

## 論文の内容の要旨

### The physical entity of the synaptic vesicle release site: a Munc13 supramolecular nanoassembly

(シナプス小胞放出部位の物理実体：Munc13 超分子ナノ構造)

坂本寛和

#### 序論

シナプス伝達はプレシナプス細胞のシナプス前終末から放出される神経伝達物質がポストシナプスに発現する受容体と結合し、ポストシナプス細胞の細胞膜電位を変動させることによって成立する。脳機能の根幹は、プレシナプスにおける神経伝達物質放出量の変化やポストシナプスにおける受容体の個数の変化等のシナプス可塑性によって、神経回路における各々のシナプスの重みがダイナミックに調節されることにある。しかしながら、シナプス伝達の重み付けがどのような分子メカニズムで実行されているのか、特にプレシナプスの面において、不明な点が多い。神経伝達物質は直径 40 ナノメートル程の脂質二重膜で構成されたシナプス小胞の中に充填されており、アクティブゾーンと呼ばれるシナプス前終末の特殊な領域において、シナプス小胞と細胞膜との膜融合を介して放出される。1970 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した Bernhard Katz らによる量子仮説によって、神経伝達物質の放出量は、1) シナプス小胞放出部位の個数、及び 2) 放出確率の二つの特性によって決まることが提唱された。神経回路の情報処理機構の解明における重要性から、これら二つの特性の分子実体及び動作原理を探ることが神経科学における長年の目標の一つであった。電気生理学的手法と電子顕微鏡による組織学的解析を用いた過去の先行研究によれば、量子仮説に基づく解析によって推定されたシナプス小胞放出部位の個数は形態学的にみられるシナプスの個数によく一致した。ほとんどの中枢シナプスはアクティブゾーンを一つだけ持つので、これらの先行研究ではアクティブゾーン自体がシナプス小胞放出部位の物理実体であると結論づけられた。他方、いくつかの研究においては単一のシナプス前終末から同時に複数のシナプス小胞が放出される事が示されており、アクティブゾーンの中に複数のシナプス小胞放出部位が構築されている可能性が示唆された。

本研究では、シナプスレベルで神経伝達物質グルタミン酸の可視化解析を行う技術を開発し、量子仮説に基づく解析によって、単一のシナプスには平均で 5 つシナプス小胞放出部位が存在することを実証した。さらに、超解像分子イメージング技術の一つである STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) を適用して、シナプスタンパク質 Munc13-1 を中心とする超分子集合体がシナプス小胞放出部位の分子実体であり、その個数が個々のシナプスの神経伝達物質の最大放出量を規定している可能性を示した。

#### シナプスにおけるグルタミン酸放出の可視化

高感度のグルタミン酸蛍光センサー (eEOS: enhanced glutamate (E) Optical Sensor)を開発し、脳の主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の単一シナプスレベルの蛍光イメージング技

術を構築した。eEOS を C 型ボツリヌス毒素の非毒性 C 末端神経結合ドメイン(BoNT-C/Hc)とつなぐことで、神経細胞に特異的に標識し、個々のシナプスにおける神経伝達物質放出の直接計測を可能にした。eEOS-BoNT-C/Hc を用いた海馬培養神経細胞における計測では、素量的放出過程、つまり単一のシナプス小胞からグルタミン酸が放出される過程を高精細に捉えることができた。さらに、電気生理学的解析に広く用いられている素量解析法 (multiple-probability fluctuation analysis) をグルタミン酸のイメージングの結果に適用することで、個々のシナプスの神経伝達物質放出強度を決めている上記の二つの特性を定量的に抽出することに成功した。特に、シナプス小胞放出部位の個数は、シナプスあたり平均で 5 個存在し、シナプス毎に大きく異なる (2~18 個) ことが明らかとなった。すなわち、個々のシナプスの情報量は 1 か 0 の二進数的ではなく、複数ビットの情報量を持ちうることを示された。

### シナプス小胞放出部位の個数と Munc13-1 分子数の因果的關係

アクティブゾーンには、Munc13、RIM、CAST/ELKS、RIMBP 及び Liprin など進化的によく保存されたタンパク質や、Bassoon 及び Piccolo/Aczonin など脊椎動物で発現がみられるタンパク質などいくつかのタンパク質が特異的に発現している。それらの中でも Munc13 はとりわけ神経伝達物質の放出との関わりが強い。なぜなら、Munc13 を欠失したシナプスではほぼ完全に神経伝達物質の放出が見られなくなるからである。従って、Munc13 がシナプス小胞放出部位の形成に関わっていると考えるとほぼ間違いないであろう。そこで、シナプス小胞放出部位の個数と Munc13 の関係を直接調べるため、蛍光色素で直接標識したモノクローナル抗体を用いて Munc13-1 の分子数を定量した。単一のシナプスには平均で 54 個の Munc13-1 分子が存在したが、興味深いことに、グルタミン酸可視化解析によって推定されたシナプス小胞放出部位の個数と Munc13-1 の分子数の間で強い正の相関が見られた。さらに、シナプスあたりの Munc13-1 分子の個数を遺伝子ノックダウン実験によってさまざまな量に操作したところ、Munc13-1 分子の個数とシナプス小胞放出部位の個数はどの条件でも同程度減少することが分かり、シナプス小胞放出部位の個数と Munc13-1 分子数の間には因果関係があることが示された。

### STORM による Munc13-1 超分子集合体の定量

Munc13-1 とシナプス小胞放出部位の関係をさらに詳細に調べるため、STORM を用いてシナプス内の Munc13-1 の局在をナノメートルスケールで詳細に解析した。驚くべきことに、Munc13-1 はシナプス内で 10 分子程度から成る超分子集合体 (Munc13-1 超分子集合体) を複数形成しており、それぞれがおよそ 90 ナノメートルの間隔で秩序を持って配置されていた。STORM 解析によって、Munc13-1 超分子集合体にはシナプス小胞の開口放出に必須である SNARE 複合体の主要タンパク質 syntaxin-1 を捕捉する機能があることも分かった。STORM 解析とグルタミン酸可視化解析を組み合わせることで分かった最も重要なポイントは、シナプス小胞放出部位の個数と Munc13-1 超分子集合体の個数は一対一で対応したということである。さらに、遺伝子ノックダウン実験によって Munc13-1 分子数を操作したシナプスでは、Munc13-1 超分子集合体の個数とシナプス小胞放出部位の個数が同数だけ減少することが分かり、これら二つの間には因果関係があることが

示された。これらの結果は、Munc13-1 超分子集合体がシナプス小胞放出部位の物理的実体である可能性を示している。

#### シナプス小胞放出部位の再構成

Munc13-1 超分子集合体は、シナプス前終末に局在している他のタンパク質群に依存して形成されていることも考えられるが、一つの可能性として、Munc13-1 の自律的な機能によって支持されていることが考えられる。そこで、Munc13-1 を非神経細胞（293T 細胞または COS-7 細胞）に強制発現させ、シナプス特有のタンパク質群が存在しない環境における Munc13-1 分子の挙動を調べた。シナプスでは Munc13-1 は細胞膜付近に局在することが分かっていたので、非神経細胞においても細胞膜移行シグナルと RIM1 との結合を利用して、人工的に細胞膜付近に局在させた。細胞膜に局在させた Munc13-1 分子は、驚くべきことに、自発的に自己組織化し分子集合体を形成することが分かった。STORM 顕微鏡で見ると、シナプスで観察されたものと同様に、ナノメートルサイズの Munc13-1 超分子集合体が確認できた。Syntaxin-1 と Munc18-1 を共発現させると、これらのタンパク質は Munc13-1 の自己集合体に捕捉されることも明らかとなった。これらの結果は Munc13-1 には自己集合能があり、シナプス小胞放出部位形成において決定的な役割を担っている可能性を示している。

#### 考察

本研究では単一シナプスレベルのグルタミン酸イメージング法を開発し、個々のシナプスのプレシナプス特性を精細に解析することによって、アクティブゾーンの中に独立した複数のシナプス小胞放出部位が存在することを明らかにした。また、超解像顕微鏡によって Munc13-1 超分子集合体を発見した。Munc13-1 超分子集合体の個数及びその特性は、グルタミン酸イメージング法で推定したシナプス小胞放出部位と良く対応した。これらの結果から、Munc13-1 超分子集合体がシナプス小胞放出部位の物理実体であり、Munc13-1 超分子集合体の個数を制御することによってプレシナプスの神経伝達物質放出量の調節がなされているという仮説を提唱した。

神経伝達物質放出量はシナプス小胞放出部位の個数と放出確率によって決定される。グルタミン酸イメージングによる解析で、これら二つの特性はシナプス間で独立に異なった分子メカニズムで制御されていることが推定できた。本研究で確立したグルタミン酸イメージングと超解像顕微鏡法を組み合わせたシナプス機能の解析によって今後さらに放出確率の分子基盤を決定する分子基盤が明らかになるだろう。

アクティブゾーンの中で Munc13-1 は高い秩序を持って配置されていた。アクティブゾーンタンパク質の秩序を持った空間配置が、シナプスの安定した機能を支持している可能性は高い。また、アクティブゾーンタンパク質の空間配置の制御がシナプスの可塑性の根底にある可能性もある。Munc13-1 は自己集合能をもっており、また Munc13-1 を中心としてアクティブゾーンタンパク質は密に相互作用している。高度に制御された相互作用が秩序を持った空間配置を作り出す助けとなっているだろう。今後、アクティブゾーンタンパク質間の相互作用及び自己集合能によって、シナプス分子の秩序配置を説明できるモデルの構築が期待される。

タンパク質の超分子集合現象がシナプス機能を制御しているという今回の発見は、超分子集合がさまざまな生理機能の根底にあるのではないかという新しい視点を与える。タンパク質の超分子集合は、有限個の分子によって支えられている現象（細胞運動、神経細胞の可塑的変化、遺伝子情報の保存等）を、分子の個数揺らぎ・ノイズを越えて実現するための生命の本質ではないかと考えられる。