

## 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24年4月17日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500346

研究課題名（和文）可溶性タンパク質によるシナプス小胞開口放出の制御

研究課題名（英文）Regulation of synaptic vesicle exocytosis by soluble proteins

研究代表者

阿部 輝雄（ABE TERUO）

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：50010103

研究成果の概要（和文）：Munc18-1、トモシン1、シナフィン／コンプレキシン等の可溶性タンパク質による神経伝達物質放出制御機構を解明するため、Munc18-1、トモシン1の海馬CA3特異的ノックアウト（KO）マウスを作製した。Munc18-1 KOでは神経細胞変性が生後1週で起きており、神経伝達物質放出解析は困難であった。トモシン1 KOでは放出が増大していた。シナフィンC末領域／シナプトタグミン1結合がPC12細胞からの小胞開口放出に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanisms by which soluble proteins such as Munc18-1, tomosyn 1 and synaphin/complexin regulate synaptic vesicle exocytosis, we generated hippocampal CA3-specific knockout (KO) mice of Munc18-1 and tomosyn 1. Neuronal degeneration was already apparent 1 week after birth in mice lacking the Munc18-1 gene in the CA3 region, rendering the analysis of synaptic transmission difficult. Tomosyn 1 KO mice exhibited larger EPSPs and smaller paired pulse facilitations. The involvement of the binding of the synaphin C-terminal region with synaptotagmin 1 in dense-core vesicle exocytosis from PC12 cells was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：神経伝達物質放出・可溶性タンパク質・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放出はシナプス小胞の開口放出によって起こる。細胞外液からのCa<sup>2+</sup>流入によって惹起されるシナプス小胞開口放出は融合する膜に存在するSNAP受容体（SNARE）タンパク質を介するが、サイトゾルの可溶性タンパク質（Munc18-1、ト

モシン1、シナフィン（別名コンプレキシン）など）によって厳密に制御されている。しかし、この制御機構に関しては不明な点が多く、互いに矛盾する結果も報告されていた。

## 2. 研究の目的

(1) Munc18-1の開口放出における役割

Munc18-1 の完全欠損 (null) マウスでは胎児段階で、脳内シナプスは形成されるが、やがてアポトーシスが起り、神経細胞が大規模に脱落する。完全欠損マウスは出生後 1 日以内に死亡する。このため、成熟脳におけるその役割は不明である。脳部位特異的ノックアウト (KO) マウスを使用することにより、アポトーシスを回避できれば、成熟脳シナプスでの Munc18-1 の機能を追究できる。

#### (2) トモシン 1 の開口放出における役割

トモシン 1 は SNARE タンパク質シナプトブレヴィン 2 (以下 Syb2) の SNARE モチーフと類似配列を持ち、シンタキシン 1 (以下 Syx1) /SNAP-25 と複合体を作り、正規の SNARE 複合体 (Syx1/SNAP-25/Syb2) の形成を妨げることにより、シナプス小胞開口放出を抑制すると考えられている。しかし、この抑制の生理的意義は明確ではない。脳部位特異的 KO の解析によってその意義を明らかにする。

#### (3) シナフィン/シナプトタグミン 1 結合の生理的意義

最近の研究ではシナフィンが、膜融合の寸前で SNARE 複合体を固定(クランプ)しており、シナプス小胞開口放出の Ca センサーであるシナプトタグミン 1 (以下 Syt1) がシナフィンを SNARE 複合体から解離させることによって、その固定を解除するとされている。しかし、われわれはシナフィンが Syt1 と直接結合すること、Syt1 の SNARE 複合体への結合がシナフィンによって促進されることから、シナフィンが Syt1 を SNARE 複合体に動員するという仮説を提唱している。この仮説の妥当性を検証する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 海馬 CA3 特異的 KO マウスの作製

海馬 CA3 特異的に Munc18-1 あるいはトモシン 1 遺伝子を欠損したマウスを得るため、Munc18-1、トモシン 1 の floxed マウス (C57BL/6) をグルタミン酸受容体 GluR $\gamma$ 1 遺伝子に Cre をノックインしたマウス (C57BL/6) と交配して、ヘテロ型 ( $\gamma$ 1<sup>Cre/+</sup>, Munc18-1<sup>flox/+</sup>あるいは $\gamma$ 1<sup>Cre/+</sup>, Tom1<sup>flox/+</sup>) を作製した。このヘテロ型マウスを floxed マウスと交配して、目的のホモ型マウス ( $\gamma$ 1<sup>Cre/+</sup>, Munc18-1<sup>flox/flox</sup> あるいは  $\gamma$ 1<sup>Cre/+</sup>, Tom1<sup>flox/flox</sup>) が得られた。これらのマウスでは生後 1 週以降はほぼ CA3 錐体細胞に局限して Munc18-1 あるいはトモシン 1 遺伝子が欠損する。KO マウスの形態学的解析、電気生理学的解析では、北海道大学大学院医学研究科の渡辺雅彦博士および神谷温之博士の協力を得た。

#### (2) PC12 細胞の小胞開口放出に対する変異シナフィンの効果

ニューロペプチド Y-Red Fluorescent Protein (NPY-mRFP) を導入した PC12 細胞に EGFP とシナフィン 1 あるいはその変異体を繋いだ cDNA を PC12 細胞に導入した。NPY-mRFP は選択的に有芯小胞 (dense-core vesicle) 内に貯蔵される。高カリウム溶液で惹起される個々の小胞の開口放出を全内部反射蛍光 (total internal reflection fluorescence) (以下 TIRF) によって観察した。TIRF による放出の解析は東京大学総合文化研究科の坪井貴司博士の協力を得た。また、シナフィンと Syt1 および SNARE タンパク質複合体との相互作用の解析は徳島文理大学香川薬学部の得丸博史博士の協力の下に行われた。

### 4. 研究成果

#### (1) Munc18-1 の海馬 CA3 特異的 KO

① KO マウス ( $\gamma$ 1<sup>Cre/+</sup>, Munc18-1<sup>flox/flox</sup>) 脳を固定し、切片を作製し、光学顕微鏡による観察を行った。生後 2 週ではすでに CA3 錐体細胞の大部分が脱落しており、生後 1 週間でも、CA3 の錐体細胞の一部に変性が見られる。これは先行研究での報告にあるように Munc18-1 の欠損により、急速にアポトーシスが誘導されたためと思われる。このように発生早期から神経変性、脱落が進行してしまうため、Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞間のシナプス伝達の解析は困難であった。一方、同腹の対照個体 ( $\gamma$ 1<sup>+/+</sup>, Munc18-1<sup>flox/flox</sup>) では、上記のような変性、脱落は観察されなかった。

② KO マウスは調べた全個体 (n=36) で生後 20 週前後から正常な姿勢を保てなくなり、19-26 週で死亡した。これはおそらく成長に伴い、Cre が海馬 CA3 以外の部分でも発現し、複数の脳部位で Munc18-1 が欠損したことによると思われる。 $\gamma$ 1-Cre を持たないマウス ( $\gamma$ 1<sup>+/+</sup>, Munc18-1<sup>flox/flox</sup>) (n=40) では少なくとも生後 18 ヶ月以内では外見上、野生型と全く差異がなかった。

③ 本研究では、脳部位特異的に Munc18-1 を KO したが、欠損による神経細胞の変性、脱落を回避できなかった。本研究および先行研究から、Munc18-1 タンパク質の機能に関して、シナプス神経変性、脱落抑制活性が神経伝達物質放出の消失によるシナプス伝達の停止に起因間接的結果である、あるいはこの抑制活性が Munc18-1 の本来の機能であるという二つの可能性が残る。後者が正しければ、Munc18-1 の神経伝達物質放出制御活性と神経変性、脱落抑制活性が Munc18-1 分子の人工的変異によって分離できる可能性がある。この場合には二つの活性をそれぞれ別個に追究できよう。これまでの多くの研究によって Munc18-1 はシナプスの SNARE の Syx1 に結合して SNARE 複合体形成を抑えるネガティブ

な機能と、SNARE 複合体に結合して膜融合を促進するポジティブな機能の、一見相矛盾する作用を有するとされている。これらの作用の切り替えのメカニズムは現時点では全く解明されていない。いずれにしても Munc18-1 分子はシナプス機能における最も重要な分子の一つと考えられ、今後も重要な研究対象であり続けるであろう。

## (2) トモシン 1 海馬 CA3 特異的 KO

① 最初にホモマウス ( $Tom1^{flox/flox}$ ) をテレンセファリン (telencephalin) 遺伝子に Cre をノックインしたヘテロマウス ( $Te1^{Cre/+}$ ,  $Tom1^{flox/+}$ ) と交配した。テレンセファリン-Cre は発生早期には広範に発現しているため、この交配によりトモシン 1 の完全欠損マウスが得られるはずである。しかし、テレンセファリン-Cre を持たない個体 ( $Te1^{+/+}$ ,  $Tom1^{flox/flox}$  あるいは  $Te1^{+/+}$ ,  $Tom1^{flox/+}$ ) は問題なく得られたが、完全欠損個体は多くの交配 ( $n=10$ ) にも関わらず、全く生まれてこなかった。これらの結果からトモシン 1 の完全欠損が胎生致死であると予想された。胎児を解析した結果、完全欠損個体は胎生 12-13 日ではすでに死亡していることが明らかになった。また、胎生 18 日では円盤状の吸収胚となっていた。これらの結果はトモシン 1 が発生において重要な役割をはたしていることを示唆する。先行論文ではトモシン 1 の完全欠損個体が生まれ、育つことが報告されているが、我々のマウスとは異なる系統のマウスを用いている。おそらくマウスの系統による遺伝的背景が関係しているものと思われる。トモシン 1 は発生の早期から発現しているが、その発生・分化における機能については報告がなく、今後の研究課題として残されている。マウスにはトモシン 1 と類似性の高いトモシン 2 も存在するが、1 に比較して量が少ない。前者の発生・分化における機能は後者によって代償されないことが示唆される。

② 海馬 CA3 特異的 KO マウスは外見上、全く異常がなく、野生型マウス ( $\gamma 1^{+/+}$ ,  $Tom1^{+/+}$ ) あるいは対照マウス ( $\gamma 1^{+/+}$ ,  $Tom1^{flox/flox}$ ) と区別できない。その寿命、成長に伴う体重増加も対照マウスおよび野生型マウスと有意差がなかった。

③ シナプス伝達の解析：生後 1-2 ヶ月齢 KO および同腹の対照マウスの海馬切片を用いて Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞間のシナプス伝達を解析した。このシナプス伝達は CNQX (6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン) によって完全に遮断されるので、AMPA 型グルタミン酸受容体を介することが明らかである。KO では対照に比較して興奮性シナプス後電位 (EPSP) が大きくなっていた。こ

のシナプスでは、連続した二発刺激 (paired pulse) によって起こる EPSP は二発目の方が一発目より大きくなる (paired pulse facilitation) (以下 PPF)。KO マウスでは刺激間隔が 50 ミリ秒以下では対照マウスに比して PPF の度合いが有意に低下していた (図 1)。これらの結果はトモシン 1 の KO により神経伝達物質放出確率が有意に上昇していることを示す。海馬歯状回顆粒細胞軸索 (苔状線維)-CA3 錐体細胞間のシナプスでの伝達も検討した。このシナプス伝達は代謝型グルタミン酸受容体アンタゴニスト DCG-IV ((1R,2R)-3-[(1S)-amino-2-hydroxy-2-oxoethyl]cyclopropane-1,2-dicarboxylic acid) によって遮断されるので、目的のシナプスであることが確認された。Schaffer 側枝-CA1 錐体細胞のシナプスとは異なり、調べた全ての刺激間隔で PPF は KO マウスと対照マウスとで有意差はなかった。

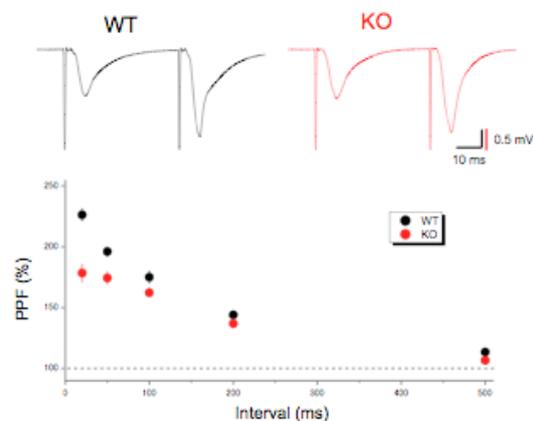


図 1 paired pulse facilitation (KO:ノックアウトマウス、WT:対照マウス)

④ これらの知見からトモシン 1 が神経終末におけるシナプス小胞の開口放出を抑制していると考えられる。その機構は開口放出確率を低くしているためと予想される。シナプス小胞にはいくつかのプール (readily releasable pool, reserve pool, resting pool など) が存在する。トモシン 1 の欠損による、これらのプールの量比の変化を調べる必要がある。トモシン 1 による開口放出確率の抑制がどのような機構によるのか、その抑制が解除される仕組みがあるとすればそれはどのようなものか、その抑制はどのような生理学的機能を有するのかなど、未だ多くの疑問が残されている。今後、追究すべき課題である。

## (3) シナフィン/Syt1 結合の役割

① われわれはすでに脳のネイティブな SNARE タンパク質および Syt1 を使って、シナフィンがシナプス小胞開口放出の Ca センサ

一である Syt1 と結合することを報告しているが、本研究では組換えタンパク質を用いて更に詳しく解析した。その結果、この結合にはシナフィン C 末端領域が関係しており、C 末端のわずか 10 残基を欠いただけで結合が見られなくなることが解った。したがって、C 末端領域がこの結合に必須であると思われる。また、シナフィン非存在下では Syt1 と SNARE 複合体との結合は低親和性であり、両者は効率的に結合できないことが確認された。これらの結果から、シナフィンの役割として SNARE 複合体あるいはその前駆体（二つの SNARE タンパク質の複合体）に Syt1 を効率よく動員することが示唆される。シナフィンが SNARE 複合体を膜融合直前でクランプ（固定）しており、Ca<sup>2+</sup>を結合した Syt1 がそれを解除すると仮定するクランプ説はわれわれの結果とは相容れない。

② シナフィン/Syt1 結合の生理的機能を明らかにするため、野生型あるいは変異型シナフィンを PC12 細胞に過剰発現させ、Ca<sup>2+</sup>に依存する有芯小胞 (dense-core vesicle) 開口放出による NPY-mRFP の放出を測定した。PC12 細胞は野生型あるいは変異型シナフィンをほぼ同程度に発現しており、細胞膜にドックした有芯小胞の密度も有意差がなかった。野生型および N 末端 45 残基を欠く変異体ではシナフィンを導入していない対照 PC12 細胞と比較して、放出は有意に変化しないが、C 末端を欠く (10 残基あるいは 30 残基) 変異体を導入した PC12 細胞では放出は著しく抑制される。これらの知見は、シナフィン C 末端領域が Ca<sup>2+</sup>によって惹起される小胞開口放出において重要や機能を担っていることを示唆しており、上記の結合実験の結果と一致している。

③ いくつかの報告（線虫の神経筋シナプス、マウス脳培養神経細胞シナプスなど）ではシナフィン C 末端が小胞の開口放出に必須ではないとされており、今回の結果と一致しない。シナフィンは下等な動物から哺乳類まで広範に存在するが、分子中央部の、SNARE 複合体への結合に関与する螺旋構造 (central helix) 以外の部分では一次構造はあまり保存されていない。したがって、線虫と哺乳類とでは、シナフィンの作用機序が部分的に異なることも考えられる。また、開口放出には様々なタイプ（放出の速度、時間経過、Ca<sup>2+</sup>依存性、刺激頻度に対する反応などが異なる）があるが、これらのタイプによってシナフィンの関与の仕方が異なる可能性も除外できない。また、N 末端領域についてもこれまでに発表されている実験結果は必ずしも一致していない。シナプス小胞開口放出過程におけるシナフィンの役割は多くの研究に

もかかわらず依然として確立されていない。今後、更なる研究が必要である。

## 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 2 件)

- ① 得丸博史、清水-岡部千草、阿部輝雄、シナプス小胞の開口放出におけるシナフィンの機能、生体の科学、査読無、61巻、2010、247-251
- ② 阿部輝雄、得丸博史、シナフィン/コンプレキシンの神経伝達物質放出における役割、生体の科学、査読無、61巻、2010、530-531

[学会発表] (計 2 件)

- ① 得丸博史、清水-岡部千草、篠原巧、阿部輝雄、シナフィン/コンプレキシンはSNARE複合体にシナプトタグミン 1を動員する、第32回日本神経科学大会、2009年9月17日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
- ② 清水-岡部千草、篠原 巧、坪井貴司、阿部輝雄、得丸 博史、Synaptotagmin 1の Synaphin/complexin-C末端への結合は、小胞開口放出に重要である、第34回日本神経科学大会、2011年9月16日、パシフィコ横浜 (横浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 輝雄 (ABE TERUO)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：50010103

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

八尾 寛 (YAWO HIROMU)

東北大学・大学院・生命科学研究科・教授  
研究者番号：00144353

山田 光則 (YAMADA MITSUNORI)

独立行政法人・国立病院機構・さいがた病院  
検査部・部長

研究者番号：30240039

\_\_\_\_\_