

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300142

研究課題名(和文) シンタキシン1アイソフォームのシナプス伝達における機能分化

研究課題名(英文) Functional difference between syntaxin1 isoforms in synaptic transmission

研究代表者

赤川 公朗 (Akagawa, kimio)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：80129303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：シンタキシン(sy)1A及びsy1Bの遺伝子破壊マウス(KO)を用いて機能差を検討した。Sy1AKOではグルタミン酸及びGABA性伝達は正常であった。sy1BK0ではmPSCが低下し、シナプス小胞(SV)のready releasable poolの減少とrecyclingの上昇が観察された。またsy1A/sy1B double KOでは誘発性神経伝達は生じたが、個々の小胞の放出は散在的であった。従ってsy1は開口放出過程には本質的に不要であるが、SV放出の同時性を制御する因子であることが示された。更にsy1Bはグリア細胞からのBDNF放出を促進して神経細胞の発達・生存を支持していた。

研究成果の概要(英文)：With gene-knockout mice, functional difference between syntaxin1A(sy1A) and syntaxin1B(sy1B) in synaptic transmission was investigated. We found that in sy1AKO glutamatergic and GABAergic transmission was normal but in sy1BK0 frequency of mPSP was decreased, and reduction of ready releasable pool and increase of vesicle recycling were observed. In case of sy1A/1B double KO, synaptic transmission occurred following evoked stimulation but release of each synaptic vesicle was asynchronous. These results indicated that syntaxin1 was not essentially necessary for exocytotic process in synaptic transmission but regulated synchronous release of synaptic vesicles. Furthermore, it was shown that sy1B regulated release of BDNF from glia cells, supporting neuronal development and survival.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：神経伝達 syntaxin1A syntaxin1B 機能分化 遺伝子ノックアウトマウス グリア細胞 BDNF

### 1. 研究開始当初の背景

syntaxin 1 はシナプス小胞からの伝達物質の開口放出過程を制御している。Syntaxin1 (以下 sy1)には異なる遺伝子から発現される sy1A 及び sy1B の2種のアイソフォームがある。両者のアミノ酸配列、結合因子、神経系における局在部位は非常に類似しており、殆どの神経細胞においても共存が認められる。それ故、両者は神経系における最も重要な働きであるシナプス伝達の安定性を保証するため、同一機能を有しながら並行して働く重複遺伝子と広く信じられていた。しかし我々は最近、sy1A と sy1B のノックアウトマウス (null mutant, 以下 K0) を作製してその表現系を比較検討した結果、先の常識に反して両者が神経系において相異なる働きをしている可能性を見出した。その第1の理由は、sy1AK0 は正常マウス (WT) と同様に外観上は正常に生育するが

(J. Neurosci, 2006) sy1BK0 は生後2週で致死となり、その中枢神経系は形態学的に、発達遅延や異常が観察されたことによる。また電気生理学的には sy1AK0 ではグルタミン酸、GABA 性伝達は全く正常であるが、個体には情動行動や学習に障害があり、自閉性障害のモデルと考えられた (Eur. J. Neurosci, 2010)。これに対して sy1B の heterozygote は生育するが、K0 には中枢神経系の発達異常、運動障害があった。これ迄の基礎的実験から sy1AK0 では、神経終末への興奮到達後、数十ミリ秒から数秒の遅い経過を経るモノアミンや神経ペプチドの放出過程が阻害されているのに対して sy1BK0 では GABA やグルタミン酸性シナプスにおける1ミリ秒程で進む伝達物質の速い放出過程が選択的に障害を受けている可能性が示唆された。また sy1BK0 神経系の発達異常の原因としてグリア細胞が有する神経細胞の維持機能に障害があると推測された。これらの結果から、両者は非常に類似した因子ではあるが両者は機能的に特殊化していると推測された。

### 2. 研究の目的

syntaxin1A (sy1A) 並びに syntaxin1B (sy1B) はその類似性からシナプス伝達において同一の制御機能を有する重複遺伝子と考えられていた。しかし両者の遺伝子ノックアウトマウスの表現型を比較したところ、sy1B は神経伝達物質の速い放出過程を制御するのに対して、sy1A は伝達物質の遅い放出過程を制御するように特殊化していると推測された。更に両因子の阻害は個体レベルでは異なる学習や情動行動の異常を惹起することが判った。これらの知見に基づいて、本研究は sy1AK0 及び sy1BK0 におけるモノアミン系を例とする遅いシナプス伝達系とグルタミン酸・GABA を代表とする速い伝達系の障害を電気生理学的あるいは生化学的に詳細

な検討をする。これにより sy1A、sy1B がシナプスで同一の機能を有すものではなく、機能分化していることを詳細に明らかにする。また2種の K0 マウスの遺伝子破壊による個体の学習、情動行動の発達に与える両因子の影響を検討する。更に神経成長因子の分泌調節と関連させて sy1B の神経細胞の生存・成熟に及ぼす新たな機能を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

[1] K0 マウスより得た培養神経細胞における速いシナプス伝達機能の解析  
培養神経細胞を用いて、グルタミン酸、または GABA 性伝達の誘発性シナプス後電流 (Evoked PSC) を記録する。低濃度の tetrodotoxin の存在下でグルタミン酸性伝達の観察を行う。基礎的実験から、伝達物質の放出確率に異常があると推測されていた。これらは sy1AK0 では正常であった。そこで細胞外液 Ca<sup>2+</sup>濃度やシナプス伝達に作用する薬剤の影響等の検討を行い、sy1BK0 の放出確率の異常の機序を推定する。また sy1A/sy1B double K0 (胎生後期死亡) の胎生13週の脳から得た培養神経細胞を用いて、伝達物質の放出を調べて、シナプスの開口放出に両因子が必須であるか検討する。

[2] シナプトソーム (SS) からの伝達物質放出実験  
K0 マウスの全脳ホモジネートからシヨ糖密度勾配遠心法により調整した SS 分画を得る。これに放射性標識したモノアミン類、GABA、グルタミン酸等を取り込ませ、高 K<sup>+</sup>による脱分極刺激を与えて SS からの伝達物質の放出量を推定する。

[3] 脳スライス標本及び培養神経細胞からのモノアミン、神経伝達物質放出の測定  
視床下部、線条体、海馬スライスを作成する。グルタミン酸刺激や K<sup>+</sup>による段階的な脱分極刺激を与え、モノアミンを分泌させる。放出されたモノアミン類は逆相 HPLC により分離し、電気化学検出器 (ECD) で定量を行う。また培養海馬神経細胞及び中脳モノアミン性神経細胞からの伝達物質等の放出を測定する。

[4] In vivo microdialysis による個体レベルでの細胞外液中への神経伝達物質の放出量の測定

K0 マウスの視床下部、線条体、海馬等にガイドカニューレを埋め込み、シリンジポンプによりプローブ内に還流したリンガー液を回収し HPLC-ECD で脳内微小領域での伝達物質放出量を測定する。

[5] Sy1BK0 に見られる神経細胞の生存率低下の原因に関する検討

Sy1BK0 の培養神経細胞は通常の培養条件下では生存率が低下した。この低下は正常グリア細胞との共培養により回復したことから

sy1BK0 のグリア細胞(AS)には何らかの成長促進因子の分泌障害がある為に神経発達に異常が生じることを推測させた。そこで WT と sy1BK0 の AS において以下の比較検討をする。(1) 培養液に種々の因子を添加して神経細胞の生存率の改善を検討 (2) 有効な因子の細胞内発現と細胞内蓄積の生化学的検討 (3) 免疫染色による細胞内局在の検討 (4) sy1BK0 AS に 外来性 WTsy1B を強制発現させた系での(1)で有効な因子の分泌能の回復 [ 6 ] マウスの行動学的解析  
 KO マウスの情動行動について startle chamber を用いた prepulse inhibition test 及び恐怖条件付け学習を利用した潜在制止反応(Fujiwara et al., Eur.J.Neurosci., 2010)により検討する。

#### 4. 研究成果

[ 1 ] 培養系を用いた電気生理学的解析を行うと、sy1AK0 ではグルタミン酸及び G A B A 性シナプス伝達は全く正常であった。しかし sy1BK0 では mEPSC (興奮性微小シナプス後電流) mIPCP (抑制性微小シナプス後電流) 共に低下していることが示された。更に sy1BK0 ではシナプス自身の数・密度は変わらないが、シナプス小胞の ready releasable pool が低下し、vesicle recycling が上昇していた (図 1 発表論文 Mishima et al., PLOS ONE (2014))。また sy1A/sy1B doubleKO マウスの培養神経細胞においてもシナプス伝達の存在が確認された。しかし刺激による誘発後の個々の微小シナプス応答は同時には起らず、asynchronous であった(図 2)。このことから sy1A 及び sy1B は伝達物質の開口放出過程には本質的に不要であり、開口放出の同時性を制御する因子であるということが明らかとなった。

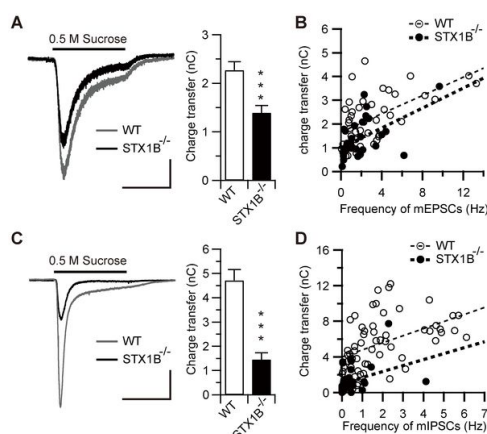


図 1 Sy1BK0 マウス由来の神経細胞における ready releasable pool (RRP) の解析。ショ糖ギャップ法によりシナプス小胞の RRP を調べた。A, B はグルタミン酸性シナプス、C, D は GABA 性シナプスでの解析。A, C は実際のシナプス電流を測定した例。B, D の点線と縦軸との交点が RRP の相対値を示す(Stevens and Tjui, PNAS(1995)による)

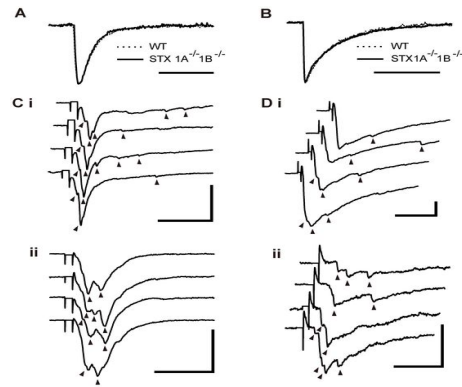


図 2 Sy1A/sy1B double KO の培養神経細胞における誘発性シナプス電流の波形。生存する細胞数が少ないため、自己回帰性シナプスが形成されている。個々の微小誘発電流 (mEPSC) の同時性が失われ、散発的にシナプス小胞の開口放出が起きている。

[ 2 ] シナプトソーム分画からの放出実験では sy1AK0 では全てのモノアミン放出が阻害されているのに対して sy1BK0 ではモノアミン放出は正常であり、G A B A、グルタミン酸の放出が低下していた。さらに脳各部位から得た脳スライス並びに培養神経細胞からの放出実験では sy1A は全てのモノアミン及び扁桃体オキシトシン分泌が阻害されているのに対して sy1Bhetero ではモノアミン分泌は正常であった。しかし in vivo microdialysis 法により細胞外液中の濃度を測定すると sy1Bhetero では海馬、視床下部等においてセロトニンは低下するが、線条体ドーパミンは増大していた。Sy1B hetero の場合にみられる in vivo、in vitro での差異は、脳内のモノアミン系の調節機構(主にグルタミン酸または G A B A 性神経系による)の変調に起因するモノアミンの分泌変動が生じていることを示唆した。

[ 3 ] KO マウス個体の情動行動を観察したところ、sy1B hetero では統合失調症の重要な中間表現型である pre-pulse inhibition の低下が観察された。しかもこの異常はドーパミン受容体アンタゴニストであるハロペリドールにより正常に復したことから、sy1Bhetero マウスは脳内ドーパミン分泌の過剰により情動行動異常が惹起されている新たな統合失調症モデルマウスとなり得ることが分かった。Sy1AK0 は自閉症モデルマウスであると考えられており (Fujiwara et al., Eur.J.Neurosci., 2010)、sy1A と sy1B という類似した因子の遺伝子の改変動物が、各々自閉症と統合失調症という、異なっているが、一部類似した 2 種類の精神疾患のモデルになるという興味ある知見が得られた。

[ 4 ] Sy1BK0 から得た神経細胞は培養 7 日後以降、細胞死が正常より増加していた。この細胞死は正常マウスのグリア細胞と共培養すると抑制された。これはグリア由来の神経成長維持を促す因子群の低下に由来すると

考えられた。そこでこの培養神経系に種々の因子を添加してその効果を調べた結果、BDNF及びneurotrophin-3が生存維持に有効であり、NGF、FGF、GDNF等の因子は無効であった。(図3 発表論文 Kofuji et al., J.Neurochem. (2014))

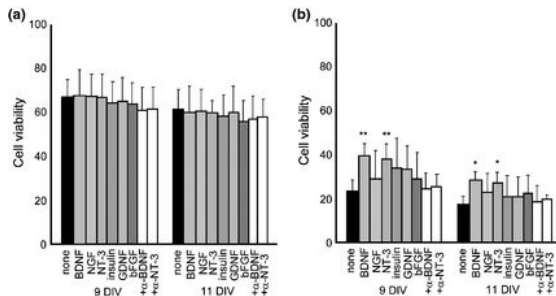


図3 Sy1BK0より得た培養神経細胞の生存率。(a)、(b)は各々正常及びsy1BK0マウス神経細胞の培養後9日及び11日の生存率。培養細胞は種々の成長因子群を培養液に加えて、グリア細胞非存在下で培養した。KOマウス由来の神経細胞の生存率の低下(B)がBDNFおよびNT-3により一部回復した。

また免疫組織学的観察からsy1BK0のグリア細胞内にはBDNF蓄積が増加していて、細胞外への分泌過程が阻害されていることが明らかとなった。この分泌障害は外来性sy1B遺伝子の導入により回復したことから(図4)、sy1BK0の神経系の発達異常の少なくとも一部はBDNFの分泌障害に起因することが確かめられた。これらの結果からsy1Bは神経伝達物質の放出過程のみならず、グリア細胞からのBDNF等の成長因子の分泌機能を調節しているという新たな知見が明らかとなった。

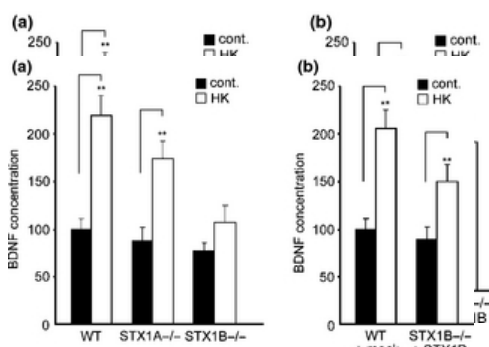


図4 Sy1BK0マウス由来のグリア細胞からのBDNF分泌能の回復。Sy1BK0のグリアに対して外来性sy1B遺伝子を強制発現させて高カリウム刺激を行うと、低下していた細胞外へのBDNF放出(a)が回復した(b)。このBDNF分泌促進作用はsy1Aには認められない。

以上の結果からsyntxin1Aとsyntxin1Bは神経伝達や開口放出過程において異なる機能を担っていることが明らかとなった。

主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

ER stress response in NG108-15 cells involves upregulation of syntaxin 5 expression and reduced amyloid beta peptide secretion. K.Suga, A.Saitoh, and K.Akagawa

Exp. Cell Res. 332 (2015) 11-23 査読有

HPC-1 syntaxin1A and syntaxin1B play distinct roles in neuronal survival.

J.Neurochemistry 130 (2014) 514-525

T.Kofuji, T. Fujiwara, M. Sanada,

T.Mishima and K. Akagawa 査読有

Syntaxin 1B, but Not Syntaxin 1A, is Necessary for the Regulation of Synaptic Vesicle Exocytosis and of the Readily Releasable Pool at Central Synapses.

T.Mishima T. Fujiwara, M. Sanada, T.

Kofuji, M.Azuma and K. Akagawa

PLoS ONE 9 (2014, February 28) e90004. 査読有

Presynaptic inhibitory action of pregabalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of mouse spinal cord: Further characterization of presynaptic mechanism.

R.Mizusawa, T.Fujiwara, K.Nemoto,

S.Yamaguchi, K.Akagawa and Y.Hori

Neuroscience Letters 558 (2014) 186-191

査読有

〔雑誌論文〕(計4件)

〔学会発表〕(計17件)

三嶋竜弥、藤原智徳、真田ますみ、小藤剛 赤川公朗: シナプス伝達におけるシタキシン1Aとシタキシン1Bの機能的差異. 第35回日本神経科学大会 平成24年9月

藤原智徳、小藤剛史、三嶋竜弥、赤川公朗: Syntaxin1B欠損マウスにおけるDA分泌の解析. 第35回日本神経科学大会 平成24年9月

K.Suga et al., : ER stress is associated with increased expression of ER-Golgi SNAREs and reduced A $\beta$  secretion in neuronal cells. 第55回日本神経化学学会大会 平成24年9月

T. Kofuji et al., : Glial cells from STX1B-KO mice were less effective of neuronal survival than WT. 第55回日本神経化学学会大会 平成24年9月

中山高宏、御子柴克彦、赤川公朗: Syntaxin1Aのシグナル伝達系・細胞種特異的発現制御機構の解析. 第41回杏林医学会大会 平成24年11月

中山高宏、御子柴克彦、赤川公朗: Class-1 HDACによるヒストンアセチル化調節がsyntaxin 1A遺伝子の細胞種特異的発現を制御する. 第85回日

本生化学会大会 平成 24 年 12 月

小藤剛史、藤原智徳、真田ますみ、三嶋竜弥、赤川公朗：神経細胞の生存に対する HPC-1/シntaxin 1 A とシntaxin 1 B の異なる役割。第 36 回日本神経科学大会/第 56 回日本神経化学会大会 平成 25 年 6 月

藤原智徳、小藤剛史、三嶋竜弥、赤川公朗：STX1A、STX1B 欠損マウスにおける行動異常の比較。第 36 回日本神経科学大会/第 56 回日本神経化学会大会、平成 25 年 6 月

K.Suga et al., : ER stress suppress Ab secretion and induces the expression of ER-Golgi SNARE including Syntaxin5 proteins in neuronal cells . 第 56 回日本神経化学会大会 平成 25 年 6 月 29 日

中山高宏、御子柴克彦、赤川公朗：Syntaxin 1A 遺伝子の組織特異的発現制御機構。第 86 回日本生化学会大会 平成 25 年 9 月

藤原智徳、小藤剛史、三嶋竜弥、赤川公朗：HPC-1/STX1A および STX1B による社会行動の制御。第 91 回日本生理学会 平成 26 年 3 月

三嶋竜弥、藤原智徳、真田ますみ、小藤剛史、赤川公朗：シナプス伝達におけるシntaxin 1 B の生理機能。第 91 回日本生理学会 平成 26 年 3 月

小藤剛史、林優子、田丸政男、赤川公朗：広汎性発達障害(PDD)と syntaxin1A 遺伝子の関連性の検討。第 56 回日本小児神経学会 平成 26 年 5 月

T Fujiwara et al., : Impairment of social behavior in HPC-1/syntaxin1A knockout mice relate with reduction of DA and OXT release . 第 37 回日本神経科学学会 平成 26 年 9 月

小藤剛史、林優子、藤原智徳、真田ますみ、田丸政男、赤川公朗：自閉症スペクトラム障害と HPC-1/syntaxin1A 遺伝子発現異常の関連性の検討。第 57 回日本神経化学会大会 平成 26 年 9 月

Suga K et al., : Upregulation of ER-Golgi SNARE Syntaxin5 by ER stress and its relationship with APP processing . 第 57 回日本神経化学会大会 平成 26 年 9 月

中山高宏、赤川公朗：Syntaxin 1A 遺伝子の PKA を介した転写制御機構。第 87 回日本生化学会大会 平成 26 年 10 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤川 公朗 (Akagawa Kimio)  
杏林大学医学部教授  
研究者番号：80129303

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

藤原 智徳 (Fujiwara Tomonori)  
杏林大学医学部准教授  
研究者番号：90255399

須賀 圭 (Suga Kei)  
杏林大学医学部講師  
研究者番号：30306675

三嶋 竜也 (Mishima Tatsuya)  
杏林大学医学部助教  
研究者番号：40317095

小藤 剛史 (Kofuji Takefumi)  
杏林大学医学部助教  
研究者番号：40365200

中山 高宏 (Nakayama Takahiro)  
杏林大学医学部助教  
研究者番号：90342823

斎藤 綾子 (Saito Ayako)  
杏林大学医学部実験助手  
研究者番号：80424109

真田 ますみ (Sanada Masumi)  
杏林大学医学部実験助手  
研究者番号：70424108