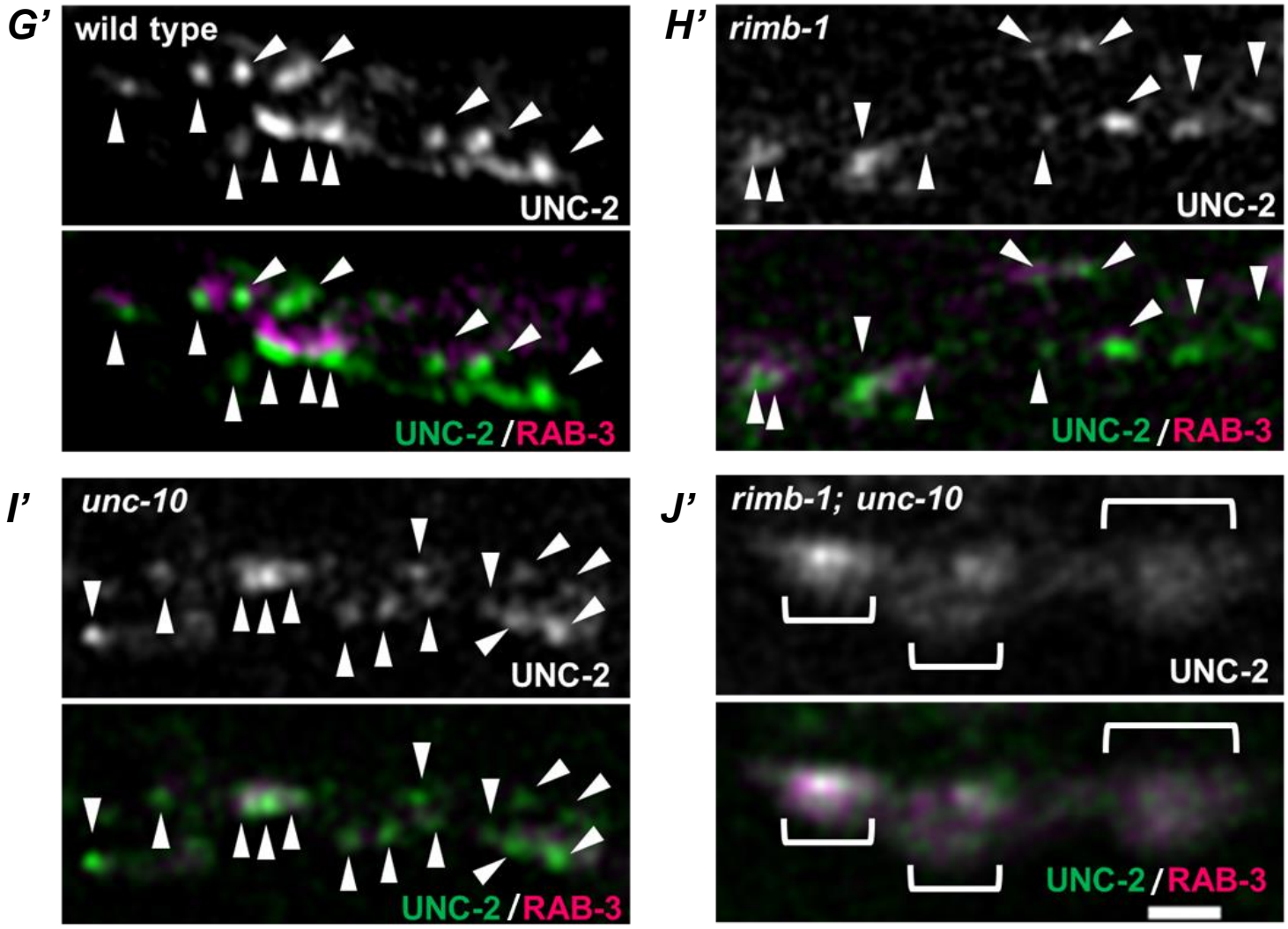
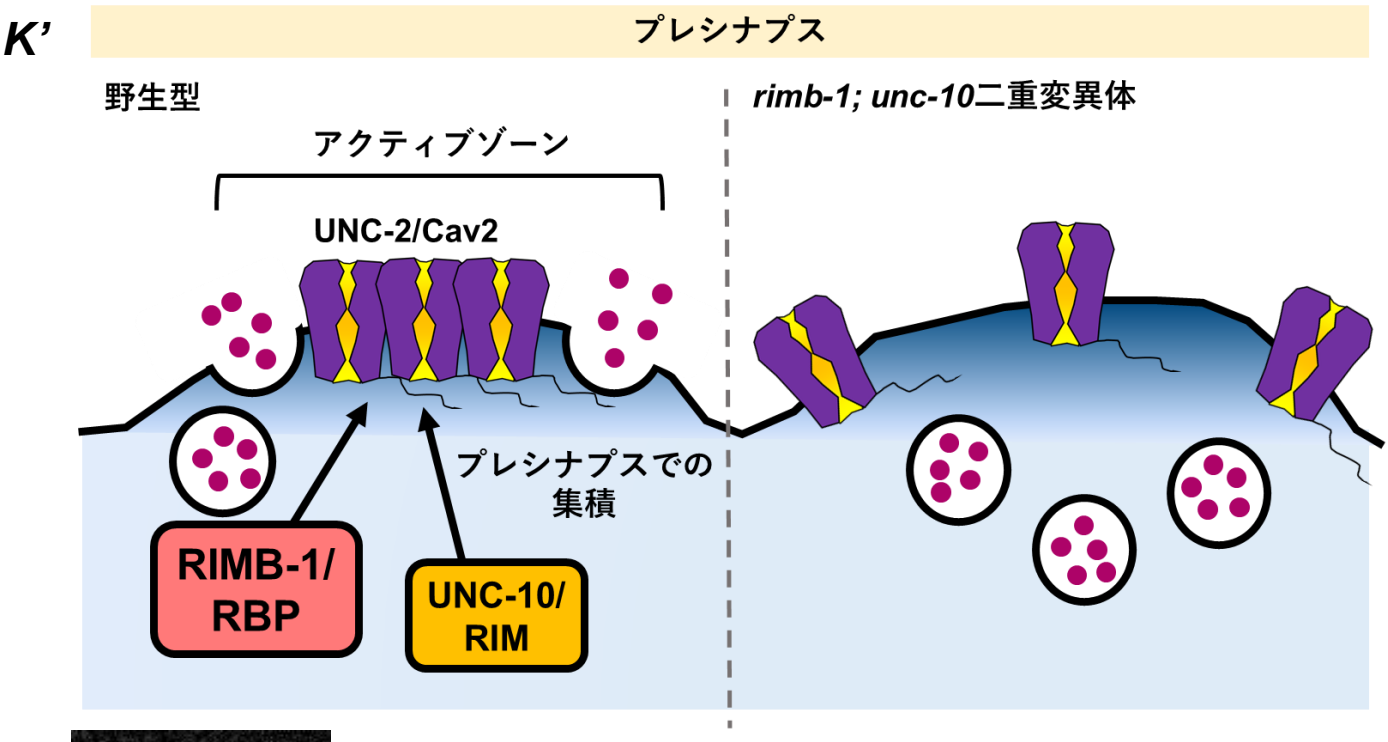

F'
wild type
AFU
rimb-1;
unc-10
Position along axon (μm)

Figure 7


G'
wild type
UNC-2
UNC-2 / RAB-3
H'
rimb-1
UNC-2
UNC-2 / RAB-3
I'
unc-10
UNC-2
UNC-2 / RAB-3
J'
rimb-1; unc-10
UNC-2
UNC-2 / RAB-3


K'
プレシナプス
野生型
rimb-1; unc-10二重変異体
アクティブゾーン
UNC-2/Cav2
プレシナプスでの
集積
RIMB-1/
RBP
UNC-10/
RIM

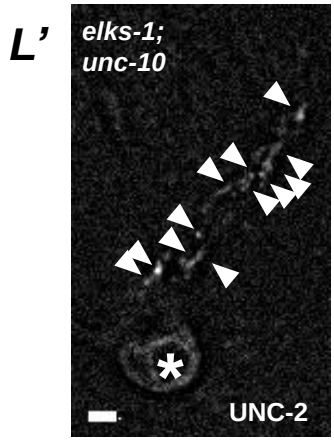

L'
elks-1;
unc-10
UNC-2

Figure 7

Figure 7.AWC感覚神経を用いたRIMB-1と冗長的にUNC-2局在を制御するプレシナプスタンパク質の探索

A.AWC神経の模式図。図のように軸索に沿ってプレシナプス（赤丸）が形成される。
B-Z. 野生型およびプレシナプスタンパク質単独変異線虫、*rimb-1*とプレシナプスタンパク質二重変異線虫のAWC神経におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の蛍光画像。アスタリスク(*)、ハッシュタグ(#)はそれぞれAWC, AWB神経細胞の細胞体を示す。スケールバー：2 µm。AWC軸索上でmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点（白矢頭）は野生型、全ての単独変異線虫において明瞭に観察された。二重変異線虫の中で*rimb-1; unc-10*二重変異線虫(E)、*gkDf40; unc-10*二重変異線虫(G), *rimb-1; nq47*二重変異線虫(Z)においてmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点が顕著に減少した。
A'. UNC-10タンパク質の一次構造。*rimb-1*の表現型を増強する順遺伝学的スクリーニングによって同定された*unc-10(nq47)*の対立遺伝子は図中矢頭のように未成熟ストップコドンが出現するナンセンス変異である。
B'-E'. AWC神経におけるGFP-UNC-2輝点の定量結果。輝点の総面積（B'）, 輝点の平均サイズ（C'）, 輝点数(D')、軸索上のGFP-UNC-2輝度値（E'）を解析した。*rimb-1; unc-10*二重変異線虫において輝点の総面積、数、平均サイズは著しく減少したが、軸索上のGFP-UNC-2輝度値は減少しなかった。数値は野生型の平均値を1とした比で表した。Mean ± SD, n = 10。one-way ANOVA後Tukey test: **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001。
F'. AWC神経軸索におけるGFP-UNC-2輝度の3Dプロット。AFU: arbitrary fluorescence units。GFP-UNC-2は野生型においてピークを示して軸索上に分布する（上パネル, wild type）が、*rimb-1; unc-10*二重変異体では明瞭なピークを示さずほぼ同一の輝度で軸索上に分布する（下パネル, *rimb-1; unc-10*）。
G'-J'. AWC神経軸索領域におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の超解像顕微鏡観察画像。スケールバー：2 µm。野生型(G'), *rimb-1*変異線虫(H'), *unc-10*変異線虫(I')ではGFP-UNC-2は輝点としてmCherry-RAB-3と共局在した(白矢頭)。*rimb-1; unc-10*二重変異線虫ではGFP-UNC-2のシグナルは観察され、mCherry-RAB-3と共局在したが、輝点として観察されず、拡散様の分布を示した(J')。
K'.野生型、*rimb-1; unc-10*二重変異線虫におけるUNC-2/Cav2のプレシナプス分布モデル図。野生型ではRIMB-1/RBPとUNC-10/RIMがUNC-2/Cav2をアクティブゾーンに局所的に集積させ、神経伝達物質の効率的な放出を実現する(左パネル)。*rimb-1; unc-10*二重変異体ではRIMB-1, UNC-10による局在制御が行われないため、UNC-2はプレシナプス全体に拡散して分布し、アクティブゾーンにおける神経伝達物質の放出が損なわれる（右パネル）。
L'. *elks-1; unc-10*二重変異体のAWC神経におけるGFP-UNC-2シグナル。スケールバー：2 µm。*elks-1; unc-10*二重変異線虫においてGFP-UNC-2シグナルは軸索上に輝点として観察される(白矢頭）。

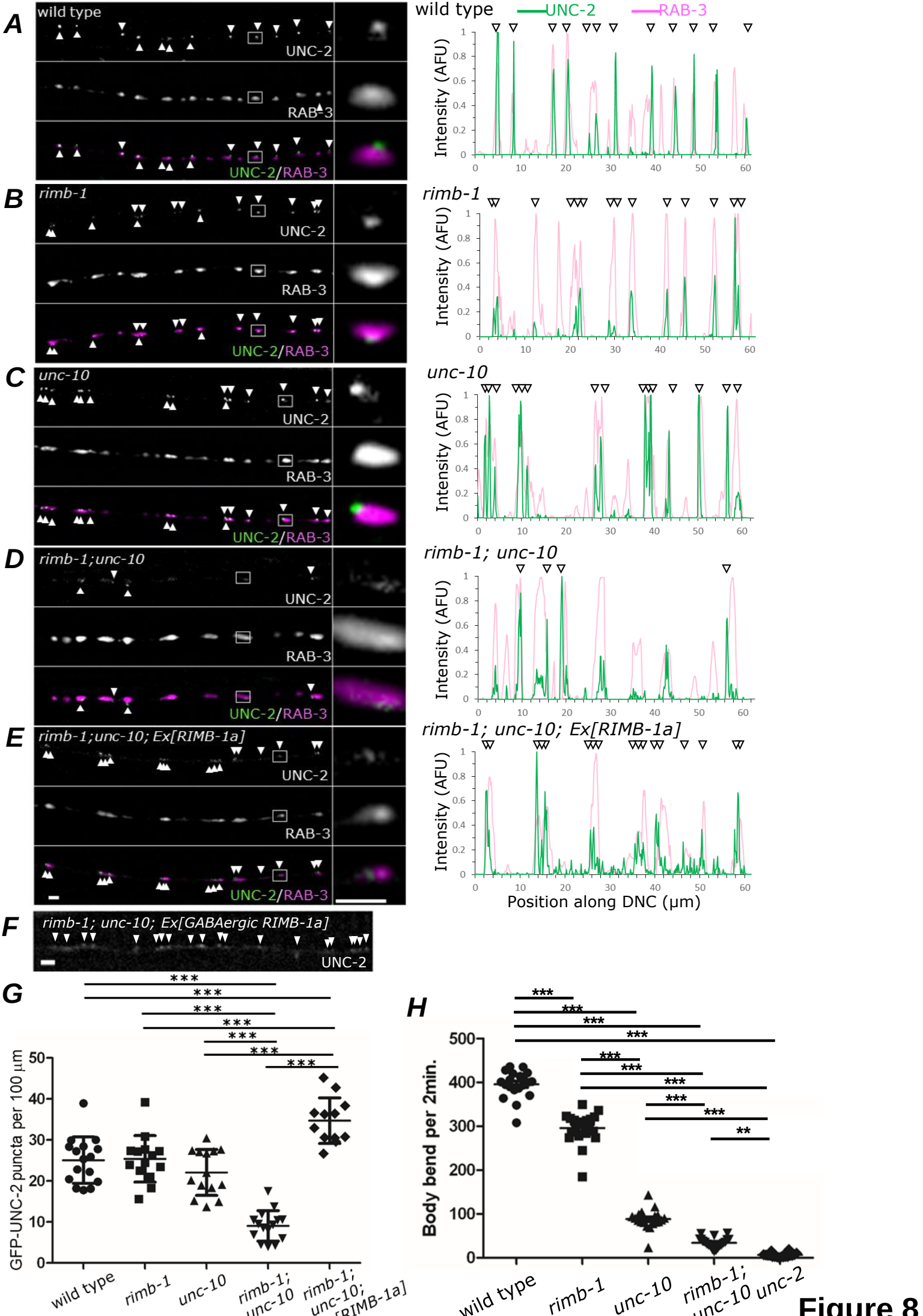

A
wild type
UNC-2
RAB-3
UNC-2/RAB-3
wild type
UNC-2
RAB-3
Intensity (AFU)
B
rimb-1
C
unc-10
D
rimb-1;unc-10
rimb-1; unc-10
E
rimb-1;unc-10; Ex[RIMB-1a]
rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]
Position along DNC (µm)
F
rimb-1; unc-10; Ex[GABAergic RIMB-1a]
G
GFP-UNC-2 puncta per 100 µm
wild type
rimb-1
unc-10
rimb-1; unc-10
rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]
H
Body bend per 2min.
wild type
rimb-1
unc-10
rimb-1; unc-10
unc-2

Figure 8

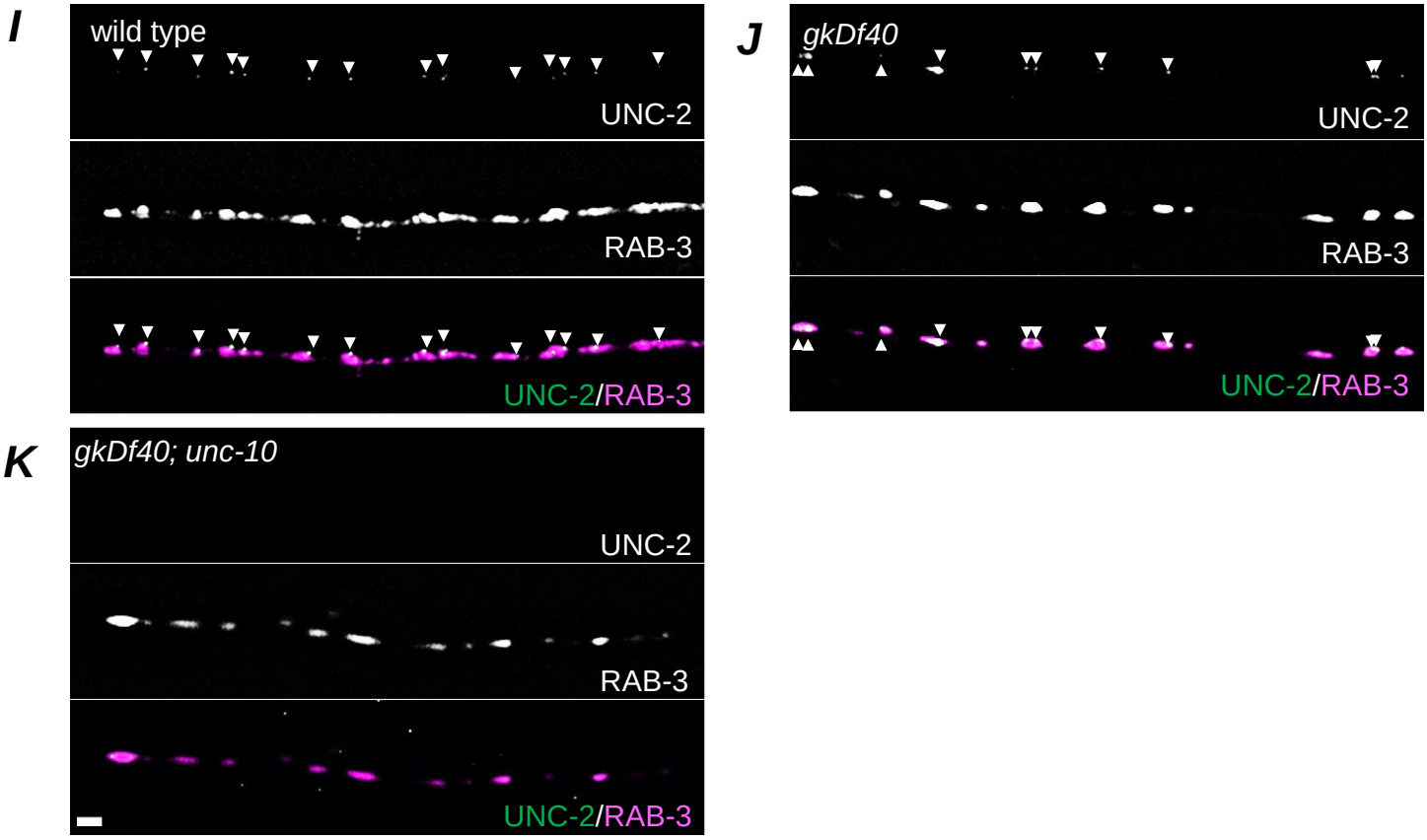


Figure 8. DD運動神経におけるRIMB-1とUNC-10による冗長的なUNC-2局在制御

A-E. DD神経軸索におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の蛍光画像。DD神経軸索の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(GFP-UNC-2:緑、mCherry-RAB-3:マゼンタ)（右パネル）を示す。白矢頭はmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点を表す。スケールバー：2 µm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。野生型（A）、*rimb-1*変異線虫（B）、*unc-10*変異線虫（C）においてGFP-UNC-2は細かい輝点（白矢頭）として観察され、mCherry-RAB-3と共局在した。*rimb-1; unc-10*二重変異線虫（D）ではGFP-UNC-2輝点が減少し、神経特異的RIMB-1a発現によりGFP-UNC-2輝点の減少は回復した（E）。

F. *unc-25*プロモーター制御化GABA作動性神経特異的RIMB-1a発現*rimb-1; unc-10*二重変異線虫のDD神経軸索におけるGFP-UNC-2蛍光観察図。スケールバー：2 µm。GABA作動性神経特異的RIMB-1a発現により*rimb-1; unc-10*二重変異線虫におけるGFP-UNC-2輝点の減少は回復した。

G. DD神経軸索におけるGFP-UNC-2輝点数の定量結果。GFP-UNC-2輝点は*rimb-1; unc-10*二重変異線虫において著しく減少し、神経特異的RIMB-1a発現により回復した。Mean ± SD, n = 12–16。one-way ANOVA後Tukey-Kramer test: ***$p < 0.001$。

H. *rimb-1*変異線虫、*unc-10*変異線虫、*rimb-1; unc-10*二重変異線虫、*unc-2*変異線虫の水中屈折頻度。野生型と比べ、いずれの変異線虫も有意な屈折頻度の低下を示した。また*rimb-1; unc-10*二重変異線虫は*rimb-1*変異線虫、*unc-10*変異線虫と比べ有意な屈折頻度の低下を示した。*unc-2*変異線虫は*rimb-1; unc-10*二重変異線虫と比べ有意な屈折頻度の低下を示した。Mean ± SD, n = 20。one-way ANOVA後Tukey test: **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$。

I-K. D神経軸索におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の蛍光画像。白矢頭はmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点を表す。スケールバー：2 µm。野生型（I）、*gkDf40*ホモ接合体線虫（J）においてGFP-UNC-2は細かい輝点（白矢頭）として観察され、mCherry-RAB-3と共局在した。*gkDf40; unc-10*二重変異線虫（K）ではGFP-UNC-2の輝点が減少した。

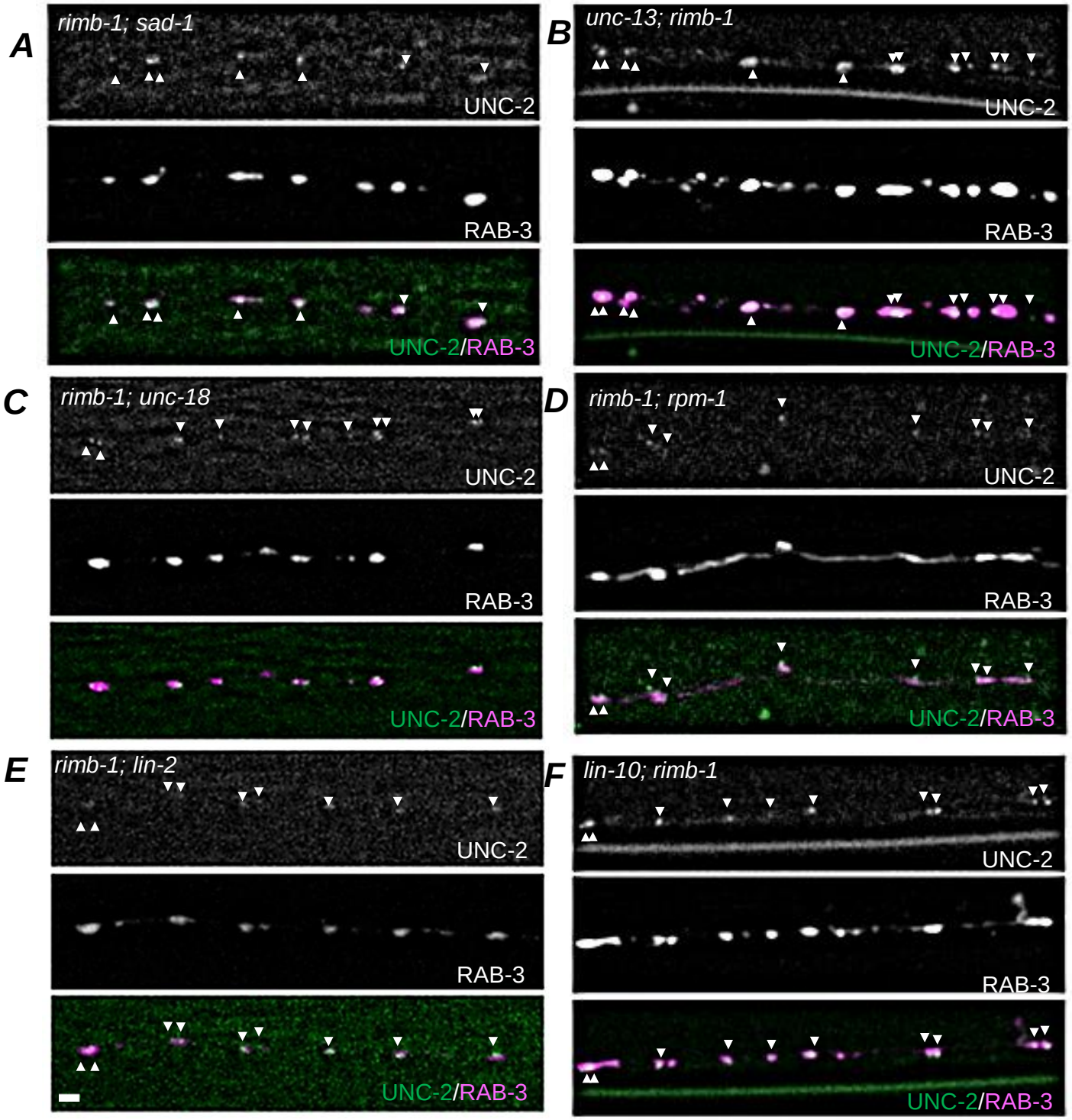
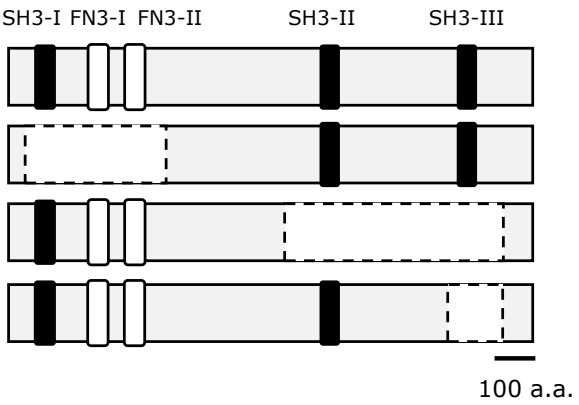


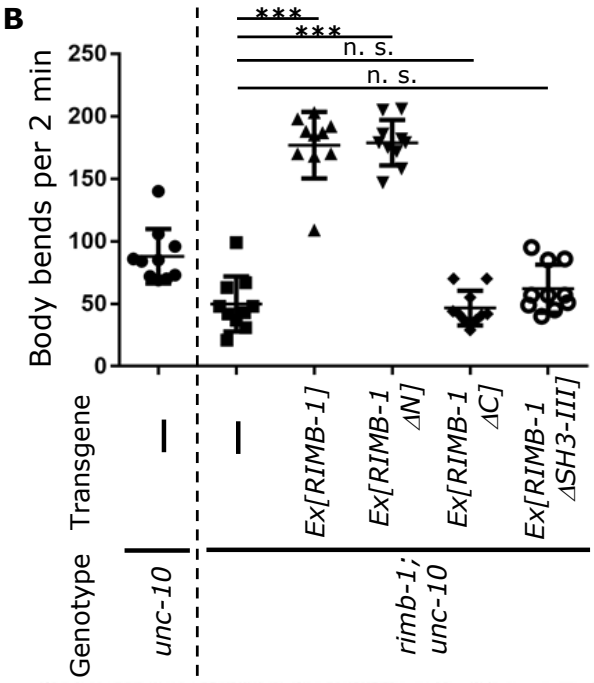
Figure 9　*rimb-1*変異のSNB-1局在異常を増強する遺伝子とVGCC結合タンパク質の線虫ホモログの二重変異線虫のDD運動神経におけるUNC-2プレシナプス局在

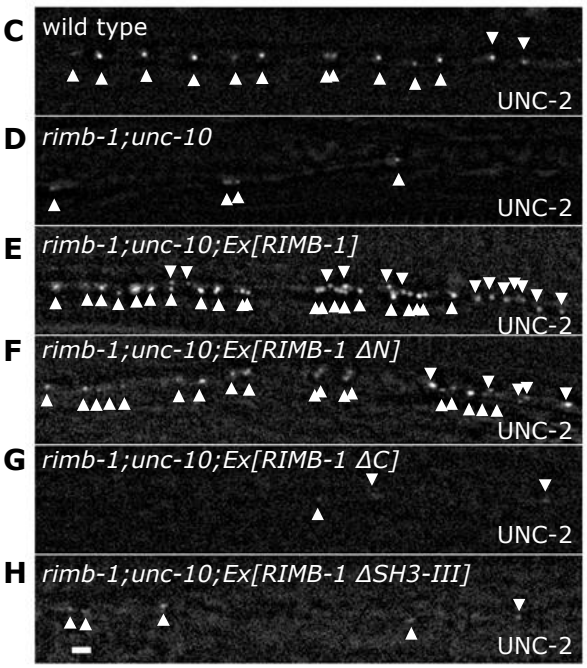
*rimb-1*変異がGFP融合SVタンパク質SNB-1分布異常を増強するプレシナプスタンパク質二重変異線虫やVGCC結合タンパク質線虫ホモログと*rimb-1*の二重変異線虫のDD神経におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の蛍光画像。スケールバー：2 μm。いずれの二重変異線虫においてもGFP-UNC-2は細かい輝点（白矢頭）として観察され、mCherry-RAB-3と共局在した。

A

	Rescue activities: Locomotion	Rescue activities: UNC-2 localization	Dense presynaptic localization
RIMB-1	2/2	2/2	5/5
RIMB-1 ΔN	2/2	2/2	2/2
RIMB-1 ΔC	0/2	0/2	0/2
RIMB-1 ΔSH3-III	0/4	0/4	1/1







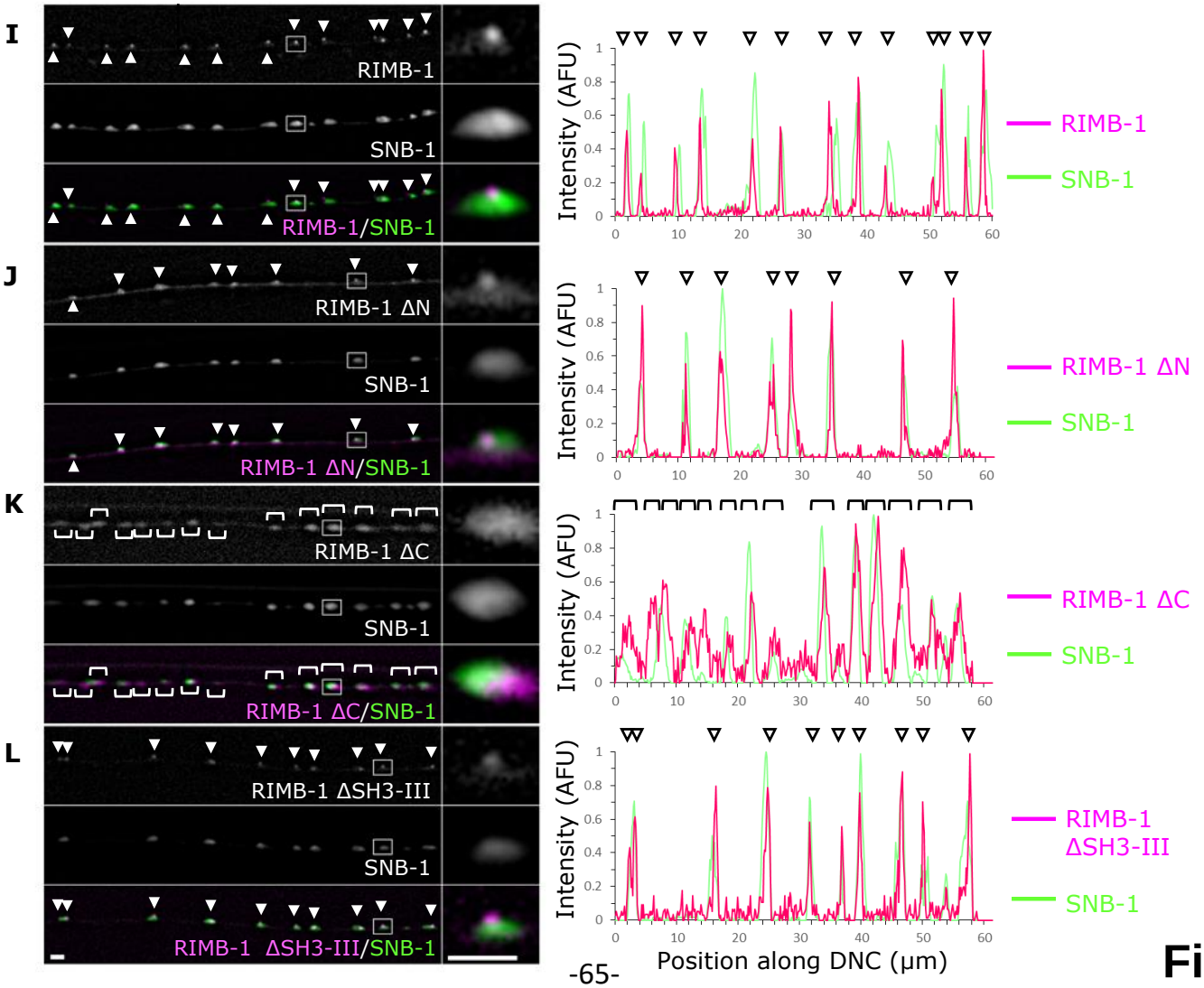


Figure 10

Figure. 10 RIMB-1構造機能相関解析

A. RIMB-1欠損コンストラクトの模式図と各コンストラクトを発現するトランスジェニック線虫を用いたレスキュー解析の結果のまとめ。各コンストラクトの神経特異的発現による*rimb-1; unc-10*二重変異線虫の運動能力低下やUNC-2局在異常のレスキュー能およびDD神経軸索におけるプレシナプス局在を解析した。表中の数値はレスキュー能あるいはRIMB-1全長様のプレシナプス局在を示したトランスジェニックラインと全体のトランスジェニックラインの比を表した。赤字：レスキュー/正常な局在、青字：非レスキュー/異常局在。RIMB-1全長、RIMB-1ΔNは全てのトランスジェニックラインで運動能力、UNC-2局在のレスキュー能、正常なプレシナプス領域における細かい輝点としての局在を示した。RIMB-1 ΔC, RIMB-1 ΔSH3-IIIは全てのトランスジェニックラインで運動能力、UNC-2局在のレスキュー能を示さなかった。また、RIMB-1 ΔCは異常な局在を示し、RIMB-1 ΔSH3-IIIはRIMB-1全長様の正常な局在を示した。

B. 各RIMB-1コンストラクトを神経特異的に発現する*rimb-1; unc-10*二重変異線虫の水中屈折頻度。RIMB-1全長発現(*Ex[RIMB-1]*)、RIMB-1 ΔN発現（*Ex[RIMB-1 ⊿N]*）により有意に屈折頻度が増加した。一方、RIMB-1ΔC発現(*Ex[RIMB-1 ⊿C])*、RIMB-1 ΔSH3-III発現（*Ex[RIMB-1 ⊿SH3-III]*）により屈折頻度の有意な増加は認められなかった。Mean ± SD, n = 9–10。one-way ANOVA後Dunnet test: n.s. $p \geq 0.05$, ***$p < 0.001$。

C-H. 各RIMB-1コンストラクトを神経特異的に発現する*rimb-1; unc-10*二重変異線虫のDD神経軸索におけるGFP-UNC-2蛍光観察図。スケールバー：2 µm。RIMB-1全長発現(E)、RIMB-1ΔN発現(F)により*rimb-1; unc-10*二重変異線虫における軸索上のGFP-UNC-2輝点（白矢頭）は回復した。一方、RIMB-1ΔC発現(G)、RIMB-1 ΔSH3-III発現(H)により、*rimb-1; unc-10*二重変異線虫における軸索上のGFP-UNC-2局在は回復しなかった。

I-L. DD神経軸索におけるmCherry融合RIMB-1コンストラクトと共発現したプレシナプスマーカーSNB-1-GFPの蛍光画像。DD神経軸索の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(mCherry-RIMB-1コンストラクト:マゼンタ、SNB-1-GFP:緑)（右パネル）を示す。スケールバー：2 µm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。mCherry-RIMB-1(I), mCherry-RIMB-1 ΔN(J), mCherry-RIMB-1 ΔSH3-III(L)は輝点としてSNB-1-GFPと共局在した(白矢頭)。一方、mCherry-RIMB-1 ΔCは拡散様の分布を示し（白括弧）、部分的にSNB-1-GFPと共局在した（K）。

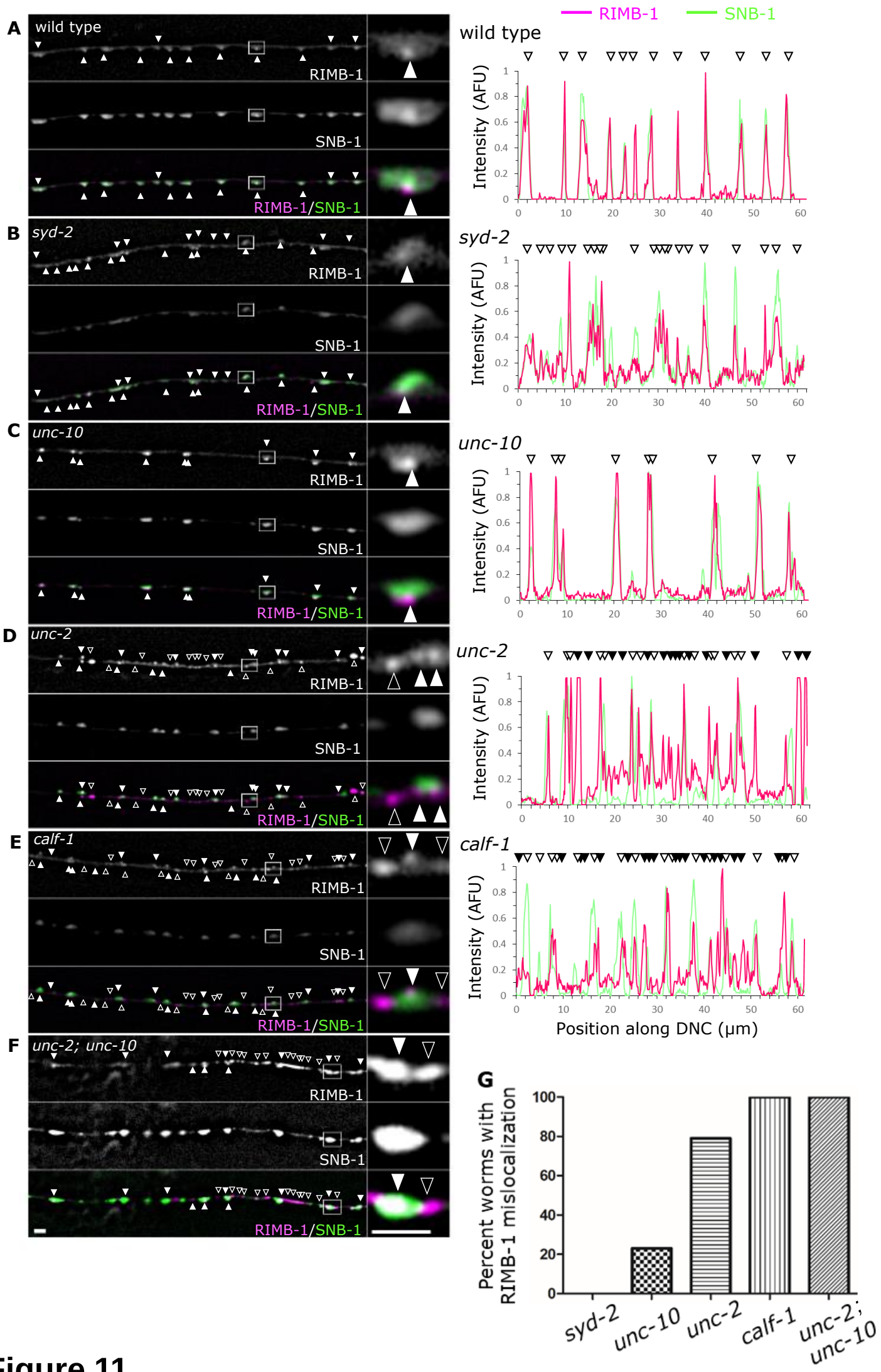

A
wild type
RIMB-1
SNB-1
RIMB-1/SNB-1
B
syd-2
C
unc-10
D
unc-2
E
calf-1
F
unc-2; unc-10
RIMB-1
SNB-1
Intensity (AFU)
Position along DNC (µm)
G
Percent worms with RIMB-1 mislocalization
syd-2
unc-10
unc-2
calf-1
unc-2; unc-10

Figure 11

Figure 11. RIMB-1局在制御遺伝子の探索

A-F. 野生型(A)、*syd-2*機能欠損変異線虫(B)、*unc-10*機能欠損変異線虫(C)、*unc-2*機能欠損変異線虫(D)、*calf-1*機能低下変異線虫(E)、*unc-2; unc-10*二重機能欠損線虫(F)のDD神経軸索におけるmCherry-RIMB-1と共発現したプレシナプスマーカーSNB-1-GFPの蛍光画像。DD神経軸索の蛍光画像（左パネル）と1プレシナプス部位を拡大した画像（中央パネル）、軸索のラインスキャン蛍光輝度プロット(mCherry-RIMB-1:マゼンタ、SNB-1-GFP:緑)（右パネル）を示す。スケールバー：2 μm。AFU: arbitrary fluorescence units。DNC: dorsal nerve cord。いずれの変異線虫においてもSNB-1-GFPと共局在したmCherry-RIMB-1の輝点（白矢頭）が観察された。*unc-2*変異線虫(D)、*calf-1*変異線虫(E)、*unc-2; unc-10*二重変異線虫(F)ではSNB-1-GFPと共局在しないmCherry-RIMB-1の輝点（黒矢頭）が観察された。

G. RIMB-1局在異常を示す個体の割合。SNB-1-GFPと共局在しないmCherry-RIMB-1輝点を示す個体の百分率を縦軸に表した（*syd-2*変異線虫: 0% (n=11), *unc-10*変異線虫: 23% (n=13), *unc-2*変異線虫: 79% (n=19),*calf-1*変異線虫: 100% (n=41), *unc-2; unc-10*二重変異線虫: 100% (n=20)）。

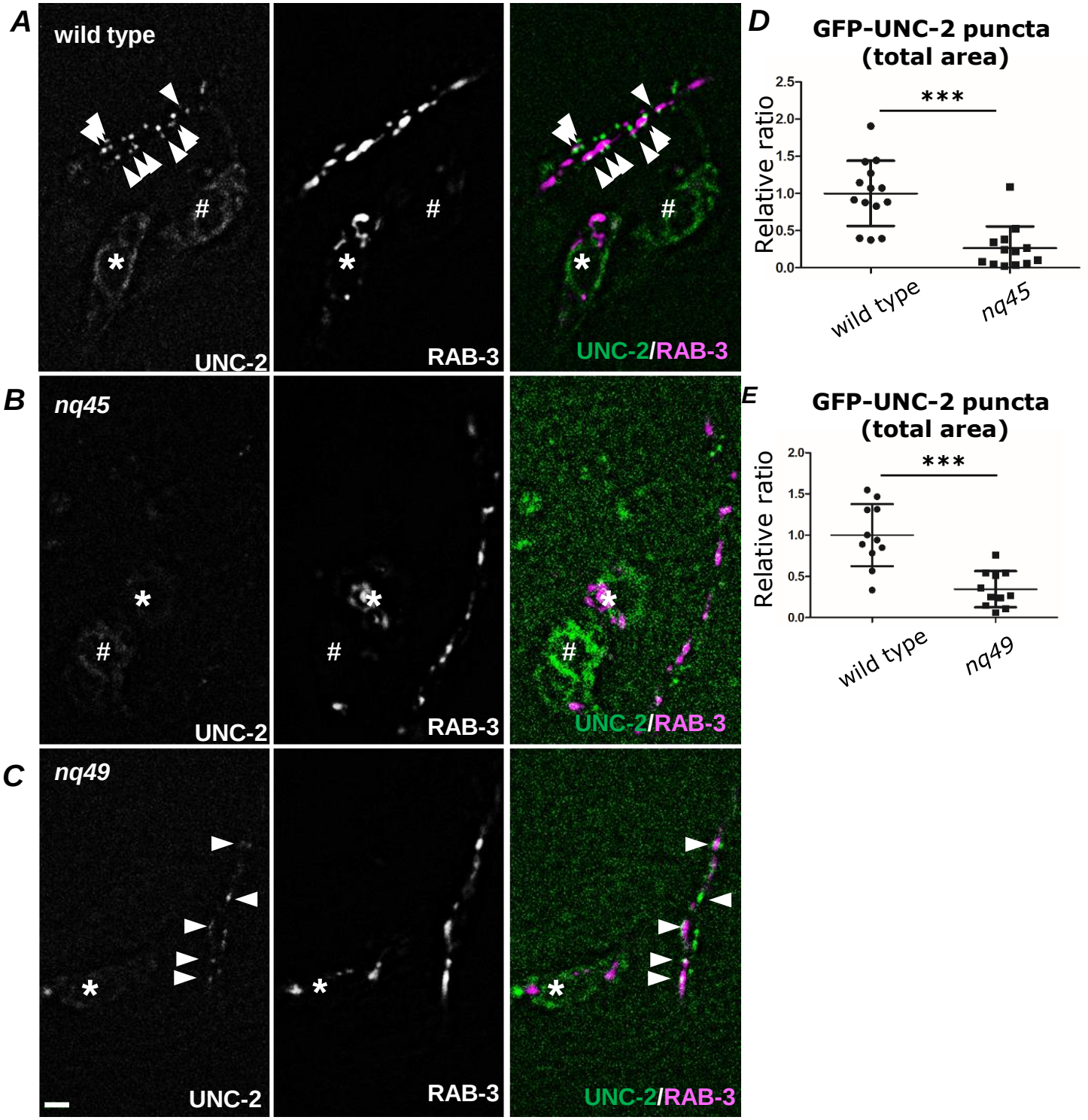


Figure 12.

A-C. 野生型(A)および*nq45*変異線虫(B)、*nq49*変異線虫(C)のAWC神経におけるGFP-UNC-2と共発現したプレシナプスマーカーmCherry-RAB-3の蛍光画像。アスタリスク(*)、ハッシュタグ(#)はそれぞれAWC, AWB神経細胞の細胞体を示す。スケールバー：2 µm。AWC軸索上でmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点（白矢頭）は野生型(A)、*nq49*変異線虫(C)で観察されたが、*nq45*変異線虫(B)ではmCherry-RAB-3と共局在したGFP-UNC-2の輝点が顕著に減少した。

D, E. AWC神経におけるGFP-UNC-2輝点の総領域の定量結果。*Nq45*変異線虫、*nq49*変異線虫は野生型線虫と比較し、有意に輝点の総面積が減少した。数値は野生型平均値を1とした比で表した。Mean ± SD。

D: wild type: n=14, *nq45*: n=13。one-way ANOVA後Tukey test: ***$p < 0.001$。

E: n=11。one-way ANOVA後Tukey test: ***$p < 0.001$。

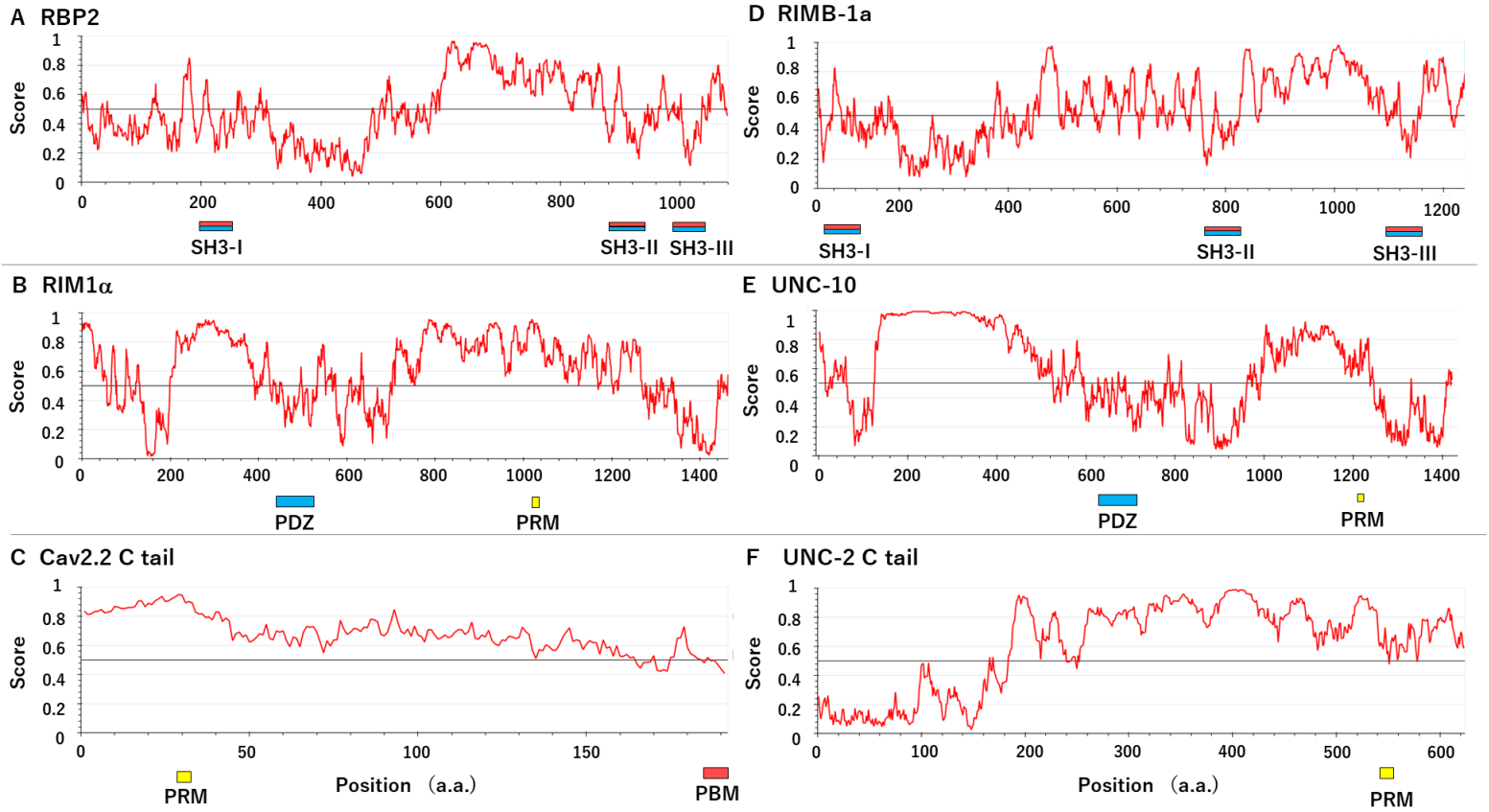


Figure 13.マウスRBP2、RIM1α、Cav2.2 C tail、線虫RIMB-1、UNC-10、UNC-2 C tailのdisorder解析結果

A-F. IUPred2 (https://iupred2a.elte.hu)を用いたマウスRBP2、RIM1α、Cav2.2 C tail、線虫RIMB-1、UNC-10、UNC-2 C tailのdisorder解析結果。RBP2(A)、RIM1α(B)、Cav2.2 C tail(C)はdisorder scoreの高い領域が多い。RIMB-1(D)、UNC-10(E)、UNC-2 C tail(F)は結合ドメインが保存されており、またdisorder scoreの高い領域が多い。RBP2/RIMB-1との結合領域は黄四角、RIM1α/UNC-10結合領域は赤四角、Cav2.2/UNC-2結合領域は水色四角で示した。

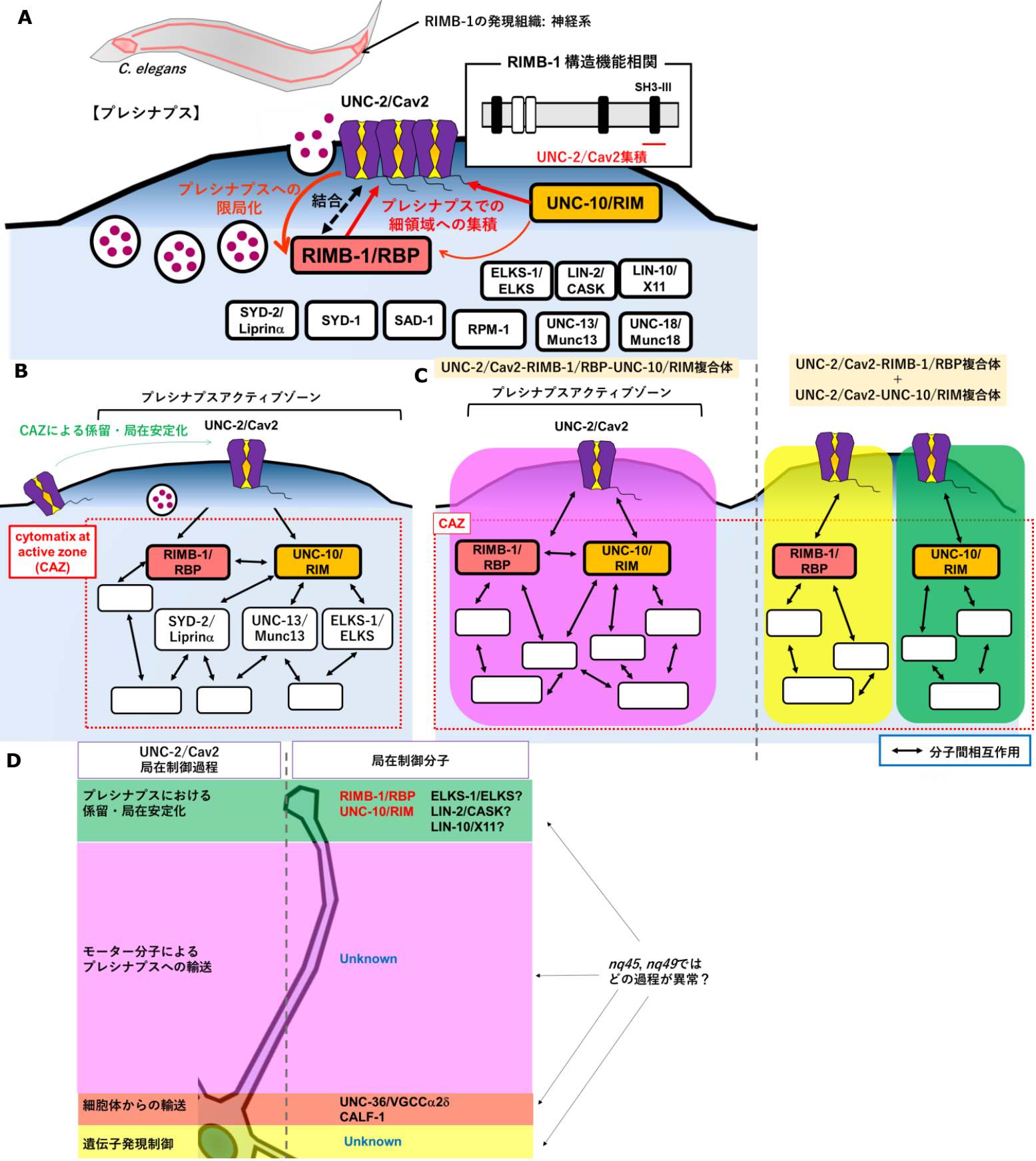


Figure 14.本研究のまとめ・今後の展望

A.本研究のまとめ。RIMB-1/RBPは神経特異的に発現し、プレシナプスアクティブゾーンに局在するCAZ分子である。RIMB-1は同じくCAZ分子であるUNC-10/RIMと冗長的にUNC-2/Cav2の局在を制御する。局在制御にはSH3-IIIドメインが必要である。RIMB-1の正常な局在にUNC-2とUNC-10が必要であり、UNC-2のプレシナプス局在がRIMB-1の局在に必要である。

B.予想されるモデル図。CAZはRIMB-1/RBPとUNC-10/RIMによるUNC-2/Cav2との結合を介し、UNC-2をプレシナプスアクティブゾーンへ係留、局在を安定化する。

C. 予想される複合体モデル図。RIMB-1,UNC-10がUNC-2局在を冗長的に制御するため、UNC-2-RIMB-1-UNC-10の三量体(左パネル)の他にUNC-2-RIMB-1、UNC-2-UNC-10の二量体(右パネル)という2種類の複合体モデルが考えられる。

D.UNC-2/Cav2プレシナプス局在制御過程とこれまでに明らかになっている制御分子。

Table 1. *rimb-1* の二重機能低下型変異体におけるプレシナプスタンパク質局在の定量結果

遺伝子	対立遺伝子	遺伝型	AWC感覚神経軸索				DD運動神経軸索	
			GFP-UNC-2		mCherry-RAB-3		SNB-1-GFP	
			輝点総領域 (野生型平均値を1とした比)		輝点総領域 (野生型平均値を1とした比)		100 μmにおける輝点数	
			Mean ± SD	統計値	Mean ± SD	統計値	Mean ± SD	統計値
		wild type	1.00 ± 0.58		1.00 ± 0.48		19.9 ± 2.5 (11)	
rimb-1 / RBP	*gk452845*	*rimb-1(gk452845)*	1.06 ± 0.61	$t_{(18)} = -0.23$, $p = 0.82$	1.65 ± 0.48	$t_{(18)} = -2.87$, $p = 0.010$	19.8 ± 2.1 (11)	$t_{(20)} = 0.10$, $p = 0.92$
	gkDf40 ¶ [1)]	*rimb-1(gkDf40)*	1.17 ± 0.64	$t_{(18)} = -0.59$, $p = 0.57$	2.09 ± 0.90 *	$t_{(18)} = -3.19$, $p = 0.005$	18.3 ± 1.9 (11)	$t_{(20)} = 1.49$, $p = 0.15$
unc-10 / RIM	*md1117* ¶	*unc-10*	0.78 ± 0.42		2.89 ± 1.10 *		19.8 ± 2.0 (15)	
		unc-10; rimb-1(gk452845)	0.07 ± 0.08 §	$F_{(3, 36)} = 8.49$, $p = 0.0002$	2.15 ± 0.75	$F_{(3, 36)} = 10.24$, $p < 0.0001$	18.1 ± 2.8 (15)	$F_{(3, 48)} = 1.77$, $p = 0.17$
		unc-10; rimb-1(gkDf40)	0.07 ± 0.06 §	$F_{(3, 36)} = 9.09$, $p = 0.0001$	2.36 ± 0.75	$F_{(3, 36)} = 8.06$, $p = 0.0003$	18.3 ± 1.9 (13)	$F_{(3, 46)} = 2.05$, $p = 0.12$
syd-2 / Liprinα	*ok217* ¶	*syd-2*	1.14 ± 0.55	$F_{(3, 36)} = 0.10$, $p = 0.96$	1.44 ± 1.51	$F_{(3, 36)} = 0.58$, $p = 0.63$	20.4 ± 4.7 (10)	$F_{(3, 44)} = 0.21$, $p = 0.89$
		syd-2; rimb-1(gk452845)	1.09 ± 0.40		1.34 ± 1.35		20.4 ± 4.3 (16)	
unc-13 / Munc13	*e450*	*unc-13*	0.91 ± 0.39	$F_{(3, 36)} = 0.95$, $p = 0.43$	1.55 ± 0.55	$F_{(3, 36)} = 2.51$, $p = 0.074$	21.0 ± 2.1 (18)	$F_{(3, 50)} = 3.70$, $p = 0.018$
		unc-13; rimb-1(gk452845)	0.69 ± 0.37		1.26 ± 0.69		18.0 ± 3.0 (14) †	
elks-1/ ELKS	*js816* ¶	*elks-1*	1.54 ± 0.47	$F_{(3, 36)} = 2.34$, $p = 0.09$	2.09 ± 0.60 *	$F_{(3, 36)} = 13.17$, $p < 0.0001$	21.0 ± 3.1 (10)	$F_{(3, 42)} = 0.67$, $p = 0.58$
		elks-1; rimb-1(gk452845)	1.45 ± 0.45		2.43 ± 0.49		19.4 ± 3.2 (14)	
syd-1 / RhoGAP-like	*ju2* ¶	*syd-1*	1.12 ± 0.42	$F_{(3, 36)} = 0.10$, $p = 0.96$	0.94 ± 0.35	$F_{(3, 36)} = 11.46$, $p < 0.0001$	19.6 ± 2.8 (12)	$F_{(3, 43)} = 0.084$, $p = 0.97$
		syd-1; rimb-1(gk452845)	1.03 ± 0.35		2.12 ± 0.65 ††		20.2 ± 4.3 (13)	
rpm-1 / E3 ligase	*js410* ¶	*rpm-1*	0.76 ± 0.32	$F_{(3, 36)} = 0.70$, $p = 0.56$	2.03 ± 0.48 *	$F_{(3, 36)} = 7.51$, $p = 0.0005$	16.2 ± 2.2 (12) *	$F_{(3, 47)} = 13.01$, $p < 0.0001$
		rpm-1; rimb-1(gk452845)	0.93 ± 0.23		1.54 ± 0.42		15.3 ± 2.3 (17)	
sad-1 / SAD kinase	*ky289*	*sad-1*	1.09 ± 0.58	$F_{(3, 36)} = 0.32$, $p = 0.81$	1.38 ± 1.00	$F_{(3, 36)} = 1.22$, $p = 0.32$	20.2 ± 3.0 (12)	$F_{(3, 41)} = 4.05$, $p = 0.013$
		sad-1; rimb-1(gk452845)	1.38 ± 1.44		1.46 ± 0.86		16.5 ± 3.1 (11) ††	
unc-2 / VGCCα1	*e55* ¶	*unc-2*	NA	NA	NA	NA	19.9 ± 1.7 (14)	$F_{(3, 42)} = 0.10$, $p = 0.96$
		unc-2; rimb-1(gk452845)	NA		NA	NA	20.3 ± 2.4 (10)	
unc-18 / Munc18	*e81*	*unc-18*	1.27 ± 0.36	$F_{(3, 36)} = 0.58$, $p = 0.64$	2.32 ± 0.41 *	$F_{(3, 36)} = 10.41$, $p < 0.0001$	20.5 ± 3.4 (12)	$F_{(3, 42)} = 3.94$, $p = 0.015$
		unc-18; rimb-1(gk452845)	1.24 ± 0.53		2.54 ± 1.03		16.6 ± 3.4 (12) †	
lin-2 / CASK	*e1309*	*lin-2*	1.25 ± 0.66	$F_{(3, 36)} = 0.39$, $p = 0.76$	1.19 ± 0.33	$F_{(3, 36)} = 9.24$, $p = 0.0001$	21.7 ± 2.5 (16)	$F_{(3, 45)} = 5.89$, $p = 0.0018$
		lin-2; rimb-1(gk452845)	1.19 ± 0.31		2.09 ± 0.60 ††		17.8 ± 1.9 (11) †	
lin-10 / Mint	*e1439* ¶	*lin-10*	1.50 ± 0.63	$F_{(3, 36)} = 3.03$, $p = 0.042$	1.62 ± 0.84	$F_{(3, 36)} = 5.43$, $p = 0.0035$	21.0 ± 2.6 (15)	$F_{(3, 44)} = 0.65$, $p = 0.59$
		lin-10; rimb-1(gk452845)	1.72 ± 0.56		2.17 ± 0.60		20.0 ± 2.6 (11)	

Table 1. *rimb-1* との二重機能低下型変異体の定量結果

プレシナプスタンパク質単独変異線虫および *rimb-1* とプレシナプスタンパク質二重変異線虫の AWC 神経軸索上の GFP-UNC-2 と mCherry-RAB-3 の輝点総領域、DD 神経における SNB-1-GFP 輝点数の定量結果(AWC 神経: n=10, DD 神経: n=10-18)。各プレシナプスタンパク質遺伝子変異について野生型、*rimb-1* 単独変異線虫、プレシナプス単独変異線虫、*rimb-1* との二重変異線虫の 4 群で one-way ANOVA および post *hoc* テストとして Tukey テストあるいは Tukey-Kramer テストを行った。post *hoc* テストの結果、有意差がついたものは以下の印をつけた。*: 野生型 vs プレシナプス単独変異線虫、†プレシナプス単独変異線虫 vs 二重変異線虫、††野生型 vs 二重変異線虫 かつ プレシナプス単独変異線虫 vs 二重変異線虫 §野生型 vs 二重変異線虫 かつ *rimb-1* 単独変異線虫 vs 二重変異線虫 かつ プレシナプス単独変異線虫 vs 二重変異線虫。NA:解析不可, ¶ : null 変異

Table2 統計解析結果

	群全体			post test p value					
Fig. 4A	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs *Ex[RIMB-1]*	wt vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*	*rimb-1* vs *Ex[RIMB-1]*	*rimb-1* vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*	*Ex[RIMB-1]* vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*
	3, 76	30.336	<.0001	<.0001	0.1609	0.0018	<.0001	<.0001	0.3472
	群全体			post test p value					
Fig. 4C	Chi square	自由度	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs Ex[RIMB-1]	wt vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*	*rimb-1* vs *Ex[RIMB-1]*	*rimb-1* vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*	*Ex[RIMB-1]* vs *rimb-1; Ex[RIMB-1]*
	121.8885	3	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.5624
	群全体			post test p value					
Fig. 4D	Chi square	自由度	p value	wt vs *Ex[RIMB-1]*	wt vs *unc-10*	wt vs *unc-10; Ex[RIMB-1]*	*Ex[RIMB-1]* vs *unc-10*	*Ex[RIMB-1]* vs *unc-10; Ex[RIMB-1]*	*unc-10* vs *unc-10; Ex[RIMB-1]*
	152.6	3	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.0288
	群全体			post test p value					
Fig. 6D	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs *Ex[RIMB-1]*	*rimb-1* vs *Ex[RIMB-1]*			
	2, 43	18.6614	<.0001	0.9894	<.0001	<.0001			
	群全体			post test p value					
Fig.6E	Chi square	自由度	p value	wt vs *Ex[RIMB-1]*	wt vs *unc-2*	wt vs *unc-2; Ex[RIMB-1]*	*Ex[RIMB-1]* vs *unc-2*	*Ex[RIMB-1]* vs *unc-2; Ex[RIMB-1]*	*unc-2* vs *unc-2; Ex[RIMB-1]*
	263.8601	3	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	0.4135
Fig. 7	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs *unc-10*	wt vs *rimb-1; unc-10*	*rimb-1* vs *unc-10*	*rimb-1* vs *rimb-1; unc-10*	*unc-10* vs *rimb-1; unc-10*
7B'	3, 36	8.49	0.0002	0.9914	0.75	0.0009	0.5753	0.0004	0.0143
7C'	3, 36	10.7411	<.0001	0.7529	0.9982	0.001	0.8428	<.0001	0.0006
7D'	3, 36	6.1798	0.0017	0.924	0.9999	0.0044	0.9058	0.0224	0.0038
7E'	3, 36	1.0779	0.3707	0.9605	0.9688	0.6081	0.7819	0.3244	0.8608
	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs *unc-10*	wt vs *rimb-1; unc-10*	wt vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]*	*rimb-1* vs *unc-10*	*rimb-1* vs *rimb-1; unc-10*
				0.9999	0.5323	<.0001	0.0001	0.4688	<.0001
Fig. 8G				post test p value					
	4, 66	42.1438	<.0001	*rimb-1* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]*	*unc-10* vs *rimb-1; unc-10*	*unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]*	*rimb-1; unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1a]*		
				0.0003	<.0001	<.0001	<.0001		
	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs *unc-10*	wt vs *rimb-1; unc-10*	wt vs *unc-2*	*rimb-1* vs *unc-10*	*rimb-1* vs *rimb-1; unc-10*
				<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
Fig. 8H				post test p value					
	4, 95	1017.054	<.0001	*rimb-1* vs *unc-2*	*unc-10* vs *rimb-1; unc-10*	*unc-10* vs *unc-2*	*rimb-1; unc-10* vs *unc-2*		
				<.0001	<.0001	<.0001	0.0038		
	群全体			post test p value					
Fig. 10B	自由度	F value	p value	*rimb-1; unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1]*	*rimb-1; unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1delN]*	*rimb-1; unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1delC]*	*rimb-1; unc-10* vs *rimb-1; unc-10; Ex[RIMB-1delSH3-III]*		
	4, 45	112.77	<.0001	<.0001	<.0001	0.9901	0.4759		
Fig. 12D	自由度	t value	p value						
	25	5.10	<.0001						
Fig.12E	自由度	t value	p value						
	20	4.96	<.0001						

Table1

D motor SNB-1-GFP number	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs single mut	wt vs double mut	*rimb-1* vs single mut	*rimb-1* vs double mut	sigle vs double
wt, *rimb-1, unc-10, rimb-1; unc-10*	3, 48	1.7664	0.1662	0.9996	0.9999	0.2711	1	0.3228	0.2333
wt, *gkDf40; unc-10, gkDf40; unc-10*	3, 46	2.0494	0.1201	0.351	0.9999	0.3023	0.3251	1	0.2714
wt, *rimb-1, syd-2, nimb-1; syd-2*	3, 44	0.2058	0.8918	0.9999	0.9876	0.9283	0.9793	0.9036	0.9952
wt, *rimb-1, unc-13, rimb-1; unc-13*	3, 50	3.7007	0.0175	0.9997	0.6352	0.2802	0.5673	0.3305	0.0087
wt, *rimb-1,elks-1, rimb-1; elks-1*	3, 42	0.6663	0.5775	0.9998	0.7766	0.9824	0.7293	0.9922	0.5273
wt, *rimb-1, syd-1, nimb-1; syd-1*	3, 43	0.0837	0.9686	0.9998	0.9981	0.9918	0.9997	0.9832	0.9644
wt, *rimb-1, rpm-1, rimb-1; rpm-1*	3, 47	13.0097	<.0001	0.9996	0.0031	<.0001	0.0043	<.0001	0.7426
wt, *rimb-1, sad-1, nimb-1; sad-1*	3, 41	4.0479	0.0131	0.9998	0.9937	0.0414	0.9851	0.0509	0.0187
wt, *rimb-1, unc-2, nimb-1; unc-2*	3, 42	0.1008	0.9591	0.9995	1	0.9766	0.9991	0.9549	0.9758
wt, *rimb-1, unc-18, rimb-1; unc-18*	3, 42	3.9389	0.0145	0.9998	0.9532	0.0657	0.9296	0.0791	0.0154
wt, *rimb-1, lin-2, rimb-1; lin-2*	3, 45	5.8859	0.0018	0.9996	0.2307	0.1783	0.1879	0.216	0.0007
wt, *rimb-1, lin-10, rimb-1; lin-10*	3, 44	0.6512	0.5864	0.9997	0.6946	0.9991	0.6308	0.9955	0.7783

AWC GFP-UNC-2 area	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs single mut	wt vs double mut	*rimb-1* vs single mut	*rimb-1* vs double mut	sigle vs double
wt, *rimb-1, unc-10, rimb-1; unc-10*	3, 36	8.49	0.0002	0.9914	0.75	0.0009	0.5753	0.0004	0.0143
wt, *gkDf40; unc-10, gkDf40; unc-10*	3, 36	9.0893	0.0001	0.8793	0.7595	0.0012	0.3254	0.0001	0.0179
wt, *rimb-1, syd-2, nimb-1; syd-2*	3, 36	0.1049	0.9567	0.9943	0.9471	0.9823	0.991	0.9994	0.9981
wt, *rimb-1, unc-13, rimb-1; unc-13*	3, 36	0.9451	0.4291	0.9928	0.9784	0.5681	0.9075	0.4057	0.8029
wt, *rimb-1,elks-1, rimb-1; elks-1*	3, 36	2.3419	0.0895	0.994	0.1571	0.2873	0.2489	0.4197	0.9858
wt, *rimb-1, syd-1, nimb-1; syd-1*	3, 36	0.0986	0.9603	0.9928	0.9537	0.9991	0.9946	0.999	0.9801
wt, *rimb-1, rpm-1, rimb-1; rpm-1*	3, 36	0.701	0.5576	0.9911	0.7021	0.9892	0.5227	0.9296	0.8677
wt, *rimb-1, sad-1, nimb-1; sad-1*	3, 36	0.3242	0.8078	0.9987	0.9959	0.8001	0.9999	0.8739	0.9022
wt, *rimb-1, unc-18, rimb-1; unc-18*	3, 36	0.5751	0.6351	0.9939	0.6955	0.7629	0.8368	0.8883	0.9994
wt, *rimb-1, lin-2, nimb-1; lin-2*	3, 36	0.3886	0.7619	0.9948	0.7679	0.888	0.8868	0.9638	0.9946
wt, *rimb-1, lin-10, nimb-1; lin-10*	3, 36	3.0295	0.0418	0.9957	0.2969	0.0684	0.4158	0.1112	0.8681

AWC mCherry-RAB-3 area	群全体			post test p value					
	自由度	F value	p value	wt vs *rimb-1*	wt vs single mut	wt vs double mut	*rimb-1* vs single mut	*rimb-1* vs double mut	sigle vs double
wt, *rimb-1, unc-10, rimb-1; unc-10*	3, 36	10.2409	<.0001	0.2737	<.0001	0.0121	0.0063	0.4853	0.1797
wt, *gkDf40; unc-10, gkDf40; unc-10*	3, 36	8.0604	0.0003	0.0441	0.0002	0.0077	0.2017	0.8986	0.5566
wt, *rimb-1, syd-2, nimb-1; syd-2*	3, 36	0.5781	0.6332	0.5765	0.8156	0.9019	0.9766	0.9307	0.9974
wt, *rimb-1, unc-13, rimb-1; unc-13*	3, 36	2.5111	0.0741	0.0823	0.1738	0.7646	0.982	0.4514	0.6791
wt, *rimb-1,elks-1, rimb-1; elks-1*	3, 36	13.1693	<.0001	0.0513	0.0004	<.0001	0.2688	0.0125	0.5008
wt, *rimb-1, syd-1, nimb-1; syd-1*	3, 36	11.4583	<.0001	0.0437	0.9944	0.0002	0.024	0.1991	<.0001
wt, *rimb-1, rpm-1, rimb-1; rpm-1*	3, 36	7.5052	0.0005	0.0266	0.0002	0.0801	0.3223	0.9636	0.14
wt, *rimb-1, sad-1, nimb-1; sad-1*	3, 36	1.2188	0.3169	0.2655	0.7012	0.5499	0.8674	0.9528	0.9947
wt, *rimb-1, unc-18, rimb-1; unc-18*	3, 36	10.412	<.0001	0.167	0.0007	<.0001	0.1443	0.0286	0.8824
wt, *rimb-1, lin-2, nimb-1; lin-2*	3, 36	9.2413	0.0001	0.0344	0.8467	0.0002	0.1934	0.2311	0.0018
wt, *rimb-1, lin-10, rimb-1; lin-10*	3, 36	5.4295	0.0035	0.1342	0.1606	0.0015	0.9997	0.2916	0.2505

謝辞

本研究の遂行にあたりまして、長らく私の指導教官であり、厳しいながらも愛のあるご指導を頂きました多留偉功 准教授に感謝申し上げます。先生のもとで思うまま研究に励むことのできた日々は学生生活の大きな思い出であり、これから歩む人生においてかけがえの財産であります。長い間大変お世話になり、心より感謝申し上げます。

神経科学研究室のスタッフであります鈴木利治 教授、中矢正 助教授、羽田沙緒里 助教授、そして西田祥江 様をはじめ、記名は控えさせていただきますが、歴代の秘書の皆様には様々なご助言、サポートをして頂きましてありがとうございました。また、多留偉功 准教授、鈴木利治 教授には本論文審査をしていただきました。重ねて感謝申し上げます。

本論文審査をしていただきました中川真一 教授、米田宏 准教授に多大なる感謝を申し上げます。米田宏 准教授には本論文発表会の座長もしていただきました。重ねて感謝申し上げます。

神経科学研究室の方々には公私ともにお世話になりました。線虫グループの皆様には、卒業されました方々も含めまして、特に感謝申し上げます。私は一旦アカデミアから離れ、外の世界を見てまいりますが、後進の皆様がよい研究成果を挙げ、線虫グループが世界に名だたる研究集団に成長していくことを遠くから楽しみにしています。くれぐれも体調に気を付けて頑張ってください。

最後に博士課程まで通わせてくれました父母、温かく見守ってくれました姉、祖父母、愛犬オスカー、親戚の皆様、そして、記名は省略させていただきますが、研究室・学内外の友人諸氏に多大なる感謝を申し上げます。めげそうになったとき皆様の励ましがどれほど私の支えであったか言葉では表すことはできません。研究をやり遂げることができたのは皆さまのおかげです。本当にありがとうございました。

最後に、5 年間半という長いような短いような研究生活でありましたが、とても密度の濃い時間を過ごすことができました。知的活動にこれほどまでに熱中することができ、とても幸せでした。ひとえに皆様のおかげです。やり残した研究があることは残念ですが、後進の皆様が私の代わりに完結させてくれることを期待しています。

皆様のこれまでのご支援・愛情を無駄にせず、誇りに思える存在となれますよう今後一層精進します。長い間大変お世話になりました。

令和二年　三月

北海道大学大学院生命科学院生命科学専攻生命医薬化学コース神経科学研究室所属

櫛引勇人