

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25290025

研究課題名(和文) コリン作動性シナプスの構築・機能化・可塑性を制御する蛋白群の解析

研究課題名(英文) Study of presynaptic proteins which regulate construction, maintenance and strengthen cholinergic synapses

研究代表者

持田 澄子(MOCHIDA, Sumiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30096341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：強靱なコリン作動性シナプスを構築する培養上頸交感神経節細胞を用いて、1) プレシナプス構築と維持、2) 構築されたシナプスの機能化、3) 機能化したシナプスの時空間的活性化のメカニズムを解析し、コリン作動性シナプス構築・維持・強化・機能化を担い、シナプス活動に依存してダイナミックに変化するシナプス可塑性を担う蛋白分子の動態を明らかにすることを目的として研究を実施した結果、1) -3) を制御するものは、活動電位発火に伴って流入するCa²⁺、その濃度変化を感知して機能タンパク質を活性化するCa²⁺結合タンパク質群、流入するCa²⁺量を調節するCa²⁺チャネル制御タンパク質であることが確認された。

研究成果の概要(英文)：Under long culture, superior cervical ganglion neurons taken from 7th day rats form strong synapses. Using this model synapse, presynaptic proteins which regulate construction, maintenance and strengthen cholinergic synapses, temporal and special activation and inactivation of functioning synapse that underlie synaptic plasticity were studied with genetic and philological approaches. Results revealed the candidates of the factors, dynamics of Ca²⁺ concentration after action potential(s) firing, Ca²⁺-binding proteins that activate cascades of presynaptic functional proteins, and proteins that control Ca²⁺-channel mobility and activity. In the mature synapse, milliseconds Ca²⁺ dynamics activate multiple protein cascades for synaptic vesicle control and synaptic plasticity.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス タンパク質 コリン作動性神経 タンパク分子 発火 カルシウム シナプス小胞 アクフィブゾーン カルシウム結合

1. 研究開始当初の背景

脳神経系では、グルタミン酸、GABA、グリシン受容体のクラスター化を担う蛋白機能分子や細胞接着蛋白分子によるシナプス構築について様々な蛋白群の機能研究が進展している。末梢神経系では、神経筋接合部でのACh受容体クラスター化を担う様々な蛋白機能分子が明らかにされてきたが、自律神経・中枢神経でのコリン作動性シナプス構築に関わる蛋白機能分子群は全く解析されていなかった。

本研究代表者は、培養法などを工夫して構築させた強靱なコリン作動性シナプスを独自のモデル実験系として、シナプス前細胞に遺伝子の導入やRNA干渉法 (RNAi) を適用し、シナプス伝達に不可欠な神経終末蛋白群の機能解析を試みて、神経終末蛋白質の機能解析研究の進展に積極的な役割を果たしてきた (Leal, K. et al., *PNAS*, 2012; Di Giovanni, J. et al., *Neuron* 67, 268-79, 2010; Mochida, S. et al., *Neuron* 57, 210-216, 2008; Krapivinsky, G. et al., *Neuron* 52, 485-496, 2006; Inoue, E. et al., *Neuron* 50, 261-275, 2006 他)。

単離された幼若ラット培養上頸交感神経節細胞が培養下で再構築するこのモデルシナプス (O'Lague, P.H. et al., *PNAS* 71, 3602-3606, 1974) は、シナプス構築分子メカニズムの解析に最適であった。

2. 研究の目的

コリン作動性シナプスの構築・維持・強化・可塑性の分子メカニズムは、中枢/末梢神経ともに未解析である。強靱なコリン作動性シナプスを構築する培養上頸交感神経細胞をモデルシナプスとして、1) シナプス構築蛋白群によるACh受容体クラスター化、2) 細胞接着分子群によるシナプス構造の維持と強化、3) シナプス構築因子群によるプレシナプス構築と維持メカニズムを明らかにする。さらに、4) 構築されたコリン作動性シナプスの機能化、5) 機能化したシナプスの時空間的活性化と不活性化のメカニズムを解析して、発育途上/成熟シナプスのコリン作動性シナプス構築・維持・強化・機能化を担う各種蛋白群の働きを理解し、シナプス活動に依存してダイナミックに変化するシナプス可塑性を担う蛋白分子の動態を明らかにすることを目的として研究を実施した。

3. 研究の方法

コリン作動性シナプス構築蛋白分子群の機能解析として、①ACh受容体クラスター化に関わるシナプス後細胞蛋白群、②シナプス構造の維持と強化を担う細胞接着分子群、③プレシナプス構築に関わるシナプス構築因子群、④構築されたシナプスの機能化を担うシナプス前/後細胞蛋白群、⑤機能化したシナプスの時空間的活性化と不活性化に関わるシナプス前細胞Ca²⁺結合蛋白群

に注目して、シナプス形成発育途上 (< 3週) と成熟期 (4週<) 神経に、①~⑤に関わる蛋白の遺伝子導入による機能亢進や阻害を起こし、シナプス伝達効率変化を電気生理学的手法で解析するとともに、①~④に関してはACh受容体、ACh受容体クラスター化蛋白群、シナプス接着蛋白群、AChシナプス小胞に特異的に発現する蛋白群を可視化してその動態とシナプス形態変化を、異色蛍光の軸索での分布密度や移動速度とシナプス小胞膜への局在化、シナプスでの局在発現と複合体形成、ACh受容体クラスター化、MusK複合体形成を指標として解析する予定であったが、①ACh受容体クラスター化に関わるシナプス後細胞蛋白群と②シナプス接着蛋白群の機能解析には着手できなかった。

4. 研究成果

①活動電位発火とシナプス伝達維持・強化:

研究目的の「シナプス構築因子群によるプレシナプス構築と維持メカニズム」と「機能化されたシナプスの時空間的活性化」を明らかにするために、まず、交感神経節細胞コリン作動性シナプスでの神経活動によって変化するCa²⁺動態に依存したアクティブゾーンへのシナプス小胞補充を指標として、結合速度の異なるCa²⁺キレート剤を細胞内に導入して解析した結果、活動電位発火に応じて小胞開口放出部であるアクティブゾーンに流入したCa²⁺のミリ秒単位で時空間的に変化する濃度を感知したCa²⁺センサーが働いて、アクティブゾーンへのシナプス小胞補充が抑制・維持・強化されることが確認された。

Mol Pharmacology に論文を掲載。

②シナプス前終末タンパク質のCa²⁺チャネル制御:

上記結果より、活動電位発火によって流入するCa²⁺がシナプスの維持・強化に関わることが分かり、Ca²⁺チャネルを制御するシナプス前終末タンパク質に注目した。

Alpha-synucleinはシナプス前終末膜に結合し、あるいは、細胞質中に遊離して存在するが、その機能は不明であった。交感神経節細胞コリン作動性シナプスにおいて、Alpha-synucleinが細胞外から作用してラフトに組みこまれていたCa²⁺チャネルを可動化し、シナプス伝達強化を担うことを見いだした。

さらに、コリン作動性シナプス小胞に発現しているSV2タンパク質がCa²⁺チャネル活性を制御して活動電位発火に応じた伝達物質放出量を維持することが見いだした。

これらの結果は、Alpha-synucleinとSV2タンパク質が、プレシナプス構築因子であるとともにシナプス機能維持因子であること、また、シナプス活動に依存してダイナミックに変化するシナプス可塑性を担う蛋白分子であることを示唆した。

J Neurosci と *Eur J Neurosci* に論文を掲載。

③シナプス小胞移送モーター分子機能：

これまでに交感神経節細胞シナプス前終末に発現を確認していたモーター分子タンパク質 Myosin IIB と新規モーター分子タンパク質 Myosin VI が ACh 含有シナプス小胞と局在することを確認するとともに、それぞれのタンパク質を遺伝子操作によってノックダウンして機能的活性化阻害による小胞移送を解析して、Myosin IIB は神経活動 (i.e. 活動電位発火) に依存したシナプス小胞輸送を、Myosin VI は神経活動非依存性のシナプス小胞輸送を担うことを明らかにした。

これらの結果は、「構築されたコリン作動性シナプスの機能化」「機能化されたシナプスの時空間的活性化」を Myosin IIB と VI が担い、シナプス活動に依存してダイナミックに変化するシナプス可塑性に関与する重要なモーター分子であることを示唆した。

また、神経活動非依存性の小胞エンドサイトーシスを駆動するダイナミン 3 の活性化に続いて Myosin VI が活性化される経路と、神経活動に依存した小胞エンドサイトーシスを駆動するダイナミン 1 の活性化に続いて Myosin IIB が活性化される経路のそれぞれでアクティブゾーンにシナプス小胞が移送されることが確認され、「機能化されたシナプスの時空間的活性化」には、異なった分子活性カスケードが駆動されることを明らかにした。 J Neuroscience に論文を掲載。

④アクティブゾーンタンパク質機能：

アクティブゾーンでは、複数のタンパク質が複合体を形成しているが、その複合体の中心に位置すると考えられている CAST は、遺伝子操作によってその発現量を変化させると他のアクティブゾーンタンパク質 (Bassoon) の発現パターンが変化することを見いだした。

また CAST の shRNA 導入による機能障害は、アクティブゾーン膜付近のシナプス小胞を消失させることが電子顕微鏡像で明らかとなり、CAST がシナプス小胞ドッキング、プライミングに不可欠であることが確認された。

さらに、第 45 残基であるセリンが特異的に SAD リン酸化酵素によってシナプス活動依存的にリン酸化を受け、アクティブゾーンへのシナプス小胞移送速度を遅延してアクティブゾーンのシナプス小胞数を減少し、シナプス伝達を短期間抑制する短期シナプス可塑性という現象の一因となることを見いだした。

これらの結果は、CAST がアクティブゾーン構築に不可欠な分子として機能すること、さらに、構築されたコリン作動性シナプスのシナプス活動に依存してダイナミックに変化するシナプス可塑性を担う蛋白分子であることを示唆した。

Cell Repots に論文を掲載。

⑤活動電位発火とシナプス小胞動態制御機構のまとめ：

研究成果①～④から見えてきた、活動電位発火によって動員された Ca^{2+} の濃度変化に依存して、200 ミリ秒以内に様々なタンパク質群カスケードが活性化されてシナプス小胞動態を調節することについて Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci に総説を発表して解説した。

さらに、シナプス前終末のカルシウムチャネルの調節機構について Neurosci Res に総説を発表して解説した。

⑥ Ca^{2+} 結合タンパク質 Synaptotagmin 機能：

Ca^{2+} 結合タンパク質 Synaptotagmin 1 と 7 の siRNA 導入による機能障害は、アクティブゾーンへの小胞補充を遅延して、Synaptotagmin の異なるアイソフォーム 1 と 7 がカルシウム濃度上昇によるエンドサイトーシスの initiator として、ダイナミン 1, 3 活性化に起因する異なる小胞再取り込み経路選択に介在することが確認された。

これらの結果は、シナプス小胞の開口放出とエンドサイトーシスを駆動する Ca^{2+} センサーとして機能する Synaptotagmin アイソフォームの時空間的活性化機構を示唆した。

平成 30 年 3 月 日本生理学会で発表、論文執筆中。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

① MOCHIDA Sumiko, Presynaptic calcium channels, Neurosci Res., 査読有 127, 2018, 33-44 doi: 10.1016/j.neures.2017.09.

012. Review.

② MOCHIDA Sumiko, Millisecond Ca^{2+} dynamics activate multiple protein cascades for synaptic vesicle control, Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci., 査読有 93, 2017, 802-820. doi: 10.2183/pjab.93.050.

③ MOCHIDA Sumiko, HIDA Yamato, TANIFUJI Shota, HAGIWARA Akari, HAMADA Shun, ABE Manabu, MA Huan, YASUMURA Misato, KITAJIMA Isao, SAKIMURA Kenji, OHTSUKA Toshihisa, SAD-B Phosphorylation of CAST Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression, Cell Rep., 査読有 16, 2016, 2901-2913. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.020.

④ HAYASHIDA Michikata, TANIFUJI Shota, MA Huan, MURAKAMI Noriko, MOCHIDA Sumiko, Neural activity selects myosin IIB and VI with a specific time window in distinct dynamin isoform-mediated synaptic vesicle reuse pathways, J Neurosci., 査読有 35, 2015, 8901-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5028-14.2015.

⑤ VOGL Christian, TANIFUJI Shota, DANIS Benedicte, FOERCH Patrik, WOLFF Christian, WHALLEY Benjamin J., MOCHIDA Sumiko, Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release and calcium channel

function at peripheral sympathetic synapses, Eur J Neurosci., 査読有 41, 2015, 398-409. doi: 10.1111/ejn.12709

⑥ RONSITTI Giuseppe, BUCCI Giovanna, EMANUELE Marco, LEO Domiana, SOTNIAKOVA Tatyana D., LUIDMILA Sotnikova, MUS Liudmila V., SOUBRANE Camille H., DALAS Mark L., THSLHSMMER Agnes, CINGOLANI Lorenzo A., MOCHIDA Sumiko, GAINETDINOV Raul R., STEPHENS Gary J., CHAEREGATTI Evelina, Exogenous α -synuclein decreases raft partitioning of Cav2.2 channels inducing dopamine release, J Neurosci., 査読有 34, 2014, 201410603-15. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0608-14.2014

⑦ MORI Michinori, TANIFUJI Shota, MOCHIDA Sumiko, Kinetic organization of Ca^{2+} signals that regulate synaptic release efficacy in sympathetic neurons, Mol Pharmacol., 査読有 86, 2014, 297-305. doi: 10.1124/mol.114.094029

⑧ TANIFUJI Shota, FUNAKOSHI-TAGO Megumi, UEDA Fumihito, KASAHARA Tadashi, MOCHIDA Sumiko, Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling, J Biol Chem., 査読有 288, 2013, 19050-9. doi: 10.1074/jbc.M112.445874

⑨ 森倫範、谷藤章太、小西真人、持田澄子、アセチルコリン放出を担う培養交感神経終末 Ca^{2+} チャネルの解析、東京医科大学雑誌、査読有、第 71 巻第 3 号 2013, 268-275

[学会発表] (計 30 件)

① Sumiko Mochida, Neurotransmitter release efficacy controlled by neuronal activity-dependent millisecond Ca^{2+} dynamics, 第 95 回日本生理学会大会、入澤彩賞受賞ポスター、平成 30 年 3 月 28-30 日、高松

② Sumiko Mochida, Neuronal activity-dependent millisecond Ca^{2+} dynamics activate multiple proteins for synaptic vesicle control, 第95回 日本生理学会大会、シンポジウム「ミクロからマクロに渡るシナプス形成機構」平成30年3月28日、高松

③ Michinori Mori, Kokuba Hiroko, Sumiko Mochida, The readily releasable synaptic vesicle pool in cultured superior cervical ganglion neurons, 1P-021, 第95回 日本生理学会大会、平成30年3月28日、高松

④ Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Synaptotagmin isoforms-mediated readily releasable pool recovery in distinct dynamin isoform-dependent synaptic vesicle recycling, 1P-023, 第95回 日本生理学会大会、平成30年3月28日、高松

⑤ 持田澄子, 神経活動に依存したダイナミン・ミオシン活性化とエンドサイトーシス・小胞移送. 2017 年度生命科学系学会合

同年次大会、ワークショップ「エンドサイトーシス生物学の新展開」、平成 29 年 12 月 9 日、神戸

⑥ Sumiko Mochida, Functional study of presynaptic calcium channels, Catterall reunion, August 25, 2017, Seattle

⑦ Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Synaptic vesicle recycling mediated by synaptotagmin-1 and 2 in sympathetic neurons, 第40回日本神経科学学会大会、平成29年7月22日、幕張

⑧ Vasco C. Silveirinha, Hong Lin, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Graeme S. Cottrell, Helena Cimarosti, Gary J. Stephens, Cav 2.2 (N-type) voltage-gated calcium channels are activated by SUMO-1 protein, p-53, 37th SEF National Meeting with guest society: the British Pharmacological Society, June 22, 2017, Barcelona

⑨ Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Synaptic vesicle recycling mediated by synaptotagmin-1 and 2 in sympathetic neurons, 第94回日本生理学会大会、平成29年3月30日、浜松

⑩ Sumiko Mochida, Constitutive and Ca^{2+} -dependent fine-tuning of the active zone Ca^{2+} channels, 第 94 回 日本生理学会大会、シンポジウム”Diversification of Ca^{2+} tuning mechanism of ion channels and its pathophysiological role”, 平成 29 年 3 月 28 日、浜松

⑪ Sumiko Mochida, Active Zone Vesicle Recycling, JSPS Core-to-Core Program & OIST Joint Symposium, September 27, 2016, Okinawa

⑫ Sumiko Mochida, SAD-B Phosphorylation of CAST Controls Active Zone Vesicle Recycling for Synaptic Depression, Gordon Research Conference “Synaptic transmission”, August 15, 2016, Water Ville Valley

⑬ Sumiko Mochida, Phosphorylation of an active zone protein controls short-term plasticity, 第 39 回日本神経科学大会 Neuro2016、シンポジウム”Novel mechanisms of the vesicular recycling in the presynaptic terminals”, 平成 28 年 7 月 22 日、横浜

⑭ Shota Tanifuji, Michikata Hayashida, Sumiko Mochida, Myosin II and VI derives distinct firing-dependent and dynamin-mediated synaptic vesicle recycling, 第 39 回日本神経科学学会大会、平成 28 年 7 月 21 日、横浜

⑮ 持田澄子, シナプス前終末. 第 93 回日本生理学会教育講演平成 28 年 3 月 24 日、札幌

⑯ Sumiko Mochida, Neural activity sets endocytic and motor proteins for synaptic vesicle recycling, FAOPS 2015, November 23 2015, Bangkok

⑰ Sumiko Mochida, Neural activity sets endocytic and motor proteins for synaptic vesicle resupply, 第 38 回 日本神経科学大会 Neuro2015、シンポジウム「プレシナプス機能解明への最前線」、平成 27 年 7 月 30 日、神戸

⑱ Sumiko Mochida, Physiological approaches to study presynaptic motor proteins in vesicle use pathways, 第 92 回日本生理学会日韓合同シンポジウム “Morphological and physiological approaches to synaptic transmission”, 平成 27 年 3 月 22 日、神戸

⑲ Michinori Mori, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Kinetic organization of Ca²⁺ signals that regulate synaptic release efficacy, 第 92 回 日本生理学会大会、平成 27 年 3 月 21 日、神戸

⑳ Shota Tanifuji, Christian Vogl, Gary J. Stephens, Sumiko Mochida, Synaptic vesicle glycoprotein 2A modulates vesicular release at sympathetic synapses, Neuro 2014 (第 38 回日本神経科学学会大会)、平成 26 年 9 月 12 日、横浜

㉑ Sumiko Mochida, Inhibition of synaptic transmission and G protein modulation by synthetic Ca_v2.2 channel peptide, 第 87 回日本薬理学会年会シンポジウム JPS Symposia S2D-25 “Novel aspects of voltage-gated Ca²⁺ channels: emerging trends for drug development”, 平成 26 年 3 月 20 日、仙台

㉒ Michikata Hayashida, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Myosin IIB and VI regulates synaptic vesicle trafficking at presynaptic terminals, 第 91 回 日本生理学会大会、平成 26 年 3 月 17 日、鹿児島

㉓ Michinori Mori, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Temporal Ca²⁺ regulation of synaptic vesicle release efficacy following action potential firing at the release site, 第 91 回 日本生理学会大会、平成 26 年 3 月 17 日、鹿児島 (ポスター賞受賞)

㉔ Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons, 第 91 回 日本生理学会大会、平成 26 年 3 月 17 日、鹿児島

㉕ Shota Tanifuji, Michikata Hayashida, Sumiko Mochida, Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling in sympathetic neurons, 第 92 回 日本生理学会大会、平成 26 年 3 月 21 日、神戸

㉖ Michikata Hayashida, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Myosins IIB and V mediate different pathways of synaptic vesicle replenishment, Godon Research Conference, August 5, 2014, Water Ville Valley

㉗ Michikata Hayashida, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Myosins mobilize synaptic

vesicles at presynaptic nerve terminals, FE NS 2014, July 7, 2014, Milano

㉘ Michinori Mori, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Temporal and special change in residual Ca²⁺ regulates synaptic vesicle recycling and presynaptic short-term plasticity. Neuro2013, November 11, 2013, San Diego

㉙ Michikata Hayashida, Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Myosin IIB regulates synaptic vesicle trafficking at a cholinergic nerve terminal. Neuro2013, November 11, 2013, San Diego

㉚ Toshihisa Ohtsuka, Yamato Hida, Huan Ma, Shota Tanifuji, Isao Kitajima, Sumiko Mochida, CAST phosphorylation mediates short-term synaptic depression, Neuro 2013 (第36回日本神経科学学会大会)、平成25年6月20日、京都

〔図書〕(計 3 件)

① Sumiko Mochida, Transmitter release, in “Physiology of Neurons” Ed. Anne Feltz, Garland Science, in press.

② 持田澄子, 伝達のしくみ「神経疾患」部門、内科学書、中山書店、in press.

③ Sumiko Mochida, Presynaptic terminals, Springer, pp365, 2015. 編集

Sumiko Mochida, Overview: Presynaptic terminal proteins orchestrate stepwise synaptic vesicle phases. In the Presynaptic terminals (S. Mochida, Eds.), Springer, pp3-44, 2015.

Karina Leal, Sumiko Mochida, Regulation of active zone Ca²⁺ channels (S. Mochida, Eds.), Springer, pp195-220, 2015.

Shota Tanifuji, Sumiko Mochida, Dynamin is a key molecule to decode action potential firing. In the Presynaptic terminals (S. Mochida, Eds.), Springer, pp257-271, 2015.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

持田 澄子 (MOCHIDA, Sumiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30096341

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()