

2018年9月6日

報道機関各位

国立大学法人 山梨大学医学部

シナプスタンパク質 CAST/ELKS による網膜神経伝達部位の構築・維持機構の発見 —網膜変性疾患の新しいメカニズム解明に向けて—

山梨大学医学部・生化学講座第一教室 大塚 稔久教授、及び萩原 明講師らの研究グループは、シナプスタンパク質 CAST/ELKS が網膜視細胞の神経伝達部位の構築や維持に重要な役割を担っていることを明らかにしました。本研究の成果は、米国の科学雑誌「*Journal of Cell Biology*」に掲載されるのに先立ち、オンライン版(9月6日付)に掲載されました。

概要

視覚機能を担う網膜では、入力した光信号は視細胞によって神経情報へと変換され、その情報は双極細胞を経て、神経節細胞(視神経)により脳へと伝達されます。本研究では、シナプスタンパク質 CAST/ELKS を網膜において欠損させたマウスを作製し、視機能が顕著に低下することを見出しました。そこで、これら欠損マウスの網膜を最先端の顕微鏡技術を駆使して観察し、CAST/ELKS がシナプスの形成や局在に関与し、またそれらが視機能と密接に関連していることを明らかにしました。

さらに、成熟したマウスの網膜において後天的に ELKS を欠損させたところ、光センサーである視細胞ならびにそのシナプスが損傷することを見出しました。

このように、網膜において CAST/ELKS を欠損させたマウスの諸症状は、網膜変性疾患の病態に酷似した点が多くみられ、今後メカニズムを詳細に解析していくことで、未だ発症や進行のメカニズムが解明されていない網膜変性疾患の新しい治療ターゲットへの応用が期待されます。

本研究は、久留米大学医学部 薬理学講座(西教授)、同解剖学講座(中村教授、太田准教授)、ドイツマックスプランク研究所(Moser 教授)、新潟大学・脳研究所(崎村教授、阿部准教授)らとの共同研究により遂行されました。

論文情報

論文タイトル:

Cytomatrix proteins CAST and ELKS regulate retinal photoreceptor development and maintenance

著者:

Akari Hagiwara, Yosuke Kitahara, Chad Paul Grabner, Christian Vogl, Manabu Abe, Ryo Kitta, Keisuke Ohta, Keiichiro Nakamura, Kenji Sakimura, Tobias Moser*, Akinori Nishi, and Toshihisa Ohtsuka* (*責任著者)

掲載誌:

Journal of Cell Biology, 11-05-2018 issue, vol. 217 no. 11.

背景

脳の様々な機能をつかさどる神経細胞は、他の神経細胞と情報伝達の間(部位)であるシナプス[1]を形成します。すなわち、神経情報は前シナプス開口放出部から放出された伝達物質が後シナプスの受容体に結合することで伝達されます。本研究で着目した CAST/ELKS は前シナプス開口放出部に局在する CAZ タンパク質[2]として同定され、放出部位の形成や調節といった機能が明らかにされてきました。

本研究で着目した網膜には、光を受容し神経情報に変換する視細胞が存在し、その情報は双極細胞や水平細胞の修飾を経たのち、神経節細胞の軸索(視神経)によって脳中枢へと伝達されていきます。この視細胞の情報伝達部位は、リボンシナプス[3]と呼ばれる特殊な構造を有し、膨大な光情報を双極細胞や水平細胞へと効率よく伝達すると考えられていますが、その詳細は十分にわかっていません。そこで、この伝達部位を形成し、放出を調節する因子の一つとして CAST/ELKS に着目し、CAST/ELKS による視機能調節機構の解明を行うこととしました。

先行研究として 2012 年に報告した CAST 欠損マウスの網膜における解析に引き続き(参考文献 1)、ファミリータンパク質である ELKS 並びに CAST/ELKS 両遺伝子欠損マウスを作製し、形態学的な観察を中心に解析を行いました。

(参考文献 1)

tom Dieck, S., D. Specht, N. Strenzke, Y. Hida, V. Krishnamoorthy, F. Schmidt, E. Inoue, H. Ishizaki, M. Tanaka-Okamoto, J. Miyoshi, A. Hagiwara, J.H. Brandstatter, S. Lowel, T. Gollisch, T. Ohtsuka, and T. Moser. Deletion of the presynaptic scaffold CAST reduces active zone size in rod photoreceptors and impairs visual processing. *Journal of Neuroscience* (2012) 32:12192 – 12203.

研究成果

今回研究チームでは、ELKS を網膜で欠損させたマウス、及び以前作成した CAST 欠損マウスと交配させた CAST/ELKS 両欠損マウスを作製し、視機能の検査を行いました。その結果、CAST/ELKS 欠損マウスは他のマウスに比べて体が全体的に小さく、また網膜電図(ERG)の検

査により視力が大幅に低下していることがわかりました。(図1)

これらマウスの網膜において、リボンシナプスの局在を観察したところ、CAST/ELKS 欠損マウスでは通常あるべきではない層へと局在が変化しており(異所性の局在)、その局在が週齢に伴って大幅に増加することが見出されました。このような異所性の局在は夜盲症のモデルマウスをはじめとして、様々な視機能疾患マウスでも共通してみられる症状として知られており、今回我々が作成したシナプスタンパク質 CAST/ELKS の欠損マウスも夜盲症のメカニズム解析等に将来貢献することが期待されます。(図2)

さらに、研究チームは久留米大学・医学部との共同研究により、最新の電子顕微鏡技術として 収束イオンビーム・走査型電子顕微鏡法(FIB-SEM 法)[4]を用い、網膜視細胞・双極細胞・水平細胞による トライアッド構造[3]の3次元立体再構築に成功しました。その結果、CAST 欠損、及び CAST/ELKS 欠損マウスでは水平細胞の構造異常やリボンシナプスの大幅なサイズ低下を認め、CAST/ELKS によるシナプスの形成異常が視機能の低下に深く関与していることが示唆されました。(図3)

このように先天的に CAST や ELKS を欠損させるマウスと併行し、本研究では成熟した網膜において後天的に ELKS を欠損させることにも成功しました。その結果、ELKS が存在する状態で構築された神経回路において、視細胞の ELKS を欠損させると視細胞が消失し、併せてリボンシナプスも減少することが見出されました。(図4)このように光センサーとして働く視細胞の消失は、失明や重症な視力障害を引き起こす 網膜変性疾患[5]の症状と酷似しており、本成果は視覚障害発症の新しいメカニズム解明に向けた大きな一歩となることが期待されます。

本研究は山梨大学重点的研究プロジェクト(先端脳科学研究)、及び日本学術振興会 JSPS 科研費・基盤研究(大塚教授、西教授)、若手研究(萩原講師)、新学術領域研究「スクラップ&ビルドによる脳機能の動的制御(研究代表者:榎本和夫教授)」「(大塚教授)、CREST「オプトバイオ・光の特性を活用した生命機能の時空間制御技術の開発と応用(研究代表者:磯村宜和教授)」「(大塚教授)、また German Research Foundation(Moser 教授)による支援を受けて行われました。

今後の展開

「見る」という感覚では、まず網膜の視細胞が光センサーとして働き、網膜内の神経回路を経て、視覚情報が脳へ送られていきます。中途失明の要因となる網膜変性疾患では、このセンサーで

ある視細胞が変性し消失することで、重症な視覚障害や失明が引き起こされます。近年、iPS 細胞由来の網膜組織をヒトへ移植する検証が開始され、治療法への応用の期待が高まっています。しかしながら、網膜変性疾患の発症や進行のメカニズムに関しては未だ不明な点が多く、有効な治療法の確立には至っていないため、様々な対処療法が施行されている段階です。

本成果により、視細胞のシナプスタンパク質 CAST/ELKS が視覚機能に重要な役割を担っており、その欠損が疾患の発症や進行に関与していることが示唆されました。今後、CAST/ELKS を中心とした視細胞の神経伝達機構やその機能を詳細に解析することで、発症メカニズムの発見並びに治療法確立への応用が期待されます。

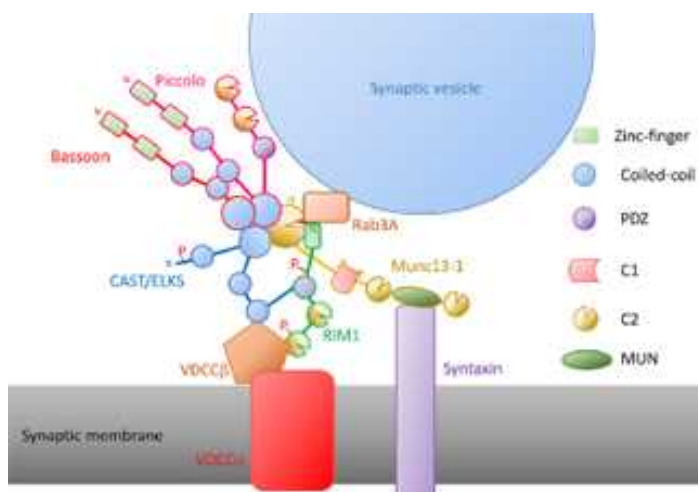
用語説明

[1] シナプス

神経細胞が他の細胞へと情報を伝達するために形成する接合部位を示し、主に電気シナプスと化学シナプスの2種類に分類される。ここでは、シナプス小胞からの伝達物質放出によって神経活動が伝達される化学シナプスをシナプスと呼称する。

シナプスの微細構造は、伝達物質を内包するシナプス小胞が多数存在する前シナプス終末、及び数十 nm(ナノメートル)の間隔を挟んで(シナプス間隙)、伝達物質に対する受容体が集積する後シナプスの膜から成る。前シナプスの神経細胞が神経発火すると、その活動電位が前シナプス終末に到達し、電位依存性カルシウムチャネルを介してカルシウムが流入する。この流入をきっかけとして、シナプス小胞が前シナプス終末の膜と融合し、伝達物質がシナプス間隙に放出される。このように、シナプス小胞が融合し放出が行われる部位を開口放出部(アクティブゾーン、AZ)と呼ぶ。間隙に拡散された伝達物質は後シナプス膜上の受容体に結合し、イオンチャネルが開閉することで後シナプスの細胞は神経発火する。

[2] CAZ タンパク質



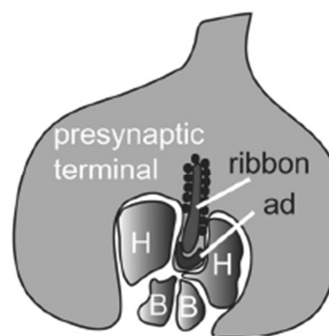
前シナプス終末の開口放出部 (AZ) に局在するタンパク質群の総称。CAST/ELKS を含め、数種類のタンパク質が同定されており、各タンパク質が相互作用することで、開口放出部の形成や、シナプス小胞の膜への融合(開口放出)を制御していることがわかってきた。

Neuroscience Research (2017), Hamada, Ohtsuka

[3] リボンシナプス・トライアッド構造

リボンシナプスは網膜及び聴覚系の神経細胞において持続的な開口放出に適した特殊な構造を有するシナプスである。電子顕微鏡で観察した際、前シナプス終末の開口放出部に、数百 nm のリボン状の構造とリボンの両サイドにシナプス小胞が集積している様子が見られる。

視細胞の前シナプス終末では、このリボンシナプスの開口放出部に水平細胞(H)と双極細胞(B)の後シナプスが陥入し、リボン・水平細胞・双極細胞で形成される構造体をトライアッド構造と呼ぶ。



J. Neurosci. (2012), tom Dieck et al.

[4] 収束イオンビーム・走査型電子顕微鏡法(FIB-SEM 法)

走査型電子顕微鏡は、電子銃から発生させた電子線を試料に照射し、試料から放出された2次電子(反射電子)を検出して観察する方法である。FIB-SEM 法では、この走査型電子顕微鏡法に、収束イオンビームを搭載し、イオンビームによって試料の表面を切削し、観察と切削を繰り返すことで連続断層像を収集する。このようにして回収した電子顕微鏡レベルの微細構造の中から、対象となる構造体を抽出し、三次元に立体再構築することで全体像の知見が得られる。

[5] 網膜変性疾患

網膜色素変性症や加齢性黄斑変性症など、目の病気のなかでも網膜に損傷が見られる疾患。症状の進行に伴い、網膜の視細胞が変性し消失することで視力の低下から失明に至ることがある。現在までに有効な治療法が確立されておらず、様々な対処療法により進行を遅らせる治療が行われている。

<研究に関する問合せ>

国立大学法人 山梨大学 医学部 生化学講座第一教室

Tel: 055-273-9490 Fax: 055-273-9490

教授 大塚 稔久 E-mail: tohtsuka@yamanashi.ac.jp

講師 萩原 明 E-mail: akarih@yamanashi.ac.jp

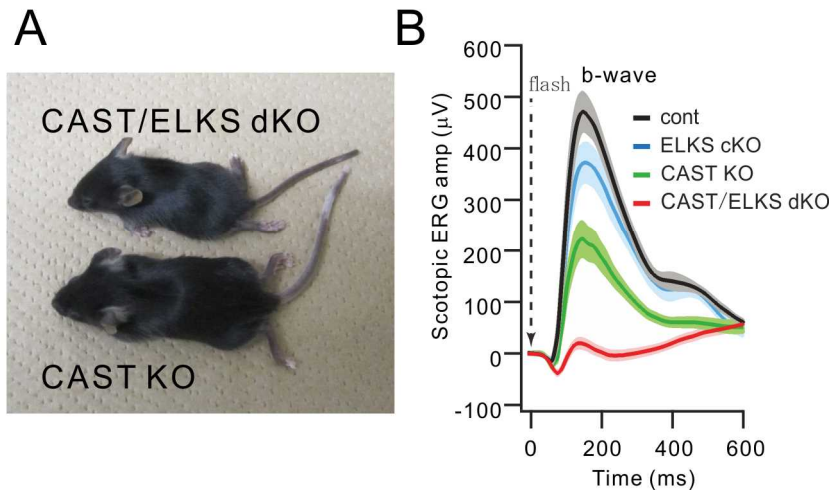
<報道に関する問合せ>

国立大学法人 山梨大学 総務部総務課広報企画室

Tel: 055-220-8006 Fax: 055-220-8799

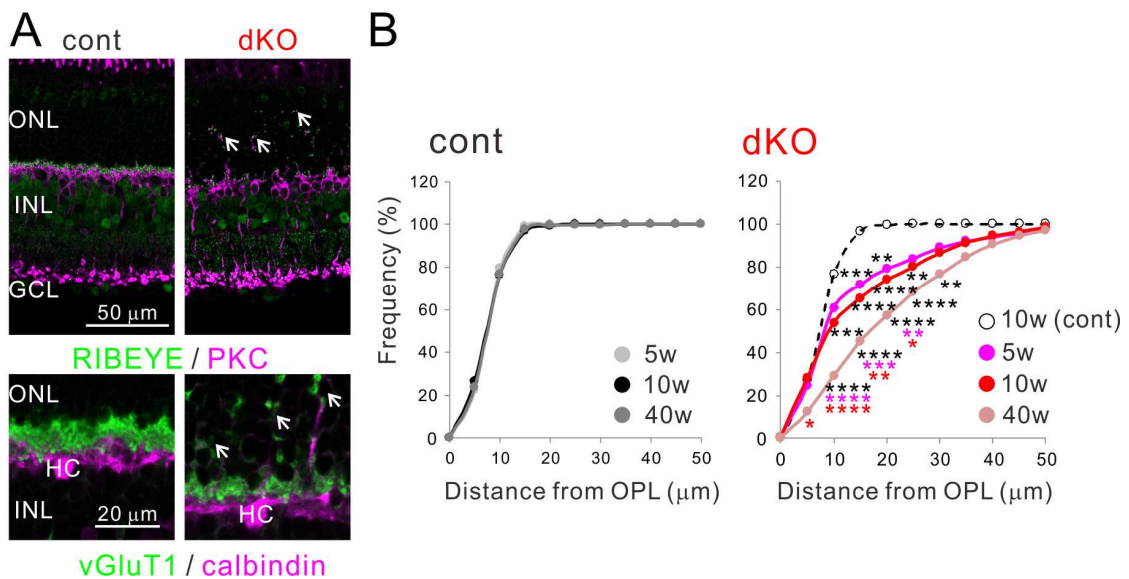
E-mail: koho@yamanashi.ac.jp

図 1 CAST/ELKS 両欠損マウス(CAST/ELKS dKO)の視機能検査



(A) CAST/ELKS 両欠損マウスでは、体重が 10-15%低下し、目のサイズも有意に小さくなっていました。(B) 網膜電図(ERG)を用いた視機能検査の結果。光照射による網膜神経細胞の活動を計測したところ、b-wave とよばれる反応の山が ELKS や CAST の欠損マウスで低下し、CAST/ELKS 両欠損(dKO)マウスでは顕著に低下していることがわかった。

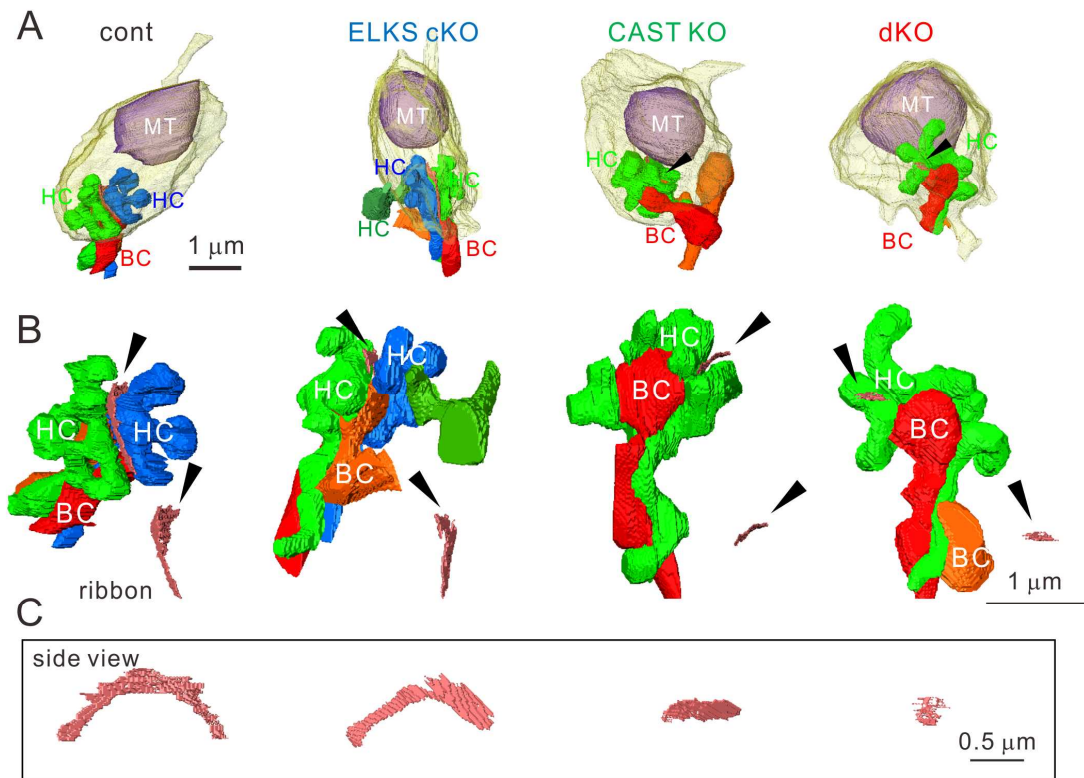
図 2 視細胞シナプスの観察により、CAST/ELKS 両欠損(dKO)マウスでは異所性の局在が増大していた



(A) 網膜視細胞のシナプスマーカーである RIBEYE や前シナプス終末のマーカである vGluT1 で染色した光学顕微鏡画像(緑色のシグナル)。通常(cont)、これらのシグナルは ONL と

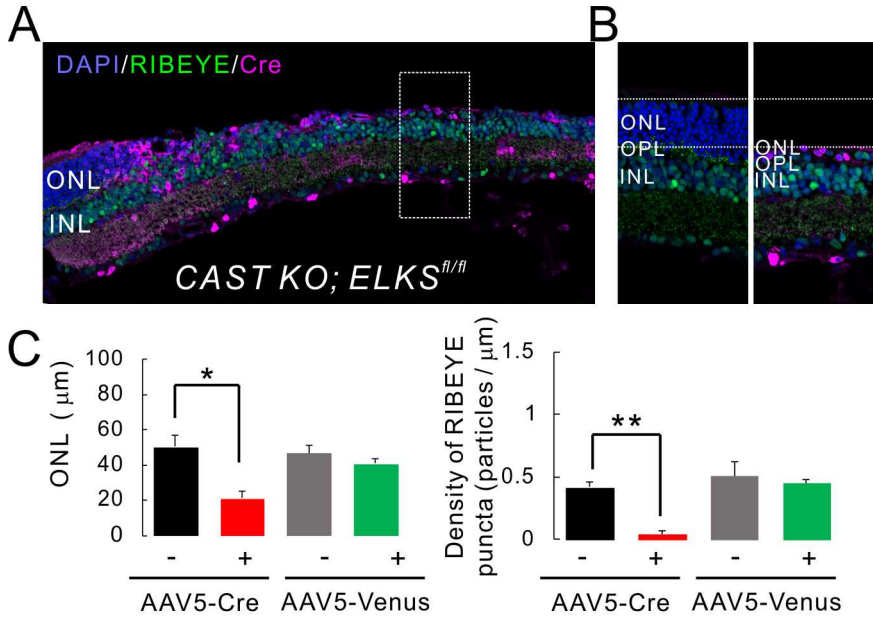
INL 層の間(OPL 層)に集積しているが、dKO マウスでは ONL 層に多くのシグナルが異所性に局在していることがわかった(矢印)。(B) RIBEYE のシグナルを OPL 層から ONL 層への距離として計測したところ、コントロールマウスではすべてのシグナルが OPL 層の厚みである 15-20 μm (マイクロメートル)以内に収まっていたが、dKO マウスでは 20-30%が ONL 層にあることがわかった。さらに 5 週齢の若齢マウスや 40 週齢の高齢マウスに関しても同様の解析を行ったところ、40 週齢の dKO マウスではこの異所性の局在が顕著に増大していた。

図 3 視細胞前シナプス終末・トライアッド構造・リボンシナプスの三次元立体再構築像



(A) 収束イオンビーム・走査型電子顕微鏡による連続断層像から構築した、視細胞前シナプス終末の構造。前シナプス終末の大きさは各遺伝子欠損マウスで変化は見られなかった。MT;ミトコンドリア (B-C) トライアッド構造及びリボンシナプスの拡大図。水平細胞(HC)がリボンシナプス(ピンク・黒矢頭)を挟みこみ、その下方に双極細胞(BC)が入り込んでいる。興味深いことに、CAST 欠損(CAST KO)や CAST/ELKS 両欠損マウス(dKO)では、1 本の水平細胞が分岐することでリボンシナプスの挟み込みを構築していた。また、リボンシナプスのサイズも顕著に小さくなっていた。

[4] 後天的に ELKS を欠損させると視細胞の層(ONL 層)が損傷する



(A-B) ウィルスベクターによりCreを発現させることでELKSを後天的に欠損させたマウスでは、視細胞が集積する ONL 層が一部消失することがわかった。DAPI;細胞核のマーカ、RIBEYE;シナプスマーカー。A の枠で囲った領域を B の右図に拡大。(C) ウィルスベクターにより Cre を発現させた領域では、ONL 層の厚みや RIBEYE の密度が有意に低下していた。一方、ウィルスベクターにより Venus(蛍光マーカー)を発現させたときには、このような視細胞の消失は起こらなかった。