

令和元年6月13日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04675

研究課題名(和文) 蛍光プローブによるシナプス小胞動態の可視化解析

研究課題名(英文) Imaging analysis of synaptic vesicle functions using fluorescent probes

研究代表者

高森 茂雄 (Takamori, Shigeo)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：10397002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経終末からの神経伝達物質の放出は、シナプス小胞の開口放出によって行われるが、小胞の動態は細胞内反応であるがために測定方法に限界があった。本研究では、pH感受性蛍光タンパク質をシナプス小胞に適用し、興奮性伝達物質と抑制性伝達物質の再充填の異なる仕組み、神経終末におけるカルシウム恒常性の仕組み、活動依存的な小胞動員に関わるSNAREタンパク質の同定など、様々な素過程を分子レベルで明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内の情報伝達はシナプスという特徴的な細胞接着構造で行われており、シナプスでの情報伝達の破綻は、てんかんや自閉症、統合失調症などの脳疾患の原因となることがわかってきた。一方で、シナプス伝達の仕組みや、それを支える個々の分子の働きについては不明な点が多い。今回の我々の研究成果は、シナプス伝達の仕組みを理解する上で有用な知見の一端であり、将来的には、脳疾患とその治療を考える上で基盤となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)： Neurotransmitter release from the presynaptic terminals is elicited by the exocytosis of synaptic vesicles. However, it has been challenging to understand underlying molecular mechanisms due to the limited technologies to track them in vivo. We have applied pH-sensitive fluorescent proteins placed in the lumen of synaptic vesicles in cultured neurons derived from rodent hippocampus, and found various novel aspects of molecular physiology of presynaptic terminals, including the distinct molecular mechanisms differentiating uptake of the excitatory and the inhibitory neurotransmitters, proteins responsible for Ca<sup>2+</sup> homeostasis and a unique SNARE protein responsible for activity-dependent mobilization of synaptic vesicles.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス小胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経終末からの神経伝達物質の放出は、我々哺乳類脳内のシグナル伝達に必要な過程であるが、シナプス小胞を取り巻く諸処の素過程は、細胞内反応であるがために測定方法に限界があり、詳細は不明な点が多い。一方で、1998年に開発された pH 感受性緑色蛍光タンパク質の改良とシナプス小胞への応用は、その後更なる改良や詳細な解析法の開発を経て、近年のシナプス小胞動態解析の中心的な研究戦略の一つとなっている。我々は、最近、新規小胞内 pH プローブを海馬神経初代培養に適用して、神経伝達物質再充填の駆動力であるプロトンの小胞内動態を定量的に測定する方法を確立した。また、シナプス小胞に存在する非典型的 SNARE タンパク質群のシナプス動態を網羅的に解析し、SNARE タンパク質種によって特徴的な exocytosis を起こす可能性を示唆する予備データを得た。このように、小胞内 pH プローブを用いたシナプス小胞動態可視化技術により、従来知られていなかったシナプス小胞機能の素過程が明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、各種蛍光プローブを用いてシナプス小胞動態、シナプス終末における神経活動の動態を可視化することにより、神経伝達物質再充填機構や活動依存的な小胞の放出特性を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の3項目を掲げた(図1)。

- (1) 小胞酸性化と神経伝達物質再充填の動態解析：エンドサイトーシスにより新たにシナプス終末で合成されたシナプス小胞は、プロトンポンプによる酸性化、プロトン勾配を駆動力とする神経伝達物質輸送隊による神経伝達物質の再充填を経て、次の放出に備える。一方、脳から精製したシナプス小胞膜画分を用いた生化学的な実験結果から、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性神経伝達物質である GABA では、輸送

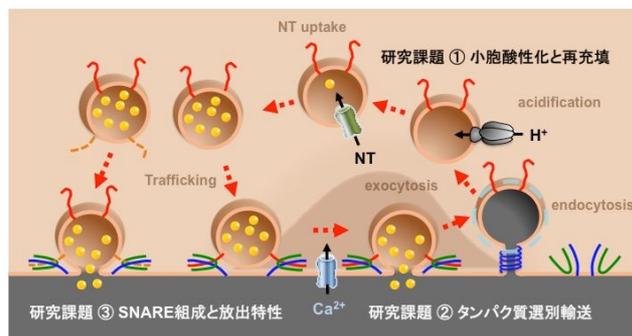


図1. 研究課題の概念図

におけるプロトン要求性が異なることが示唆されていた。また、これらの神経伝達物質の輸送の際にプロトンがどのように共役するかについては、長年謎であった。本項目では、我々が確立した蛍光プローブによるシナプス小胞内 pH 定量解析法(Egashira et al., J Neurosci, 2015)を用いて、グルタミン酸と GABA を含む小胞における小胞内 pH と酸性化動態の違いを明らかにすることを目的とした。

- (2) 活性帯におけるタンパク質の選別輸送機構の解明：シナプス小胞の放出部位は活性帯 (active zone) と呼ばれる局所に限定される。そこでは、シナプス小胞上のシナプトプレビン VAMP2 と形質膜の Syntaxin 1, SNAP-25 が複合体を形成して、刺激依存的な膜融合を引き起こす。一方、エキソサイトーシス後は、VAMP2 のみがシナプス小胞に回収され、Syntaxin 1, SNAP-25 は形質膜に留まる。本項目では Syntaxin 1 に注目し、形質膜に留まる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。
- (3) SNARE 多様性による放出特性規定メカニズムの解明：げっ歯類脳由来のシナプス小胞のプロテオーム解析から、シナプス小胞のエキソサイトーシスに必要な SNARE タンパク質であるシナプトプレビン VAMP2 以外に、細胞内の様々なオルガネラの膜融合に関係している約 20 種類の SNARE タンパク質が検出された(Takamori et al., Cell, 2006)。本項目では、SNARE タンパク質の種類と小胞の放出特性の規定メカニズムの一端を明らかにするために、個々の SNARE タンパク質のシナプス内局在と刺激依存的な動態を包括的に精査し、その共通点と特異点を明らかにすることを目的とした。

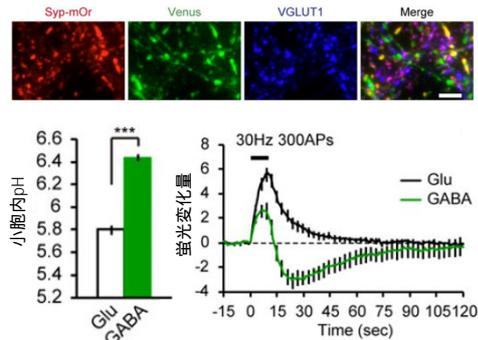
## 3. 研究の方法

本研究課題を通じて、着目する小胞タンパク質の小胞内腔側に pH 感受性蛍光タンパク質を融合させ、海馬由来神経初代培養細胞に遺伝子導入して、刺激依存的な挙動をライブイメージングによって解析した。また、必要に応じて遺伝子欠損マウスを利用した解析を行った。

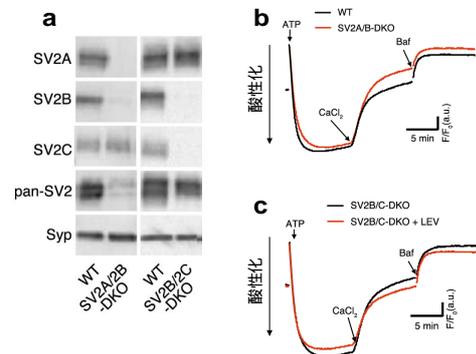
## 4. 研究成果

- (1) 抑制性神経伝達物質のシナプス小胞再充填メカニズムと速度の解明：海馬神経初代培養細胞の GABA を含むシナプス小胞では、定常状態における小胞内 pH が約 6.4 であり、グルタミン酸を含むシナプス小胞(pH 5.8)よりも著しく高いことが明らかになった。また、小胞

内腔の緩衝能 (pH を 1 変化させるのに必要なプロトン濃度) についても、グルタミン酸小胞が約 58mM/pH なのに対して、GABA 小胞は 25mM/pH と大きな違いが見られた。興味深いことに、エキソサイトシス後の小胞内酸性化の過程を観察すると、グルタミン酸ニューロンでは一次の指数関数的な蛍光光度の減衰が見られるのに対して、GABA ニューロンでは一旦ベースラインよりも下降した後に回復する二層性の変化が見られた(図2)。これらの GABA 含有小胞の特性が GABA 再充填過程に寄与しているか否かを検証するために、同様の測定を小胞型 GABA 輸送体(VGAT)欠損ニューロンで行なった結果、定常状態における高 pH と二層性の酸性化過程は、GABA 再充填過程に起因することが判明した。また、野生型 GABA ニューロンと VGAT 欠損ニューロンの再酸性化過程を比較することにより、GABA 輸送中の小胞内 pH の変化と速度を求めた結果、(1) GABA 充填が小胞内のアルカリ化と並行して起こることから VGAT は GABA/H<sup>+</sup>交換体であること、(2)生理的な温度における GABA 充填の時定数は 1.5 秒程度であることが示唆された。これらの研究成果をまとめ、PNAS 誌に発表した(Egashira et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A., 2016)。また、本項目を遂行する中で開発したグルタミン酸ニューロン特異的な遺伝子発現を可能にするレンチウイルス・ベクターの開発結果については、Scientific Reports 誌に発表した(Egashira et al., Sci Rep, 2018)。



- (2) 活性帯におけるタンパク質の選別輸送機構の解明：野生型 Syntaxin 1A-pHluorin と変異体 Syntaxin 1A-pHluorin を作成し、それらの刺激依存的な挙動を解析したところ、Habc 部位と SNARE 部位をつなぐリンカー部位に変異を加えた変異体で、刺激後にエンドサイトシスによる細胞内移行を認めた。しかしながら、シグナル/ノイズ比が非常に低いため、現状のイメージング法では詳細を調べるのが困難だと判断した(Mori et al., 未発表)。
- (3) Q-SNARE タンパク質 Syntaxin 7 が規定する高頻度刺激時のみ動員されるシナプス小胞群の存在：シナプス小胞膜に存在するエンドソーム由来 SNARE を網羅的に調べたところ、Syntaxin 7-pHluorin は 10 Hz 以下の刺激では反応しないが、20 Hz 以上の強い刺激を与えると動員されるシナプス小胞に存在していることが明らかになった。Syntaxin 7 含有小胞のエキソサイトシスは、Ca<sup>2+</sup>イオン濃度に依存し、アクチン動態にも依存していることがわかった。また、Syntaxin 7 小胞の動員は、Syntaxin 7 の N 末端部位が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。本項目は、現在論文投稿を目指して継続中である (Mori et al., 投稿準備中)。
- (4) 形質膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase がシナプス小胞の Ca<sup>2+</sup>輸送を司る：シナプス小胞膜には ATP 依存的に Ca<sup>2+</sup>を輸送するタンパク質が存在することが知られていたが、その分子実体については諸説あった。特に、1980 年後半にシナプス小胞膜タンパク質として同定された SV2 (Synaptic Vesicle Glycoprotein 2)は、その欠損マウスの解析結果から、シナプス小胞膜上の Ca<sup>2+</sup>輸送体と目されていた。一方、我々の生化学的解析から、小胞膜上の Ca<sup>2+</sup>輸送体は高親和性の Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体であり、薬理的な実験から形質膜 Ca<sup>2+</sup>-ATPase (PMCA)が候補として浮上した。また、SV2 欠損マウスから得たシナプス小胞画分で、正常な ATP 依存的 Ca<sup>2+</sup>取り込み活性と Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>交換体活性が観察されたことから、SV2 が小胞の主要な Ca<sup>2+</sup>輸送体として寄与していない可能性が示唆された。次に、従来形質膜に存在すると考えられてきた PMCA がシナプス小胞に存在するか否かを検証するために、PMCA1 の小胞内腔部位に pH 依存性緑色蛍光タンパク質 (pHluorin) を融合させたレンチウイルス・ベクターを作成し、海馬神経初代培養細胞に発現させたところ、PMCA1-pHluorin は主にシナプス終末の酸性オルガネラに存在し、刺激依存的にリサイクリングすることが判明した。以上のことから、シナプス小胞膜にある Ca<sup>2+</sup>輸送体は PMCA であることが強く示唆された。これら研究成果は、Scientific Reports 誌に発表した(Ono et al., Sci Rep, 2019)。



上記の原著論文発表につながる成果に加えて、神経伝達物質再充填を規定する因子に関する総説、小胞型グルタミン酸トランスポーターが内含する塩化物イオン透過性に関する総説、シナ

プス小胞タンパク質がエンドサイトーシスの際に新規小胞に回収されるメカニズムに関する総説、計3篇を Invited Review として上梓した。また、日本語の解説文を2篇執筆した。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計8件)

Ono Y, Mori Y, Egashira Y, Sumiyama K, Takamori S. Expression of plasma membrane calcium ATPases confers  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange in rodent synaptic vesicles. *Sci Rep* 9(1):4289 (2019) doi: 10.1038/s41598-019-40557-y.

Egashira Y, Mori Y, Yanagawa Y, Takamori S. Development of lentiviral vectors for efficient glutamatergic-selective gene expression in cultured hippocampal neurons. *Sci Rep*. 8(1):15156 (2018). doi: 10.1038/s41598-018-33509-5.

高森茂雄 トランスポーターの基礎 小胞型グルタミン酸トランスポーター *Clinical Neuroscience* 36(6) 670-672, 2018.

Mori Y, Takamori S. Molecular Signatures Underlying Synaptic Vesicle Cargo Retrieval.

*Front Cell Neurosci*. 11:422 (2018). doi: 10.3389/fncel.2017.00422.

江頭良明, 高森茂雄 神経伝達物質のシナプス小胞内輸送機構 *生化学* 89(6) 856-860, 2017.

Egashira Y, Takase M, Watanabe S, Ishida J, Fukamizu A, Kaneko R, Yanagawa Y, Takamori S. Unique pH dynamics in GABAergic synaptic vesicles illuminates the mechanism and kinetics of GABA loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(38):10702-7 (2016). doi: 10.1073/pnas.1604527113.

Takamori S. Presynaptic Molecular Determinants of Quantal Size. *Front Synaptic Neurosci*. 8:2 (2016). doi: 10.3389/fnsyn.2016.00002.

Takamori S. Vesicular glutamate transporters as anion channels? *Pflugers Arch*. 468(3):513-8 (2016). doi: 10.1007/s00424-015-1760-y.

### 〔学会発表〕(計22件) うち口頭発表10件(詳細は以下のリスト) ポスター発表12件。

Takamori S. Imaging synaptic vesicle functions. JSPS Core-to-Core Symposium, Kyoto, Japan (2018).

Mori Y. Endosomal Q-SNARE Syntaxin 7 specifies a subpopulation of recycling synaptic vesicles preferentially responsive to high frequency stimulation. Joint annual meeting of 51<sup>st</sup> JSDB and 70<sup>th</sup> JSCB. Tower-Hall, Funabori, Tokyo, Japan (2018).

Takamori S. Diverse synaptic vesicle pools revealed by fluorescent imaging. Forefront of Neurotransmitter Release and Calcium Channel Signaling. Tokyo Medical University, Tokyo, Japan (2018).

森靖典. 神経終末におけるシナプス小胞のリサイクリング経路の解析. ConBio 2017 第40回日本分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会 神戸ポートアイランド 兵庫 (2017).

Mori Y. Q-SNARE Syntaxin 7 specifies rapidly replenishing synaptic vesicles during high activity. JSPS Core-to-Core Symposium on 'Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy'. Doshisha Biwako Retreat Center, Otsu, Japan (2017).

高森茂雄. 神経伝達物質放出を支えるタンパク質の多様性. 第26回神経行動薬理若手研究者の集い 福岡 (2017).

Egashira Y. Vesicular GABA transport mechanism illuminated by pH monitoring of the synaptic vesicles. Seminar at Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) (Host: Volker Haucke), Berlin, Germany (2017).

Takamori S. Imaging synaptic vesicle functions at the presynaptic terminals. Seminar at Neurocure (Host: Christian Rosenmund), Berlin, Germany (2017).

Takamori S. Imaging synaptic vesicle functions at the presynaptic terminals. JSPS Core-to-Core Program & OIST joint Symposium. OIST, Okinawa, Japan (2016).

江頭良明. シナプス小胞内 pH イメージングによる抑制性伝達物質充填機構の解析 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」 生理学研究所、愛知 (2016).

### 〔その他〕

ホームページ等 <https://takamori-lab.wixsite.com/takamori-lab>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 森 靖典

ローマ字氏名: Yasunori Mori

研究協力者氏名：江頭 良明  
ローマ字氏名：Yoshihiro Egashira

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、研究者個人に帰属されます。