

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06901

研究課題名(和文)オルガネラによるプレシナプス機能制御ーシナプス小胞サイクルにおける小胞体の役割

研究課題名(英文)Role of organelles in regulating presynaptic function

研究代表者

小林 静香 (Kobayashi, Shizuka)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：50705879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでその機能がほとんど解明されていなかったシナプス前終末に存在する小胞体が、神経伝達およびシナプス前性の短期可塑性調節にどのような役割を果たしているかを明らかにする目的で、小胞体の機能制御に関与する分子をシナプス前終末特異的に欠損させた遺伝子改変マウスを作製し、電気生理学的手法によりシナプスの機能解析を行った。その結果、分子Aのシナプス前終末特異的欠損マウスにおいて、シナプス前性テタヌス刺激後短期増強ならびに低頻度頻回刺激応答の異常を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因として小胞体におけるカルシウム調節の異常や脂質代謝の異常が相次いで指摘されているが、シナプス前終末における小胞体の生理的、機能的意義については不明な点が多いのが現状であった。本研究の成果により、シナプス前終末における小胞体の機能異常が神経伝達やシナプス可塑性に影響を及ぼすことが明らかになったことで、認知・記憶障害をはじめとする神経疾患の新たな発症機序の発見につながるという意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to elucidate the functional roles of presynaptic endoplasmic reticulum (ER) on neurotransmission and presynaptic short-term plasticity. We generated presynaptic site-specific ER-resident regulatory proteins (Molecule A and B)-deficient mice and examined whether presynaptic ER influenced the release properties and short-term synaptic plasticity. In the electrophysiological analysis with hippocampal slices, presynaptic short-term plasticity was significantly changed in presynaptic site-specific Molecule A-deficient mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス可塑性 短期可塑性 海馬 細胞内小器官 シナプス小胞 神経伝達物質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

小胞体は細胞内に広く分布するオルガネラで、タンパク質や脂質合成・代謝、細胞内カルシウム貯蔵など幅広い局面において重要な役割を果たしていることが示唆されている。近年、神経細胞において、細胞体や軸索のみならずシナプス前終末内のシナプス小胞近傍にも小胞体の分枝細管が存在し、さらにはシナプス前終末内においてエンドソームをはじめとする他の膜構造ともネットワークを形成するなど、従来の想定を超える分布形態を示すことが報告されているが、こうしたシナプス前終末に局在する小胞体が、プレシナプス機能においてどのような役割を果たしているかは不明な点が多い。また、細胞内カルシウム動態調節をはじめとする小胞体機能の破綻と神経の機能異常および疾患との関連性もしばしば取り上げられており、特に近年、アルツハイマー病やパーキンソン病の原因として小胞体カルシウム調節の異常や脂質代謝の異常が相次いで指摘されている。しかしその研究の大半は神経細胞の細胞体周辺や軸索に存在する小胞体の機能に着目したものであり、シナプス前終末のシナプス小胞サイクルにおける小胞体の生理的、機能的意義について検討する研究は少ないのが現状である。いわゆるコンベンショナルノックアウトマウスを用いた解析と異なり、本研究では小胞体機能制御分子である分子 A および分子 B をシナプス前終末特異的に欠損させることで、これらの分子がプレシナプスの機能にどのような影響を及ぼしているかを選択的に解析することを可能にしている点で類似の他の研究とは大きく異なり、認知・記憶障害をはじめとする神経疾患の新たな発症機序の発見につながることを期待される。また、シナプス小胞は、脂質膜構造からなる、細胞内の独立したコンパートメントであり、細胞内に存在するエンドソームやリソソームなどの他の細胞内小器官とも共通の性質を有しているため、シナプス小胞サイクル制御で明らかになった知見は、その他の細胞内小器官の制御機構にも共通する可能性があり、細胞生物学の分野において、より広範で普遍的な動作原理の発見につながる可能性がある。

2. 研究の目的

近年、3次元形態観察技術の著しい進展により、シナプス前終末内のシナプス小胞近傍に小胞体の分枝細管が局在し、さらにはシナプス前終末内においてエンドソームをはじめとする他の膜構造ともネットワークを形成するなど、これまでに報告されていた細胞体や軸索内にとどまらない分布形態を示すことが新たに報告されているが、その機能的役割は不明な点が多い。そこで本研究では、シナプス前終末内に局在する小胞体はプレシナプス機能をどのように制御するか？を明らかにすることを目的とし研究を進める。

3. 研究の方法

正常な神経伝達物質放出やシナプス前性短期可塑性において、シナプス前終末の小胞体が果たしている機能的役割を明らかにするため、小胞体機能を制御する分子 A および B をシナプス前終末特異的に欠損させたマウスを作製し、その海馬スライス標本を対象とした電気生理実験を中心にシナプスの機能解析を行う。シナプス前終末特異的機能分子欠損マウスの作製にあたっては、分子 A および分子 B それぞれの flox マウスと、海馬 CA3 特異的 Cre 発現マウスとを掛け合わせて Cre-loxP システムにより得られた CA1 シナプス前終末特異的分子 A (および分子 B) 欠損マウスを使用する。

1) 組織学的・生化学的解析

抗分子 A (および B) 抗体を用いた免疫組織染色により、変異マウスにおいて CA3 領域特異的な分子 A (および B) 欠損を確認するとともに、ウエスタンブロッティング法により分子 A (および B) の細胞内局在パターンを確認する。また、synaptophysin、synapsin などといったシナプス関連分子の発現量や発現分布、リン酸化パターンの変化等もあわせて確認する。さらに、免疫沈降法を用いて分子 A および B との結合タンパクを同定することで、電気生理実験で得られた表現型の分子メカニズムを詳細に検討する。

2) 電気生理学的手法によるプレシナプス機能解析

コントロールおよびシナプス前終末特異的分子 A (および B) 欠損マウスから急性海馬スライスを作製し、シャッフアー側枝-CA1 シナプスを対象として、シナプス前終末における分子 A (および B) 欠損が神経伝達物質放出およびシナプス可塑性に及ぼす影響を明らかにする目的で、以下に列挙した項目 ~ を実施する。なお、これらの実験項目はシナプス前性の機能異常を電気生理学的に検討する際に標準的に用いられる項目を網羅している。二発刺激促進測定による、定常状態での神経伝達物質放出確率 (Pr) の評価。シナプス前性テタヌス刺激後短期増強 (post-tetanic potentiation: PTP) の測定による、活動依存的な神経伝達物質放出確率の変化ならびにシナプス前性の短期可塑性の検討。低頻度 (5Hz) 頻回刺激応答の評価による、シナプス小胞動態変化の検討。20Hz、200 発刺激による、シナプス小胞プールサイズ (= 放出により減少するシナプス小胞を随時補充するのに必要なシナプス小胞集団の大きさ) の変化およびシナプス小胞補充速度の変化の検討。微小シナプス後電流の測定による Pr ならびに量子サイズ変化の評価。

4. 研究成果

本研究では、これまでその機能がほとんど解明されていなかったシナプス前終末に存在する小胞体が、神経伝達物質放出およびシナプス前性の短期可塑性調節にどのような役割を果たしているかを明らかにすべく、小胞体の機能制御に関与する分子をシナプス前終末特異的に欠損させた遺伝子改変マウスを作製、解析することを試みた。まず令和元年度はシナプス前終末特異的な機能分子 A および B 欠損マウスの作製を行い、その作出に成功した。また併せて、機能分子 A、B 以外のシナプス関連分子の発現変化についても検討を行った。令和 2~3 年度は、シナプス前終末における小胞体の機能的役割をあきらかにするため、作出した遺伝子改変マウスを用いて電気生理学的手法によるシナプスの機能解析を行った。定法により作成した急性海馬スライス標本を用い、細胞外電位記録法ならびにホールセルパッチクランプ法を用いた解析の結果、分子 A 欠損マウスにおいて、シナプス前性テタヌス刺激後短期増強に変化が認められたことから、小胞体の機能異常により、活動依存的な神経伝達物質放出確率に変化がもたらされていることが強く示唆された。また、低頻度頻回刺激応答の異常も認められたことから、シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の変化も示唆された。一方、分子 B のシナプス前終末特異的欠損マウスシナプスでは、明らかな機能異常は検出できなかった。現在これらの成果を取りまとめ、近いうちに論文として発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Matsuura K, Kobayashi S, Konno K, Yamasaki M, Horiuchi T, Senda T, Hayashi T, Satoh K, Arima-Yoshida F, Iwasaki K, Negishi L, Yasui-Shimizu N, Kohu K, Kawahara S, Kirino Y, Nakamura T, Watanabe M, Yamamoto T, Manabe T, Akiyama T.	4. 巻 42
2. 論文標題 SIPA1L1/SPAR1 Interacts with the Neurabin Family of Proteins and is Involved in GPCR Signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2448 ~ 2473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.0569-21.2022	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 Keita, Koebis Michinori, Nakao Kazuki, Kobayashi Shizuka, Kiyama Yuji, Watanabe Masahiko, Manabe Toshiya, Iino Yuichi, Aiba Atsu	4. 巻 15
2. 論文標題 Loss of calyntenin paralogs disrupts interneuron stability and mouse behavior	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	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) 10.1186/s13041-022-00909-8	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 Arima-Yoshida Fumiko, Raveau Matthieu, Shimohata Atsushi, Amano Kenji, Fukushima Akihiro, Watanabe Masashi, Kobayashi Shizuka, Hattori Satoko, Usui Masaya, Sago Haruhiko, Mataga Nobuko, Miyakawa Tsuyoshi, Yamakawa Kazuhiro, Manabe Toshiya	4. 巻 10
2. 論文標題 Impairment of spatial memory accuracy improved by Cbr1 copy number resumption and GABAB receptor-dependent enhancement of synaptic inhibition in Down syndrome model mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71085-9	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 Takahashi Miyuki, Sugiyama Arika, Wei Ran, Kobayashi Shizuka, Fukuda Kimiko, Nishino Hironori, Takahashi Roka, Tsutsumi Koji, Kita Ichiro, Ando Kanae, Manabe Toshiya, Kamiguchi Hiroyuki, Tomomura Mineko, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Hyperactive and impulsive behaviors of LMTK1 knockout mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15461
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72304-z	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 Shirane Michiko, Shoji Hirotaka, Hashimoto Yutaka, Katagiri Hiroyuki, Kobayashi Shizuka, Manabe Toshiya, Miyakawa Tsuyoshi, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 13
2. 論文標題 Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00693-3	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 Montrose Kristopher, Kobayashi Shizuka, Manabe Toshiya, Yamamoto Tadashi	4. 巻 414
2. 論文標題 Lmtk3-KO Mice Display a Range of Behavioral Abnormalities and Have an Impairment in GluA1 Trafficking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 154 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.06.033	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 Usui Ryota, Yabe Daisuke, Fauzi Muhammad, Goto Hisanori, Botagarova Ainur, Tokumoto Shinsuke, Tatsuoka Hisato, Tahara Yumiko, Kobayashi Shizuka, Manabe Toshiya, Baba Yoshihiro, Kurosaki Tomohiro, Herrera Pedro Luis, Ogura Masahito, Nagashima Kazuaki, Inagaki Nobuya	4. 巻 9
2. 論文標題 GPR40 activation initiates store-operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15562
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52048-1	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Usui R., Yabe D., Fauzi M., Goto H., Botagarova A., Tokumoto S., Tatsuoka H., Tahara Y., Kobayashi S., Manabe T., Baba Y., Kurosaki T., Herrera P., Ogura M., Nagashima K. and Inagaki N.
2. 発表標題 GPR40 activation initiates store operated Ca ²⁺ entry and potentiates insulin secretion via the IP3R1/STIM1/Orai1 pathway in pancreatic β -cells.
3. 学会等名 American Diabetes Association (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------