

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06473

研究課題名(和文) 神経細胞の軸索終末においてエンドソームに由来する小胞の役割

研究課題名(英文) The endosomal Q-SNARE, Syntaxin 7, defines a rapidly replenishing synaptic vesicle recycling pool in hippocampal neurons

研究代表者

森 靖典 (Yasunori, Mori)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：80443042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞の軸索終末すなわちシナプス前終末において、形質膜から生じるシナプス小胞以外に、エンドソームからもシナプス小胞が生じることが明らかになっているが、異なる経路より生じたシナプス小胞の性質の違いについては明確な結論が出ていない。本研究ではエンドソーム由来のシナプス小胞の性質を明らかにするために、幾つかのエンドソームSNAREタンパク質を蛍光標識して、それらのシナプス前終末でのリサイクリング特性を蛍光イメージングにより解析した。その結果、海馬培養神経細胞においてSyntaxin-7を含む一部のシナプス小胞は、カルシウムおよびアクチン重合に依存した補充メカニズムであることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、これまでの研究では明らかにできなかったシナプス小胞プールを細分化する分子基盤を提唱し、シナプス前終末における神経伝達物質の多様な開口放出機構を明らかにすることができた。また、本研究により明らかになったシナプス小胞プールの違いを支える分子基盤は、一般的な小胞膜輸送に関わる基礎的な知見にも貢献することができた。本研究で得られた基礎的な知見は、シナプス伝達の異常が原因となる神経疾患に対する新しい治療戦略への波及が期待される。

研究成果の概要(英文)： Replenishment of readily releasable synaptic vesicles (SVs) with vesicles in the recycling pool is important for sustained transmitter release during repetitive stimulation. However, whether all SVs in the recycling pool are recruited for release with equal probability and speed is unknown. Here, using comprehensive optical imaging of various presynaptic endosomal SNARE proteins in cultured hippocampal neurons, we demonstrate that part of the recycling pool bearing the endosomal Q-SNARE, syntaxin 7 (Stx7), is preferentially mobilized for release during high-frequency repetitive stimulation. Recruitment of the SV pool marked with an Stx7-reporter requires actin polymerization, as well as activation of the Ca²⁺/calmodulin signaling pathway. Our data indicate that endosomal membrane fusion involving Stx7 forms rapidly replenishing vesicles essential for synaptic responses to high-frequency repetitive stimulation.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経 シナプス シナプス小胞 小胞輸送 ライブイメージング SNARE カルシウム アクチン

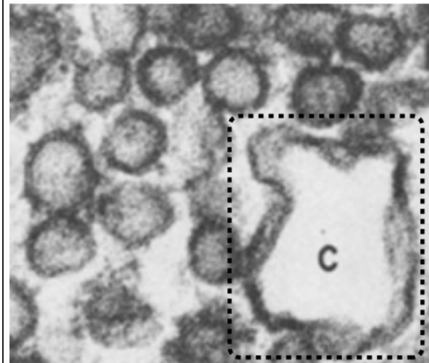
1. 研究開始当初の背景

神経伝達物質の放出は、神経伝達物質が貯蔵されているシナプス小胞と形質膜の膜融合（エキソサイトーシス）によって行われる。その後、シナプス小胞膜の構成成分はエンドサイトーシスによってシナプス前終末に取り込まれ、新たに作られたシナプス小胞が次のエキソサイトーシスに備える。これら一連の過程をリサイクリングと呼ぶ。シナプス前終末においてエンドソームと推定される小胞は 1970 年代に電子顕微鏡での観察から発見されている (Heuser and Reese, *J. Cell. Biol.*, 1973) (図 1)。このことから、シナプス小胞のリサイクリングにはクラスリンに依存して形質膜からシナプス小胞が産生される経路以外にも、形質膜からクラスリン非依存的に生じるエンドソームを仲介した経路が存在するのではないかと考えられてきた。ただし、エンドソームを仲介した経路から生じたシナプス小胞と形質膜から生じたシナプス小胞との動態の違いについては未だ十分に理解されていない (図 2)。

シナプス前終末におけるシナプス小胞の集団 (シナプス小胞群) が “機能的な分類” すなわちシナプス小胞プールに区分されることは、1950-60 年代の電気生理学的な知見と電子顕微鏡による観察の結果による。さらに 1990 年代の後半以降から新たに開発された両親媒性の化合物である FM 色素および pH 感受型 GFP を用いたシナプス小胞を可視化する技術が加わり、シナプス小胞プールの分類に関して詳細な知見が得られるようになった。シナプス小胞は活動電位に迅速に応答して伝達物質を放出する即時放出可能プール (RRP; Readily Releasable pool)、RRP が枯渇した後に放出されるリサイクリングプール (Recycling pool)、通常の刺激ではほとんど放出に関与しない静止プール (Reserved pool もしくは Resting pool) の 3 つの機能的なプールに分類されることが示されている (Alabi and Tsien, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2012)。

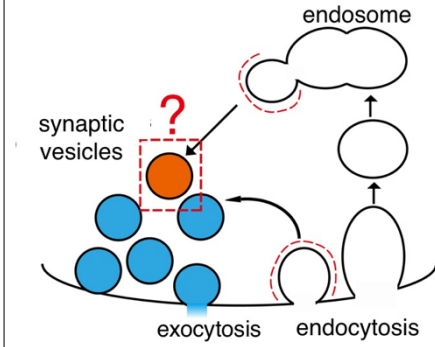
小胞プールの違いを支える分子基盤候補の一つに、膜融合関連タンパク質である SNARE タンパク質ファミリーが挙げられる。細胞内の膜融合過程においては小胞膜側とターゲット膜側にそれぞれ適した SNARE タンパク質が存在し、それらが複合体を形成することで膜融合を引き起こす。実際に、神経伝達物質の放出の際には小胞膜側の Synaptobrevin/VAMP-2 および形質膜側の Syntaxin-1 と SNAP-25 が複合体 (neuronal SNARE 複合体) を形成することでシナプス小胞と形質膜の融合が起こる。一方で上記の 3 つの SNARE タンパク質以外の SNARE タンパク質 (Syntaxin-6, Syntaxin-7, Syntaxin-8, Syntaxin-12/13, Syntaxin-16 など) も、近年行われたシナプス

図 1



プレシナプスの電子顕微鏡像。シナプス小胞以外にエンドソーム様の構造体が観察されている。

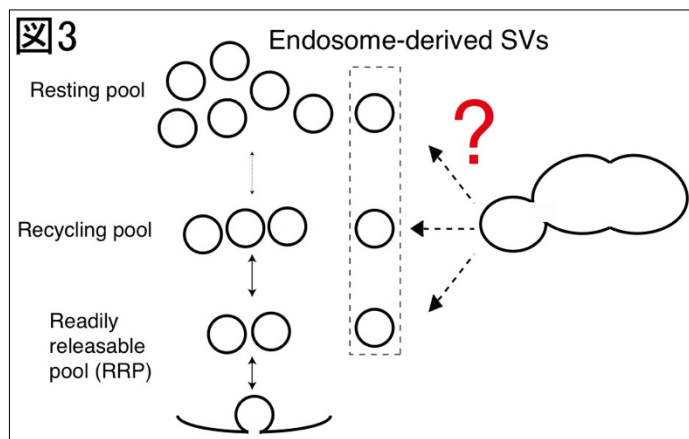
図 2



小胞のプロテオーム解析によってシナプス小胞に存在していることが明らかになった (Takamori *et al*, *Cell*, 2006)。これらの SNARE タンパク質は非神経細胞においてエンドソーム SNARE 複合体の形成によりエンドソーム同士の融合に関わっていることが報告されている (Antonin *et al*, *EMBO J*, 2000; Zwillig *et al*, *EMBO J*, 2007)。最近になっていくつかのエンドソーム SNARE タンパク質 (VAMP-7, VAMP-4, vti1a, Syntaxin-12/13 など) は活動電位に依存しない自発的な放出を引き起こす小胞プールや非同期性の小胞プールへの存在 (Hua *et al*, *Neuron*, 2011; Ramirez *et al*, *Neuron*, 2012)、および即時放出可能プールへの影響が報告されており (Hoopmann *et al*, *PNAS*, 2010)、エンドソーム SNARE タンパク質がシナプス前終末での一部の機能に関与することが明らかになっている。

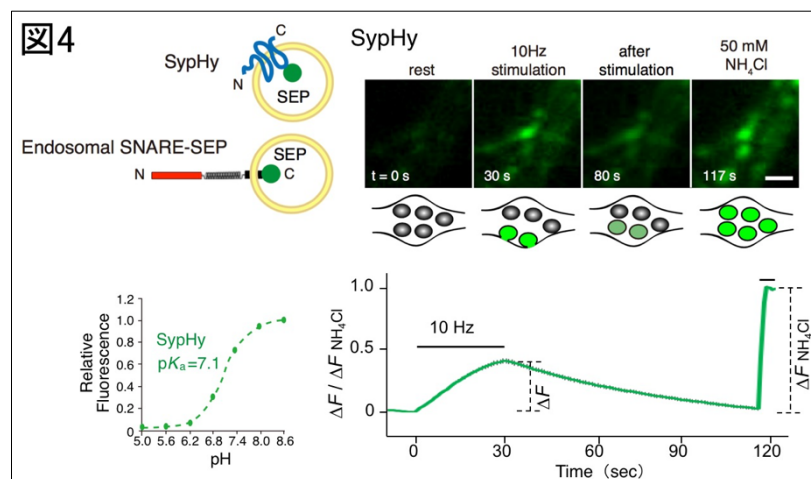
2. 研究の目的

本研究では、エンドソーム SNARE タンパク質ファミリーに注目してエンドソーム由来のシナプス小胞の動態、神経伝達物質の放出への寄与およびシナプス前終末内での分布を調べることで、シナプス前終末におけるエンドソームの生理機能の一端を明らかにすることを目的とする (図 3)。



3. 研究の方法

本研究では、ライブイメージによりシナプス前終末におけるエンドソーム SNARE タンパク質を含むシナプス小胞の動態を観察するために SEP (super ecliptic pHluorin) と呼ばれる酸解離定数 (pKa) が 7.1 の pH 感受性 GFP タンパク質を用いた (図 4 左)。



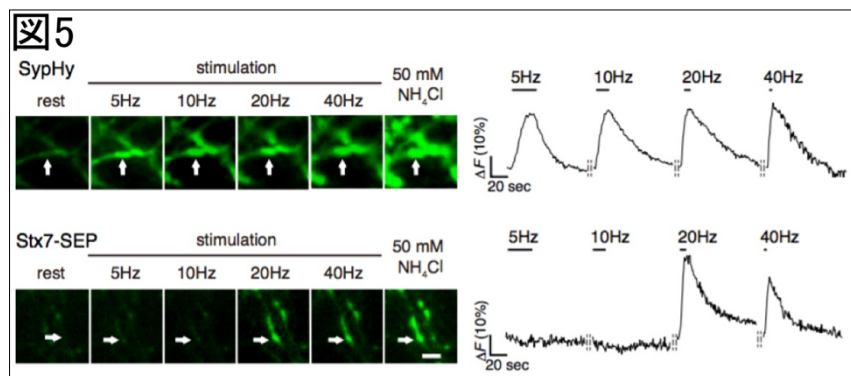
シナプス小胞に局在する膜タンパク質の小胞内領域に SEP を融合させたタンパク質、例えば Synaptophysin-pHluorin (SypHy) を発現させると小胞内 pH が約 5.6 のため静止状態ではわずかしき蛍光が検出されない。この時にシナプス小胞のエキソサイトーシスが起こると、小胞膜と形質膜が融合することにより SEP は細胞外領域 (pH 7.4) に移行するので蛍光量が増加する (ΔF)。その後エンドサイトーシスにより細胞外から小胞内へと SEP が回収されると、小胞

の再酸性化によって徐々に蛍光量は減少して最終的には元の状態へと戻る。ここでアンモニア溶液を細胞外から加えると全てのシナプス小胞内領域がアルカリ化されて小胞内 pH は 7.4 に変化するので (ΔFNH_4Cl)、小胞内に存在する SEP の蛍光を検出することができる。アンモニア溶液を添加させた時の蛍光量によって補正することで ($\Delta F / \Delta FNH_4Cl$)、シナプス前終末に存在する小胞の中で活動刺激に依存して応答した小胞の割合を算出することができる (図 4 右)。

4. 研究成果

本研究では、過去のプロテオーム解析によりシナプス小胞分画で検出されたエンドソーム SNARE タンパク質である Syntaxin-6, -7, -8, -12/13, -16、および以前の報告で自発性の放出への関与が報告されている vti1a および VAMP-7 の小胞内領域に SEP を融合させて、シナプス前終末においてこれらのエンドソーム SNARE を含む小胞の動態の観察を試みた。その結果、海馬由来の培養神経細胞において全てのエンドソーム SNARE-SEP は電気刺激に対する応答が観察された。その中で Syntaxin-7 を含む小胞は刺激頻度が 5Hz および 10Hz での応答ピークは SypHy に比べて少ないが (10%以下)、刺激頻度が 20Hz および 40Hz での応答は SypHy と同程度 (40-50%) と特徴的な応答を示した (図 5)。また、Synaptobrevin を切断するテタヌス毒素を用いて Syntaxin-7 の活動電位刺激に対する応答を検討したところ、通常のシナプス小胞タンパク質である SypHy や VGLUT1-SEP と同様に Syntaxin-7-

SEP の電気刺激による応答は消失することが確認されたが、他のエンドソーム SNARE-SEP は部分的に応答が検出された。従って、シナプス前終末におい



て Syntaxin-7-SEP は他のエンドソーム SNARE-SEP よりも高い割合でシナプス小胞に存在しており、かつ Syntaxin-7-SEP は性質の異なるシナプス小胞に存在する可能性が示された。

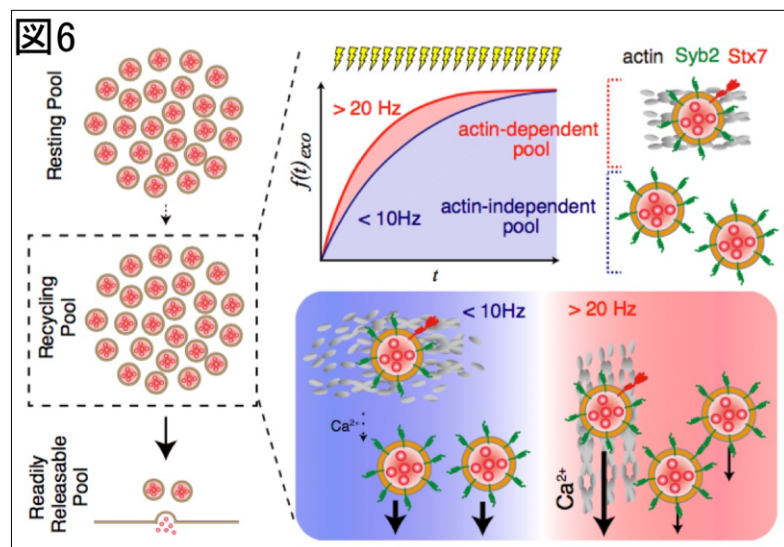
そこで Syntaxin-7 を含む小胞の性質についてさらに詳細に調べるために、細胞染色によりシナプス前終末における Syntaxin-7 の局在について詳細に検討した。その結果、Syntaxin-7 は Synaptophysin と部分的に共局在が認められたが、一方でアクティブゾーンのマーカーである Bassoon とは共局在が認められなかった。従って、Syntaxin-7 はシナプス前終末においてアクティブゾーンから離れた位置に存在する可能性が示唆されたので、Syntaxin-7 を含む小胞のアクティブゾーンからの距離について定量的に測定するために電子顕微鏡を用いて解析を行った。その結果、Syntaxin-7-SEP は SypHy に比べて有意にアクティブゾーンから遠い位置に存在していることが明らかになった。さらに、ラット脳から精製したシナプス小胞画分を材料として定量的なイムノブロットによりシナプス小胞膜に存在する Syntaxin-7 の 1 小胞あたりの平均モル数、すなわちコピー数を算出した。その結果、1 つのシナプス小胞あたり Syntaxin-7 は約 0.14 と算出された。この結果は Syntaxin-7 が小胞に 1 コピー存在すると仮定すると、全てのシナプス小胞群の中でお

よそ10-15%程度のシナプス小胞がSyntaxin-7を含んでいると予想される。以上の結果から、シナプス前終末においてSyntaxin-7はアクティブゾーンから離れた位置に存在している一部のシナプス小胞に局在していることが示された。

Syntaxin-7 が 20Hz 以上の高頻度刺激に応答する理由として、高頻度刺激により一過的に上昇したカルシウム濃度が関係する可能性が考えられる。そこで、細胞外カルシウム濃度を 2 mM から 8 mM に変えたところ、10Hz の刺激においても Syntaxin-7 に顕著な応答が認められた。過去にカリックスシナプスにおいて、カルシウムセンサータンパク質の一つであるカルモデュリンを阻害すると早い成分のシナプス小胞の補充に遅れが生じることが報告されていることから (Sakaba and Neher, *Neuron*, 2001)、カルモデュリンの役割について検討を行った。カルモデュリンを阻害するペプチド (CIP; calmodulin inhibitory peptide) を細胞内に発現させて SypHy および Syntaxin-7-SEP の応答について検討した結果、SypHy および Syntaxin-7-SEP は 20Hz の刺激において CIP を発現した場合には刺激中の上昇速度に遅れが生じていることが明らかになった。さらに Syntaxin-7 を含むシナプス小胞の補充メカニズムについて詳細に検討するために、これまでカリックスシナプスにおいてシナプス小胞の補充への関与が明らかになっているアクチン重合との関係について検討した (Sakaba and Neher, *J. Neurosci*, 2003)。その結果、アクチン重合阻害剤であるラトランキュリン A (Lat-A) を作用させると SypHy および Syntaxin-7-SEP は 40Hz での応答が減少していることや、SypHy において 10Hz での刺激では Lat-A を加えても応答に顕著な差は確認されなかったが 20Hz の高頻度刺激では Lat-A を加えると刺激中の上昇速度が遅くなることが明らかになった。さらにシナプス小胞のリサイクリングにおける Syntaxin-7 の役割を明らかにするために Syntaxin-7 の N 末端領域を神経細胞内で発現させて内在性 Syntaxin-7 の機能を阻害して SypHy の応答を検討したところ、高頻度刺激の条件ではアクチン重合化を阻害した時と同様にシナプス小胞の補充に遅れが生じていることが明らかになった。これらの結果から、海馬ニューロンにおいて高頻度刺激ではカルシウムおよびアクチン重合に依存して Syntaxin-7 を含む一部のシナプス小胞が優先して補充されることが示された。

以上本研究から、海馬由来の培養神経細胞において Syntaxin-7 を含む一部のシナプス小胞は活動刺激に依存して応答する小胞プール、すなわちリサイクリングプールに存在していることが

示された。従ってリサイクリングプールを規定しているシナプス小胞群は単一ではなくエンドソームより由来している異なる分子組成を持ったシナプス小胞が存在しており、これらのシナプス小胞はカルシウムおよびアクチン重合に依存した補充メカニズムであることが考えられる (図 6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Taoufiq Zacharie, Ninov Momchil, Villar-Briones Alejandro, Wang Han-Ying, Sasaki Toshio, Roy Michael C., Beauchain Francois, Mori Yasunori, Yoshida Tomofumi, Takamori Shigeo, Jahn Reinhard, Takahashi Tomoyuki	4. 巻 117
2. 論文標題 Hidden proteome of synaptic vesicles in the mammalian brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 33586 ~ 33596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2011870117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yasunori, Takenaka Koichiro, Fukazawa Yugo, Takamori Shigeo	4. 巻 2020.08.13.249672v1
2. 論文標題 Q-SNARE Syntaxin 7 confers actin-dependent rapidly replenishing synaptic vesicles upon high activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.08.13.249672	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono Yoshiyasu, Mori Yasunori, Egashira Yoshihiro, Sumiyama Kenta, Takamori Shigeo	4. 巻 9
2. 論文標題 Expression of plasma membrane calcium ATPases confers Ca ²⁺ /H ⁺ exchange in rodent synaptic vesicles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40557-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Egashira Yoshihiro, Mori Yasunori, Yanagawa Yuchio, Takamori Shigeo	4. 巻 8
2. 論文標題 Development of lentiviral vectors for efficient glutamatergic-selective gene expression in cultured hippocampal neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33509-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Yasunori, Takamori Shigeo	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular Signatures Underlying Synaptic Vesicle Cargo Retrieval	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2017.00422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 森靖典, 竹中康一郎, 深澤有吾, 高森茂雄
2. 発表標題 神経終末におけるSyntaxin 7を含むシナプス小胞の機能解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Q-SNARE Syntaxin 7 defines a reluctant recycling pool of synaptic vesicles in hippocampal neurons
2. 発表標題 森靖典, 竹中康一郎, 深澤有吾, 高森茂雄
3. 学会等名 生理学研究所シナプス研究会「マイクロからマクロに至る脳の構造と機能のダイナミクス」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mori Y, Fukazawa Y, Takamori S.
2. 発表標題 Endosomal Q-SNARE Syntaxin-7 specifies a subpopulation of recycling synaptic vesicles preferentially responsive to high frequency stimulation.
3. 学会等名 Joint annual meeting of 51st JSDB and 70th JSCB. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mori Y, Takenaka K, Fukazawa Y, Takamori S.
2. 発表標題 Endosomal Q-SNARE Syntaxin-7 specifies a subpopulation of recycling synaptic vesicles preferentially responsive to high frequency stimulation.
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Symposium “ Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy ” (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://brainscience.doshisha.ac.jp/ https://takamori lab.wixsite.com/takamori-lab https://researchmap.jp/mori1221

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高森 茂雄 (Takamori Shigeo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------