様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　６　月　２３　日現在

機関番号：　３２６１０
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５００４６２

研究課題名（和文）シナプス伝達におけるシンタキシン１Ｂ特異的な生理機能の解明

研究課題名（英文）Functional role of syntaxin 1B in the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses

研究代表者

三嶋　竜弥（Mishima, Tatsuya）

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：４０３１７０９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、シンタキシン1B（STX1B）のシナプス伝達における生理機能を解明するため、STX1Bノックアウトマウスと、STX1AとSTX1Bのダブルノックアウトマウスを用いたシナプス伝達機能の解析を行った。STX1Bノックアウトマウスには頻回刺激に対するシナプス応答の減衰に有意な低下がみられ、STX1Bがシナプス小胞のリサイクリングや細胞内輸送に関与することが示唆された。ダブルノックアウトマウスのシナプス伝達では、Ca2+依存性のシナプス応答の低下や、非同期的なシナプス小胞の放出が観察された。以上の結果から、STX1はCa2+流入に同期したシナプス小胞の放出に重要な事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to examine the physiological function of STX1B, we analyzed the presynaptic properties of glutamatergic and GABAergic synapses in STX1B null mutant and STX1A/1B double null mutant mice. We found that the frequency of spontaneous quantal release was lower and the paired-pulse ratio of evoked postsynaptic currents was significantly greater in glutamatergic and GABAergic synapses of STX1B null neurons. Deletion of STX1B also accelerated synaptic vesicle turnover in glutamatergic synapses and decreased the size of the readily releasable pool in glutamatergic and GABAergic synapses. Moreover, STX1A/1B double null neurons showed reduced and asynchronous evoked synaptic vesicle release in glutamatergic and GABAergic synapses. Our results suggest that although STX1A and 1B share a basic function as neuronal t-SNAREs, STX1B but not STX1A is necessary for the regulation of spontaneous and evoked synaptic vesicle exocytosis in fast transmission.

研究分野：　神経科学

キーワード：　syntaxin1　SNARE　シナプス伝達

１．研究開始当初の背景

syntaxin 1（STX1）は中枢神経系や内分泌細胞に発現する形質膜蛋白質で、シナプス小胞や分泌顆粒の開口放出を制御する。シナプス終末において以下の生理機能を有することが明らかになっている。(1) 神経伝達物質の開口放出機構関連蛋白質としての機能。シナプス小胞や大型有芯小胞の開口放出には SNARE (soluble *N*-maleimide- sensitive factor attachment protein receptors)と呼ばれる３種の蛋白質（syntaxin 1, SNAP-25 and synaptobrevin）の複合体形成が必須である。(2) N-, P/Q-type Ca^{2+} channel に結合し、その機能を膜電位依存的に調節する。(3) 形質膜上のニューロモジュレーター輸送体の活性や局在を制御する。

ヒトにおいては STX1A 遺伝子を含む第 7 染色体の微小欠失によって起こるウィリアムス症候群において精神遅滞や特異的な認知障害がみられ、近年では自閉症や統合失調症との関連も指摘されている。STX1 のアイソフォームである STX1A と STX1B はどちらも 288 アミノ酸からなる形質膜蛋白質で、アミノ酸配列では 82%の相同性を示す。両アイソフォームは一部を除きほとんどの脳内領域に発現しており、細胞内分布の違いも見られない。SNARE 複合体の形成能にも差は見られない。このため両者はシナプス小胞の開口放出に対して同等の機能をもつと考えられてきた。一方、アイソフォーム間で Ca^{2+} channel に対する調節機構が一部異なることや、神経活動の可塑的変化に伴って STX1B の発現量が大きく変化することなどが報告されている。よって STX1A と STX1B の生理機能は多くは共通したものであるが、一部に機能的な差異があるのではないかと考えられる。

申請者らは STX1 の生理機能を詳細に解析するために各アイソフォームのノックアウトマウスの作成に成功した。先に作成できた STX1A ノックアウト（STX1A-/-）マウスを用いて機能解析を行ったところ以下の結果を得た。(1) 基本的な早い興奮性・抑制性シナプス伝達機能は正常であったが、海馬 CA1 領域における長期増強（LTP）に異常が見られた。また、恐怖条件付け学習において記憶の固定、消去過程に異常が見られた [Fujiwara et al. J Neurosci 26:5767, 2006]。さらに STX1A-/-マウスは、(2) 統合失調様の行動を示す他、海馬や視床下部での 5-HT 分泌量が低下しており、選択的 5-HT 再取り込み阻害薬の投与で一部の行動異常に改善が見られた[Fujiwara et al. Eur J Neurosci 32:99, 2010]。加えて、STX1A-/-マウスの海馬では (3) LTP 誘導刺激時のカテコールアミン放出量が減少した結果 cAMP/プロテインキナーゼ A シグナル伝達系が減衰し、LTP 異常が起こることが分かった。この LTP 異常はノルアドレナリンやドーパミンの選択的再取り込み阻害薬の投与で回復した [Mishima et al. J Neurosci, 32:381, 2012]。これらの結果は、STX1A はシナプス小胞ではなく、大型有芯小胞の開口放出に重要であることを示す。つまり、大型有芯小胞を介したモノアミン（5-HT、ノルアドレナリン、ドーパミン）の分泌に異常が生じた結果、シナプス可塑性、記憶・学習行動や社会性行に影響が現れた可能性を強く示唆する。一方、次に作成した STX1B ノックアウト（$STX1B^{-/-}$）マウスは生後一週間程度で致死となり、海馬や小脳の神経発生に異常がみられた。また予備実験の結果、$STX1B^{-/-}$マウスのグルタミン酸作動性シナプス終末の形態に異常があることを確認した。特にアクティブゾーンにドッキングしたシナプス小胞の数が減少していた。さらに興奮性の自発性微小シナプス後電流の頻度が低下していることもあわせて確認している。$STX1A^{-/-}$マウスや、SNAP-25 や synaptobrevin のノックアウトマウスではシナプス形態の変化は起こらない。シナプス小胞のドッキングには Munc-18 や synaptotagmin、rab-3 といった蛋白質が関与していることが知られており、これらの蛋白質との結合能が STX1A と STX1B とで異なる可能性がある。

上記のように STX1A と STX1B のノックアウトマウスの表現形が大きく異なり、特に $STX1B^{-/-}$マウスにはシナプス伝達機能に関する異常が見られたことから、シナプス小胞の開口放出に対する STX1B 生理機能を検証する。

２．研究の目的

開口放出機構（SNARE 機構）はその大筋の機序は解明されているが、細かい調節部分では謎が多い。SNARE 蛋白質の中でも

syntaxin 1（STX1）には 2 つのアイソフォーム（STX1A と STX1B）があり、両者は同等の生理機能を持つと考えられている。このため SNARE 機構の解析の大部分は STX1A が用いられてきた。申請者らは各アイソフォームのノックアウトマウス（STX1A$^{-/-}$ or STX1B$^{-/-}$）を作成し機能解析を行ったところ、STX1A$^{-/-}$マウスは大型有芯小胞の放出に異常を示すこと、STX1B$^{-/-}$マウスは生後数日で死亡し、神経発生や機能に異常があることを確認した。そこで本研究ではシナプス伝達機能において重要なのは STX1B であると仮定し、STX1B$^{-/-}$マウスの神経表現型を解析することによりシナプス伝達における STX1 の機能を解明することを目的とする。

（1）シナプス小胞の Ca^{2+}-independent な自発性放出に対する STX1B の機能解析

STX1B の欠損は自発性開口放出を抑制し、即時放出可能なシナプス小胞数を減少させると予想される。そのためグルタミン作動性、および GABA 作動性の自発性微小シナプス後電流の頻度や浸透圧刺激に対する応答を解析する。

（2）シナプス小胞の Ca^{2+}-dependent な誘発性放出に対する STX1B の機能解析

STX1B の欠損は活動電位依存型の開口放出を抑制し、放出確率を低下させると予想される。そのためグルタミン作動性、および GABA 作動性の誘発性シナプス後電流の振幅やペアドパルス比を解析する。

（3）シナプス小胞のターンオーバーに対する STX1B の機能解析

STX1B の欠損はシナプス小胞のエンドサイトーシスを抑制し、ターンオーバーが遅延すると予想される。そのため高頻度の頻回刺激に対する応答パターンの変化を解析する。

（4）STX1A と STX 1B のダブルノックアウトマウスのシナプス機能の解析

シナプス小胞のドッキングおよび開口放出には STX1 が必須であると予想される。そのため STX1A と STX1B のダブルノックアウトマウスの自発性、誘発性の開口放出が起こっているのかを観察する。

３．研究の方法

STX1B$^{-/-}$マウスの神経表現型は STX1A や他の SNARE 蛋白質のノックアウトマウスと大きく異なる。これがシナプス伝達機能にどのように影響しているのかを解析する。STX1B 特有の生理機能を解析するために以下の 3 つの機能解析を行う。

（1）シナプス小胞の Ca^{2+}-independent な自発性放出に対する STX1B の機能解析

方法：海馬初代分散培養系を用い、グリアフィーダー細胞上に神経細胞を低密度培養する。培養開始後 12 日程度経過し、近接する神経細胞間で相互にシナプス結合ができたものを実験に用いる。ホールセル記録を行い、興奮性・抑制性の微小シナプス後電流の波形や頻度･振幅等を解析し、開口放出の kinetics、quantal content の変化などを推定する。また、0.5M sucrose 溶液を樹状突起部に投与し、即時放出可能なシナプス小胞による応答を記録する。反応の大きさからシナプス小胞のプールサイズを推定する。

（2）シナプス小胞の Ca^{2+}-dependent な誘発性放出に対する STX1B の機能解析

方法： グリアフィーダー細胞上に神経細胞を低密度培養する。近接した 2 つの神経細胞から同時にホールセル記録を行い、一方をシナプス前神経として電気刺激することで、もう一方から興奮性もしくは抑制性の誘発性シナプス後電流を観察する。誘発性シナプス後電流の波形や振幅、ペアドパルス比からシナプス小胞の放出確率や誘発性放出の kinetics を解析する。細胞外 Ca^{2+}濃度を変化させたときの誘発性シナプス後電流の振幅、ペアドパルス比の変化を解析する。

（3）シナプス小胞のターンオーバーに対する STX1B の機能解析

方法：低密度培養した 2 つの神経細胞から同時記録を行う。一方をさまざまな頻度（1～50 Hz 程度）で長期間刺激したときのシナプス応答の振幅の経時変化を解析してシナプス小胞のリサイクリング速度や即時放出可能なプールやリザーブプールのサイズを検討する。

（4）STX1A と STX 1B のダブルノックアウトマウスのシナプス機能の解析

方法：他の SNARE である SNAP-25 と synaptobrevin のノックアウトマウスはどちらも胎生致死であるため STX1 のダブルノックアウトマウスも同様であると予想される。このため胎生期 14.5 日程度の海馬から分散培養神経を作成する。実験標本が作成できれば上記（1）～（3）と同様の方法でシナプス

機能の解析を行う。

４．研究成果

（1）シナプス小胞の Ca^{2+}-independent な自発性放出に対する STX1B の機能解析

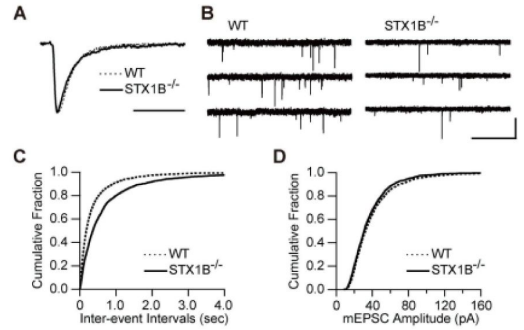

図 1　STX1B ノックアウトマウスでは興奮性自発性微小シナプス後電流の頻度が低下していた。

自発性微小シナプス後電流の波形や発生頻度を解析したところ、STX1B ノックアウトマウスでは興奮性・抑制性の自発性微小シナプス後電流の頻度が低下していた（図 1）。また、浸透圧刺激に対する応答が減少していたことから即時放出可能なシナプス小胞のプールサイズが低下していることが示唆された。

（2）シナプス小胞の Ca^{2+}-dependent な誘発性放出に対する STX1B の機能解析

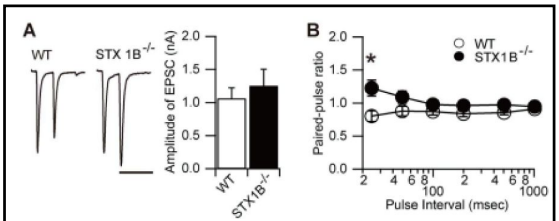

図 2　STX1B ノックアウトマウスでは興奮性誘発性シナプス後電位のペアドパルス比が有意に低下していた。

ダブルパッチクランプ法により誘発性シナプス後電位を観察した。興奮性・抑制性の誘発性シナプス後電位の波形や振幅に異常は見られなかったが、ペアドパルス比に有意な低下がみられた（図 2）。特に刺激間隔が 25 ミリ秒程度の短い間隔の時に差が顕著であった。

（3）シナプス小胞のターンオーバーに対する STX1B の機能解析

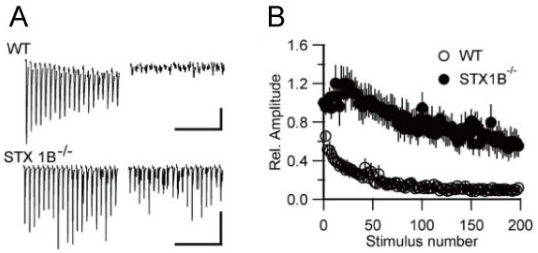

図 3　高頻度頻回刺激に対する応答パターンに異常がみられた。

STX1B ノックアウトマウスでは 1Hz での頻回刺激行った際の応答パターンに変化は見られなかったが、20Hz で頻回刺激を行った際の応答パターンに異常がみられた（図 3）。刺激開始直後には一時的にシナプス応答の増強が起こり、その後の応答にあまり減衰がみられなかった。

（4）STX1A と STX 1B のダブルノックアウトマウスのシナプス機能の解析

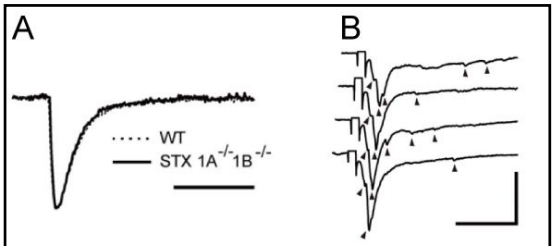

図 4　STX1A と STX 1B のダブルノックアウトマウスのシナプス応答

ダブルノックアウトマウスで観察された興奮性・抑制性の誘発性シナプス後電位は野生型のものと比べて波形に違いは見られなかったが、振幅が有意に低下していた。また、活動電位に対して非同期的にシナプス小胞が放出されていることが観察された（図 4）。興奮性・抑制性の自発性シナプス後電流の頻度に差は見られなかったが、振幅が有意に低下していた。

以上の結果から、STX1B が STX1A とは異なる生理機能を持つことが分かった。特に、STX1B が自発性・誘発性のシナプス伝達により重要な機能を果たし、シナプス小胞のリサイクリングや細胞内輸送にも関与していることが示唆された。

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２件）
① Mishima T, Fujiwara T, Sanada M, Kofuji T, Kanai-Azuma M, Akagawa K. Syntaxin 1B, but not syntaxin 1A, is necessary for the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses. PLoS One. 2014 9(2):e90004.
doi: 10.1371/journal.pone.0090004. 査読有り

② Kofuji T, Fujiwara T, Sanada M, Mishima T, Akagawa K. HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. J Neurochem. 2014 130(4):514-25. doi: 10.1111/jnc.12722. 査読有り

〔学会発表〕（計６件）
① 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ンタキシン1Bの生理機能」、日本生理学会、2014年03月16日～2014年03月18日、鹿児島
② 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」、日本生理学会、2014年03月16日～2014年03月18日、鹿児島
③ 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」、日本神経科学会、2013年06月20日～2013年06月23日、京都
④ 須賀 圭、齋藤 綾子、三嶋 竜弥、赤川 公朗 「神経細胞における小胞体ストレスはAβ分泌の抑制とSyntaxin5を含むER-Golgi SNAREの発現量の上昇を引き起こす」、日本神経科学会、2013年06月20日～2013年06月23日、京都
⑤ 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/シンタキシン1Aとシンタキシン1Bの異なる役割」、日本神経科学会、2013年06月20日～2013年06月23日、京都
⑥ 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ンタキシン1Aとシンタキシン1Bの機能的差異」、日本神経科学会、2012年09月18日～2012年09月21日、名古屋

６．研究組織
(1)研究代表者
三嶋 竜弥（MISHIMA, Tatsuya）
杏林大学・医学部・助教
研究者番号：４０３１７０９５

(2)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