

Mini Review

ASD リスク遺伝子産物ミオシン Id の樹状突起スパイン局在機構

佐々木哲也*, 武井 陽介*

抄録: ミオシンはアクチンと結合する分子モーターである。ミオシン Id は自閉スペクトラム症のリスク遺伝子であり、神経細胞での局在や機能は不明である。培養神経細胞に EGFP 融合ミオシン Id を発現させたところ、樹状突起スパインに集積が認められ、この局在には TH1 ドメインが重要であることが判明した。本研究結果は、自閉スペクトラム症発現・病態における本分子の役割を理解する最初の手がかりを与えると考えられる。

日本生物学的精神医学会誌 31 (2) : 93-97, 2020

Key words : actin filament, autism spectrum disorder, dendritic spine, molecular motor, myosin Id

はじめに

アクチン結合タンパク質であるミオシンは、アデノシン三リン酸 (ATP) の加水分解エネルギーを用いてアクチンフィラメント上を移動する分子モーターである。ミオシンスーパーファミリーは改訂が続いており、現在のところ少なくとも 30 クラスが存在することがわかっている¹²⁾。神経細胞に発現するミオシンは多数存在し、多種多様なカーゴの輸送およびアクチン構造の調節によってシナプス機能に影響を与える⁶⁾。これまでに非筋肉型ミオシン II, VI が樹状突起スパインの形態形成に関与していること^{16, 18)}、ミオシン Va が AMPA 受容体 (GluA1) と結合し樹状突起シャフトからスパインへの輸送を行うことで長期増強に寄与すること⁴⁾、ミオシン Vb がリサイクリングエンドソームを輸送し、LTP 中の AMPA 受容体挿入とスパインの成長に寄与していること²³⁾ など、シナプス可塑性への関与が報告されている。

自閉スペクトラム症 (ASD) の病態の背景にはシナプスの構造・機能の異常があると考えられる¹⁷⁾。ASD は社会的コミュニケーション障害および常同

行動で特徴づけられる神経発達障害で、発症率は 1% を超える。これまでにミオシンファミリーに属するいくつかの分子と ASD との関連が報告されている。ミオシン IXb は RhoA 活性を制御し、大脳皮質神経細胞における樹状突起形態形成に関与しており¹¹⁾、その変異が ASD リスクに影響を及ぼす可能性が示唆された⁵⁾。また、コホート研究によって、ミオシン XVI と ASD との関係が示唆された²²⁾。さらに、一塩基多型 (SNP) の連鎖解析研究により、ミオシン Id が ASD リスク遺伝子の候補に挙げられている¹⁹⁾。

ミオシン I は単量体で存在するミオシンで Ia ~ Ih のサブクラスを有し、それぞれ細胞接着やアクチン構造の調節、エキソサイトーシスやエンドサイトーシス、細胞内輸送に関与する¹⁴⁾。ミオシン I は ATP 加水分解によりアクチンと相互作用するモータードメイン、IQ モチーフを含むカルモジュリンあるいはカルモジュリン様軽鎖に結合する軽鎖結合ドメイン、そして膜脂質と相互作用する tail homology 1 (TH1) ドメイン¹³⁾ という共通の構造を持つ。実際、ミオシン I はさまざまな細胞種でアクチンフィラメントと細胞膜とのリンカーとして機

受理日: 2020 年 2 月 26 日

Localization Mechanism of Myosin Id, an ASD Risk Gene Product in Dendritic Spines

* 国立大学法人 筑波大学 医学医療系 解剖学・神経科学研究室 (〒 305-8577 茨城県つくば市天王台 1-1-1) Tetsuya Sasaki, Yosuke Takei : Department of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, 1-1-1, Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8577, Japan

【佐々木哲也 E-mail : tsasaki@md.tsukuba.ac.jp】

【武井 陽介 E-mail : ytakei@md.tsukuba.ac.jp】

能することが知られている。クラス I ミオシンに属するミオシン Id は、神経細胞で発現することがわかっているが、その局在や機能はこれまで不明のままである。本稿は、当研究室から発表された論文“*Myosin Id localizes in dendritic spines through the tail homology 1 domain*”⁹⁾の内容を Mini Review として紹介するものである。

1. EGFP 融合ミオシン Id を用いた細胞内局在解析

研究の第一段階として、脳内でミオシン Id の発現量に差があるかどうか検討するため、定量 PCR を行った。ミオシン Id は成体マウス脳全体に発現がみられたが、線条体、視床、脳幹において特に強く発現していた。また細胞質分画とシナプトソーム分画に分けてその細胞内分布を調査した結果、ミオシン Id はシナプトソーム分画に多く存在していることがわかった。

次に HEK293T 細胞に EGFP 融合ミオシン Id を発現させたところ、F アクチンに富む仮足にミオシン Id が集積することが認められた。さらに初代培養海馬神経細胞に EGFP 融合ミオシン Id を導入し観察した。スパインが形成された神経細胞（培養 14 日）において、後シナプス部位のマーカーである PSD-95 抗体を用いて抗体染色を行ったところ、樹状突起上で EGFP シグナルと PSD-95 シグナルとの共局在が観察された（図 1）。さらに樹状突起シャフトにおける蛍光強度に対するスパインの蛍光強度の比を算出した結果、EGFP-Myosin Id シグナルは mCherry シグナル（神経細胞全体のシグナル検出に用いた赤色蛍光タンパク質）と比べシグナル比が有意に高く、スパイン内部へ集積する傾向が明らかになった。

ミオシン Id の樹状突起スパインへの局在を制御する領域を明らかにするため、EGFP-Myosin Id（全長配列）のほかに、モータードメインに存在するアクチン結合部位を欠失させたベクター（ Δ 584-594 vector）、TH1 ドメインを含む C 末端側を欠失させた EGFP-Myosin Id ベクター（ Δ TH1 vector）と、モータードメインを含む N 末端側を欠失させた EGFP-Myosin Id ベクター（IQ + TH1 vector）を作製した。これらのベクターを HEK293T 細胞に導入して検討したところ、TH1 ドメインを欠失したベクター Δ TH1 vector で、ミオシン Id の仮足への分布が顕著に低下した。さらに TH1 ドメイン内の pleckstrin homology (PH1)³⁾ ドメイン（クラス I

ミオシンに保存されており、リン脂質との結合に重要である）に存在する特定の塩基性アミノ酸残基がアクチン結合能に大きな影響を与えることを見いだしている。最後に、成熟した神経細胞において、EGFP-Myosin Id（全長配列）と Δ TH1 vector をそれぞれ導入し、ミオシン Id の局在の変化を調査した。その結果、 Δ TH1 vector では樹状突起におけるシグナルが弱く、樹状突起への局在が阻害されていること、さらに樹状突起スパインへの局在も減弱していることを見いだした（図 2）。

まとめ

ミオシン Id は神経細胞の樹状突起スパインに集積すること、従来考えられていたアクチン結合部位を欠損させてもアクチン結合能が減弱しないこと、驚くべきことに TH1 ドメインがアクチン結合能に重要であることが示された。環境に応じてシナプス伝達を微調整するシナプス可塑性は、学習や記憶の基盤をなす⁷⁾。これまでに樹状突起スパインに存在する分子の多くがシナプス可塑性の制御に関与していることがわかっている。またシナプス形成・除去のダイナミクスの異常が、ASD や統合失調症といった精神疾患の病態生理の原因となっている¹⁷⁾。網羅的遺伝子多型解析により、ミオシン Id は ASD リスク遺伝子として報告されている¹⁹⁾。ミオシン Id が樹状突起スパインに集積しアクチンフィラメントと結合することから、本分子が興奮性シナプス伝達の調整に関与し、その機能異常が ASD の病態に寄与している可能性がある。

ミオシン Id の TH1 ドメインは、N アセチルアスパラギン酸 (NAA) アシル化酵素であるアスパルトアシラーゼの C 末端と相互作用することが示されている²⁾。NAA は哺乳類の脳に高濃度で存在しており、統合失調症や多発性硬化症、てんかんといった精神神経疾患との関連が指摘されている。ASD の児童においても、定型発達児と比較して NAA の低下が観察されており¹⁵⁾、この点においてもミオシン Id と精神疾患との関係について興味を喚起する。

神経細胞は高度に分化した樹状突起に各種分子を配送する細胞内輸送システムを有している。この輸送システムでは、キネシン、ダイニン、ミオシンといった分子モーターが用いられている⁵⁾。これらの分子は、微小管やアクチンなどの細胞骨格に沿って「荷物」を目的地まで運ぶ。細胞内輸送の障害が統合失調症や認知症に関与することが明らかになりつつある^{1, 20)}。アクチンフィラメントは樹状突起スパ

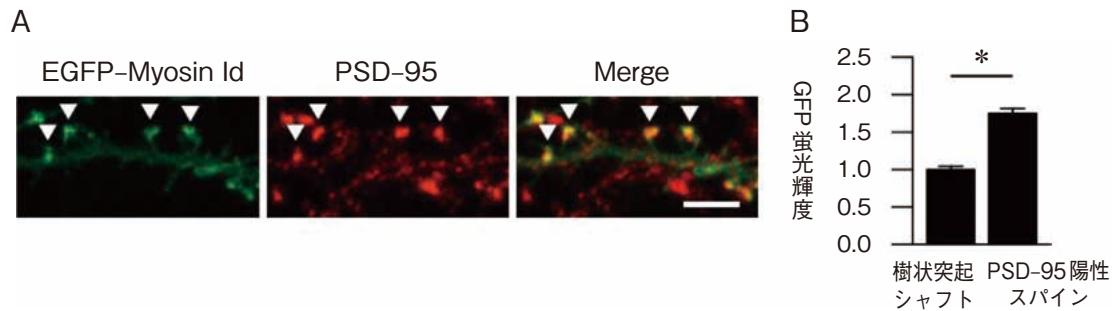


図1 海馬培養ニューロンにおけるミオシンIdの局在

A. 成熟した神経細胞（培養14日目）において、EGFP-Myosin Id（全長配列）を導入し、後シナプスのマーカーであるPSD-95抗体を用いて免疫染色を行った。樹状突起上でEGFPシグナルが強い部分とPSD-95シグナルの共局在が観察された（矢頭）。Scale bar=5 μ m。B. EGFPのシグナルは、樹状突起シャフトよりもPSD-95陽性スパインのほうが強い。* P <0.05。本図は文献9より抜粋・改変した。

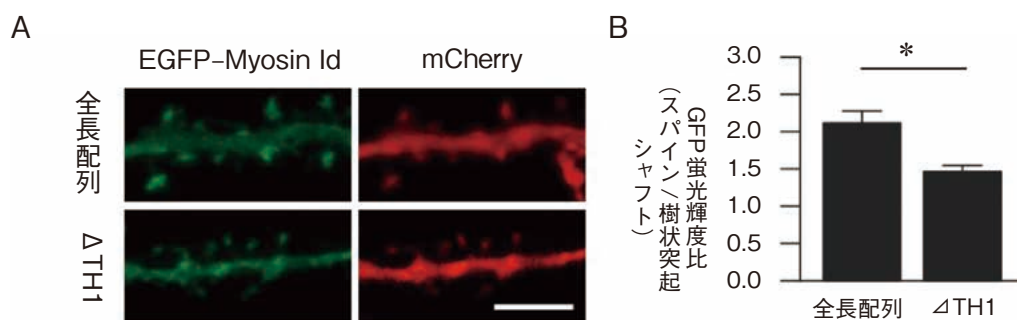


図2 ミオシンIdの樹状突起スパインへの局在にはTH1ドメインが重要である

A. EGFP-ミオシンId全長配列を発現させた樹状突起（上段）とEGFP-ミオシンId（TH1ドメイン欠損）を発現させた樹状突起（下段）の拡大図。mCherryを同時導入して樹状突起の形態を可視化してある。Scale bar=5 μ m。B. TH1ドメインを欠損したミオシンIdは、樹状突起スパインへの局在が阻害されている。* P <0.05。本図は文献9より抜粋・改変した。

インだけでなく、樹状突起シャフト内にも存在していることが報告されている⁸⁾。興味深いことに、アクチンの脱重合を促進する薬剤で処理すると、特定の分子の樹状突起への局在が阻害されることが報告されている¹⁰⁾。例えばミオシンVaはアクチン依存性の樹状突起内輸送を担っていると考えられている。TH1ドメインを欠損したミオシンIdは、intactなミオシンIdと比較して樹状突起への局在が阻害されていたことから、本分子はアクチンフィラメントと相互作用することで樹状突起内を移動するのかもしれない。

これらの結果を踏まえて、ニューロンにおけるミオシンIdの機能解析を進めたいと考えている。さまざまな細胞種でクラスIミオシンはアクチンフィラメントとリン脂質とのリンカーとして機能することが知られている¹⁴⁾。実際、クラスIミオシンは、微絨毛や卵母細胞（ミオシンIa, Id）、聴覚有毛細胞の不動毛（ミオシンIc）、および糸球体上皮細胞の足突起（ミオシンIe）などのアクチンに富む突起

に局在化する傾向がある。またクラスIミオシンは、細胞膜に小胞を融合またはつなぎとめる機能があることが提案されている。ミオシンIdがこれらの機能を共有している場合、樹状突起スパインの構造または小胞輸送を制御することでシナプス伝達を調節する可能性がある。本研究成果は、ASD発現とその病態における本分子の役割を理解する最初の手がかりをもたらすと考えられる。今後、遺伝子改変マウスやヒトを対象とした研究により、さらに機能の詳細が明らかになることを期待する。

本研究は、筑波大学医学医療系の大塚優江さんに技術的なサポートをいただいた。本研究の一部は、AMED（Brain/MINDS）および上原記念生命科学財団のサポートの下で行われた。佐々木は、新学術領域「マルチスケール脳」（<http://multiscale-brain.umin.ne.jp/>）のサポートを受けている。すべての動物実験は国立大学法人筑波大学動物実験取扱規程に従って行われた。開示すべき利益相反は存在しない。

文 献

- 1) Alsabban AH, Morikawa M, Tanaka Y, et al (2019) Kinesin Kif3b mutation reduces NMDAR subunit NR2A trafficking and causes schizophrenia-like phenotypes in mice. *EMBO J*, 39 : e101090.
- 2) Benesh AE, Fleming JT, Chiang C, et al (2012) Expression and localization of myosin-1d in the developing nervous system. *Brain Res*, 1440 : 9–22.
- 3) Berg JS, Derfler BH, Pennisi CM, et al (2000) Myosin-X, a novel myosin with pleckstrin homology domains, associates with regions of dynamic actin. *J Cell Sci*, 113 : 3439–3451.
- 4) Correia SS, Bassani S, Brown TC, et al (2008) Motor protein-dependent transport of AMPA receptors into spines during long-term potentiation. *Nat Neurosci*, 11 : 457–466.
- 5) De Rubeis S, He X, Goldberg AP, et al (2014) Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515 : 209–215.
- 6) Hirokawa N, Niwa S and Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons : Transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron*, 68 : 610–638.
- 7) Hotulainen P and Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines : Connecting dynamics to function. *J Cell Biol*, 189 : 619–629.
- 8) Konietzny A, Bär J and Mikhaylova M (2017) Dendritic actin cytoskeleton : structure, functions, and regulations. *Front Cell Neurosci*, 11 : 147.
- 9) Koshida R, Tome S and Takei Y (2018) Myosin Id localizes in dendritic spines through the tail homology 1 domain. *Exp Cell Res*, 367 : 65–72.
- 10) Lewis TL, Mao T, Svoboda K, et al (2009) Myosin-dependent targeting of transmembrane proteins to neuronal dendrites. *Nat Neurosci*, 12 : 568–576.
- 11) Long H, Zhu X, Yang P, et al (2013) Myo9b and RICS modulate dendritic morphology of cortical neurons. *Cereb Cortex*, 23 : 71–79.
- 12) Luna EJ (2019) Unconventional myosins muscle into myofibrils. *J Bio Chem*, 294 : 7219–7220.
- 13) Mazerik JN, Kraft LJ, Kenworthy AK, et al (2014) Motor and tail homology 1 (TH1) domains antagonistically control myosin-1 dynamics. *Biophys J*, 106 : 649–658.
- 14) McIntosh BB and Ostap EM (2016) Myosin-I molecular motors at a glance. *J Cell Sci*, 129 : 2689–2695.
- 15) Moffett JR, Ross B, Arun P, et al (2007) N-Acetylaspartate in the CNS : From neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol*, 81 : 89–131.
- 16) Osterweil E, Wells DG and Mooseker MS (2005) A role for myosin VI in postsynaptic structure and glutamate receptor endocytosis. *J Cell Biol*, 168 : 329–338.
- 17) Penzes P, Cahill ME, Jones KA, et al (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 14 : 285–293.
- 18) Ryu J, Liu L, Wong TP, et al (2006) A critical role for myosin IIB in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron*, 49 : 175–182.
- 19) Stone JL, Merriman B, Cantor RM, et al (2007) High density SNP association study of a major autism linkage region on chromosome 17. *Hum Mol Genet*, 16 : 704–715.
- 20) Takei Y, Kikkawa YS, Atapour N, et al (2015) Defects in synaptic plasticity, reduced NMDA-Receptor transport, and instability of postsynaptic density proteins in mice lacking microtubule-associated protein 1A. *J Neurosci*, 35 : 15539–15554.
- 21) Wagner W, Brenowitz SD and Hammer JA (2011) Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat Cell Biol*, 13 : 40–48.
- 22) Wang K, Zhang, H, Ma D, et al (2009) Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*, 459 : 528–533.
- 23) Wang Z, Edwards JG, Riley N, et al (2008) Myosin Vb Mobilizes Recycling Endosomes and AMPA Receptors for Postsynaptic Plasticity. *Cell*, 135 : 535–548.

■ ABSTRACT

Localization Mechanism of Myosin Id, an ASD Risk Gene Product in Dendritic Spines

Tetsuya Sasaki, Yosuke Takei

Department of Anatomy and Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

Dendritic spines, the postsynaptic compartments at excitatory synapses, are capable of changing their shape and size to modulate synaptic transmission. The actin cytoskeleton and a variety of actin-binding proteins play a critical role in the dynamics of dendritic spines. Abnormalities of spine dynamics are implicated in several psychiatric disorders. Class I myosins are monomeric motor proteins that move along actin filaments using the energy of ATP hydrolysis. Of these class I myosins, myosin Id has been reported to be expressed in neurons, whereas its subcellular localization in neurons remained unknown. The linkage analysis suggests that myosin Id is a potential risk gene for autism spectrum disorder (ASD). Here, we investigated the subcellular localization of myosin Id and determined the domain responsible for it. We found that myosin Id is enriched in the dendritic spines of primary hippocampal neurons. The mutant form lacking the TH1 domain is less distributed in dendritic spines than is the full-length form. Taken together, our findings reveal that myosin Id localizes in dendritic spines through the TH1 domain. These results provide the first clues to understand the role of this molecule in the development and pathophysiology of ASD.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 31 (2) : 93-97, 2020)
