

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23220008

研究課題名(和文) 神経伝達物質放出の修飾機構解明のための分子生理学的研究

研究課題名(英文) Molecular physiological study for the elucidation of mechanisms for modulation of neurotransmitter release

研究代表者

真鍋 俊也 (MANABE, Toshiya)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70251212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス前終末の細胞内小器官に存在するカルシウム動態を調節する複数の機能分子の役割を明らかにするために、それらの分子の遺伝子改変マウスを用いて興奮性シナプス伝達を解析したところ、シナプス前性のシナプス可塑性に異常があることを見出した。また、神経伝達物質放出を制御する蛋白複合体と相互作用するシナプス前分子の機能解析を行ったところ、神経伝達物質の放出の制御とシナプス前終末内のシナプス小胞の動態に關与することが明らかとなった。さらに、シナプス前終末に存在する蛋白リン酸化酵素によるリン酸化により、シナプス前性の短期シナプス可塑性が修飾されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the roles of functional molecules localized in the organelle in the presynaptic terminal, we examined synaptic transmission of gene-targeted mice lacking the molecules, and found that the mutant mice exhibited impaired presynaptic plasticity of excitatory synaptic transmission. We also examined the roles of presynaptic molecules interacting with the protein complex that regulated neurotransmitter release, and found that they are associated with the regulation of neurotransmitter release and the dynamics of synaptic vesicles in the presynaptic terminal. Furthermore, we found that some of the protein kinases present in the presynaptic terminal modified presynaptic short-term plasticity.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経科学 生理学 生体分子 脳・神経 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

シナプス可塑性に関する研究動向：記憶などの高次脳機能は、シナプスにおける伝達効率の長期的変化によりもたらされると考えられおり、一部の例外を除いて、シナプス後細胞で発現するとされている。私たちの研究室も含め、世界中の多くの研究室でシナプス後細胞での可塑性誘導・発現機構が明らかにされてきているが、可塑性が誘導されるためには、神経伝達物質の放出や放出機構自体の可塑的变化が決定的に重要であるが、これまでこの領域については、研究が十分に進んでいるとは言えない。

シナプス前性のシナプス伝達修飾機構の重要性：シナプス前終末における神経伝達物質の放出機構そのものについては明らかになりつつあるが、放出過程の可塑的变化については、きわめて限られた知見しか得られていない。シナプス後細胞での可塑性に関する知見は多いが、それにも影響を与えるシナプス前終末での放出過程の可塑性を明らかにしなければ、シナプス機能のごく一面しかみていないことになる。ある種の神経疾患では、神経伝達物質の放出機構の異常が関与しており、放出装置の効率や単位放出量（シナプス前性量子サイズ）の短期的・長期的修飾機構を明らかにすることは、基礎神経科学だけでなく、臨床的にもきわめて大きな意義を有する。

研究対象とする分子と細胞内小器官に関する学術的背景：これまで、当研究室では、シナプス前終末からの神経伝達物質放出機構やその可塑性に関する研究で多くの世界的な研究成果をあげてきた。例えば、海馬 CA3 領域苔状線維シナプスにおけるシナプス前性の長期抑圧 (LTD) 現象を世界に先駆け発見し、*Science* 誌に連報で発表しているし、これら以外にも数多くの論文を発表している。本研究計画では、このようなこれまでの経験や技術を生かし、神経伝達物質放出過程の修飾機構の全貌を明らかにすることを究極的な目標とし、具体的には、以下の2項目について研究を進める。

(1)シナプス前終末内でのカルシウムイオン (Ca^{2+}) 動態による神経伝達物質放出の修飾機構の解明：

細胞内小器官の Ca^{2+} 動態調節分子：細胞内小器官は、細胞内の Ca^{2+} 動態の調節に関与することが知られているが、その神経系、特に、シナプス前終末機能における役割はほとんど検討されていない。例えば、中枢神経系においては、小胞体は、その内部に Ca^{2+} を貯蔵したり放出したりすることにより細胞内の Ca^{2+} 動態を調節しているが、その分子機構については不明の点が多い。

シナプス前終末に局在する蛋白リン酸化酵素：これまでもっぱらシナプス後細胞でのシナプス可塑性の誘導・発現に関連した研究が進められてきたが、シナプス前終末にも、多くの種類の酵素がかなり豊富に発現して

いることが知られている。しかし、それらの酵素活性による神経伝達物質放出の調節機構については、まだまったく不明であるといっても過言ではない。

(2)ひとつのシナプス小胞に含まれるグルタミン酸の含有量を決定する機構の解明：

アクティブゾーン(AZ)蛋白 cytomatrix at the active zone (CAZ)-associated protein (CAST): CAST は脳にのみ発現する AZ 蛋白のひとつで、Bassoon、RIM1、Piccoloなどの他の AZ 蛋白と直接結合することにより、巨大な複合体を形成していると考えられている。BassoonやRIM1などは神経伝達物質放出に関与しているとされるが、中枢神経系における CAST の機能は、ほとんど不明である。予備実験で、シナプス小胞のグルタミン酸充填に関与する可能性を見出している。

2. 研究の目的

(1)シナプス前終末内での Ca^{2+} 動態による神経伝達物質放出の修飾機構の解明

細胞内小器官の Ca^{2+} 動態調節分子：シナプス前終末内の細胞内小器官による Ca^{2+} 動態調節が神経伝達物質の放出をどのように修飾するかを明らかにし、放出過程の可塑性誘導機構を解明する。また、長期増強 (LTP) や LTD などのシナプス可塑性への関与の可能性を検討する。さらに、これらの機構の異常により引き起こされる神経疾患のモデルマウスとなるような遺伝子改変マウスを作製し、その原因解明を目指す。

シナプス前終末の蛋白リン酸化酵素による放出過程の短期可塑性の誘導・発現機構を明らかにする。また、LTP や LTD などのシナプス可塑性への関与の可能性を検討する。

(2)ひとつのシナプス小胞に含まれるグルタミン酸の含有量を決定する機構の解明

CAST：シナプス小胞内のグルタミン酸充填量を制御していることを電気生理学的に確定させるとともに、その分子・細胞機構を解明する。また、個体レベルでの役割も明らかにする。

3. 研究の方法

マウスの海馬スライス標本を用いて電気生理学的に神経伝達物質放出の修飾機構を解析する。対象とする分子は上記の機能分子で、細胞内小器官そのものにも焦点を当てる。細胞内小器官と Ca^{2+} 動態制御分子については、CA3 錐体細胞特異的に遺伝子改変することで、CA1 領域のシナプス前終末でのみ遺伝子操作の効果が出るマウスを用いてシナプス伝達の解析を行う。シナプス前終末内蛋白リン酸化酵素については、シナプス後細胞の可塑性を阻害した条件でシナプス前可塑性の検討を進める。CASTについては、mEPSCや低親和性 AMPA 受容体阻害薬などを用いて、量子サイズの評価を行う。研究の後半以降では、これらの遺伝子改変マウスの個体レベルでの行動実験を進める。行動実験バッテリーを行

い、異常がみられた項目については、さらに詳細に検討する。具体的には、以下のような内容の研究を進めた。

(1) 細胞内小器官の神経伝達物質放出機構における役割に関する検討

(2) Ca²⁺動態制御分子の役割に関する検討

(3) シナプス前終末内蛋白リン酸化酵素の役割に関する検討

(4) ひとつのシナプス小胞に含まれるグルタミン酸の含有量を決定する機構の検討

4. 研究成果

(1) シナプス前終末内での Ca²⁺動態による神経伝達物質放出の修飾機構の解明：

細胞内小器官からの Ca²⁺放出機構に関与する機能分子が海馬 CA1 シナプスの前終末でのみ欠損するコンディショナル遺伝子改変マウスの作製に成功し、この変異マウスの海馬スライスで、まだ例数は十分ではないが、シナプス活動依存性のシナプス抑制に異常があることを見出した。

海馬特異的に Ca²⁺動態調節分子が欠損する変異マウスの作製に成功した。この変異マウスを用いて、海馬における役割を電気生理学的、および、行動学的に解析した。海馬特異的コンディショナルノックアウトマウスにおいて、短期的、および、長期的可塑性に異常のある可能性が示唆されるデータを得た。また、行動バッテリーテストを行い、いくつかの項目で異常を見出した。

シナプス前終末に存在する蛋白リン酸化酵素の機能阻害遺伝子改変マウスにおいて、シナプス前性の短期可塑性が、特殊な条件下では野生型に比べて大きく亢進していることを見出した。

神経伝達物質放出を制御する蛋白複合体を構成する分子のリン酸化欠損ノックインマウスの海馬 CA1 領域において、入出力関係が大きく減少していることを見出した。それと合致し、2 発刺激促進が大きく増大し、神経伝達物質の放出確率の低下が示唆された。論文の作成が終了し、投稿の最終準備を行っている。

(2) ひとつのシナプス小胞に含まれるグルタミン酸の含有量を決定する機構の解明：

神経伝達物質放出に関与するアクティブゾーン蛋白である CAST を欠損するノックアウトマウスを用いて神経伝達物質放出機構を検討し論文を投稿した(Kobayashi et al. The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus)。以下にその要約を記載する。

海馬 CA1 領域における興奮性シナプス伝達の入出力関係において伝達効率が野生型より高かった。

微小興奮性シナプス後電流の振幅が野生型より増大していた。

神経伝達物質の放出確率が低下していた。

シナプス間隙におけるグルタミン酸濃度

が高いことがわかった。

5 ヘルツの持続低頻度刺激後にみられるシナプス抑制が有意に大きかった。

以上のように、いくつかのプロジェクトについては、現在、論文投稿中であり、論文作成中のものも数編ある。現時点では、直接的に本研究計画に関連する雑誌論文は多くはないが、2016 年度中には、関連論文は少なくとも数編は発表できるものと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Kobayashi, S., Hida, Y., Ishizaki, H., Inoue, E., Tanaka-Okamoto, M., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Fukaya, M., Kitajima, I., Takai, Y., Watanabe, M., Ohtsuka, T. and Manabe, T. (2016). The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* (in press).

Nakamura, T., Arima-Yoshida, F., Sakae, F., Nasu-Nishimura, Y., Takeda, Y., Matsuura, K., Akshoomoff, N., Mattson, S. N., Grossfeld, P. D., Manabe, T. and Akiyama, T. (2016). PX-RICS-deficient mice mimic autism spectrum disorder in Jacobsen syndrome through impaired GABA_A receptor trafficking. *Nat. Commun.* 7: 10861. DOI: 10.1038/ncomms1086

Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Watabe, A. M., Kassai, H., Nakano, K., Aiba, A., Watanabe, M. and Manabe, T. (2014). The glutamate receptor GluN2 subunit regulates synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 40:3136-3146. DOI: 10.1111/ejn.12682

Inoue, T., Hoshina, N., Nakazawa, T., Kiyama, Y., Kobayashi, S., Abe, T., Yamamoto, T., Manabe, T. and Yamamoto, T. (2014). Lemur kinase 3 deficiency causes pronounced locomotor hyperactivity and impairs endocytic trafficking. *J. Neurosci.* 34:5927-5937. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1621-13.2014

Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Togano, T., Itoh, R., Sato, M., Yamazaki, M., Abe, M., Sato, T., Oda, K., Yokoyama, M., Takao, K., Fukaya, M., Miyakawa, T., Watanabe, M., Sakimura, K., Manabe, T. and Igarashi, M. (2013). Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short-term plasticity. *J. Biol. Chem.* 288:34906-34919. DOI: 10.1074/jbc.M113.504050

Nomoto, M., Takeda, Y., Uchida, S.,

Mitsuda, K., Enomoto, H., Saito, K., Choi, T., Watabe, A. M., Kobayashi, S., Masushige, S., Manabe, T. and Kida, S. (2012). Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol. Brain* 5:8. DOI: 10.1186/1756-6606-5-8

Arima-Yoshida, F., Watabe, A. M. and Manabe, T. (2011). The mechanisms of the strong inhibitory modulation of long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 33:1637-1646. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2011.07657.x

[学会発表](計12件)

Tanaka, T., Okuda, K., Kobayashi, S., Murakami, T., Fukaya, M., Takao, K., Watanabe, A., Hagiwara, M., Mizuguchi, M., Sakagami, H., Miyakawa, T. and Manabe, T. Society for Neuroscience, Annual Meeting 2015年10月21日 Functional analyses of the CDKL5, a causative gene for severe neurodevelopmental disorders accompanied by intractable epilepsies. Chicago (USA)

Tanaka, T., Okuda, K., Kobayashi, S., Fukaya, M., Takao, K., Watanabe, A., Murakami, T., Hagiwara, M., Sakagami, H., Mizuguchi, M., Miyakawa, T. and Manabe, T. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2015年9月13日 CDKL5 controls NMDA receptor function and regulates memory, emotion and seizure susceptibility. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Tanaka, T., Watanabe, A., Hagiwara, M., Murakami, T., Kobayashi, S., Manabe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Fukaya, M., Sakagami, H., Mizuguchi, M. and Okuda, K. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2014年9月13日 Functional analyses of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Watanabe, Y., Katayama, N., Takeuchi, K., Sakimura, K., Manabe, T. and Igarashi, M. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2013年6月22日 Presynaptic Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates short-term plasticity through the interaction with syntaxin-1A. 京都国際会議場(京都府・京都市)

Okuda, K., Watanabe, A., Kobayashi, S., Manabe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Fukaya, M., Sakagami, H., Nishioka, T.,

Amano, M., Kaibuchi, K., Mizuguchi, M. and Tanaka, T. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2013年6月22日 Functional studies of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders, by interactome screening and loss-of-function analyses. 京都国際会議場(京都府・京都市)

Matsuda, N., Ogawa, I., Hamada, S. and Manabe, T. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2013年6月21日 Live imaging of BDNF secretion using a small peptide-based fluorescent tag. 京都国際会議場(京都府・京都市)

Katayama, N., Yamamori, S., Fukaya, M., Watanabe, M., Takahashi, M. and Manabe, T. Japan Neuroscience Society, Annual Meeting 2013年6月21日 Roles of SNAP-25 phosphorylation in presynaptic short-term plasticity. 京都国際会議場(京都府・京都市)

Tanaka, T., Okuda, K., Watanabe, N., Kobayashi, S., Manabe, T., Takao, K., Miyakawa, T., Fukaya, M., Sakagami, H. and Mizuguchi, T. The Japanese Society of Neuropathology, Annual Meeting 2013年4月25日 Elucidation of the molecular functions and LOF of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders. タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Kobayashi, S., Hida, Y., Ishizaki, H., Inoue, E., Tanaka-Okamoto, M., Yamasaki, M., Miyazaki, T., Fukaya, M., Kitajima, I., Takai, Y., Watanabe, M., Ohtsuka, T. and Manabe, T. The Physiological Society of Japan 2013年3月28日 The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size. タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

真鍋俊也 第4回 Cell Metabolism & Communication Conference 2013年2月2日 シナプス可塑性と高次脳機能 トップオブザスクエア「宴」(東京都・千代田区)

Takahashi, K. I., Katagiri, H. and Manabe, T. Society for Neuroscience, Annual Meeting 2011年11月16日 The reduction of growth hormone enhances the efficacy of basal synaptic transmission and LTP in the rat hippocampal CA1 region. Washington DC (USA)

Hamada, S., Ogawa, I., Yamasaki, M., Kiyama, Y., Watabe, A. M., Kassai, H., Nakao, K., Aiba, A., Watanabe, M. and Manabe, T. Society for Neuroscience, Annual Meeting 2011年11月14日 The replacement of GluN2B with GluN2A

increases synaptic trafficking of AMPA receptors in the neonatal mouse brain. Washington DC (USA)

〔図書〕(計7件)

真鍋俊也 興奮の伝達:シナプス伝達の調節、中枢神経におけるシナプス伝達 医学書院 「標準生理学」第8版 第2編 神経と筋 第6章 2014年 154-166 ページ

真鍋俊也 McGraw-Hill、丸善出版 「ギヤノング生理学」第24版 第編 医科生理学の細胞および分子の基礎 5章 興奮性組織:神経 2014年 97-113 ページ

小林静香、真鍋俊也 羊土社 脳神経科学イラストレイテッド 改訂第3版 シナプス可塑性 - 長期増強:LTP/長期抑圧:LTD 2013年 177-184 ページ

Manabe, T. Springer Analysis of synaptic plasticity with the slice patch-clamp recording technique. In: Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols 2012年 147-157 ページ

渡部文子、真鍋俊也 羊土社 「イラストで徹底理解するシグナル伝達キーワード事典」神経 神経可塑性 2012年 266-273 ページ

真鍋俊也 吉岡書店 「最新パッチクランプ実験技術法」スライスパッチによるシナプス可塑性解析法 2011年 103-109 ページ

真鍋俊也 McGraw-Hill、丸善出版 「ギヤノング生理学」第23版 4章興奮性組織:神経第編 神経細胞と筋肉細胞の生理学 2011年 93-109 ページ

〔その他〕

ホームページ

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/NeuronalNetwork/Neuronal_Network/Index_japanese.htm

プレスリリース

日本経済新聞 2016年2月4日(朝刊・社会面):物質輸送の蛋白質不足 統合失調症リスク(Nakazawa, T. et al. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nat. Commun. 7:10594, 2016)

毎日新聞 2016年2月4日(朝刊・総合面):たんぱく質移動分子 欠けると脳機能障害 統合失調症新薬に道(Nakazawa, T. et al. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nat. Commun. 7:10594, 2016)

産経新聞 2016年2月4日(朝刊・社会面):統合失調症のリスク増加(Nakazawa, T. et al. Emerging roles of ARHGAP33 in

intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nat. Commun. 7:10594, 2016)

プレスリリース(UTokyo Research) 2016年3月16日:自閉症の原因となる遺伝子を特定 GABA受容体の運び屋タンパク質が発症の鍵握る(Nakamura, T. et al. PX-RICS-deficient mice mimic autism spectrum disorder in Jacobsen syndrome through impaired GABA_A receptor trafficking. Nat. Commun. 7: 10861, 2016)

6. 研究組織

(1)研究代表者

真鍋 俊也(MANABE, Toshiya)
東京大学・医科学研究所・教授
研究者番号:70251212