

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18300109

研究課題名（和文） シナプス伝達強化を担う神経終末蛋白質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of presynaptic proteins involved in facilitation of synaptic transmission

研究代表者

持田 澄子（MOCHIDA SUMIKO）

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30096341

研究成果の概要：

神経回路可塑性の機能解析、とくにシナプス伝達強化のメカニズムを蛋白分子レベルから解明することを目指し、培養下で交感神経細胞間に形成させたモデルシナプスに、遺伝子や変異遺伝子を導入して外因性蛋白質を強制発現させたり、siRNA を導入して（RNAi 法）内因性蛋白発現を抑制し、シナプス小胞の動態を制御して神経伝達物質の放出を短期間、または持続的に増強するシナプス前終末蛋白質群の働きを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2007 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス・シナプス小胞・神経伝達物質・開口放出

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路強化のシナプス前機能として、シナプス構造変化を伴わない蛋白分子レベルでの強力なシナプス伝達強化メカニズムが働くことを示唆する結果を研究開始以前に得ていた。神経終末のシナプス小胞は、docking, priming, fusion, endocytosis, reserve など様々なステージにあり、それぞれのステージ

には様々な蛋白質複合体が関与する。それぞれの複合体の鍵蛋白と考えられる蛋白は磷酸化酵素の標的となることが示されており、磷酸化された蛋白質群によって神経伝達物質の放出が増強されると推測された。そこで、培養交感神経節細胞間に形成されたひとつのシナプスのシナプス前神経細胞に、遺伝子操作や外因性蛋白質導入によって機能蛋白

質を制御し、(1)シナプス小胞ステージの蛋白燐酸化酵素による調節機構、(2)Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇に依存するCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン結合蛋白のdocking, priming, vesicle transportへの関与やそのモジュレーション機構の究明を目指した。

## 2. 研究の目的

神経回路可塑性の機能解析、とくにシナプス伝達強化のメカニズムを蛋白分子レベルから解明することを目指し、培養下で形成された脳モデルシナプスを用いて、シナプス小胞の動態を制御して神経伝達物質の放出を短期間、または持続的に増強する蛋白質群の働きを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

脳モデルシナプスを用いて、シナプス小胞動態制御してシナプス伝達効率を上昇させる可能性のある蛋白群の機能解析を試みた。

(1)単離した生後7日のラット上頸交感神経節を酵素処理し、長期(6-8週間)培養下でコリン作動性シナプスを形成させた。

(2)機能ドメインの合成ペプチド・リコンビナント蛋白をシナプス前細胞に導入し、その効果をシナプス後細胞で記録されるシナプス応答の変化として捉えて、シナプス伝達効率の変化を電気生理学的手法で確認した。

(3)機能蛋白のDNA、ミュ-タントDNAをシナプス前細胞に導入して強制発現させ、さらにRNAi法を用いて上記蛋白をノックダウンしたときのシナプス伝達効率の変化を電気生理学的手法で確認した。

## 4. 研究成果

シナプス伝達効率を上昇させる可能性のあるシナプス前終末蛋白群および軸索輸送関連蛋白の機能解析を試みたところ、下記に示すことが明らかになった。

(1)active zoneに発現するSAD-1燐酸化酵素はactive zone cytomatrix蛋白のRIMと結合して、シナプス小胞priming過程を増強する(発表論文)。

(2)コリン作動性神経終末のアセチルコリンを含有するシナプス小胞に特異的に発現するTRPM7チャンネルは、シナプス小胞蛋白のスナピンと結合してシナプシン1・シナプタグミンと複合体を形成し、TRPM7チャンネルの開口がシナプス小胞内のアセチルコリンをシナプス間隙へ放出することを駆動する(発表論文)。

(3)NADからサイクリックADPリボースを合成する酵素活性をもつCD38を欠損するマウスでは養育行動異常を示すが、その原因はオキシトシンの分泌が阻害されることによる。また、単離した視床下部分泌神経細胞や下垂体後葉神経終末部を用いた実験で、cADPR依存性に細胞内カルシウムストアからCa<sup>2+</sup>が放出され、これをトリガーとしてオキシトシンが放出される(発表論文)。

(4)P/Q型Ca<sup>2+</sup>チャンネルに結合するCa<sup>2+</sup>結合蛋白であるカルモジュリンは、神経終末内に流入したCa<sup>2+</sup>を感知して、継時的に変化するCa<sup>2+</sup>濃度に依存してP/Q型Ca<sup>2+</sup>チャンネル活性を抑制的・促進的に調節し、短期シナプス前可塑性として知られるPPD/PPF、Augmentationの成因に寄与する(発表論文)。

(5)シナプス小胞膜と神経終末膜の融合装置として機能するSNARE蛋白質のt-SNAREとカルボキシル基末端部位で相互作用してシナプス開口放出を制御することが確認されているトモシンは、そのアミノ基末端部位がSNARE複合体の重合を調節して、開口放出を促進する(発表論文)。さらに、カルボキシル基末端部位に隣接する部位(tail domain)がカルボキシル基末端部位に結合してSNARE複合体の形成を

制御して、開口放出を調節する（発表論文）

(6)シナプス小胞エンドサイトーシスに関わるダイナミンは、高頻度の神経活動に依存してクラスリンコートされたシナプス小胞エンドサイトーシスと神経活動に依存せずクラスリンコートされないシナプス小胞エンドサイトーシスに関わっていて、神経伝達物質放出量を維持している（発表論文）

(7)微小管モーター蛋白分子 KIF5B のアダプター蛋白質であるシンタブリンは、シナプス伝達を担う重要な蛋白を軸索輸送するばかりでなく、シナプス前終末でシナプス伝達の強化発現に重要な機能を担うミトコンドリアをも神経終末に運搬する非常に重要な蛋白質である（学会一般発表）

(8)シナプス小胞への神経伝達物質充填に必須であるシナプス小胞の  $H^+$  ポンプは、SNAP-25(v-SNARE) 蛋白質と結合して、SNARE 蛋白質複合体の形成を調節する（論文投稿中）

(9)代謝型グルタミン酸受容体は、静止時にはシナプス小胞 priming に関わる Munc18 蛋白質を結合しているが、わずかな細胞質  $Ca^{2+}$  濃度増加で Munc18 をカルモジュリンと置換して、シナプス伝達効率の上昇を担う短期シナプス前可塑性の成因に寄与している（論文投稿中）

#### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Inoue, E, Mochida, S., Takagi, H., Deguchi-Tawarada, M., Takao-Rikitsu, E., Inoue, M., Yao, I., Setou, M., Ohtsuka, T. & Takai, Y. SAD: a presynaptic kinase associated with synaptic vesicles and the active zone cytomatrix that regulates neurotransmitter release. **Neuron** **50**, 261-275, 2006. (査読

有)

Krapivinsky, G, Mochida, S., Krapivinsky, L., Cibulsky, S.M. & Clapham, D.E. TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. **Neuron** **52**, 485-496, 2006. (査読有)

Dou Jin, D., Liu, H-X., Hirai, H., Torashima, T., Nagai, T., Lopatina, O., Schayder, N., Yamada, K., Noda, M., Seike, T., Fujita, K., Takasawa, S., Yokoyama, S., Koizumi, K., Shiraishi, M., Tanaka, S., Hashii, M., Yoshihara, T., Higashida, K., Islam, M., Yamada, N., Hayashi, K., Noguchi, N., Kato, I., Okamoto, H., Matsushima, A., Salmina, A., Munesue, T., Shimizu, N., Mochida, S., Asano, M. & Higashida, H. CD38 is critical for social behavior by regulating oxytocin secretion. **Nature** **446**, 41-45, 2007. (査読有)

Ma, H. & Mochida, S. A cholinergic model synapse to elucidate protein function at presynaptic terminals. **Neurosci. Res.** **57**, 491-498, 2007. (査読有)

Mochida, S., Few, A.P., Scheuer, T. & Catterall, W. Regulation of presynaptic  $Ca_v2.1$  channels by  $Ca^{2+}$  sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. **Neuron** **57**, 210-216, 2008. (査読有)

Sakisaka, T., Yamamoto, Y., Mochida, S., Nakamura, M., Nishikawa, K., Ishizaki, H., Okamoto-Tanaka, M., Miyoshi, J., Fujiyoshi, Y., Manabe, T. & Takai, Y. Dual inhibition of SNARE complex formation by tomosyn ensures controlled neurotransmitter release. **J Cell Biol.** **183(2)**, 323-37, 2008. (査読有)

Lu W., Ma, H., Sheng Z.-H. & Mochida, S. Dynamin and activity regulate synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. **J Biol Chem.** **284**, 1930-1937, 2009. (査読有)

Yamamoto, Y., Mochida, S., Kurooka, T. & Sakisaka, T. Reciprocal intramolecular interactions of tomosyn control inhibition of the SNARE complex formation. **J Biol Chem.** **284(18)**, 12480-90, 2009. (査読有)

持田澄子、シナプス小胞 TRPM7 チャネル、蛋白核酸酵素 53 (4), 442-447, 2008. (査読有)

持田澄子、神経伝達物質の放出機構、日本生理学雑誌 70, 77-88, 2008(査読無)

[学会発表](計 17 件)

招待講演

Mochida, S. Molecular mechanisms of presynaptic structure and function. Neuroscience 2006 in Kyoto JAPAN Symposia, The latest in presynaptic research: New molecules and physiological functions. (Organizer) 平成 17 年 7 月 21 日 京都

Sakisaka, T. Baba, T., Mochida, S., & Takai, Y. Regulation of SNAREs by tomosyn and its implication in  $Ca^{2+}$ -dependent neurotransmitter release. Neuroscience 2006 in Kyoto JAPAN Symposia, The latest in presynaptic research: New molecules and physiological functions. 平成 17 年 7 月 21 日 京都

Mochida, S. Neuro2007 Symposia, Signal integration at synapses. (Organizer) 平成 18 年 9 月 11 日 横浜

Catterall, W.A. Few A., Lautermilch, N., Scheuer, N. & Mochida, S. Calcium channels and synaptic plasticity. Neuro2007 Symposia, Signal integration at synapses. 平成 18 年 9 月 11 日 横浜

Mochida, S., Krapivinsky, G. & Clapham, D.E. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicle exocytosis. IBRO2007 Satellite Conference, Secretary

Vesicle Cycle and Novel Approaches. 平成 18 年 7 月 10 日 Brisbane, Australia

Mochida, S.  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of P/Q type  $Ca^{2+}$  channel activity: facilitation/depression and calmodulin. 第 84 回日本生理学会大会 IUPS symposium:  $Ca^{2+}$ -dependent regulation of voltage-gated  $Ca^{2+}$  channels. 平成 18 年 3 月 21 日 大阪

Mochida, S. Regulation of presynaptic  $Ca_v2.1$  channels by  $Ca^{2+}$  sensor proteins mediates short-term synaptic plasticity. International Symposium on Innovative Brain Science for Development, Learning, Memory and Autism. 平成 19 年 7 月 17 日 金沢

一般発表

Mochida, S., Baba, T., Sakisaka, T. & Takai, Y. Tomosyn phosphorylation by Protein kinase A and its implication in neurotransmitter release Gordon Research Conference. Cell Biology of the Neuron. 平成 17 年 6 月 21 日 New London, USA

Mochida, S., Sakisaka, T. & Takai, Y. Regulation of neurotransmitter release by PKA-phosphorylation of Tomosyn. Neuro 2006 平成 17 年 7 月 21 日 京都

Ma, H., Lu, W., Itoh, K. & Mochida, S. Syntabulin, vesicle cargo-protein interacting with kinesin-1, maintains synaptic transmission. 第 84 回日本生理学会 平成 18 年 3 月 21 日大阪

Lu, W. & Mochida, S. Endocytic pathways in the long-cultured sympathetic neuron. 第 85 回日本生理学会 平成 19 年 3 月 26 日 東京

Ma, H. & Mochida, S. Syntabulin, a vesicle cargo-protein, interacting with kinesin-1 maintains synaptic transmission. 第 85 回日本生理学会 平成 19 年 3 月 26 日 東京

Mochida, S., Few, AP., Scheuer, T. &

Catterall, WA. Presynaptic Cav2.1 channel activity mediates short-term plasticity. 第85回日本生理学会 平成 19 年 3 月 26 日 東京  
Mochida, S., Few, A.P., Scheuer, T. & Catterall, W. Regulation of Presynaptic Cav2.1 channels by Ca<sup>2+</sup> Sensor Proteins Mediates Short-term Synaptic Plasticity. 38<sup>th</sup> Annual meeting of the Soc. for Neuroscienc. 平成 19 年 11 月 5 日 San Diego, USA

Mochida, S., Few, A.P., Scheuer, T. & Catterall, W. Regulation of Presynaptic Cav2.1 channels by Ca<sup>2+</sup> Sensor Proteins Mediates Short-term Synaptic Plasticity. Gordon Research Conference. Cell Biology of the Neuron. 平成 20 年 6 月 16 日 New London, USA

Ma, H. & Mochida, S. Translocation of mitochondria to presynaptic terminals by syntaxin is required for synaptic transmission. Neuro 2008, 平成 20 年 7 月 9 日 東京

Lu, W., Ma, H. Sheng, ZH & Mochida, S. Activity-dependent and -independent synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons. 39<sup>th</sup> Annual meeting of the Soc. for Neuroscienc. 平成 20 年 11 月 16 日 Washington, DC, USA

〔図書〕(計 1 件)

持田澄子他、翻訳ニューロンの生理学、原著：D. Tritsch (編) 京都大学学術出版会、759ページ (翻訳分担:1章, 17章, 19章)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

持田澄子 (SUMIKO MOCHIDA)  
東京医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30096341

