

## リン酸化によるアクティブゾーン蛋白質CASTの機能制御機構の解明

### 1. はじめに

緒言:神経シナプスは脳内における情報伝達の間である。情報を発信する側のプレシナプスにはアクティブゾーンと呼ばれる構造体が存在し、神経伝達のタイミングを制御している。アクティブゾーン特異的蛋白質としては、Bassoon, Piccolo, Munc13-1, Rim1, CAST, ELKSが知られており、生化学的解析・細胞生物学的解析から、これらアクティブゾーン蛋白質間の相互作用と機能関連が明らかになりつつある。本研究では、私共が見出したアクティブゾーン蛋白質CASTの機能発現にかかわるリン酸化シグナル伝達機構の解明を試みた。

目的:アクティブゾーン(active zone:AZ)は神経前シナプス膜直下に存在する比較的電子密度の高い領域で、神経伝達物質の放出を時間的かつ空間的に制御している重要な構造体である。私共は、最近AZに特異的に存在する蛋白質CAST(Cytomatrix at the AZ-associated Structural protein)を見出した。さらに、CASTが他のAZ蛋白質であるBassoon, Piccolo, Munc13s, RIMsと巨大な分子複合体を形成し神経伝達物質の放出を制御していることを明らかにしている。現在、このCASTを介した分子複合体が比較的電子密度の高いAZの分子基盤ではないかと私共は考えている。さらに、最近私共は、AZに局在するリン酸化酵素SADキナーゼを同定することに成功し、SADがRIMをリン酸化し神経伝達物質の放出を制御していることを報告した。本研究では、SADによるAZ蛋白質CASTのリン酸化を生化学的・細胞生物学的に解析し、CASTの機能発現におけるリン酸化の役割を明らかにすることを目的とする。また、リン酸化部位に変異を入れたノックインマウスの作製・解析を試み、AZにおけるリン酸化シグナル伝達の個体レベルでの役割を明らかにする。

背景:AZ 特異的分子群の解析は特に欧米において盛んに研究が行われており、神経科学分野でも極めてホットな分野のひとつである。実際に、CAST 以外の AZ 蛋白質はすべて欧米のグループによって単離・解析されてきた。いずれも Nature や Neuron などのトップジャーナルに報告され、私共が CAST を発見するまで、この分野において世界と伍する研究室は日本国内に存在しなかったといつてよい。一方で、それまで個々の研究室がそれぞれの AZ タンパク質を個別に研究していたために、それらの相互作用という観点から、解析を進める研究は全くなされていなかった。したがって、私共による CAST の発見 (Ohtsuka et al., 2002. *J.Cell Biol.*) とその後の CAST を介した AZ タンパク質間の巨大な分子複合体形成の発見は(Takao-Rikitsu et al., 2004. *J.Cell Biol.*)、この分野に大きなインパクトを与えることとなった(実際に、CAST は Bassoon, Piccolo, RIM1, RIM2 および CAST のファミリーメンバーである ELKS と直接結合する)。AZ 自体は電子顕微鏡を用いた解析から、1960年代にはその構造が明らかとなっていたがその分子構造に関しては長らく不明であった。現在、この CAST を介した巨大な分子複合体が AZ の分子基盤ではないかと広く考えられており、実際、ショウジョウバエの CAST 変異体では AZ が完全に消失することが昨年 Neuron 誌、Science 誌に相次いで報告された。

序論:現在、このテーマに関連した世界的な研究の方向性は、AZ の形成・維持・機能発現においていかなるシグナル伝達機構が必要なのか、その発見とメカニズムの解明にある。したがって、AZ に特異

的に存在する SAD キナーゼの発見と SAD キナーゼによる AZ タンパク質 RIM1 のリン酸化の発見は、多くの研究者の興味を引きつけることとなった (Inoue et al., 2006. *Neuron*)。さらに、SAD による CAST のリン酸化の生理学的な意義を明らかにできれば、AZ におけるリン酸化シグナル伝達機構の全容解明につながることを期待できる。実際、私共は CAST と RIM だけでなく Bassoon と Piccolo も SAD によってリン酸化されることを見出している (未発表データ)。

したがって、当該研究分野で世界をリードする研究を遂行するために本研究計画を強力に推し進める必要がある。AZ タンパク質の分子間ネットワークと AZ におけるリン酸化のシグナル伝達機構を有機的に結びつけるような取り組みは、国内外でも本申請者のグループにおいて他にはない。

さらに、国内には電気生理学・形態学の分野で世界のトップに位置する研究室があり、それらと共同研究および密な情報交換を行うことで、国内においてもこの分野で世界をリードする研究拠点の形成が期待できる。

2. 方法: CASTの全長をカバーするGST融合蛋白質を作製し、大腸菌で発現・精製を行い、in vitroのリン酸化アッセイを用いて、CASTがSADキナーゼによってリン酸化されるかどうかをまず確認し、どのセリンもしくはスレオニン残基がリン酸化されるのかを解析した。また、海馬初代培養神経細胞を用いてリン酸化がCASTのアクティブゾーンへの局在にあたる影響を解析した。

### 3. 結果 研究成果

SADキナーゼがCASTのアミノ末端に存在する1つのセリン残基をリン酸化することが明らかとなった。さらに、このリン酸化部位特異的なウサギポリクローナル交代を作製し、生体内においてもCASTがリン酸化されていること、生後すぐにリン酸化のピークが見られ徐々にリン酸化の程度が低くなっていくこと、およびリン酸化されたCASTもアクティブゾーンに強く結合していることを、マウスで明らかにした。

次に、このリン酸化されるセリン残基をアラニン残基に置換して、リン酸化されないようにした変異体を海馬初代培養神経細胞に導入したところ、野生体と同じように、内在性のアクティブゾーンマーカーBassoonと共局在した。

### 4. 考察 まとめ

アクティブゾーンに存在するリン酸化酵素SADキナーゼがRIM1だけでなく、CASTを直接リン酸化することが明らかとなり、アクティブゾーンにおいてアクティブゾーン構成蛋白質のリン酸化ネットワークが形成されていることが示唆された。現在、Munc13-1以外のアクティブゾーン蛋白質がSADキナーゼによってリン酸化されることを明らかにしており、今後、これらリン酸化の生理的な意義を解明することが肝要である。実際に、予備的なデータでは、CASTのリン酸化が神経伝達物質の放出に関与していることを電気生理学的に明らかにしており、それらの個体レベルでの意義の解明が期待される。

### 5. 発表論文、参考文献

\*Ohtsuka, T and Takai, Y Roles of the ELKS/CAST family and SAD kinase in neurotransmitter release: Chapter 9, molecular mechanisms of neurotransmitter release. Chap.9, pp157-170. 2008. (\*corresponding author)