

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03330

研究課題名(和文)興奮性神経伝達物質グルタミン酸のシナプス小胞再充填機構の包括的解明

研究課題名(英文) Comprehensive understanding of refilling mechanism of excitatory neurotransmitter glutamate into synaptic vesicles

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の興奮性神経伝達を担うグルタミン酸は、VGLUTと呼ばれるタンパク質によってシナプス小胞内に充填されます。今回、我々はVGLUTの発現が減弱したマウスの聴覚系巨大シナプスの機能を調べた結果、小胞へのグルタミン酸充填速度が低下し、その結果シナプス伝達の持続時間が短くなることを発見しました。また、マウス海馬培養細胞を用いたシナプス小胞イメージングの結果から、高頻度の刺激が起こった際には、VGLUTを含む一部のシナプス小胞が選択的に動員され、その動員には膜融合に関わるSyntaxin 7が関わっていることを見出しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

統合失調症、自閉症、認知症などの脳神経疾患の多くは、シナプス異常が原因で起こることがわかってきており、総称してシナプトパチーと呼ばれています。これらの病気の発症予防や治療法を確立するためには、シナプス伝達がどのように起こっているか分子レベルで解明することが必要です。今回の我々の研究成果では、VGLUT及びSyntaxin 7をはじめとした脳での発現が低いSNAREタンパク質の働きがシナプス伝達効率の維持に重要な役割を果たしていることがわかりました。これらの知見を蓄積することは、病態の理解、薬物候補のアセスメントの厳格化に寄与することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：The vast majority of excitatory synaptic transmission in our brain is mediated by the principal neurotransmitter glutamate, which is accumulated into presynaptic vesicles (SVs) by vesicular glutamate transporters (VGLUTs). We have discovered that the reduction of VGLUT expression slowed the rate of glutamate transport into SVs, consequently resulting in synaptic failure during high repetitive stimulation. In a separate study, we found that SVs are not functionally homogeneous, but a subpopulation of SVs defined by the endosomal SNARE, Syntaxin 7, undergoes exocytosis preferentially during high repetitive stimulation. Thus, our studies reveal that glutamate refilling into SVs can be a rate-limiting step for synaptic transmission and that the segregation of SV pools by endosomal SNAREs can be one of the key features for functional heterogeneity of individual synapses.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス シナプス小胞 グルタミン酸 神経伝達物質 エンドサイトーシス クラスリン 海馬

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類中枢神経系における主要な興奮性神経伝達を媒介する神経伝達物質はグルタミン酸であり、実に80%以上ものニューロンがグルタミン酸の放出と受容を介して情報を伝達している。シナプス終末からのグルタミン酸放出には、シナプス小胞膜上に存在する小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の働きでグルタミン酸がシナプス小胞内に濃縮される過程が必須である。したがって、学習・記憶、認知などの脳高次機能の発現にはVGLUTの働きは欠かせない。実際に統合失調症やアルツハイマー病患者の脳内ではVGLUTの発現量の変化が認められている。これまでの研究で、ヒトを含めた哺乳類脳内には3つのVGLUTイソ型(アミノ酸配列が若干異なる類似タンパク質)が存在し、それらのタンパク質を指標とすることで、脳内のグルタミン酸部位を可視化することができるようになった。一方、VGLUTタンパク質によるグルタミン酸輸送機構の詳細や、VGLUT発現量やイソ型の違いとシナプス小胞放出特性の関係、活動依存的なVGLUTのリサイクリングの分子機構などの詳細は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、VGLUTに着目し、(1)VGLUTがどのような力(駆動力という)でグルタミン酸を輸送しているのか?(2)VGLUTの発現量が下がると興奮性神経伝達にどのような影響を及ぼすのか?(3)VGLUTタンパク質の活動依存的な挙動はどのような分子機構で制御されており、その破綻によって神経伝達にどのような影響があるのか?など、VGLUTの特性に関する基礎知見を得ることを目的とした。これらの詳細な分子機構を明らかにすることによって、脳内興奮性神経伝達を人為的に制御したり、機能を制御するためのターゲット分子の発見につながる。

## 3. 研究の方法

野生型およびVGLUT1欠損マウスの胎仔から海馬神経初代培養細胞(分散培養・単一オータパス培養)を調整し、蛍光タンパク質プローブや遺伝子ノックダウンはレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。シナプス終末に直接操作を加えることが可能な聴覚系巨大シナプスを用いた実験では、生後3週間程度のマウスから脳幹スライス標本を作成して用いた。シナプス機能評価、分子動態の評価はパッチクランプ法と蛍光ライブイメージングを行った。また、必要に応じて蛍光抗体染色法を組み合わせ、タンパク質の量や分布を調べた。

## 4. 研究成果

(1)聴覚系の速い神経伝達の維持にはグルタミン酸の迅速な再充填が重要である

VGLUTタンパク質がないと脳内の興奮性シナプス伝達が消失することは知られていたが、VGLUTの発現量がシナプス伝達の律速段階になっているかどうかは不明であった。本項目では、聴覚系リレーシナプスであるヘルド萼状シナプス(calyx of Held synapse)でVGLUT1を欠損した時のシナプス特性の変化を電気生理学的手法で詳細に調べた。ヘルド萼状シナプスでは本来VGLUT1とVGLUT2の両方が発現しており、VGLUT1遺伝子のみを欠損させてもシナプス伝達の基本性能には大きな変化が認められない。ところが、高頻度かつ持続的なシナプス入力が入った場合、VGLUT1欠損シナプスでは忠実なシグナル伝達の維持できないことがわかった。更に、我々が独自に開発した手法でグルタミン酸がシナプス小胞に輸送される過程を継続的に観察したところ、VGLUT1欠損シナプスではグル

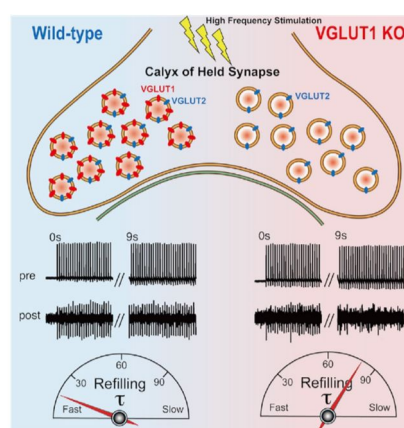


図1: 今回の発見の概念図。VGLUT1を欠損したマウスのヘルド萼状シナプスではグルタミン酸のシナプス小胞への再充填速度(Refilling)が低下し、その結果シナプス応答の維持が損なわれる。

タミン酸の充填速度が4分の1程度にまで低下することがわかった(図1)。今回の研究は聴覚系のシナプスをモデルとして実験を行ったが、アルツハイマー病・パーキンソン氏病など様々

な脳神経疾患において、VGLUT の発現量が脳部位特異的に増加したり低下したりすることが知られている。従って、本研究成果は、脳神経疾患に伴う VGLUT 発現低下がシナプス機能に及ぼす影響を端的に反映していると言える。本研究は、同志社大学生命医科学部・堀哲也准教授、独マックスプランク研究所実験医学研究所 Nils Brose 教授と行った国際共同研究で、その成果は米国科学誌 *Cell Reports* 誌 (2020 年) に発表した。

### (2) クラスリン・アダプタータンパク質 AP-2 の働きによりシナプス小胞膜上の VGLUT 数が保たれる

シナプス小胞に存在するタンパク質は、エキソサイトーシスによって形質膜に一時的に移動するが、その後エンドサイトーシスによって形質膜から回収される。このエンドサイトーシスの過程は、長らくクラスリン被覆によって形質膜上行われると信じられてきたが、哺乳類に取手の生理的な温度(35 度程度)ではクラスリンが不要であることがわかってきた。本研究では、VGLUT1 タンパク質に pH 感受性蛍光タンパク質を融合させたプローブを海馬由来の神経培養細胞に発現させ、エンドサイトーシスによって回収される速度を測定した。その結果、生理的な温度における VGLUT1 の回収にはクラスリンが不要であるものの、VGLUT1 とクラスリンを繋げる役目を果たしていると考えられるクラスリン・アダプタータンパク質(AP-2)との直接の結合が、VGLUT1 タンパク質の回収に重要な役割を果たすことがわかった(図2)。最近の研究では、AP-2 に変異があるとてんかんを呈することが示唆されていることから、AP-2 の機能破綻の結果として、小胞へのグルタミン酸充填の遅延に伴う興奮性神経伝達の低下が考えられた。本研究は、独・分子薬理学研究所 Volker Haucke 教授との国際共同研究で、その成果は国際オンラインジャーナル *eLife* 誌(2022 年)に発表した。

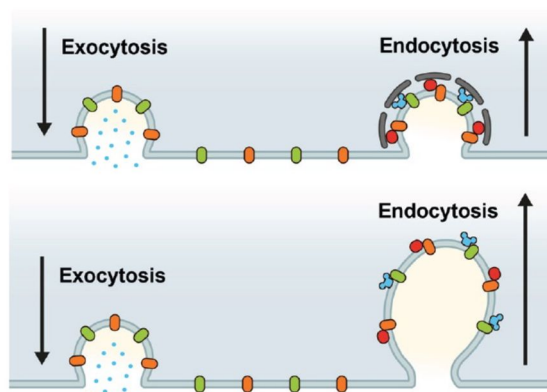


図2: AP-2(水色)はクラスリン依存的なエンドサイトーシス(上)が行われるときにクラスリンとVGLUTを結合させることで、VGLUTの回収を助ける。今回の我々の研究では、クラスリンを用いないエンドサイトーシス時(下)においてもVGLUT(緑)と結合して回収を促進していることがわかった。

### (3) VGLUT がグルタミン酸を濃縮する際の駆動力を理解する

VGLUT によるグルタミン酸のシナプス小胞への輸送は、液型プロトンポンプによって小胞内外に形成されるプロトン勾配によって駆動される。ところが、プロトン勾配には2つの成分、すなわち電気的な勾配(膜電位)と化学的な勾配(pH 勾配)が想定されるが、どちらが重要かについては長らく論争的である。本項目では、野生型ニューロンとVGLUT 欠損ニューロンにおける小胞内プロトン動態の違いを調べることで、新たな知見を得ることを目指した。精度の高いデータを取得するためには、①グルタミン酸放出を完全に欠損した培養ニューロンの調整、②グルタミン酸性ニューロンに限定した小胞内 pH プローブの導入、の2点が必要であり、これまでに双方の最適化を進めている。我々が最適化を図った神経培養細胞での小胞内 pH 定量法に関しては、*Methods in Molecular Biology ~ Synaptic Vesicles* (2022 年)に発表した。

(4) VGLUT タンパク質リサイクリングおよびグルタミン酸再充填機構解明に向けたその他の取り組み: グルタミン酸シナプス伝達の分子機構を理解するためには、シナプス小胞のリサイクリングを司る分子機構、シナプス小胞を構成する分子の理解、VGLUT タンパク質の回収を制御する分子機構などを理解することが必要となる。これらの研究から、①シナプス終末に存在するエンドソーム様 SNARE タンパク質 Syntaxin 7 が頻回刺激に応答するシナプス小胞プールの形成に必要なこと (*Commun Biol* 誌, 2021 年)、②シナプス小胞次世代プロテオーム解析による構成タンパク質の網羅的定量 (*PNAS* 誌, 2020 年)、③VGLUT1-C 末に結合するタンパク質の網羅的プロテオーム解析から、AP-2 よりも endophilin 1 の方が結合しやすいこと(未発表)等の知見を得た。更に endophilin 1 の性質を調べた結果、液-液相分離を起こし、他のエンドサイトーシスに関わるタンパク質群を集積する能力を有することを見出した(論文投稿準備中)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Egashira Yoshihiro, Katsurabayashi Shutaro, Takamori Shigeo	4. 巻 2417
2. 論文標題 Quantitative Analysis of Presynaptic Vesicle Luminal pH in Cultured Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 45 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1916-2_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hori Tetsuya, Takamori Shigeo	4. 巻 15
2. 論文標題 Physiological Perspectives on Molecular Mechanisms and Regulation of Vesicular Glutamate Transport: Lessons From Calyx of Held Synapses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 811892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.811892	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lopez-Hernandez Tania, Takenaka Koh-ichiro, Mori Yasunori, Kongpracha Pornparn, Nagamori Shushi, Haucke Volker, Takamori Shigeo	4. 巻 11
2. 論文標題 Clathrin-independent endocytic retrieval of SV proteins mediated by the clathrin adaptor AP-2 at mammalian central synapses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e71198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.71198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Mori Yasunori, Takenaka Koh-ichiro, Fukazawa Yugo, Takamori Shigeo	4. 巻 4
2. 論文標題 The endosomal Q-SNARE, Syntaxin 7, defines a rapidly replenishing synaptic vesicle recycling pool in hippocampal neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-02512-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taoufiq Zacharie, Ninov Momchil, Villar-Briones Alejandro, Wang Han-Ying, Sasaki Toshio, Roy Michael C., Beauchain Francois, Mori Yasunori, Yoshida Tomofumi, Takamori Shigeo, Jahn Reinhard, Takahashi Tomoyuki	4. 巻 117
2. 論文標題 Hidden proteome of synaptic vesicles in the mammalian brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 33586 ~ 33596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2011870117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakakubo Yutaro, Abe Saeka, Yoshida Tomofumi, Takami Chihiro, Isa Masayuki, Wojcik Sonja M., Brose Nils, Takamori Shigeo, Hori Tetsuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Vesicular Glutamate Transporter Expression Ensures High-Fidelity Synaptic Transmission at the Calyx of Held Synapses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108040 ~ 108040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Takenaka K, Lopez-Hernandez T, Mori Y, Nagamori S, Haucke V, Takamori S.
2. 発表標題 Cargo-selective sorting function of clathrin adaptor protein AP-2 during clathrin-independent endocytosis at hippocampal synapses.
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田知史、竹中康一郎、埴京子、森靖典、高森茂雄
2. 発表標題 Intersectin 1が形成する液滴は、SNAP-25によって形質膜に係留されたエンドサイトーシス関連タンパク質の貯蔵庫として働く。
3. 学会等名 第72回 日本細胞生物学会。
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takenaka K, Lopez-Hernandez T, Mori Y, Nagamori S, Haucke V, Takamori S.
2. 発表標題 Cargo-selective sorting function of clathrin adaptor protein AP-2 during clathrin-independent endocytosis at hippocampal synapses.
3. 学会等名 生理学研究所 シナプス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田知史
2. 発表標題 形質膜に係留されている ITSN1 によって形成される相分離環境はエンドサイトーシス関連タンパク質の動的な貯蔵庫として機能する.
3. 学会等名 生理学研究所 シナプス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takenaka K, Lopez-Hernandez T, Mori Y, Nagamori S, Haucke V, Takamori S.
2. 発表標題 Cargo-selective sorting function of clathrin adaptor protein AP-2 during clathrin-independent endocytosis at hippocampal synapses.
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program Symposium “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy” (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshida T.
2. 発表標題 Intersectin 1 condensates, the reservoir for various endocytic proteins, are anchored at plasma membrane by SNAP-25.
3. 学会等名 JSPS Core-to-core Program (A) Symposium “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy” (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shigeo Takamori
2. 発表標題 Intersectin-1 liquid phase serves as the cytoplasmic reservoir for endocytic proteins.
3. 学会等名 Core-to-Core Symposium: Understanding synapses: Form molecules to function (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森靖典、竹中康一郎、深澤有吾、高森茂雄
2. 発表標題 Q-SNARE Syntaxin 7 defines a reluctant recycling pool of synaptic vesicles in hippocampal neurons
3. 学会等名 生理学研究所シナプス研究会「ミクロからマクロに至る脳の構造と機能のダイナミクス (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部冨華、中久保佑太郎、吉田知史、伊佐真幸、高森茂雄、堀哲也
2. 発表標題 小胞型グルタミン酸輸送体タイプ1(VGLUT1)欠損が神経活動低下を引き起こす様々な要因の検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森靖典、竹中康一郎、深澤有吾、高森茂雄
2. 発表標題 神経終末におけるSyntaxin 7を含むシナプス小胞の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichiro Takenaka, Tania Lopez Hernandez, Yasunori Mori, Shushi Nagamori, Volker Haucke and Shigeo Takamori
2. 発表標題 Cargo- Selective Sorting Function of Clathrin Adaptor Protein Complex AP-2 During Clathrin- Independent Endocytosis at Hippocampal Synapses
3. 学会等名 Core-to-Core Symposium: Understanding synapses: Form molecules to function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaro Nakakubo, Saeka Abe, Tomofumi Yoshida, Chihiro Takami Masayuki Isa, Sonja M. Wojcik, Nils Brose , Shigeo Takamori and Tetsuya Hori
2. 発表標題 Vesicular Glutamate Transporter Expression Ensures the High Fidelity Synaptic Transmission at the Calyx of Held Synapses
3. 学会等名 Core-to-Core Symposium: Understanding synapses: Form molecules to function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomofumi Yoshida, Koichiro Takenaka, Manabu Kitamata, Kyoko Hanawa-Suetsugu, Yasunori Mori, Shiro Suetsugu and Shigeo Takamori
2. 発表標題 A liquid phase of Intersectin1 serves as the cytoplasmic reservoir for endocytic proteins
3. 学会等名 Core-to-Core Symposium: Understanding synapses: Form molecules to function (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	森 靖典  (Mori Yasunori)		



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	伊佐 真幸  (Isa Masayuki)		
研究協力者	隅山 健太  (Sumiyama Kenta)		
研究協力者	永森 収志  (Nagamori Shushi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関