

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16251

研究課題名(和文) シナプス前終末におけるMunc13-1とカルシウムチャネルのナノスケール配置

研究課題名(英文) Nanoscale distribution of Munc13-1 and calcium channels at the presynaptic terminals

研究代表者

坂本 寛和 (Sakamoto, Hirokazu)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：10837397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達は脳機能の根幹である。本研究ではシナプス伝達効率を制御する分子機構を解明するために、神経伝達物質放出に必須の分子であるMunc13-1と電位依存性カルシウムチャネルのシナプス内配置および分子間位置関係をナノメートルスケールで解析した。免疫組織化学染色法を最適化することによって、Munc13-1と電位依存性カルシウムチャネルを効率の良く標識する手法を確立した。また、超解像蛍光顕微鏡による多色の高精細分子局在測定法と組み合わせることで、海馬および小脳の数千ものシナプスにおけるMunc13-1とカルシウムチャネルの分子局在定量解析を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脳を構築する神経細胞間のコミュニケーションを担うシナプスに焦点を当てて研究を行った。シナプス伝達は脳機能の根幹であるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。最先端の超解像顕微鏡技術と独自の分子標識技術を組み合わせることで、神経伝達物質放出に必須の分子群の局在配置を、膨大な数のシナプスにおいて定量する手法を構築することができた。今回の成果によって、シナプス分子の配置によってどのようにしてシナプス伝達効率が決定されるのかという神経科学における重要な問いに答えることができた。また、この成果は脳の機能を分子の観点から理解する上で大きな意味を持つ。

研究成果の概要(英文)：Synaptic transmission is fundamental to the brain function. It is important to quantify the distribution of presynaptic proteins essential for neurotransmitter release, such as Munc13-1 and voltage-gated calcium channels, at synapses to understand the molecular mechanisms that regulate the efficacy of synaptic transmission. In this study, we established an efficient immunohistochemical method for labeling Munc13-1 and voltage-gated calcium channels at synapses in the brain sections. We successfully quantified the nanoscale spatial distribution and the inter-molecular spatial relation of Munc13-1 and voltage-gated calcium channels at thousands of synapses in the hippocampus and cerebellum by combining the established immunohistochemical method with multi-color super-resolution fluorescence imaging techniques.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス

### 1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達は脳における情報処理の素過程である。シナプス前終末に到達した活動電位は電位依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを開き、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性のシナプス小胞の開口放出を引き起こす。その結果、シナプス小胞に含まれていた神経伝達物質がシナプス間隙へと放出され、シナプス後細胞の受容体を活性化し、シナプス伝達が成立する(図1)。これら一連の過程はミリ秒オーダーで起こる非常に速い生理現象であり、シナプス前終末にはシナプス小胞を決まったタイミングで素早く開口放出させる

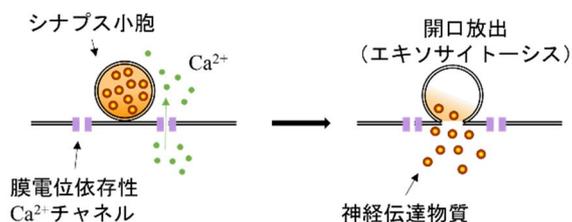


図1 シナプス小胞の開口放出過程。  
活動電位に伴った $\text{Ca}^{2+}$ の流入によってシナプス小胞の開口放出が引き起こされる。

ための特殊な放出装置が存在しているはずである (Neher et al., Neuron, 2008)。現在までに遺伝子ノックアウト動物を用いた研究等によって、シナプス小胞の開口放出に関与する分子が多数同定されており (Jahn et al., Nature, 2012)  $\text{Ca}^{2+}$  センサーの synaptotagmin、膜融合を担う SNARE タンパク質、電位依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、そしてシナプス小胞の放出部位を定める Munc13 などの分子群がシナプス小胞の開口放出に必須であることが分かってきた。素早い開口放出を実現するためには、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルがシナプス小胞放出部位の近傍に配置される必要があると考えられているが、実際に  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルがシナプス小胞放出部位の周辺でどのような空間配置をとっているのか不明であった。

$\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの空間配置様式の解明は、神経伝達物質の放出確率を理解する上において特に重要である。たとえ同じ神経細胞の樹状突起上に形成されるシナプスであっても、放出確率は一定ではない。また、同一の軸索が形成するシナプスでも標的の神経細胞が異なれば、放出確率は異なる。このようなシナプス間の放出確率の違いを説明する一つの仮説として、「シナプス小胞放出部位と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの距離がシナプス毎に異なる」という説がある (Eggermann et al., Nat. Rev. Neurosci., 2012)。シナプス小胞放出部位と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの距離が近ければ放出確率は高く、遠ければ放出確率は低いということである。しかしながら、シナプス小胞放出部位と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを可視化する方法がなかったため、この仮説を直接検証することはできなかった。研究代表者はこれまでの研究で Munc13-1 の超分子集合体がシナプス小胞放出部位の分子実体であることを明らかにしており (Sakamoto et al., Nat. Neurosci., 2018)、Munc13-1 をシナプス小胞放出部位のマーカーとすることで、 $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルとシナプス小胞放出部位の位置関係を明らかにすることが可能であると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、シナプス小胞の放出位置を定める分子である Munc13-1 とシナプス小胞の放出効率を定める分子である  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのシナプス内空間配置及び両分子間の位置関係をナノメートルスケールで可視化解析することにより、シナプス小胞放出部位の周辺で  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルがどのように配置されているのかを明らかにすることである。超解像顕微鏡技術を駆使して、Munc13-1 と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの空間配置を定量することによってこの目的を達成する。さらに、Munc13-1 と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル間の距離の違いによってシナプス間の放出確率の違いを説明できるのかを検証する。

### 3. 研究の方法

凍結マイクロトームを用いて、厚さ  $10\ \mu\text{m}$  以下の海馬もしくは小脳を含む脳組織切片 (マウスおよびラット由来) を作製して、蛍光免疫組織化学染色法にて Munc13-1 と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを共染色し、超解像顕微鏡 (STORM および STED) による多色分子局在計測を行うことで、Munc13-1 が構成するシナプス小胞放出部位と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの分布をナノメートルスケールで明らかにした。この計測を海馬の二種類のグルタミン酸作動性シナプス (シャッフアー側枝シナプス、苔状線維シナプス) および小脳の二種類のグルタミン酸作動性シナプス (平行繊維シナプス、登上線維シナプス) で行うことによって、中枢神経系シナプスで普遍的にみられる  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと Munc13-1 の分布特性を明らかにすることを目指した。また、神経伝達物質の放出確率の異なるこれらのシナプス間で、シナプス小胞放出部位と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル間の距離・分布様式が異なるのかを検証した。

### 4. 研究成果

本研究では、蛍光免疫組織化学染色法を改良・最適化することによって、Munc13-1 と  $\text{Ca}^{2+}$  チャン

ネル (Cav2.1 および Cav2.2 サブユニット) の脳組織切片における非常に効率の良い標識法を確立した。また、分子標識した脳組織切片を用いた超解像蛍光顕微鏡 (STORM および STED) による多色の高精細分子局在測定法を確立し、脳組織切片中の数千のシナプスにおける Munc13-1 と Ca<sup>2+</sup>チャネルの分子局在定量解析を実現した。以下に具体的な研究成果を示す。

### (1) 脳組織切片における蛍光免疫組織化学染色

分子の超解像顕微鏡測定を行うためには、蛍光免疫組織化学染色が有効である。一般的に、脳組織切片におけるシナプス分子の染色は難しいとされているが、脳組織切片の作製法および蛍光免疫染色法を改良することで、Munc13-1 および Ca<sup>2+</sup>チャネル (Cav2.1 および Cav2.2) の定量性を伴った染色結果を得ることに成功した (図2)。さらに、最適化した蛍光免疫組織化学染色法は、シナプス前終末で Munc13-1 および Ca<sup>2+</sup>チャネルと相互作用する分子群 (RIM, CAST, RIM-BP, Piccolo, Bassoon など) の標識にも適用できることが分かっており、この手法の汎用性の高さ・分子標識の効率の良さを証明している。また、VGLUT1・VGLUT2・VGAT などのプレシナプスマーカーに加えて、PSD95・GluD2・Gephyrin などのポストシナプスマーカーの同時標識にも成功しており、シナプスタイプ特異的な Munc13-1 および Ca<sup>2+</sup>チャネルの局在解析を行う基盤を整えることができた。

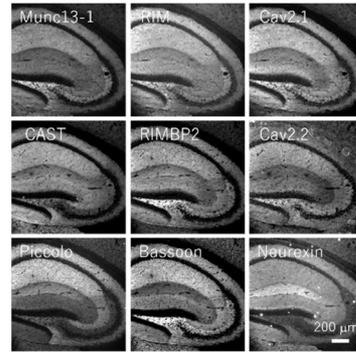


図2 海馬におけるプレシナプス分子の染色像。

### (2) 超解像顕微鏡測定・画像解析

Munc13-1 と Ca<sup>2+</sup>チャネルの同時標識を行った脳組織切片標本を用いて多色の超解像顕微鏡測定 (STORM および STED) を行い、Ca<sup>2+</sup>チャネルと Munc13-1 の位置関係を調べた。STORM を用いた計測では、最大三色の超解像同時観察が可能であり、同一シナプス内での Munc13-1、Cav2.1、および Cav2.2 の局在解析が可能となった (図3)。一方、STED 顕微鏡を用いた計測では、超解像モードで同時観察可能な分子は二色までに限定されるが、STORM に比べて広範な領域を素早く計測できる利点があるため、一度の実験で数百~数千に及ぶシナプスにおける Munc13-1 と Ca<sup>2+</sup>チャネルの定量が可能となった。また、計測した STED データを独自のアルゴリズムで解析することで、従来の解析法では処理できないほど膨大な数のシナプスにおけるナノメートルスケールの分子局在・発現量を定量することに成功した (図4)。

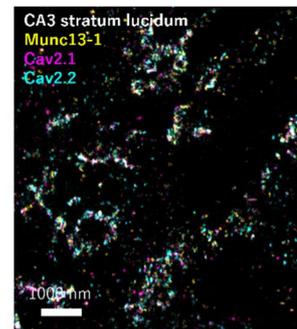


図3 海馬苔状線維シナプスにおける Munc13-1 および Ca<sup>2+</sup>チャネルの STORM 画像。

海馬のシャッフアー側枝シナプス及び苔状線維シナプスは共に VGLUT1 陽性であり、海馬内の位置及びその形態に特徴を持っている。また、両シナプス共にポストシナプス側に PSD95 を発現する。従って、これらのシナプスは VGLUT1 および PSD95 の染色とその位置・形態からシナプスタイプを同定した。小脳の平行線維シナプス及び登上線維シナプスはそれぞれ特異的なマーカーである GluD2 及び VGLUT2 染色からシナプスタイプを同定した。

効率の良い分子標識技術とスループットの高い解析技術を構築できたおかげで、当初計画していた4種類のグルタミン酸作動性シナプス (海馬シャッフアー側枝シナプス、海馬苔状線維シナプス、小脳平行線維シナプス、および小脳登上線維シナプス) に加えて、さらに2種類のグルタミン酸作動性シナプス (海馬貫通線維シナプスおよび連合・交連線維シナプス) と2種類の GABA 作動性シナプスの計8種類のシナプスにおける Munc13-1 と Ca<sup>2+</sup>チャネルの計測を実施することができた。また、RIM, CAST, RIM-BP についても同様に発現・局在解析を行うことができた。これらの超解像蛍光顕微鏡計測の解析結果から、中枢神経系シナプスのシナプス小胞放出部位周辺で普遍的にみられる Ca<sup>2+</sup>チャネルの分布特性とシナプスタイプ特異的な分布特性を明らかにすることができた。今回の成果によって、プレシナプス分子の配置によってどのようにしてシナプス伝達効率が決定されるのかという神経科学における重要な問いに答えることができる。また、今回の成果は脳の機能を分子の観点から理解する上で大きな意味を持つ。

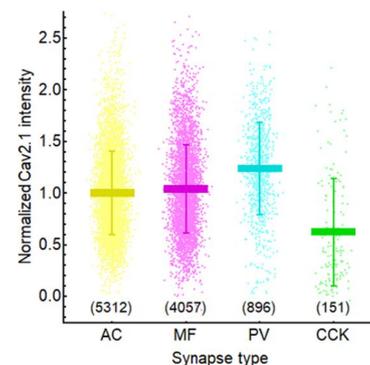


図4 四種類のシナプスタイプにおける Cav2.1 の発現解析例。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto Hirokazu, Namiki Shigeyuki, Hirose Kenzo	4. 巻 154
2. 論文標題 Nanoscale Molecular Imaging of Presynaptic Active Zone Proteins in Cultured Hippocampal Neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuromethods	6. 最初と最後の頁 245 ~ 259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0532-5_12	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 Kitajima Nami, Takikawa Kenji, Sekiya Hiroshi, Satoh Kaname, Asanuma Daisuke, Sakamoto Hirokazu, Takahashi Shodai, Hanaoka Kenjiro, Urano Yasuteru, Namiki Shigeyuki, Iino Masamitsu, Hirose Kenzo	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-time in vivo imaging of extracellular ATP in the brain with a hybrid-type fluorescent sensor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e57544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.57544	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hirokazu Sakamoto
2. 発表標題 Micro- and nano-scale mapping of neurotransmitter release machineries in the hippocampus
3. 学会等名 FMP Symposium: Understanding Synapses from molecules to function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshima-Takago T, Sakamoto H, Namiki S, Hirose K, Tachibana M, Takago H.
2. 発表標題 Optical measurements of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cells
3. 学会等名 FMP Symposium: Understanding Synapses-From Molecules to Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshima-Takago T, Sakamoto H, Namiki S, Hirose K, Tachibana M, Takago H.
2. 発表標題 Optical measurements of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cells
3. 学会等名 Ribbon Synapses Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Optical measurement of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cell
2. 発表標題 大島知子、坂本寛和、並木繁行、廣瀬謙造、立花政夫、鷹合秀輝
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂本寛和
2. 発表標題 シナプス型特異的なシナプス前部ナノ構造の超解像可視化解析
3. 学会等名 シナプス研究会 (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------