

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500338

研究課題名（和文） シンタキシン1アイソフォームの機能差についての遺伝子欠損マウスを用いた研究

研究課題名（英文） Studies for the functional difference of STX1A and STX1B in vivo

研究代表者

藤原 智徳 (FUJIWARA TOMONORI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：90255399

研究成果の概要（和文）：開口放出を制御するシンタキシンは、神経細胞において2つのアイソフォーム（STX1A、STX1B）が発現している。これまで一般に、これらの蛋白質は同一の機能を持つとされていた。われわれは、遺伝子解析マウスを用いた解析から、これらの蛋白質の生体における機能が異なることを我々は明らかにした。さらに、その機能差は、Munc18 との相互作用及びその相互作用を制御する機構が関わることを示された。

研究成果の概要（英文）：In neurons, two types of syntaxin (STX) isoforms, STX1A and STX1B, were expressed. It was believed that STX1A and STX1B have same function. However, we demonstrated that these proteins exhibited distinctive function in vivo. We showed the difference of the interaction with one of the STX binding proteins, Munc18, which might cause for the functional differences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学・神経薬理学

キーワード：シナプス伝達、シンタキシン、痙攣、遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

SNARE 蛋白質として知られるシンタキシン (STX) はシナプス前終末でのシナプス小胞の開口放出の制御に関わる蛋白質として知られている。神経細胞には STX1A と STX1B の2つのアイソフォームが多く発現している。これらの蛋白質は高いアミノ酸配列の相同性を示し、その発現部位も類似していることから、

一般に両者は相補的に働くと推測されていた。しかし、我々はこれらの遺伝子を欠損したマウスを新規に作成し、その解析を行ったところ、生後発育、痙攣発作の発症率など表現型に顕著な違いが見られた。これらの結果から、STX1A と STX1B の生体内での機能は全く同一ではないことが明らかとなった。

2. 研究の目的

遺伝子欠損マウスの表現型解析から示された上記のような STX1A と STX1B の生体内での機能の違いはどのような分子機構をもとに生じるのかを解明することを目的として本研究を行なった。その足がかりとして、STX1B 欠損マウスでのみ見られる高頻度に生じる痙攣発作に着目し、それが生じる分子機構を明らかにすることを目的として研究を行なった。

3. 研究の方法

行動薬理学的解析：痙攣発作について評価するため、痙攣誘発剤であるペンチレンテトラゾールを用い各マウスにおける薬剤感受性を調べた。また、バルプロ酸等の抗癲癇薬の効果についても検討した。

シナプス伝達の解析：初代培養神経細胞を用いて、電気生理学的手法により Glu、GABA のシナプス伝達の解析を行なった。モノアミン分泌の測定は、シナプトソームを用いた解析、マイクロダイアリシスによる解析を行なった。蛋白質間相互作用の解析：脳抽出液を用いた免疫沈降法、および組換え蛋白質を用いた結合実験により解析を行なった。また、株細胞に強制発現させ、細胞内での相互作用の解析も行なった。

4. 研究成果

STX1B 欠損マウスでの癲癇発作は GABA の作用を増大させる作用を持つバルプロ酸の投与により改善されることが明らかとなり、GABA 作動性神経の機能低下が示唆された。そこで、初代培養神経細胞を使った解析の結果、STX1B の欠損により GABA のシナプス伝達が低下することがわかった。それに対し STX1A の欠損では、このような GABA 作動性神経の機能低下は認められなかったが、モノアミン分泌が低下することが明らかとなった。このように、STX1A と STX1B はそれぞれ異なるシナプス伝達の過程を制御することがわかった。これらの違いが生じる分子機構を解明するため、STX1A と STX1B の蛋白質間相互作用の違いについて検討した。各遺伝子欠損マウスにおいて、STX と相互作用することが知られる蛋白質の発現解析を行なった結果、STX1B 欠損マウスで Munc18-1 の低下が認められた。これまでに、ヒト遺伝子解析から Munc18-1 と難治性の癲癇との関連が示唆されていた。そのため、STX1B 欠損マウスにおける Munc18-1 の発現量の低下が癲癇発作と関連すると推測し、in vitro の解析により Munc18 との相互作用について調べた。その結果、STX1A と STX1B で in vitro での相互作用に顕著な違いは認められ

なかった。次に、脳抽出液を用いた免疫沈降法による解析により in vivo での相互作用について検討したところ、Munc18-1 に対する親和性が STX1A と STX1B で異なることを見出した。そこでその詳細について解析するため、新規の遺伝子改変マウスを作成し、それらを用いた解析を行うことを計画した。本研究では tet-system により外来遺伝子の発現の on/off を制御できる新規の遺伝子組換えマウスの作成を行なった。5 line の遺伝子組換えマウスが得られたが、これらのマウスはいずれも外来遺伝子の発現量が低く、本研究目的には適していなかった。そこで、計画を変更し Cre/loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスの作成を再度計画し、現在作成中である。

また、STX1A と STX1B の違いに関わる分子として、Munc18 以外のものがないか、Yeast Two-Hybrid 法によるスクリーニングを行なった。その結果いくつかの候補遺伝子を同定し、STX1A と STX1B で蛋白質間相互作用の違いがあるか解析を行なっている。

このように本研究により、生体内において Munc18 との相互作用は STX1A と STX1B で異なる制御を受けていることが示され、それが GABA 神経、モノアミン神経といった異なる神経機能の調節において重要な働きをしている可能性が示唆された。今後、これらの仮説を、本研究で作成した各遺伝子改変動物を使い検討することで、シナプス前終末における開口放出を調節する分子機構の詳細を明らかにすることになる。また当初の研究目的であった癲癇の病態機構の解明にもつながることが期待できる。

5. 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Oligomerised lychee fruit-derived polyphenol attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice and endoplasmic reticulum stress in neuronal cells.

Sakurai T, Kitadate K, Nishioka H, Fujii H, Ogasawara J, Kizaki T, Sato S, Fujiwara T, Akagawa K, Izawa T, Ohno H. Br J Nutr. 2013 Mar 28;1-10.

(2) Exercise training and the promotion of neurogenesis and neurite outgrowth in the hippocampus

Sakurai T, Ogasawara J, Kizaki T, Ishibashi Y, **Fujiwara T**, Akagawa K, Izawa T, Radak Z, Ohno H.

J Phys Fitness Sports Med, 1 (2): 333-337 2012

(3) T Mishima **T Fujiwara** T Kofuji and K Akagawa

Impairment of Catecholamine Systems during Induction of Long-Term Potentiation at Hippocampal CA1 Synapses in HPC-1/Syntaxin 1A Knock-out Mice

J. Neurosci 2012, 32:381-389

(4) T Sakurai, J Ogasawara, T Kizaki, Y Ishibashi, **T Fujiwara**, K Akagawa, T Izawa, S Oh-ishi, S Haga, H Ohno

(5) Involvement of leucine zipper transcription factor-like protein 1 (Lztf11) in the attenuation of cognitive impairment by exercise training

Biochemical and Biophysical Research Communications 416 (2011) 125-129

(6) **Fujiwara T**, Kofuji T, Akagawa K

Dysfunction of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis in STX1A KO mice.

J Neuroendocrinol. (2011) 23: 1222-1230

(7) Kaneko Y, Suge R, **Fujiwara T**, Akagawa K, Watanabe SI.

J Mol Histol. (2011) 42: 483-9.

Unusual retinal layer organization in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice.

7) H Wang, R Ishizaki, E Kobayashi, **T Fujiwara**, K Akagawa and T Izumi

J. Biol. Chem. (2011) 286: 32244-50

LOSS OF GRANUPHILIN AND OF SYNTAXIN-1A CAUSE DIFFERENTIAL EFFECTS ON INSULIN GRANULE DOCKING AND FUSION

HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems

(8) **T Fujiwara**, M Snada, T Kofuji, T Yoshikawa and K Akagawa

Eur. J. Neurosci., 32: 99-107 (2010)

[学会発表] (計 15件)

(1) 日本神経化学会 2012 神戸

Glial cells from STX1B-KO mice were less effective on neuronal survival than WT

T Kofuji, **T Fujiwara**, T Mishima and K Akagawa

(2) 日本神経科学会 2012 名古屋

DA release in STX1B heterozygous mutant mice was increased *in vivo*, but not *in*

vitro.

T Fujiwara, T Kofuji, T Mishima and K Akagawa

(3) 日本神経科学会 2012 名古屋

Functional differences between syntaxin1A and syntaxin1B in fast synaptic transmission.

T Mishima, **T Fujiwara**, M Sanada T Kofuji, and K Akagawa

(4) 日本生理学会 2012 松本

Diminishment of the cortical signal propagation in HPC-1 / syntaxin 1A knockout mice

M Osanai, A Matsumura, **T Fujiwara**, I Mori, K Akagawa, T Yagi

(5) 日本生理学会 2011 横浜

The genetic analysis of HPC-1/STX1A and STX1B revealed the distinctive functions *in vivo*.

T Fujiwara, T Kofuji, T Mishima and K Akagawa

(6) 日本神経科学会 2011 横浜

Diminishment of the cortical signal propagation in HPC-1 / syntaxin 1A knockout mice

M Osanai, A Matsumura, **T Fujiwara**, I Mori, K Akagawa, T Yagi

(7) 日本神経科学会 2011 横浜

A study on the neuronal phenotype of syntaxin1B knockout mice: implication of differential role of syntaxin1A and syntaxin1B in synaptic transmission

T Mishima, **T Fujiwara**, M Sanada, T Kofuji, K Akagawa

(8) 日本神経科学会 2011 横浜

Distinct roles of HPC-1/STX1A and STX1B in neuronal survival

T Kofuji, **T Fujiwara**, M Sanada, T Mishima, K Akagawa

(9) 日本生化学会 2011 京都

Analyses of insulin-granule docking and fusion in Granuphilin- and/or Syntaxin-1a-knockout mice

R Ishizaki, H Wang, **T Fujiwara**, K Akagawa, and T Izumi

(10) 統合医療機能性食品国際会議 2011 札幌

oligonol の老化促進モデルマウスの認知機能障害に対する予防効果と海馬におけるターゲット分子の同定

櫻井拓也、北館健太郎、西岡浩、若命浩二、藤井創、小笠原準悦、木崎節子、石橋義永、**藤原智徳**、赤川公朗、中野法彦、井澤鉄也、大

野秀樹

(11) 日本予防医学学会 2011 東京
oligonol は神経細胞において小胞体ストレスを減弱させる

櫻井拓也、北舘健太郎、西岡浩、若命浩二、藤井創、小笠原準悦、石橋義永、木崎節子、**藤原智徳**、赤川公朗、炭谷由計、石田均、芳賀脩光、大野秀樹

(12) 統合医療機能性食品国際会議 2010 札幌

老化促進モデルマウスの認知機能障害に対して oligonol は運動と同様に予防効果を持つ
櫻井拓也、北舘健太郎、西岡浩、若命浩二、藤井創、小笠原準悦、木崎節子、石橋義永、**藤原智徳**、赤川公朗、中野法彦、齊藤大蔵、根本浩一郎、芳賀脩光、大野秀樹

(13) 日本神経科学会 2010 神戸

A study on the phenotype of syntaxin1B knockout mice

T Fujiwara, M Sanada, T Kofuji, T Mishima and K Akagawa

(14) 日本神経科学会 2010 神戸

Impaired induction of long-term potentiation in HPC-1/syntaxin 1A knockout mice may be due to altered catecholaminergic system

T Mishima, **T Fujiwara**, T Kofuji, K Akagawa

(15) 日本生理学会 2010 盛岡

HPC-1/STX1A and STX1B might have distinct roles in neuronal function.

T Fujiwara, T Kofuji, T Mishima, M Kanai-Azuma and K Akagawa

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 智徳 (FUJIWARA TOMONORI)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号 : 90255399

(2) 研究分担者

なし

研究者番号 :

(3) 連携研究者

なし

研究者番号 :