

## 博士論文

論文題目          シナプス分子 Munc13-1 によって制御される  
神経伝達物質の開口放出

氏名                      有吉 哲郎

シナプス分子 Munc13-1 によって制御される  
神経伝達物質の開口放出

東京大学大学院 医学系研究科

医学博士課程 脳神経医学専攻

指導教員

廣瀬 謙造

申請者

有吉 哲郎

## 目次

要旨	3
序文	4
方法	9
結果	26
考察	39
引用文献	43
図	51
付録	71
謝辞	73

## 要旨

Munc13-1 はシナプス前終末からの神経伝達物質開口放出を制御する重要な分子であるが、分子内の天然変性領域について機能が調べられたことはなかった。

本研究では神経細胞の Munc13-1 を天然変性領域が欠失した変異体に置き換え、グルタミン酸の開口放出を蛍光プローブによって可視化した。その結果、天然変性領域が開口放出されるグルタミン酸の量を制御していることを示した。さらに超解像イメージング技術を用いてシナプスにおける変異体の微細構造を明らかにし、天然変性領域が Munc13-1 のアクティブゾーンへの局在とナノクラスターの形成を制御していることを示した。

## 序文

中枢神経系の神経回路では神経細胞同士がシナプスと呼ばれる構造を介して接触し情報の伝達を行っている。シナプス前細胞で発生した活動電位はシナプス前終末に到達すると神経伝達物質の開口放出を引き起こし、放出された伝達物質はシナプス後部の受容体に結合してイオンを流入させシナプス後細胞の興奮を促す<sup>1</sup>。このシナプス伝達と呼ばれる過程は神経回路における情報処理の素過程として捉えられており<sup>2</sup>、従ってシナプス伝達の詳細を明らかにすることは神経回路での情報処理機構を解明する上で非常に重要である<sup>3</sup>。

特にシナプス前終末からの神経伝達物質開口放出については、神経伝達物質が充填された分泌小胞であるシナプス小胞がアクティブゾーンと呼ばれる細胞膜直下領域の膜との間で膜融合を起こすことによって神経伝達物質が細胞外へと放出されるというメカニズムが既によく知られている<sup>4</sup>。シナプス前終末に存在するシナプス小胞のうち放出される準備ができているシナプス小胞は即時放出可能な小胞と呼ばれる<sup>5</sup>。即時放出可能な小胞は活動電位に応じて確率的に放出されることが知られており、その確率は放出確率と呼ばれる<sup>6</sup>。即時放出可能な小胞数と放出確率は開口放出される神経伝達物質の量を決定する主要因であり<sup>7</sup>、その値が神経活動に依存して可塑的に変化することやシナプスの種類によって大きく異なることなどが知られている<sup>8,9</sup>。アクティブゾーンに局在するタンパク質群が何らかの形で即時放出可能

な小胞数や放出確率を制御していると考えられるが<sup>10</sup>、詳細な分子メカニズムについては未解明の部分が多く残されている。

アクティブゾーンに局在し神経伝達物質開口放出の制御に関わることが示唆されているタンパク質として、膜融合を引き起こす装置である SNARE 複合体の構成分子 Syntaxin-1<sup>11, 12</sup>、活動電位依存的なカルシウム流入を引き起こす P/Q type カルシウムチャンネル<sup>13</sup>、足場タンパク質である Bassoon や Piccolo<sup>14, 15</sup>、様々なアクティブゾーンタンパク質同士を結びつける役割を果たすと考えられている RIM、CAST や Rimbp<sup>16-21</sup>、シナプス小胞を開口放出可能な状態にする役割を果たす Munc13-1 や Munc18-1<sup>22</sup> などが知られている。特に Munc13-1 については、先行研究から開口放出に必要な不可欠な分子であることがよく知られている<sup>23</sup>。

電気生理学的実験から Munc13-1 ノックアウトマウスでは即時放出可能な小胞がほぼ消失することが分かっている<sup>23</sup>。また高圧凍結法を用いた電子顕微鏡観察により Munc13-1 ノックアウトマウスのシナプス前終末では即時放出可能な小胞の形態学的実体であると見なされるアクティブゾーンの膜に接触したシナプス小胞が見られなくなることが報告されている<sup>24-26</sup>。加えて、確率的光学再構築顕微鏡法

(STORM) による超解像イメージングにより Munc13-1 がアクティブゾーンにおいて直径数十 nm 程度のナノスケールのクラスター (ナノクラスター) を形成しており、さらに個々のシナプスにおいて Munc13-1 ナノクラスター数と即時放出可能な小胞数がほぼ一致することが示されている (付録参照)。これらの先行研究における

知見は Munc13-1 が即時放出可能な小胞数の制御に強く関わる重要な分子であることを示している。

Munc13-1 分子内にはいくつかの機能ドメインが存在することが知られており、それぞれのドメインが開口放出の制御にどのような役割を果たしているのかこれまで多くの知見が得られている (図 1)。C<sub>2</sub>A ドメインを含む N 末領域は RIM、Bassoon、Piccolo、CAST と結合可能であることが示されており<sup>27</sup>、特に C<sub>2</sub>A ドメインと RIM との結合は正常な開口放出の実現に重要であることが分かっている<sup>28-30</sup>。460 から 477 番目のアミノ酸領域は Calmodulin との結合部位であり、開口放出によってシナプス小胞が枯渇した際アクティブゾーンにシナプス小胞が再充填される過程に重要な役割を担っている<sup>31,32</sup>。C<sub>1</sub> ドメインはホルボールエステル及びジアシルグリセロールの結合ドメインとして働いており、これらの分子の結合によって C<sub>1</sub> ドメインが活性化されるとグルタミン酸開口放出が亢進することが知られている<sup>33-35</sup>。C<sub>2</sub>B ドメインはカルシウム結合部位であり、カルシウム依存的な構造変化によってホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸と結合し放出確率の上昇をもたらすことが報告されている<sup>36</sup>。MUN ドメインは細胞膜側に位置する SNARE タンパク質である Syntaxin-1 の立体構造を closed form と呼ばれる状態から open form と呼ばれる状態に変化させる触媒能を有しており、この触媒能が SNARE 複合体の形成に必要不可欠であることが示されている<sup>37-41</sup>。以上のように Munc13-1 のほぼ全長にわたって各ドメインの持つ機能が調べられているが、C<sub>2</sub>A ドメインと

Calmodulin 結合部位との間に位置する領域についてはそのアミノ酸配列が知られている機能ドメインとの相同性を持たず、限られた種類のアミノ酸残基が繰り返し現れる複雑性の低い配列であることから<sup>38</sup>、その性質や機能についてこれまであまり注目されてこなかった。

タンパク質の一次構造中にはしばしば配列複雑性の低い領域が含まれており、そのような領域は多くの場合特定の立体構造をとらないことが知られている<sup>42</sup>。<sup>43</sup>。タンパク質あるいはその一部が定まった立体構造をとらない性質のことを天然変性と呼ぶ<sup>43</sup>。従来天然変性の性質を持つ領域は定まった立体構造をとる機能ドメイン間のリンカー程度の役割を担うに過ぎず、積極的な生理的機能を持たないと考えられてきた<sup>44</sup>。しかしながら近年の研究から天然変性領域は様々なタンパク質と相互作用するハブとしての性質を持つ場合があることが分かってきており<sup>45</sup>、RNA 粒子の形成、核膜孔複合体の形成、転写・翻訳の制御など様々な場面において重要な生理的機能を担っていることが明らかにされつつある<sup>46-50</sup>。シナプスにおいてもアクティブゾーンに局在するタンパク質 mSYD1A に含まれる天然変性領域が開口放出の機能制御に関わっていることが示されており<sup>51</sup>、また Munc13-1 を含む多くのアクティブゾーン局在分子内に天然変性領域が存在することが報告されている<sup>51</sup>。以上の知見から、Munc13-1 の C<sub>2</sub>A ドメインと Calmodulin 結合部位間の領域が天然変性領域としてシナプスにおける開口放出に重要な生理的機能を担っている可能性があるのではないかと考えた。



本研究ではこれまで機能未知であった **Munc13-1** の **C<sub>2</sub>A** ドメインと **Calmodulin** 結合部位の間の領域に着目し、その内部に天然変性領域が含まれることを見出した。開口放出における生理的役割について調べたところ、**Munc13-1** の天然変性領域は即時放出可能な小胞数を制御していることが明らかとなった。また **STORM** を用いた超解像イメージングによって天然変性領域が **Munc13-1** のアクティブゾーンにおける正常なナノクラスター形成に働いていることを示した。非神経細胞における局在の観察から天然変性領域が **Munc13-1** の集合体形成に関わることを示し、天然変性領域を介した **Munc13-1** の自己相互作用及び他のアクティブゾーンタンパク質との相互作用が正常なナノクラスター形成と神経伝達物質の開口放出に必要である可能性を示した。

## 方法

### プラスミドの作製

#### アデノ随伴ウイルス (AAV) 作製用プラスミド

Munc13-1 に対する shRNA の発現プラスミド (pAAV shMunc13-1 clone1 及び clone2) は、pAAV-MCS (アジレント・テクノロジー) の NotI サイト間に U6 プロモーター配列と Munc13-1 に対する shRNA の配列 (clone 1: CTCCCGGAAGAAT CAGGAAG、clone 2: TTCCTGCCTGGATTTGGAG) をサブクローニングすることで得た。

#### レンチウイルス作製用プラスミド

テトラサイクリン応答因子の下流で HA タグと Munc13-1 の融合タンパク質を発現させるプラスミド (pLenti 6PW HA-Munc13-1) は以下の方法で得た。まずラット Munc13-1 を発現させるプラスミド (pEGFP-Munc13-1<sup>33</sup>、Dr. Nils Brose より供与) をテンプレートとし、HA タグ配列を付与したプライマーを用いたインバーサ PCR を行い Munc13-1 の 250 番目のアミノ酸残基と 251 番目のアミノ酸残基の間に HA タグを挿入した (フォワードプライマー: 5'-GCTAGCCCGCGGGCACT CAGTCCCAC-3'、リバープライマー: 5'-CCTCCAGCATAATCTGGAACATCATA TGGATACTCAGAGAACTCTTCATAGCTGTG-3')。得られた PCR 産物をリガーゼ

(タカラバイオ) で処理し、さらに PCR で開始コドンの 5' 側に attb1 配列を、終止コドンの 3' 側に attb2 配列を付加して pLenti 6PW プラスミド<sup>52</sup> に Gateway テクノロジー (Invitrogen) を用いて挿入した。

Munc13-1 の 251 から 320 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体及び 321 から 450 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体を発現させるプラスミド (pLenti 6PW HA-Munc13-1- $\Delta$ 251-320 及び pLenti 6PW HA-Munc13-1- $\Delta$ 321-450) は、pLenti 6PW HA-Munc13-1 をテンプレートにインバース PCR を行い、ライゲーション反応を行った後にクローニングすることで得た。

#### COS-7 細胞での発現用プラスミド

Munc13-1 と単量体緑色蛍光タンパク質 (mEGFP) の融合タンパク質の C 末にプレニル化配列を付与したタンパク質を発現させるプラスミド (pMunc13-1-mEGFP-CAAX) は次の手順で得た。まず Munc13-1 と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の融合タンパク質を発現させるプラスミド pEGFP-Munc13-1 をテンプレートとしてインバース PCR を行うことで EGFP 内に点変異を導入し、Munc13-1 と mEGFP の融合タンパク質を発現させるプラスミド pMunc13-1-mEGFP を得た。pMunc13-1-mEGFP をテンプレートとして KRas のプレニル化配列 (KMSKDGKKK KKKSCTKCVIM) をコードする塩基配列を付与したプライマーを用いたインバース PCR を行い、ライゲーション反応を行った後にクローニングすることで pMunc13-

1-mEGFP-CAAX を得た。部分欠失変異体と mEGFP 及びプレニル化配列の融合タンパク質を発現させるプラスミド (pMunc13-1- $\Delta$ 251-320-mEGFP-CAAX 及び pMunc13-1- $\Delta$ 321-450-mEGFP-CAAX) は pMunc13-1-mEGFP-CAAX をテンプレートにインバース PCR を行い、ライゲーション反応を行った後にクローニングすることを得た。すべてのプラスミドはサンガーシーケンスによって配列を確認した。

### 海馬神経細胞とグリア細胞の共分散培養

妊娠 21 日目の Sprague-Dawley ラットから胎児を取り出し、直ちに胎児の脳から海馬を抽出した。抽出した海馬をトリプシン (Invitrogen) と DNase I (Sigma) で消化し、神経細胞を分離した。神経細胞はポリ-L-リシン (ナカライテスク) 及びラミニン (Invitrogen) でコートした厚さ 0.12 ~ 0.17 mm のカバーガラス (松浪硝子、25 × 25 mm) の上で単層に撒かれたラット海馬由来のグリア細胞と共に 2 % B-27 サプリメント (Invitrogen)、1 % glutamax (Invitrogen)、1 % ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen) を含む Neurobasal-A 培地 (Invitrogen) により二酸化炭素濃度 5 %、37 °C で 21 日から 31 日間培養した。培養開始 1 日後に cytosine arabinoside (終濃度 2  $\mu$ M、Sigma Aldrich) を加え、その後 5 ~ 7 日毎に培地を半量交換した。すべての動物実験は東京大学動物実験実施マニュアルに従って行い、医学系研究科動物実験委員会の承認を得ている。

## AAV の作製と神経細胞への感染

10 % ウシ胎児血清 (FBS、Sigma) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Wako) 中で二酸化炭素濃度 5 %、37 °Cにおいて培養した 293T 細胞 (Gen Hunter) に対し、XtremeGENE HP DNA (ロシュ・ライフサイエンス) を用いて pAAV shMunc13-1 clone1 と pAAV shMunc13-1 clone2 の等量混合液、pAAV-RC 及び pHelper (アジレント・テクノロジー) を導入した。48 時間培養した後セルスクレーパーを用いて細胞を回収し、凍結融解によって細胞を破碎した。得られた細胞破碎液を DNase I で処理した後 Opti-Prep (Axis-Shield) を用いた非連続密度勾配超遠心分離法<sup>53</sup> によって AAV 粒子を精製した。得られたウイルス液を Amicon Ultra (30K、メルクミリポア) を用いて濃縮し、使用時まで -80 °Cで保存した。

神経細胞への AAV の感染には培養日数 10 ~ 14 日の神経細胞を用いた。培地 500  $\mu$ l に対し 2 ~ 5  $\mu$ l の解凍したウイルス液を加え、感染後 10 ~ 16 日間培養した。

## レンチウイルスの作製と神経細胞への感染

HA タグと Munc13-1 の融合タンパク質を発現させるレンチウイルスを作製するため、293T 細胞に対し XtremeGENE HP DNA を用いて pLenti 6PW HA-Munc13-1、psPAX2 及び pMD2.G を導入した。48 時間後培地を全て回収し、4 °Cで 8 分、200 g で遠心して細胞を落とした。上清を 4 °Cで一晩 9,000 g で遠心し、

上清を捨て神経細胞の培養に用いる培地で再懸濁することでウイルス液を得た。同様の手順により Munc13-1 の各種部分欠失変異体を発現させるウイルス液を作製した。また、pLenti 6PW STB<sup>52</sup> より synapsin プロモーターの下流でテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA) を発現させるウイルス液を作製した。得られたウイルス液は使用時まで -80 °C で保存した。

神経細胞へのレンチウイルスの感染には培養日数 14 ~ 21 日の神経細胞を用いた。培地 500  $\mu$ l に対し tTA を発現させるウイルス液と各 Munc13-1 を発現させるウイルス液をそれぞれ 5 ~ 20  $\mu$ l 加え、さらに 7 ~ 10 日間培養した。レンチウイルスに感染させた後ドキシサイクリン (Clontech) を終濃度 20 pg/ml ~ 50 pg/ml になるよう加え、発現量を調整した。

## 免疫染色

培養海馬神経細胞を 1% のパラホルムアルデヒド、4% のスクロースを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS、600 mM 塩化ナトリウム、2.68 mM 塩化カリウム、9.58 mM リン酸一水素ナトリウム、1.47 mM リン酸二水素カリウム) によって室温で 8 分間固定した後、0.1% のサポニン (Sigma) を含む PBS で室温 5 分間処理することで細胞膜の透水性を上げた。0.1% のサポニンと 3% のウシ血清アルブミン (BSA、ナカライテスク) を含む PBS (BSA-PBS) 中で室温 15 分間ブロッキング処理をした後、一次抗体 (後述) を BSA-PBS 中で 1 時間反応させた。一次抗体を洗浄した後に、

蛍光標識した二次抗体（後述）を BSA-PBS 中で室温 30 分間反応させた。反応後 BSA-PBS で細胞を洗浄し、4 % のパラホルムアルデヒド、4 % のスクロースを含む PBS により室温で 15 分間後固定を行った後通常の顕微鏡あるいは STORM 顕微鏡による観察まで 0.09 % のアジ化ナトリウム（ナカライテスク）を含む PBS 中で 4 °Cにて保存した。

### 蛍光画像の取得、解析

免疫染色した標本の通常の顕微鏡による観察にはキセノンアークランプを備えた倒立顕微鏡 (IX-71、Olympus) 及び 100 倍の油浸対物レンズ (Olympus、UPlanSApo、開口数 1.4) を用いた。蛍光画像は EM-CCD カメラ (iXon、Andor) を用いて取得し、Alexa Fluor 405 の蛍光画像を取得する際は励起フィルター FF01-377/50-25 (Semrock)、吸収フィルター FF02-438/24-25 (Semrock)、ダイクロイックミラー FF409-Di03-25x36 (Semrock) からなるキューブを、Alexa Fluor 488 の蛍光画像を取得する際は U-MGFPHQ フィルターセット (Olympus) を、Alexa Fluor 555 の蛍光画像を取得する際は U-MRFPHQ フィルターセット (Olympus) を、Alexa Fluor 647 の蛍光画像を取得する際は Cy5-4040A フィルターセット (Semrock) を、DyLight 755 の蛍光画像を取得する際は Cy7-B フィルターセット (Semrock) を用いた。

取得した画像は ImageJ (NIH) を用いて解析した。Munc13-1 の免疫染色強度の定量においてはまず Bassoon の免疫染色画像においてスポット状に蛍光シグナル

が見られた領域を Bassoon 陽性のシナプス前終末であると見なし、その周囲に設定した  $1.3 \times 1.3 \mu\text{m}$  の注目画像領域 (ROI) をシナプス上の ROI とした。この時複数のシナプスが ROI 内に含まれないような場所に限り解析対象とした。シナプス上の ROI の近傍で Bassoon 由来のシグナルがない場所に同じく  $1.3 \times 1.3 \mu\text{m}$  の補正用 ROI を設定した。次に Munc13-1 の免疫染色画像においてシナプス上の ROI における蛍光強度の値から補正用 ROI における蛍光強度の値を差し引き、得られた値を対象としたシナプスにおける Munc13-1 の分子数を反映した値とした。

## 抗体

Bassoon に対する抗体はマウスモノクローナル抗体 (Enzo Life sciences、clone SAP7F407、1/500 – 1/2000) あるいはウサギポリクローナル抗体 (Synaptic Systems、141-003、1/200) を用いた。Munc13-1 に対する抗体はすべて独自に作製したマウスモノクローナル抗体を用いた。クローン 5D-7G ( $2.5 \mu\text{g/ml}$ ) は 1 ~ 320 番目のアミノ酸残基を抗原として作製し、エピトープは 1 ~ 250 番目のアミノ酸残基内に位置する。クローン 11B-10G ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) は 1 ~ 320 番目のアミノ酸残基を抗原として作製し、エピトープは 251 ~ 320 番目のアミノ酸残基内に位置する。クローン 2-A5 ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) は Munc13-1 の 859 ~ 1531 番目のアミノ酸残基を抗原として作製した。抗 HA タグ抗体はマウスモノクローナル抗体 (MBL、M180-3、1/500) を、抗 VGlut1 抗体はウサギポリクローナル抗体 (フロンティア研究所、VGlut1-Rb-Af500、1/2000)



を、抗 RIM 1/2 抗体はウサギポリクローナル抗体 (Synaptic Systems、140-203、1/200) を用いた。

二次抗体は未標識の抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch、715-005-151、115-005-205、115-005-206、115-005-207) 及び抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch、111-005-047) を NHS 基を付した蛍光色素 Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 647 (Life Technologies) と DyLight 755 (Thermo Scientific) で標識したものを終濃度約 1  $\mu\text{g/ml}$  で用いた。

### **eEOS と BoNT/C-Hcの精製**

グルタミン酸受容体 GluA2 のグルタミン酸結合領域である S1S2 タンパクの 448 番目のグリシン残基をシステインに変異させた組換えタンパク質 G448C を発現させるプラスミド pET S1S2-G448C<sup>54</sup> で大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。50  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む 2 $\times$ YT 培地中に形質転換後の大腸菌を加え、600 nm での吸光度が 1 に達するまで 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。さらに終濃度 0.5 mM の IPTG (Wako) を加え、13  $^{\circ}\text{C}$  で 36 時間振盪培養した。

大腸菌のペレットに培養液 1000 ml あたり 100 ml のリン酸バッファー (PBS) を加えてペレットを溶解した。フレンチプレス (SLM-Aminco Rochester) を用いて大腸菌を破碎し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 15 分間、15,000 g で遠心して上清を回収した。回収した上清 100 ml につき 300  $\mu\text{l}$  の TALON Metal Affinity Resin (Clontech) を添加し、氷中で 15

分間振盪して G448C を吸着させた。4 °C で 3 分間、1,500 g で遠心し上清を除去した後 10 mM イミダゾール含有 PBS で 3 回洗浄した。洗浄後 150 mM イミダゾール含有 PBS を加え、氷中で 15 分間振盪し G448C を溶出させた。振盪後 4 °C で 3 分間、1,500 g で遠心して溶出液を回収し G448C を得た。得られた G448C は Mono S 5/50 GL (GE ヘルスケア) を用いてさらに精製した。10  $\mu$ M の G448C を含む溶出液に終濃度 25  $\mu$ M となるように Alexa Fluor 488 maleimide (Life Technologies) を加え氷上で 45 分間反応させ、G448C のチオール基に Alexa Fluor 488 を標識することで eEOS を得た。反応後 PD-10 column (GE Healthcare) を用いて未反応の Alexa Fluor 488 maleimide を除去し、eEOS を精製した。

ボツリヌストキシンタイプ C 重鎖の C 末領域 (BoNT/C-Hc) を発現させるプラスミド pET-30a Hc/CB-19<sup>55</sup> (大阪府立大学小崎俊司教授より供与) で大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した。20  $\mu$ g/ml のカナマイシンを含む 2 $\times$ YT 培地中に形質転換後の大腸菌を加え、600 nm での吸光度が 0.6 に達するまで 37 °C で培養した。さらに終濃度 0.1 mM の IPTG を加え、25 °C で 24 時間振盪培養した。大腸菌ペレットからのタンパク質精製は eEOS と同様に行った。

### **eEOS の神経細胞への標識**

精製した eEOS と BoNT/C-Hc は NHS-PEG<sub>4</sub>-biotin (Thermo Scientific) を用いてビオチン化した。eEOS については 10  $\mu$ M のタンパク質溶液と 300  $\mu$ M の

NHS-PEG<sub>4</sub>-biotin を、BoNT/C-HC については 10 μM のタンパク質溶液と 200 μM の NHS-PEG<sub>4</sub>-biotin を混合し、4 °C で 45 分間反応させた後、NAP-5 カラム (GE ヘルスケア) を用いて未反応の NHS-PEG<sub>4</sub>-biotin を除き、さらに Amicon Ultra (30K、メルクミリポア) を用いて濃縮した。ストレプトアビジン (Vector)、ビオチン化 BoNT/C-Hc とビオチン化 eEOS を分子量比 1:1:3 で混合することで eEOS と BoNT/C-Hc の複合体を作製し、液体窒素を用いて急速凍結した後使用時まで -80 °C で保存した。

神経細胞上に eEOS を標識するため、HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS; 25 mM HEPES、115 mM 塩化ナトリウム、2.5 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化カルシウム、1 mM 塩化マグネシウム、25 mM D-グルコース、10 mM L-アスコルビン酸ナトリウム、3 mM myo-イノシトール、2 mM ピルビン酸ナトリウム、pH 7.4) に eEOS と BoNT/C-Hc の複合体を終濃度 0.5 μM (BoNT/C-Hc 換算) となるよう加えた液で培養神経細胞を室温 20 分間インキュベートした。eEOS で標識された神経細胞は HBS による洗浄を 4 回経た後に以降の実験に使用した。

なお、この方法によって eEOS が神経細胞軸索表面に標識されること、シナプス間隙中にも eEOS が標識されることを確認している。

### 神経細胞における蛍光グルタミン酸イメージング

細胞の観察は倒立顕微鏡 (IX-71、Olympus) を用いて行った。光源には LED

照明 (LCS-BC25-0495、Mightex) を用いた。観察には 100 倍の油浸対物レンズ (Olympus、UPlanSApo、開口数 1.4) を用いた。撮影は電子増幅機能を備えた冷却 CCD カメラ (iXon、Andor) によって行い、蛍光の観察はフィルターセット U-MGFPHQ (Olympus) を用いた。

電気刺激実験に際しては神経細胞の自発発火と回帰的な活動を防ぐため細胞外液の HBS に AMPA 型グルタミン酸受容体の非拮抗阻害薬 GYKI52466 (Tocris、終濃度 100  $\mu$ M)、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害薬 D-AP5 (Tocris、終濃度 50  $\mu$ M)、カイニン酸受容体の阻害薬 SYM2081 (Tocris、終濃度 200 nM) を加えた。刺激電極は 1.5 mm 間隔のプラチナ平行電極を用い、7 V、0.5 ms の矩形波を与えた。生理的条件下でのグルタミン酸開口放出をイメージングする実験では 20 Hz、8 回の刺激を 10 秒間隔で 20 セット与えた。即時放出可能な小胞数を見積もる実験ではカルシウム濃度を 4 mM に、マグネシウム濃度を 0.5 mM に調整し 4-アミノピリジン (ナカライテスク) を終濃度 20  $\mu$ M で加えた各種受容体の阻害薬を含む HBS を細胞外液として用い、50 Hz、20 回刺激を 20 秒間隔で 5 セット与えた。

グルタミン酸イメージング終了後直ちに標本を固定し Bassoon、VGlut1、HATag あるいは Bassoon、VGlut1、Munc13-1 に対する多重免疫染色を施した。染色画像及び免疫染色後の eEOS の蛍光画像は通常の顕微鏡を用いて取得した。

画像解析はすべて ImageJ (NIH) を用いて行った。グルタミン酸イメージング中の標本ドリフトは ImageJ の stackreg プラグインを用いて補正した。蛍光画像に

0.32  $\mu\text{m}$  (1 ピクセル) のガウシアンフィルターをかけた後、電気刺激中の eEOS の蛍光画像を電気刺激前の eEOS の平均蛍光画像で割った。得られた蛍光強度変化を示す画像は同一視野の複数セットについて平均化し以降の解析に用いた。

興奮性シナプス前終末からのグルタミン酸開口放出を解析するため、まず免疫染色画像において前述の方法で Bassoon 陽性シナプス前終末上に ROI を設定しそのうち VGlut1 陽性であった ROI を興奮性シナプス前終末上の ROI とした。外来性 Munc13-1 を発現させた標本においてはさらに Munc13-1 あるいは HA タグ陽性である ROI を Munc13-1 が発現している興奮性シナプス前終末上の ROI として解析対象とした。免疫染色後の eEOS の蛍光画像とグルタミン酸イメージング時の eEOS の蛍光画像とを照らし合わせることで免疫染色画像から設定された ROI と同じ場所にグルタミン酸イメージングデータ解析用の ROI を設定した。

0.96  $\times$  0.96  $\mu\text{m}$  の ROI を免疫染色によって同定した興奮性シナプス前終末上に設定し、拡散したグルタミン酸に由来する蛍光強度変化及び光退色の影響を補正するための ROI を目的のシナプス近傍のシナプスでない領域に設定した。この時、補正用の ROI はシナプス上の ROI と同程度の蛍光強度を持つ神経細胞上の場所で、かつシナプス上の ROI から 3.2  $\mu\text{m}$  以内の場所に設定することとした。シナプス上の ROI における蛍光強度変化から補正用 ROI における蛍光強度変化を差し引いた値が目的のシナプスから放出されたグルタミン酸に由来する蛍光強度変化分 (グルタミン酸シグナル) であるとした。なお eEOS の神経細胞上での最大蛍光変化率は

800% 以上であり、全実験において観察された最大の蛍光変化は 50% 未満であったため、ここで求めたグルタミン酸シグナルは eEOS の飽和による影響を受けないと考え以降の解析を行った。

### グルタミン酸シグナルのデコンボリューション解析

eEOS の蛍光強度変化は  $\tau = 170$  ms の時定数で減衰する性質を持つことから、ある時点で観察されたグルタミン酸シグナルはその時点までに放出されたグルタミン酸に由来する蛍光強度変化が  $\tau = 170$  ms で減衰したものの総和であると考えられる。そこで、グルタミン酸シグナルの時間推移  $S(t)$  に対しデコンボリューション解析を施すことにより、グルタミン酸の放出速度  $r(t)$  を求めた。

$$S(t) = \int_0^t n(t') \cdot e^{-(t-t')/\tau} dt'$$

の関係が成り立つことから

$$r(t) = dS(t)/dt + S(t)/\tau$$

となる。

即時放出可能な小胞に対応したグルタミン酸シグナル ( $RRP_{Glu}$ ) および放出確率は次のように求めた。まず 50 Hz、20 回刺激に応答するグルタミン酸放出を観察する実験における  $S(t)$  をデコンボリューションすることで  $r(t)$  を求め、さらに累積グルタミン酸シグナル  $C(t)$  を  $r(t)$  の積分値として求めた。 $t = 200$  ms から  $t = 380$  ms までの  $C(t)$  に対し線形近似を施し、得られた関数の y 切片の値を  $RRP_{Glu}$  と定

義した<sup>6</sup>。この時、求められた  $RRP_{Glu}$  が 2% 以下であったシナプス及び 5 セットの測定中に著しいグルタミン酸シグナルの低下が見られたシナプスは解析から除外した。 $RRP_{Glu}$  が求められたシナプスについて、2 mM カルシウム条件下で 1 回の電気刺激によって生じたグルタミン酸シグナルを  $RRP_{Glu}$  で割ることにより放出確率を求めた。

### STORM 顕微鏡による超解像イメージング

STORM 顕微鏡は 100 倍の油浸対物レンズ (Olympus、UPlanSApo、開口数 1.4)、EMCCDカメラ (iXon3 860、Andor)、ピエゾコントローラー (PI)、シリンドリカルレンズを用いて自作した。Alexa Fluor 647 の励起には 640 nm レーザー (OBIS、Coherent) を約  $5 \text{ kW/cm}^2$  で使い、DyLight 755 の励起には 670-745 nm の励起光フィルター (FF01-708/75-25、Semrock) を通した 745 nm の超短パルスレーザー (Chameleon、Coherent) を約  $1 \text{ kW/cm}^2$  で用いた。Alexa Fluor 647 の蛍光はペンタバンドダイクロイックミラー (FF408/504/581/667/762-Di01 -25x36、Semrock) とバンドパス吸収フィルター (710QM80、Omega) を、DyLight 755 の蛍光はペンタバンドダイクロイックミラーと 770-850 nm の吸収フィルター (FF02-809/81-25、Semrock) を通した後に検出した。蛍光色素の活性化は 405 nm レーザー (OBIS、Coherent) を  $0.1 - 40 \text{ W/cm}^2$  で照射することにより行った。

内因性 Munc13-1 の STORM 顕微鏡による測定では一次抗体に抗 Munc13-1

抗体（クローン 11B-10G）と抗 Bassoon 抗体（Enzo Life sciences、clone SAP7F407）を、二次抗体に抗 Munc13-1 抗体を認識する Alexa Fluor 647 の標識された抗体と抗 Bassoon 抗体を認識する DyLight 755 の標識された抗体を用いて免疫染色を施した標本を用いた。外来性 Munc13-1 の測定では一次抗体に抗 HA タグ抗体と抗 Bassoon 抗体（Synaptic Systems、141-003）及び抗 RIM 1/2 抗体を、二次抗体に抗 HA タグ抗体を認識する Alexa Fluor 647 の標識された抗体と抗 Bassoon 抗体及び抗 RIM 1/2 抗体を認識する DyLight 755 の標識された抗体を用いて免疫染色を施した標本を用いた。免疫染色終了後まず位置補正用マーカーとして直径 200 nmの蛍光ビーズ（F8810、Life Technologies）を標本上に撒き、標本の外液を 50 mM HEPES（pH 8.0）、10 mM 塩化ナトリウム、60 % スクロース、10 % グルコース、0.1 %  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.5 mg/ml グルコースオキシダーゼ、0.04 mg/ml カタラーゼに置換した。その後標本をカバーガラスで挟み込み、マニキュアを用いて密閉することで包埋した。画像取得はまず Alexa Fluor 647 の蛍光画像を 16 ミリ秒の露光時間で 60,000 枚取得した後、DyLight 755 の蛍光画像を 50 ミリ秒の露光時間で 30,000 – 35,000 枚取得した。

## **STORM 顕微鏡画像の解析**

取得した画像に対しまず 192 nm（1 ピクセル）の二次元ガウシアンフィルター処理を施した後、画像上の蛍光スポットに二次元ガウス関数を適合させ最小二乗法



により最適解を算出することで蛍光スポットの中心点位置座標を求めた。z 座標は蛍光スポットの非点収差より求めた<sup>56</sup>。測定中の標本ドリフトは位置補正用マーカを用いて補正し、Alexa Fluor 647 に由来する蛍光と DyLight 755 に由来する蛍光の色収差は予め蛍光ビーズを用いて実測したデータを元に補正した。求めた位置座標を 10 nm の解像度で画像に再構築し、画像のピクセル値にはそのピクセルに対応する座標領域に含まれる位置座標の数を用いた。再構築した画像をさらに 10 nm の三次元空間ガウシアンフィルターで処理した結果を STORM 顕微鏡における観察像とした。

Munc13-1 ナノクラスターの解析においてはまず画像を三次元回転することでアクティブゾーン平面を垂直方向から見た図を作成した。DyLight 755 のシグナルよりアクティブゾーン領域を決定し、内部に形成された Alexa Fluor 647 シグナルのクラスター状構造を Munc13-1 のナノクラスターとした。決定された Munc13-1 ナノクラスターに対し直径に沿ったシグナル強度の分布を求めて一次元ガウス関数を適合させ、得られた関数の半値全幅を各ナノクラスターのサイズと定義した。また各ナノクラスターの重心間の最近傍距離をナノクラスター間の最近傍距離と定義した。

Munc13-1 のアクティブゾーン内比率を求める解析においてはあるシナプスにおいて観察された Alexa Fluor 647 由来のシグナルのうち DyLight 755 のシグナルと三次元的に重なる Alexa Fluor 647 のシグナルの割合をアクティブゾーン内比率と定義した。この時異なるシナプスに由来すると見なしたシグナルは解析から排除した。

## COS-7 細胞の培養と遺伝子導入、細胞の観察

COS-7 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (FBS、Sigma) を含むダルベッコ変法イーグル培地 (Wako) 中で二酸化炭素濃度 5 %、37 °Cにおいて培養した。pMunc13-1-mEGFP-CAAX、pMunc13-1- $\Delta$ 251-320aa-mEGFP-CAAX 及び pMunc13-1- $\Delta$ 321-450-mEGFP-CAAX の導入には Xtreme GENE HP DNA (ロシュ・ライフサイエンス) を用い、導入後 36 ~ 48 時間で観察に用いた。観察は HBS 中で行い、キセノンアークランプを備えた倒立顕微鏡 (IX-71、Olympus) 及び 100 倍の油浸対物レンズ (Olympus、UPlanSApo、開口数 1.4) を用いた。蛍光画像は EM-CCD カメラ (iXon、Andor) を用いて取得し、フィルターセットは U-MGFPHQ (Olympus) を用いた。

## 統計解析

2 群の差の検定は Mann-Whitney U-test によって行った。3 群以上における差の検定はまず Kruskal-Wallis test を行い、有意差が認められた場合は Steel-Dwass test による検定を行った。

## 遺伝子組換え実験の承認

全ての遺伝子組換え実験は東京大学遺伝子組換え実験等の使用等実施規則に従い、東京大学遺伝子組換え生物等委員会の承認を得ている

## 結果

### 分散培養神経細胞における Munc13-1 のノックダウン

Munc13-1 の機能未知である領域について調べるため、shRNA の発現による内因性 Munc13-1 のノックダウンと部分欠失変異体の外来性発現によってシナプスの Munc13-1 を変異体に置き換えることにした。ノックダウンの効率を確認するため Munc13-1 に対する shRNA を AAV によってラット海馬神経細胞の分散培養標本に発現させ、Munc13-1 の発現量を免疫染色によって確認した。対照群 (Control) の神経細胞ではアクティブゾーンのマーカー分子 Bassoon の免疫染色シグナルによって示されるシナプス前終末に局在した Munc13-1 のシグナルが見られたが、ノックダウンを行った神経細胞 (KD) ではシナプス前終末での Munc13-1 に由来するシグナルがほとんど認められなかった (図 2A)。免疫染色強度を定量したところ、Munc13-1 に由来するシグナルが大幅に減少していることが分かった (図 2B、Control 比  $4.0 \pm 1.8\%$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test、Control:  $n = 55$  シナプス、KD:  $n = 49$  シナプス)。一方で Bassoon に由来するシグナルは両群で差が見られなかった (図 2C、Control 比  $115.5 \pm 6.7\%$ 、 $p > 0.05$ 、Mann-Whitney U-test、Control:  $n = 55$  シナプス、KD:  $n = 49$  シナプス)。この結果は AAV を用いた Munc13-1 に対する shRNA の発現によって Munc13-1 の発現を特異的に抑制できたことを示す。

## Munc13-1 のノックダウンによるグルタミン酸開口放出の抑制

Munc13-1 のノックダウンによる興奮性シナプス前終末からのグルタミン酸開口放出の変化を調べるため、蛍光グルタミン酸プローブである eEOS を用いたグルタミン酸イメージングによる評価を行った。eEOS はグルタミン酸受容体 GluA2 のグルタミン酸結合領域と蛍光色素 Alexa Fluor 488 からなるハイブリッド型蛍光プローブで<sup>54</sup>、グルタミン酸の結合によって自身の蛍光強度を増大させる性質を持つ<sup>59</sup>。神経細胞特異的に発現しているガングリオシドを認識する BoNT/C-Hc を用いた手法により神経細胞表面に eEOS を標識し（方法参照）、20 Hz、8 回の電気刺激によって惹起されたシナプス前終末からのグルタミン酸開口放出を eEOS の蛍光変化として可視化した。測定後神経細胞を固定し Bassoon に対する免疫染色を施すことによりシナプス前終末の位置を特定した。結果、シナプス前終末と一致する領域において eEOS の蛍光強度上昇（グルタミン酸シグナル）が観察されたことから（図 3A）、eEOS によってシナプス前終末からのグルタミン酸開口放出をイメージング可能であることが示された。なお、Bassoon 陽性かつ VGlutI 陽性の興奮性シナプス前終末のうちグルタミン酸シグナルが観察されたシナプスの割合は約 86.4 % であった。この結果は本研究で用いた分散培養標本中のシナプスはその大部分が機能的なシナプスであることを示している。

ノックダウンを行った標本において同様のイメージングを行ったところシナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルはほとんど観察されず（図 3A）、定量し

たところグルタミン酸シグナルは Control と比べ大幅に小さかった (図 3B、  
\*\*\* $p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test、Control:  $n = 29$  シナプス、KD:  $n = 17$  シナプ  
ス)。以上の結果は Munc13-1 の発現抑制によってシナプス前終末からのグルタミン  
酸開口放出が強く抑制されたことを示しており、これは先行研究における知見と一  
致している<sup>58</sup>。

### **Munc13-1 の外来性発現によるグルタミン酸開口放出の回復**

Munc13-1 のノックダウンによるグルタミン酸開口放出の抑制が Munc13-1  
の外来性発現によって回復されるかグルタミン酸イメージングによって調べた。発  
現させる外来性 Munc13-1 は後の実験において内因性と識別するため HA タグを挿  
入したものを用いた (図 4A、WT)。外来性 Munc13-1 の発現は Tet-off の系を介し  
て行い、至適濃度のドキシサイクリンを添加することによって Munc13-1 の発現量  
が対照群における内因性 Munc13-1 の発現量と同程度となるよう調整した。

抗 Munc13-1 抗体 (11B-10G、方法参照) を用いた免疫染色により Munc13-  
1 の発現を確認したところ、外来性に発現させた Munc13-1 は内因性 Munc13-1 同  
様 Bassoon 陽性のシナプス前終末に局在することが分かった (図 4B)。ノックダウ  
ンと外来性発現の操作を行っていない対照群の標本 (Control)、ノックダウンのみ行  
った標本 (KD)、ノックダウンと外来性発現を行った標本 (Rescue) の 3 群で  
Munc13-1 の免疫染色強度を比較したところ、ノックダウンを行った標本では免疫染

色強度が大幅に小さかったがノックダウンと外来性発現を行った標本では対照群と同程度の免疫染色強度であった (図 4C、Control 比、KD:  $15.5 \pm 4.5\%$ 、Rescue:  $109.2 \pm 19.2\%$ 、\*\*\*  $p < 0.001$ 、Kruskal-Wallis test、Control vs. KD:  $p < 0.01$ 、Control vs. Rescue:  $p > 0.05$ 、KD vs. Rescue:  $p < 0.01$ 、Steel-Dwass test、Control:  $n = 35$  シナプス、KD:  $n = 36$  シナプス、Rescue:  $n = 32$  シナプス)。

グルタミン酸イメージングによってグルタミン酸開口放出を 3 群で比較した。イメージング後標本を固定し Bassoon 及び VGlut1 に対する免疫染色を施すことで興奮性シナプス前終末の位置を特定した (方法参照)。結果、ノックダウンした標本では興奮性シナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルは大幅に小さかったがノックダウンと外来性発現を行った標本のグルタミン酸シグナルは対照群と差がなかった (図 4D、\* $p < 0.05$ 、Kruskal-Wallis test、Control vs. KD:  $p < 0.05$ 、Control vs. Rescue:  $p > 0.05$ 、KD vs. Rescue:  $p < 0.05$ 、Steel-Dwass test、Control:  $n = 35$  シナプス、KD:  $n = 36$  シナプス、Rescue:  $n = 32$  シナプス)。以上より、Munc13-1 のノックダウンによって抑制されたグルタミン酸開口放出が外来性 Munc13-1 の発現によって回復することが確認された。

### **Munc13-1 分子内天然変性領域の解析**

先行研究において Munc13-1 分子の中に天然変性領域が存在する可能性が示されている<sup>51</sup>。対象とするタンパク質と既知の天然変性領域とのアミノ酸配列の比較

から天然変性領域の存在を予測するツール PrDOS<sup>57</sup> を用いた解析を行った結果、C<sub>2</sub>A ドメイン（1 から 130 番目のアミノ酸残基） と Calmodulin 結合部位（460 から 477 番目のアミノ酸残基）の間におよそ 200 アミノ酸残基にわたって天然変性である確率が非常に高い領域が存在していることが分かった（図 5A）。一方 Munc13-1 同様中枢神経系のシナプスにおいて発現していることが知られる Munc13-1 のホモログ Munc13-2 についても解析を行ったところ、Munc13-1 において見られるような 200 アミノ酸残基以上にわたって高い変性確率を示す領域は見られなかった（図 5B）。

次に Munc13-1 の天然変性領域について一次構造上の特徴を分析した（図 5C）。アミノ酸組成に着目すると全 200 アミノ酸残基（251 から 450 番目）中グルタミン酸残基（E）が50 個（25 %）、アスパラギン酸残基（D）が 19 個（9.5 %）含まれており、天然変性領域全体にわたって酸性アミノ酸残基に富んだ組成であることがわかった。また、途中グルタミン酸残基が連続する特徴的な配列（ポリ E 配列）が存在していた。

### **Munc13-1 部分欠失変異体に置き換えたシナプスからのグルタミン酸開口放出**

シナプスの Munc13-1 を天然変性領域が欠失した変異体に置き換えることでグルタミン酸開口放出がどのように変化するのか調べるため、Munc13-1 のノックダウンと部分欠失変異体の外来性発現を行った標本でのグルタミン酸イメージングを

行うことにした。ポリ E 配列を含まない N 末側領域とポリ E 配列を含む C 末側領域の 2 つに分け変異体を作製することとし、251 から 320 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体 ( $\Delta$ 251-320) と 321 から 450 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体 ( $\Delta$ 321-450) の 2 種類を作製した (図 6A)。

Munc13-1 のノックダウンと  $\Delta$ 251-320 または  $\Delta$ 321-450 の発現によって Munc13-1 を部分欠失変異体に置き換えた神経細胞を作製し、HA タグに対する抗体で変異体の発現を確認した。同時に Bassoon に対する抗体でシナプス前終末を可視化したところ、両方の標本について HA タグ由来のシグナルと Bassoon 由来のシグナルが強く共局在している様子が観察された (図 6B)。この結果は部分欠失変異体が正常に発現しシナプス前終末に局在することを示している。

野生型を発現する神経細胞と部分欠失変異体  $\Delta$ 251-320、 $\Delta$ 321-450 に置き換えた神経細胞におけるグルタミン酸開口放出をイメージングによって比較した。興奮性シナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルに注目したところ、 $\Delta$ 321-450 で置き換えた標本のグルタミン酸シグナルは野生型を発現する標本と差がなかったのに対し、 $\Delta$ 251-320 に置き換えた標本ではグルタミン酸シグナルが小さかった (図 7A、\* $p$ <0.05、Kruskal-Wallis test、WT vs.  $\Delta$ 251-320:  $p$ <0.05、WT vs.  $\Delta$ 321-450:  $p$ >0.05、Steel-Dwass test、WT:  $n$  = 38 シナプス、 $\Delta$ 251-320:  $n$  = 50 シナプス、 $\Delta$ 321-450:  $n$  = 43 シナプス)。以上の結果から、これまで機能未知であった Munc13-1 の天然変性領域 (251 から 320 番目のアミノ酸残基) がシナプス前終末からの正常な



グルタミン酸開口放出に何らかの形で関与していることが示された。

### Δ251-320 変異体の発現確認

Δ251-320 変異体に置き換えたシナプスにおいてグルタミン酸開口放出量が低下していたのは Δ251-320 変異体の発現レベルが野生型に比べ低い為である可能性があると考えた。そこでシナプスにおける発現量に差がないか Munc13-1 に対する 3 つのモノクローナル抗体を用いて調べることにした (図 8A)。ここで用いた抗体はそれぞれエピトープが異なり、5D-7G、11B-10G、2-A5 はそれぞれ 1 から 250 番目、251 から 320 番目、859 から 1531 番目のアミノ酸残基の間にエピトープを持つ。この 3 つの抗体を用いて野生型を発現する神経細胞と Δ251-320 変異体で置き換えた神経細胞に免疫染色を施したところ、5D-7G ではどちらの標本でも Bassoon 陽性シナプス前終末に局在した同程度の強度を持つシグナルが得られたが (図 8B、D、WT 比  $107.5 \pm 12.0 \%$ 、 $p > 0.05$ 、Mann-Whitney U-test、WT:  $n = 27$  シナプス、Δ251-320:  $n = 35$  シナプス)、11B-10G では Δ251-320 変異体で置き換えた標本においてほとんどシグナルが検出されなかった (図 8B、E、WT 比  $9.0 \pm 1.8 \%$ 、 $***p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test、WT:  $n = 27$  シナプス、Δ251-320:  $n = 35$  シナプス)。また、2-A5 ではどちらの標本でも同程度の強度を持つシグナルが得られた (図 8C、F、WT 比  $110.0 \pm 6.5 \%$ 、 $p > 0.05$ 、Mann-Whitney U-test、WT:  $n = 53$  シナプス、Δ251-320:  $n = 61$  シナプス)。この結果は Δ251-320 変異体の発現量が野生型

と同程度であることを示すとともに、Munc13-1 のノックダウンと  $\Delta 251-320$  変異体の発現によってシナプスの Munc13-1 が  $\Delta 251-320$  変異体にほぼ置き換わっていることを示している。

### **$\Delta 251-320$ 変異体に置き換えたシナプスにおける即時放出可能な小胞数と放出確率**

$\Delta 251-320$  変異体におけるグルタミン酸開口放出量の減少が即時放出可能な小胞数と放出確率のどちらを原因としているのか調べるため、野生型を発現するシナプスと  $\Delta 251-320$  変異体を発現するシナプスの即時放出可能な小胞数と放出確率をグルタミン酸イメージングによって評価し比較することにした。

シナプス前終末からのグルタミン酸開口放出を人為的に促進した状態で高頻度刺激を加えると即座に即時放出可能な小胞の枯渇が起こり、続いて貯蔵プールと呼ばれる小胞がアクティブゾーンに供給されて緩やかな開口放出が起こることが知られている<sup>60</sup>。そこで、開口放出を促進した状態で高頻度刺激に応じて放出されるグルタミン酸をイメージングすることで個々のシナプスについて即時放出可能な小胞数を定量的に評価することができると考えた。細胞外液のカルシウムイオン濃度を 4 mM に上昇させ、さらにカリウムチャネルの阻害薬である 4-アミノピリジンを加えた状態で 50 Hz の高頻度刺激を標本に与えてグルタミン酸の放出を eEOS によって可視化した。興奮性シナプス前終末に着目してグルタミン酸シグナルの時間推移を求めると、刺激開始直後に一過性のピークを迎えその後徐々にシグナル強度が低

下していく変化を示した (図 9A)。ここで、eEOS の蛍光強度変化は解離速度定数 170 ms に従って減弱する性質を持つことを踏まえ、求めたグルタミン酸シグナルにデコンボリューション解析を施すことでグルタミン酸放出速度の時間推移を求めた (図 9B、方法参照)。さらに、放出されたグルタミン酸量の累積的な時間推移を示す関数 (累積グルタミン酸シグナル) をグルタミン酸放出速度の積分によって求めた (図 9C、図 10A、B)。累積グルタミン酸シグナルは刺激開始直後に急上昇しその後緩やかに上昇していく二相性を示しており、急上昇する部分は即時放出可能な小胞からのグルタミン酸放出に、緩やかに上昇する部分は貯蔵プールから供給された小胞からのグルタミン酸放出に対応していると考えられる。そこで、累積グルタミン酸シグナルの後半部分に対して線形近似を行い、得られた関数の y 切片を求めることで個々のシナプスについて即時放出可能な小胞に対応したグルタミン酸シグナルを求めた ( $RRP_{Glu}$ 、方法参照)。

野生型を発現する神経細胞、 $\Delta 251-320$  に置き換えた神経細胞それぞれについて各シナプスの  $RRP_{Glu}$  を求め両者を比較したところ、 $\Delta 251-320$  で置き換えたシナプスの  $RRP_{Glu}$  は野生型を発現するシナプスと比べて小さいことが分かった (図 10C、WT:  $19.3 \pm 1.7\%$ 、 $n = 32$  シナプス、 $\Delta 251-320$ :  $9.3 \pm 1.5\%$ 、 $n = 21$  シナプス、\*\*\* $p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test)。

生理的条件下での放出確率を求めるため、 $RRP_{Glu}$  を求めるための高頻度刺激実験を行った視野と同一の視野において生理的なカルシウムイオン濃度条件 (2

mM) におけるグルタミン酸シグナルを測定した (図 11A、B)。この条件下で 1 回の電気刺激に応じて生じたグルタミン酸シグナルの値を  $RRP_{Glu}$  で割ることにより、各シナプスについて放出確率を求めた。両標本で放出確率を比較したところ、差は見られなかった (図 11C、WT:  $0.177 \pm 0.028$ ,  $n = 32$  シナプス、 $\Delta 251-320$ :  $0.163 \pm 0.046$ ,  $n = 21$  シナプス、 $p > 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。以上の結果から、Munc13-1 の天然変性領域 (251 から 320 番目のアミノ酸残基) の欠失は即時放出可能な小胞数を減少させ、放出確率は変化させないことが分かった。

### Munc13-1 のシナプスにおける微細構造

先行研究において各々のシナプスにおける即時放出可能な小胞数とアクティブゾーン内で観察される Munc13-1 のナノクラスター数が一致することが示されていることから (付録参照)、 $\Delta 251-320$  に置き換えた標本において  $RRP_{Glu}$  が減少していたのはアクティブゾーンにおける Munc13-1 ナノクラスター数が減少したためではないかと考えた。そこで野生型を発現する標本、 $\Delta 251-320$  を発現する標本それぞれにおいて Munc13-1 の微細構造を STORM によって観察することにした。

まず内因性 Munc13-1 が形成するナノクラスターについて評価するため、神経細胞を抗 Munc13-1 抗体で免疫染色し STORM によって微細構造を観察した (図 12A)。先行研究同様 (付録参照) Munc13-1 がナノクラスターを形成している様子が観察された (図 12B)。Munc13-1 ナノクラスターのサイズは  $47.6 \pm 1.0$  nm ( $n =$

120 クラスター、図 12C)、クラスター間の最近傍距離は  $84.7 \pm 2.4$  nm ( $n = 120$  クラスター、図 12D)、アクティブゾーンあたりのクラスター数は  $9.1 \pm 0.6$  個であった ( $n = 16$  シナプス、図 12E)。

外来性に発現させた Munc13-1 が形成する微細構造について評価するため、Munc13-1 のノックダウン及び外来性 Munc13-1 (WT、図 4A) の発現を行った標本を抗 HA タグ抗体及びアクティブゾーンマーカー分子に対する抗体で免疫染色し、STORM を行った (図 13A)。アクティブゾーンにおいて外来性 Munc13-1 が内因性 Munc13-1 と同様のナノクラスターを形成している様子が観察された (図 13B)。外来性 Munc13-1 によって形成されたナノクラスターのサイズは  $51.4 \pm 1.5$  nm ( $n = 119$  クラスター、図 13C)、クラスター間の最近傍距離は  $87.2 \pm 2.2$  nm ( $n = 119$  クラスター、図 13D)、アクティブゾーンあたりのクラスター数は  $7.2 \pm 0.8$  個であった ( $n = 19$  シナプス、図 13E)。上記の値はすべて内因性 Munc13-1 と差がなかったことから ( $p > 0.05$ 、Mann-Whitney U-test)、外来性に発現させた野生型 Munc13-1 は内因性 Munc13-1 と同様の微細構造をとることが示された。

### **Δ251-320 変異体のシナプスにおける微細構造**

野生型を発現する神経細胞及び Δ251-320 変異体で置き換えた神経細胞に対して免疫染色及び STORM を行い、微細構造を比較した。アクティブゾーン内に存在する Munc13-1 に着目すると、Δ251-320 変異体は野生型同様アクティブゾーン内

でナノクラスターを形成していたが、野生型に比べナノクラスターの数少なく低い密度で分布している様子が観察された (図 14A)。アクティブゾーンあたりのナノクラスター数を標本間で比較したところ  $\Delta 251-320$  変異体は少ない数のナノクラスターを作ることが分かり (図 14B、WT:  $7.2 \pm 0.7$ ,  $n = 20$  シナプス、 $\Delta 251-320$ :  $4.8 \pm 0.4$ ,  $n = 21$  シナプス、 $*p < 0.05$ , Mann-Whitney U-test)、単位アクティブゾーン面積あたりのナノクラスター数も少なかった (図 14C)。それに伴ってナノクラスター間の最近傍距離は  $\Delta 251-320$  の方が大きかったが (図 14D、WT:  $88.7 \pm 2.1$  nm,  $n = 137$  クラスター、 $\Delta 251-320$ :  $116.1 \pm 4.6$  nm,  $n = 96$  クラスター、 $***p < 0.001$ , Mann-Whitney U-test)、ナノクラスターのサイズには差は見られなかった (図 14E、WT:  $54.3 \pm 1.7$  nm,  $n = 137$  クラスター、 $\Delta 251-320$ :  $55.2 \pm 2.1$ ,  $n = 96$  クラスター、 $*p > 0.05$ , Mann-Whitney U-test)。

$\Delta 251-320$  変異体は通常の顕微鏡観察では野生型とシナプス前終末における発現量に差が見られなかったこと (図 8D、F)、アクティブゾーン内ナノクラスター数は野生型に比べ少なかったがクラスターのサイズに差はなかったこと (図 14B、E) から、 $\Delta 251-320$  変異体はシナプス前終末のアクティブゾーン外部に多く局在しているのではないかと考えた。そこでシナプス前終末に見られる Munc13-1 のアクティブゾーン内外の分布を野生型と  $\Delta 251-320$  で比較したところ、野生型では大部分がアクティブゾーン内に局在していたのに対し  $\Delta 251-320$  ではアクティブゾーン外部にも多く局在している様子が観察された (図 15 A)。アクティブゾーン内に存

在している比率を両者で比較したところ、 $\Delta 251-320$  のアクティブゾーン内比率が低いことが分かった (図 15B、WT:  $86.1 \pm 2.7\%$ 、 $n = 20$  シナプス、 $\Delta 251-320$ :  $63.6 \pm 4.6\%$ 、 $n = 21$  シナプス、\*\*\* $p < 0.001$ 、Mann-Whitney U-test)。以上の結果から、Munc13-1 の天然変性領域はアクティブゾーン内における正常なナノクラスター形成に必要であることが明らかとなった。

### COS-7 細胞における Munc13-1 の集合体形成

Munc13-1 の天然変性領域によるナノクラスター形成制御のメカニズムを探るため、非神経細胞である COS-7 において Munc13-1 を発現させその局在を観察する実験を行った。発現パターン可視化のため野生型 Munc13-1、 $\Delta 251-320$  変異体又は  $\Delta 321-450$  変異体の C 末に単量体緑色蛍光タンパク質 (mEGFP) を融合し、またアクティブゾーンにおける発現を模すため膜直下領域での発現を促すプレニル化配列を mEGFP の C 末に融合して発現させた。結果、野生型 Munc13-1 と  $\Delta 321-450$  変異体は COS-7 細胞の膜直下において非連続的な集合体を形成している様子が観察された。一方で  $\Delta 251-320$  の発現では細胞膜全体に連続的に分布している様子が観察された (図 16)。この結果は非神経細胞において Munc13-1 が 251 から 320 番目のアミノ酸残基依存的に集合体を形成することを示している。

## 考察

本研究ではこれまで機能未知であった Munc13-1 の C<sub>2</sub>A ドメインと Calmodulin 結合部位の間の領域に注目し、その中に天然変性領域が含まれることを示した。天然変性領域の生理的機能を明らかにするため神経細胞の Munc13-1 を部分欠失変異体に置き換え、グルタミン酸イメージングによってシナプス前終末からのグルタミン酸開口放出を定量的に評価した。その結果、天然変性領域の一部（251 から 320 番目のアミノ酸残基）の欠失によってグルタミン酸放出量が減少すること、即時放出可能な小胞数が減少することが明らかとなった。変異体のシナプスにおける微細構造を STORM による超解像イメージングで観察したところ、野生型 Munc13-1 に比べアクティブゾーン外部に局在する比率が増加していること、アクティブゾーン内で形成されるナノクラスター数が減少していることが明らかとなった。

### 天然変性領域がナノクラスター形成を制御するメカニズム

天然変性領域による Munc13-1 ナノクラスター制御のメカニズムについての示唆が COS-7 細胞における発現実験から得られている。Munc13-1 は COS-7 細胞において天然変性領域の一部、251 から 320 番目のアミノ酸残基依存的に集合体を形成した。COS-7 細胞は非神経細胞であり、RIM、Bassoon、CAST など Munc13-



1 と相互作用することが知られているアクティブゾーンタンパク質は発現していない。従って、集合体形成がこれらの分子を介した相互作用によるものとは考えられない。1 つの可能性として、集合体形成は天然変性領域の一部領域を介した Munc13-1 自身の自己相互作用によるものと考えることができる。アクティブゾーンにおいても Munc13-1 の自己相互作用が働いている可能性は十分に考えられ、自己相互作用の欠如が天然変性領域の一部領域を欠失した変異体のナノクラスター形成異常の原因となっている可能性がある。

天然変性領域がナノクラスター形成の制御に働くメカニズムとして、他のアクティブゾーンタンパク質との相互作用が関わっていることも十分に考えられる。

Munc13-1 と相互作用するアクティブゾーンタンパク質としては RIM がよく知られている<sup>28</sup>。Munc13-1 は RIM 分子中の Zinc Finger ドメイン (ZF ドメイン) と結合することが分かっているが<sup>61</sup>、この結合は 3 から 209 番目までのアミノ酸残基によって担われていること<sup>28</sup>、また 1 から 181 番目のアミノ酸残基と 1 から 651 番目のアミノ酸残基では ZF ドメインとの結合能力に差がないことが示されており<sup>27</sup>、今回 251 から 320 番目のアミノ酸残基の欠失によってナノクラスター形成に異常が生じた理由に RIM との結合が関与しているとは考えにくい。

一方で、Munc13-1 の 1 から 320 番目のアミノ酸残基は Bassoon 及び Piccolo と結合することが先行研究において報告されている<sup>27</sup>。この結合は C 末側を削ると弱くなることから、1 から 320 番目のアミノ酸残基の C 末側領域が

Bassoon、Piccolo と結合することが示唆されている<sup>27</sup>。この領域が本研究において調べた天然変性領域の一部 251 から 320 番目のアミノ酸残基と重なることから、天然変性領域は Bassoon 及び Piccolo との結合によって Munc13-1 のナノクラスター形成に働いている可能性がある。

先行研究において、天然変性領域は単独では決まった立体構造をとらないが結合相手との相互作用に共役して一定の形状を持った複合体を形成する性質を持つこと<sup>62</sup>、また同一の相互作用領域が複数の異なる標的と結合しうる性質を持つことなどが報告されている<sup>45</sup>。特に同種あるいは異種の天然変性領域間で複合体を形成する性質が RNA 粒子の形成や核膜孔複合体の形成など様々な場面において生理的に重要な役割を果たしていることが近年明らかにされつつある<sup>46-49</sup>。シナプス分子の中には Munc13-1 以外にも天然変性領域を持つものが多く含まれることが示唆されており、特に Munc13-1 との結合が報告されているアクティブゾーン局在タンパク質 Piccolo や CAST の内部にも天然変性である可能性の高い領域が含まれている<sup>51</sup>。これらの知見を総合して考えると、Munc13-1 のナノクラスター形成には Munc13-1 分子間あるいは Piccolo や CAST との間での天然変性領域を介した超分子複合体の形成が関与している可能性が考えられる。

進化の観点から見ると、今回機能が明らかにされた Munc13-1 の天然変性領域は哺乳類から魚類まで脊椎動物においては強く保存されている一方で、無脊椎動物であるキイロシヨウジョウバエと線虫のホモログにおいては相同性の高い領域は

存在していない。Munc13-1 の天然変性領域を介した超分子複合体がアクティブゾーンにおいて形成されることが高等動物特有の高次情報処理機構の実現に必要とされている可能性がある。

## 分子置き換え実験の限界と今後の展望

本研究では shRNA による内因性 Munc13-1 のノックダウンと部分欠失変異体の発現によりシナプスの Munc13-1 を部分欠失変異体に置き換えることで対象領域が担う機能を評価した。今回 251 から 320 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体に置き換えた結果グルタミン酸放出量の減少が見られたことからこの領域が機能を担っていると考えたが、グルタミン酸放出量が減少したのは部分欠失によって間接的にタンパク質全体の機能が損なわれたためである可能性がある。321 から 450 番目のアミノ酸残基の欠失ではグルタミン酸放出量に野生型と差がなかったことは部分欠失が必ずタンパク質全体の機能を損なうわけではないことを示しているが、251 から 320 番目のアミノ酸残基の欠失ではタンパク質の機能が破壊され得る可能性は本研究の中では否定できていない。将来的には 251 から 320 番目のアミノ酸残基を Munc13-2 分子内の相当する領域と置き換えるなどの実験を行うことで Munc13-1 の 251 から 320 番目のアミノ酸残基が機能を担っているという考えがより強く支持されるであろう。また、251 から 320 番目のアミノ酸残基のうち機能を果たす上で特に重要なアミノ酸残基を特定することができればアミノ酸置換変

異体を用いた実験が強力な手段となるだろう。

また、Munc13-1 のノックダウンによってシナプス後部の性質が変容し、その結果間接的にシナプス前終末からのグルタミン酸開口放出に変化が生じたという可能性が考えられるかもしれない。しかしながら、先行研究において Munc13-1 ノックアウトマウスではシナプス後部の足場タンパク質 SAP102、グルタミン酸受容体 NR1、シナプス後部に局在するシナプス接着分子 Neuroligin などの分子の発現量に野生型と差がないこと、さらに微小興奮性シナプス後電流の大きさに野生型と差がないことが示されていることから<sup>23</sup>、Munc13-1 のノックダウンによってシナプス後部に変容が生じるとは考えにくい。

### グルタミン酸イメージングについての今後の展望

本研究ではグルタミン酸開口放出のイメージングにおいてグルタミン酸シグナルの立ち上がり速度を評価する実験を行っていない。フレームレートが 1 kHz 程度の早いイメージングを行うことで、野生型と変異体でシナプス小胞と細胞膜が膜融合する過程の動態に違いがある可能性などを検証することが可能になるかもしれない。また、1 回の電気刺激に対するグルタミン酸シグナルの減衰の時間推移を野生型と変異体で比較することで非同時性の開口放出に違いがある可能性なども検証できるであろう。

## Munc13-1 のナノクラスター構造についての今後の展望

本研究では固定標本における免疫染色と STORM による観察によって Munc13-1 の微細構造を評価している。シナプスにおける Munc13-1 のナノクラスター構造は固定時のパラホルムアルデヒド濃度を 1% から 0.25% まで下げても観察されること、固定にメタノールとアセトンの混合溶液を用いた場合でも観察されること、タンパク質上の異なる場所にエピトープを持つ抗体を用いた場合でも観察されることが分かっており、ナノクラスター構造が固定や免疫染色のアーティファクトであるとは考えにくい。ナノクラスター構造がアーティファクトではないことを完全に証明するためには、何らかの方法で Munc13-1 分子を蛍光分子で標識し単一粒子トラッキングによって固定後にほとんど動かないことを示した上で STORM による観察を行うか、PALM や STED などの手法を用いて生きた標本での超解像イメージングを行うことが必要になるであろう。

## 天然変性領域についての限界と今後の展望

本研究では予測アルゴリズム PrDOS を用いた解析によって Munc13-1 の C<sub>2</sub>A ドメインと Calmodulin 結合部位の間の領域が天然変性領域であることを示した。対象の領域が天然変性領域であることを示す別の手段として、精製タンパク質を用いた生化学実験が挙げられる。特に今回機能的に重要であることが示された 251 から 320 番目のアミノ酸残基については、精製タンパク質を取得し熱変性耐性

や円偏光性を調べることで変性度を評価する実験を将来的に行いたいと考えている。また、251 から 320 番目のアミノ酸残基が自己相互作用を生む可能性についても精製タンパク質を用いたプルダウンアッセイなどを行うことでより直接に証明できる可能性がある。

## 本研究の意義とインパクト

本研究において明らかにされた **Munc13-1** の天然変性領域が開口放出において重要な機能を担っているという知見はシナプス分子の天然変性領域がシナプス機能に関わっていることを直接に示した初めての例であり、これまで定まった立体構造をとるタンパク質ドメイン間の相互作用に注目してきたシナプス伝達の分子基盤解明研究に大きなインパクトを与える研究成果である。天然変性領域を介したシナプス伝達の機能制御という視点で今後さらに研究を進めることが重要であると考えている。

## 引用文献

1. Ribault, C. *et al.* From the stochasticity of molecular processes to the variability of synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience* **12**, 375-387 (2011).
2. Abbott, L. F. & Regehr, W. G. Synaptic computation. *Nature* **431**, 796-803 (2004).
3. O'Rourke, N. A. *et al.* Deep molecular diversity of mammalian synapses: why it matters and how to measure it. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 365-379 (2012).
4. Südhof, T. C. Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* **80**, 675-690 (2013).
5. Rizzoli, S. O. & Betz, W. J. Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 57-69 (2005).
6. Neher, E. Merits and Limitations of Vesicle Pool Models in View of Heterogeneous Populations of Synaptic Vesicles. *Neuron* **87**, 1131-1142 (2015).
7. Tsodyks, M. V. & Markram, H. The neural code between neocortical pyramidal neurons depends on neurotransmitter release probability. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 719-723 (1997).
8. Fioravante, D. & Regehr, W. G. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* **21**, 269-274 (2011).

9. Branco, T. & Staras, K. The probability of neurotransmitter release: variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 373–383 (2009).
10. Südhof, T. C. The Presynaptic Active Zone. *Neuron* **75**, 11–25 (2012).
11. Arancillo, M. *et al.* Titration of Syntaxin1 in Mammalian Synapses Reveals Multiple Roles in Vesicle Docking, Priming, and Release Probability. *Journal of Neuroscience* **33**, 16698–16714 (2013).
12. Acuna, C. *et al.* Microsecond Dissection of Neurotransmitter Release: SNARE-Complex Assembly Dictates Speed and Ca<sup>2+</sup> Sensitivity. *Neuron* **82**, 1088–1100 (2014).
13. Nakamura, Y. *et al.* Nanoscale Distribution of Presynaptic Ca<sup>2+</sup> Channels and Its Impact on Vesicular Release during Development. *Neuron* **85**, 145–158 (2015).
14. Hallermann, S. *et al.* Bassoon Speeds Vesicle Reloading at a Central Excitatory Synapse. *Neuron* **68**, 710–723 (2010).
15. Waites, C. L. *et al.* Bassoon and Piccolo maintain synapse integrity by regulating protein ubiquitination and degradation. *The EMBO journal* **32**, 954–969 (2013).
16. Kiyonaka, S. *et al.* RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature Neuroscience* **10**, 691–701 (2007).
17. Kaeser, P. S. *et al.* RIM Proteins Tether Ca<sup>2+</sup> Channels to Presynaptic Active Zones via a Direct PDZ-Domain Interaction. *Cell* **144**, 282–295 (2011).



18. Ohtsuka, T. *et al.* Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and Munc13-1. *The Journal of Cell Biology* **158**, 577-590 (2002).
19. Liu, C. *et al.* The Active Zone Protein Family ELKS Supports Ca<sup>2+</sup> Influx at Nerve Terminals of Inhibitory Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience* **34**, 12289–12303 (2014).
20. Davydova, D. *et al.* Bassoon Specifically Controls Presynaptic P/Q-type Ca<sup>2+</sup> Channels via RIM-Binding Protein. *Neuron* **82**, 181–194 (2014).
21. Müller, M., Genç, Ö. & Davis, G. W. RIM-Binding Protein Links Synaptic Homeostasis to the Stabilization and Replenishment of High Release Probability Vesicles. *Neuron* **85**, 1056–1069 (2015).
22. Ma, C. *et al.* Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release. *Science* **339**, 421–425 (2013).
23. Augustin, I. *et al.* Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* **400**, 457–461 (1999).
24. Siksou, L. *et al.* A common molecular basis for membrane docking and functional priming of synaptic vesicles. *European Journal of Neuroscience* **30**, 49–56 (2009).
25. Watanabe, S. *et al.* Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* **504**, 242–247 (2013).

26. Imig, C. *et al.* The Morphological and Molecular Nature of Synaptic Vesicle Priming at Presynaptic Active Zones. *Neuron* **84**, 416–431 (2014).
27. Wang, X. *et al.* A Protein Interaction Node at the Neurotransmitter Release Site: Domains of Aczonin/Piccolo, Bassoon, CAST, and Rim Converge on the N-Terminal Domain of Munc13-1. *Journal of Neuroscience* **29**, 12584–12596 (2009).
28. Dulubova, I. *et al.* A Munc13/RIM/Rab3 tripartite complex from priming to plasticity. *EMBO J.* **24**, 2839-50 (2005).
29. Lu, J. *et al.* Structural Basis for a Munc13–1 Homodimer to Munc13–1/RIM Heterodimer Switch. *PLoS Biology* **4**, e192 (2006).
30. Deng, L. *et al.* RIM Proteins Activate Vesicle Priming by Reversing Autoinhibitory Homodimerization of Munc13. *Neuron* **69**, 317–331 (2011).
31. Junge, H. J. *et al.* Calmodulin and Munc13 form a Ca<sup>2+</sup> sensor/effector complex that controls short-term synaptic plasticity. *Cell* **118**, 389–401 (2004).
32. Lipstein, N. *et al.* Dynamic Control of Synaptic Vesicle Replenishment and Short-Term Plasticity by Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Munc13-1 Signaling. *Neuron* **79**, 82–96 (2013).
33. Betz, A. *et al.* Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* **21**, 123–136 (1998).

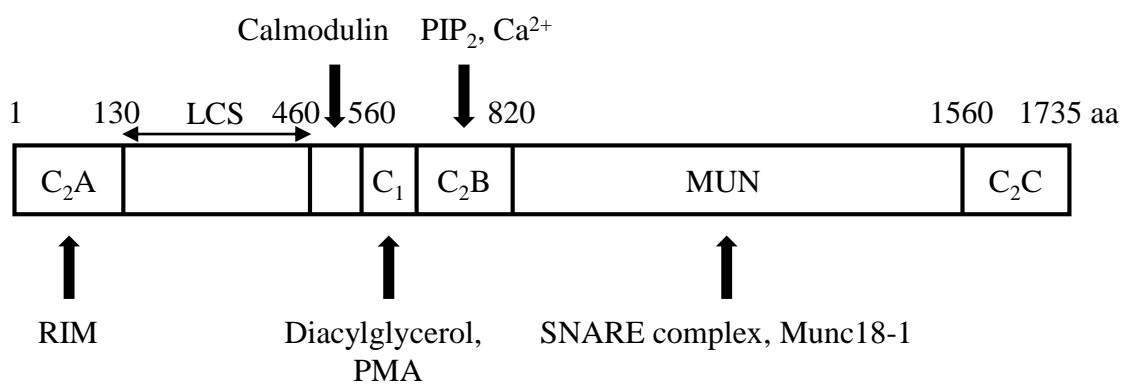
34. Rhee, J.S. *et al.*  $\beta$ -Phorbol Ester- and Diacylglycerol-Induced Augmentation of Transmitter Release Is Mediated by Munc13s and Not by PKCs. *Cell* **108**, 121-133 (2002).
35. Basu, J. *et al.* Munc13-1 C<sub>1</sub> Domain Activation Lowers the Energy Barrier for Synaptic Vesicle Fusion. *Journal of Neuroscience* **27**, 1200–1210 (2007).
36. Shin, O.-H. *et al.* Munc13 C<sub>2</sub>B domain is an activity-dependent Ca<sup>2+</sup> regulator of synaptic exocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 280–288 (2010).
37. Betz, A. *et al.* Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 2520–2526 (1997).
38. Basu, J. *et al.* A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nature Structural & Molecular Biology* **12**, 1017–1018 (2005).
39. Guan, R., Dai, H. & Rizo, J. Binding of the Munc13-1 MUN Domain to Membrane-Anchored SNARE Complexes. *Biochemistry* **47**, 1474–1481 (2008)
40. Ma, C. *et al.* Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin–Munc18 complex to the SNARE complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 542-549 (2011).
41. Yang, X. *et al.* Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 547–554 (2015).
42. Uversky, V. N. Natively unfolded proteins: A point where biology waits for physics. *Protein Science* **11**, 739–756 (2002).

43. Romero, P. *et al.* Sequence complexity of disordered protein. *Proteins* **42**, 38-48 (2001).
44. Haerty, W. & Golding, G. B. Low-complexity sequences and single amino acid repeats: not just "junk" peptide sequences. *Genome* **53**, 753-762 (2010).
45. Cumberworth, A. *et al.* Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes. *Biochemical Journal* **454**, 361-369 (2013).
46. Kato, M. *et al.* Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell* **149**, 753–767 (2012).
47. Patel, A. *et al.* A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated Disease Mutation. *Cell* **162**, 1066–1077 (2015).
48. Molliex, A. *et al.* Phase Separation by Low Complexity Domains Promotes Stress Granule Assembly and Drives Pathological Fibrillization. *Cell* **163**, 123–133 (2015).
49. Frey, S. & Görlich, D. A Saturated FG-Repeat Hydrogel Can Reproduce the Permeability Properties of Nuclear Pore Complexes. *Cell* **130**, 512–523 (2007).
50. Bah, A. *et al.* Folding of an intrinsically disordered protein by phosphorylation as a regulatory switch. *Nature* **519**, 106–109 (2014).
51. Wentzel, C. *et al.* mSYD1A, a Mammalian Synapse-Defective-1 Protein, Regulates Synptogenic Signaling and Vesicle Docking. *Neuron* **78**, 1012–1023 (2013).
52. Hioki, H. *et al.* High-level transgene expression in neurons by lentivirus with Tet-Off system. *Neuroscience Research* **63**, 149–154 (2009).

53. Zolotukhin, S. *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene therapy* **6**, 973–985 (1999).
54. Takikawa, K. *et al.* High-Throughput Development of a Hybrid-Type Fluorescent Glutamate Sensor for Analysis of Synaptic Transmission. *Angewandte Chemie International Edition* **53**, 13439–13443 (2014).
55. Tsukamoto, K. *et al.* Binding of *Clostridium botulinum* Type C and D Neurotoxins to Ganglioside and Phospholipid: *NOVEL INSIGHTS INTO THE RECEPTOR FOR CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 35164–35171 (2005).
56. Huang, B. *et al.* Three-Dimensional Super-Resolution Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy. *Science* **319**, 810-813 (2008).
57. Ishida, T. & Kinoshita, K. PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Research* **35**, W460–W464 (2007).
58. Calloway, N. *et al.* The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *eLife* 07728 (2015).
59. Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Iino, M. & Hirose, K. Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission: Visualization of glutamate dynamics. *European Journal of Neuroscience* **25**, 2249–2259 (2007).

60. Schneggenburger, R. *et al.* Released Fraction and Total Size of a Pool of Immediately Available Transmitter Quanta at a Calyx Synapse. *Neuron* **23**, 399-409 (1999).
61. Betz, A. *et al.* Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* **30**, 183-196 (2001).
62. Tompa, P. The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Letters* **579**, 3346–3354 (2005).

図 1



**図 1. Munc13-1 のドメイン構造**

Munc13-1 のドメイン構造を示した模式図。矢印の上下に記された分子名は各ドメインに結合することが知られているものを示す。LCS: Low Complexity Sequences、低複雑性配列、PMA: 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate、PIP<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate、aa: amino acids

図 2

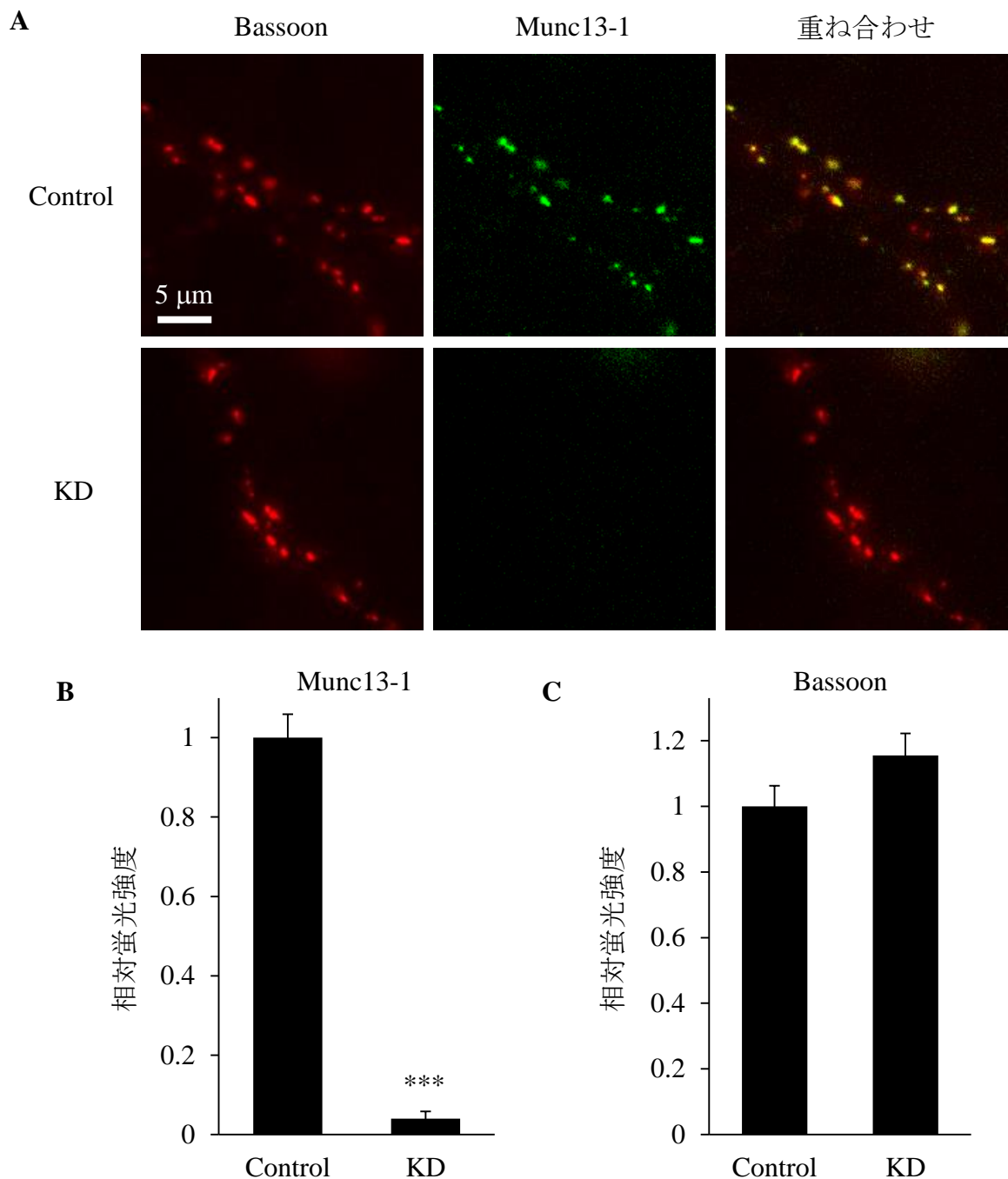


図 2. shRNA による内因性 Munc13-1 のノックダウン

- A.** シナプス前終末アクティブゾーンのマーカーである Bassoon と Munc13-1 の共免疫染色像。対照群 (Control) の神経細胞では Bassoon 陽性のシナプス前終末に Munc13-1 が局在している様子が観察されたが、Munc13-1 をノックダウンした神経細胞 (KD) ではシナプス前終末における Munc13-1 のシグナルが消失していた。
- B.** Bassoon 陽性シナプス前終末における Munc13-1 の免疫染色強度を Control と KD で比較したグラフ。縦軸は Control の平均値を 1 とした相対蛍光強度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。
- C.** Bassoon の免疫染色強度を Control と KD で比較したグラフ。縦軸は Control の平均値を 1 とした相対蛍光強度を示す。エラーバーは標準誤差を示す。



図 3

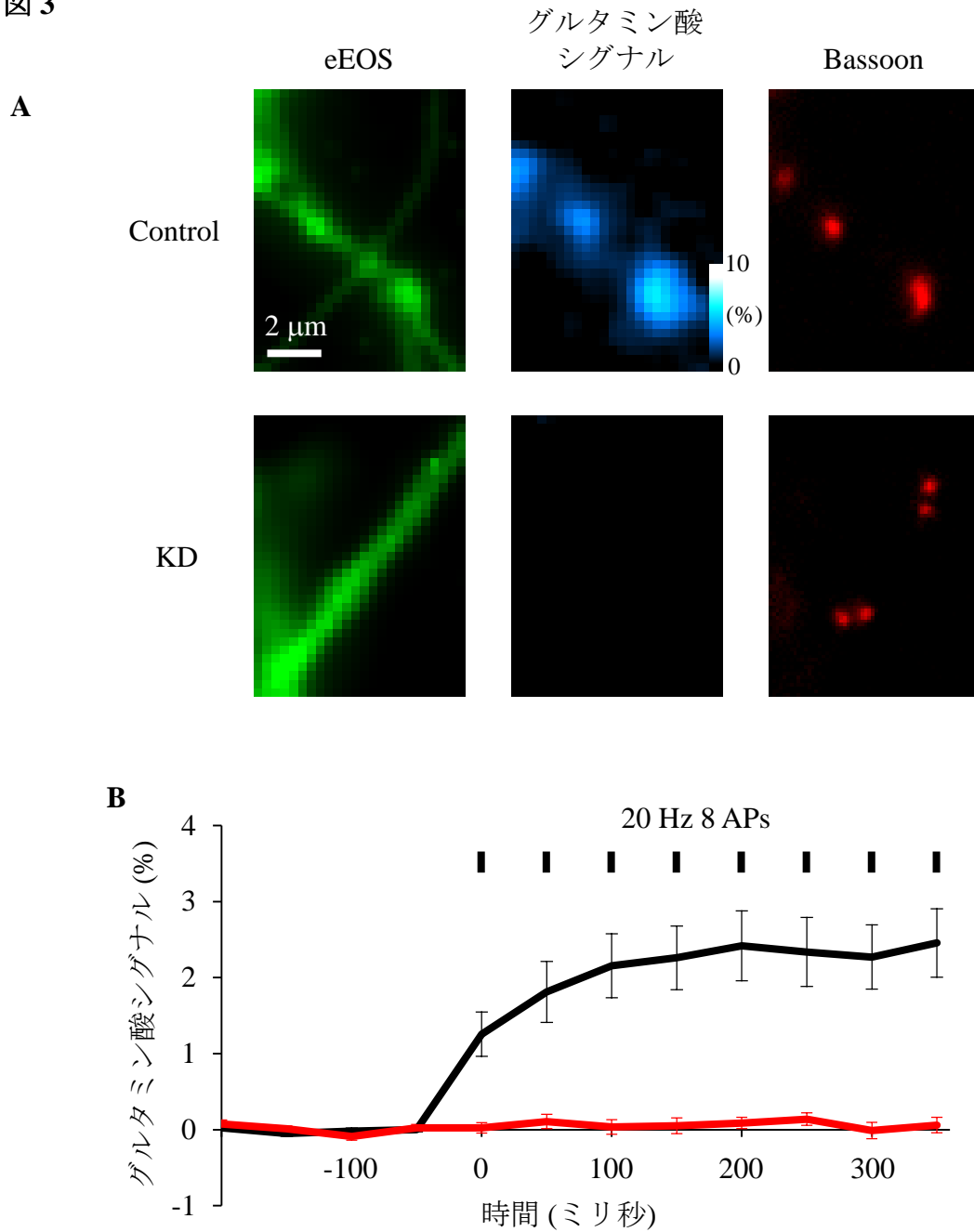
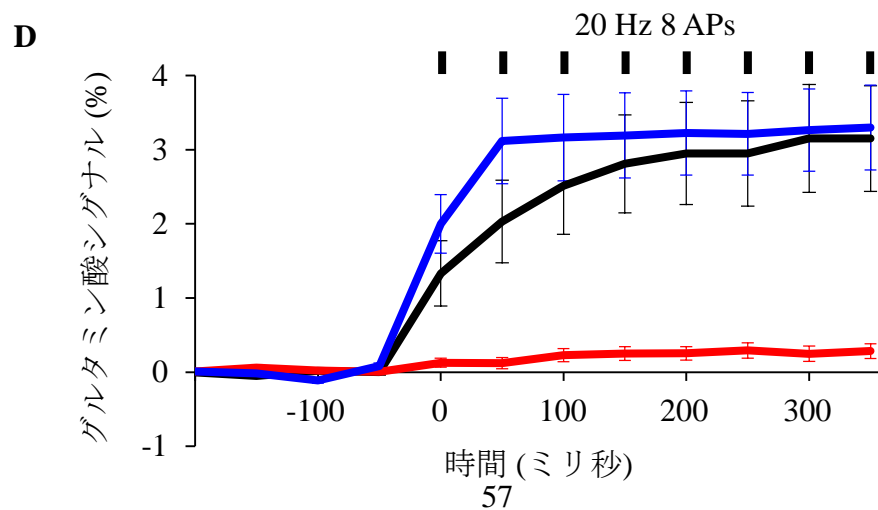
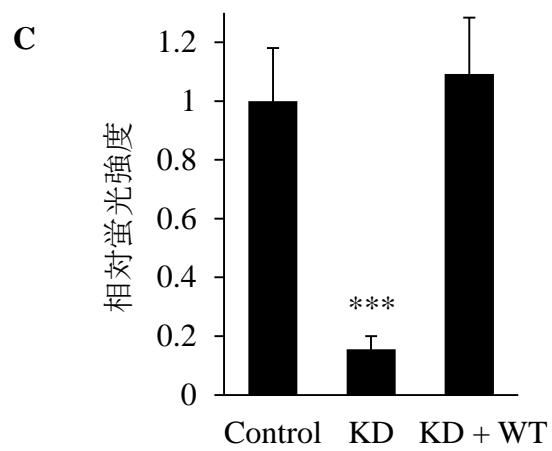
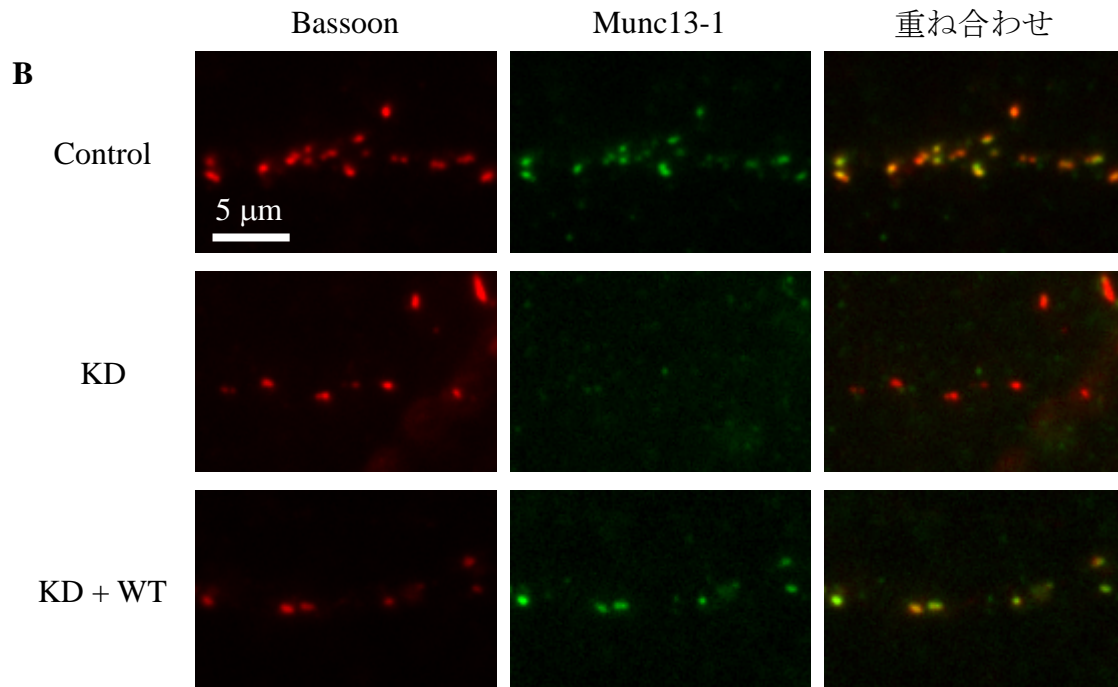
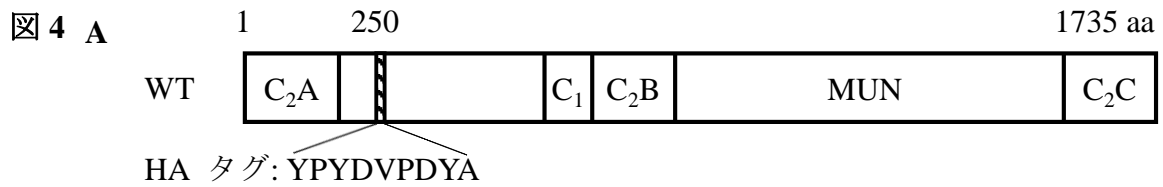


図 3. Munc13-1 ノックダウン神経細胞におけるグルタミン酸イメージング

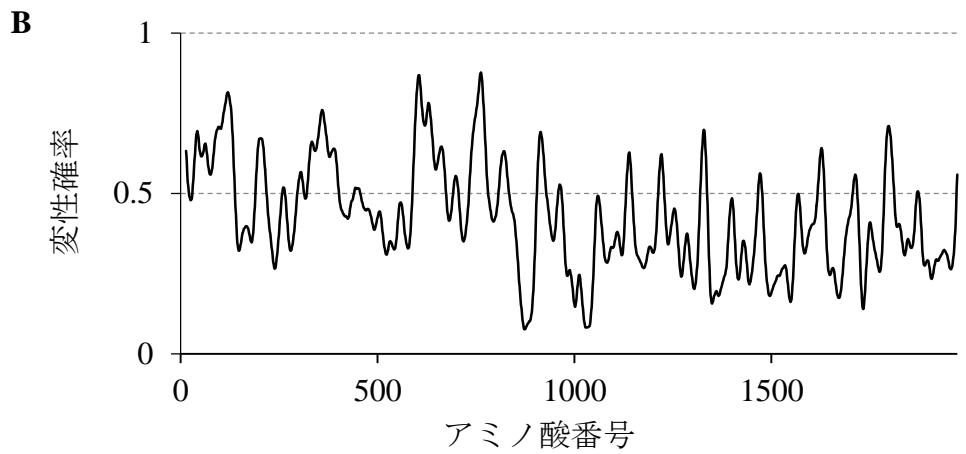
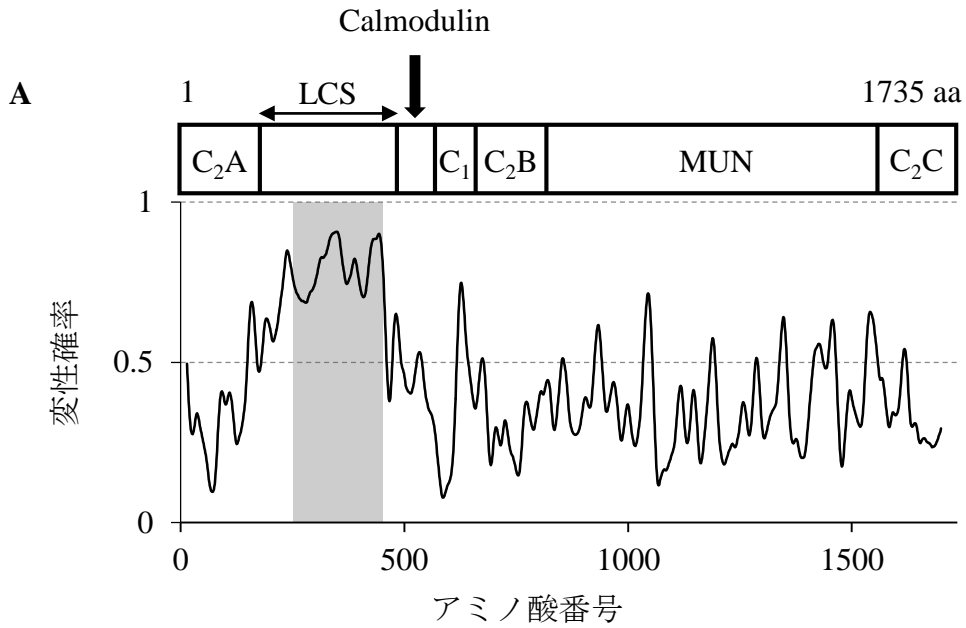
- A.** (左) 神経細胞表面に標識された eEOS の蛍光像。(中央) 20 Hz 8 回の電気刺激を与えた時の 8 回目の電気刺激時点での eEOS の蛍光変化率 (グルタミン酸シグナル) を示す画像。(右) Bassoon の免疫染色像。対照群 (Control) の神経細胞においては Bassoon 陽性のシナプス前終末と一致する領域でグルタミン酸シグナルが観察されたのに対し、Munc13-1 のノックダウンを行った神経細胞 (KD) ではグルタミン酸シグナルがほとんど見られなかった。
- B.** シナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルの時間推移を示すグラフ。エラーバーは標準誤差を示す。APs: action potentials、活動電位



#### 図 4. 外来性 Munc13-1 の発現によるグルタミン酸開口放出の回復

- A. レスキューに用いた野生型の外来性 Munc13-1 (WT) の模式図。斜線部は HA タグを表す。
- B. Munc13-1 のノックダウンと外来性 Munc13-1 の発現を行った神経細胞 (KD + WT) における Bassoon と Munc13-1 の共免疫染色像を、ノックダウンや外来性発現を行っていない対照群 (Control) 及びノックダウンのみを行った神経細胞 (KD) と比較した画像。外来性に発現させた Munc13-1 が Bassoon 陽性のシナプス前終末に局在している様子が観察された。
- C. Bassoon 陽性シナプス前終末における Munc13-1 の免疫染色強度の比較。縦軸は Control での平均値を 1 とした相対蛍光強度を示す。KD + WT における Munc13-1 の発現量は Control と同程度であった。
- D. 興奮性シナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルの時間推移を示すグラフ。黒線は Control、赤線は KD、青線は KD + WT におけるデータを示す。外来性 Munc13-1 の発現でグルタミン酸開口放出が Control と同程度まで回復した。エラーバーは標準誤差を示す。

図 5



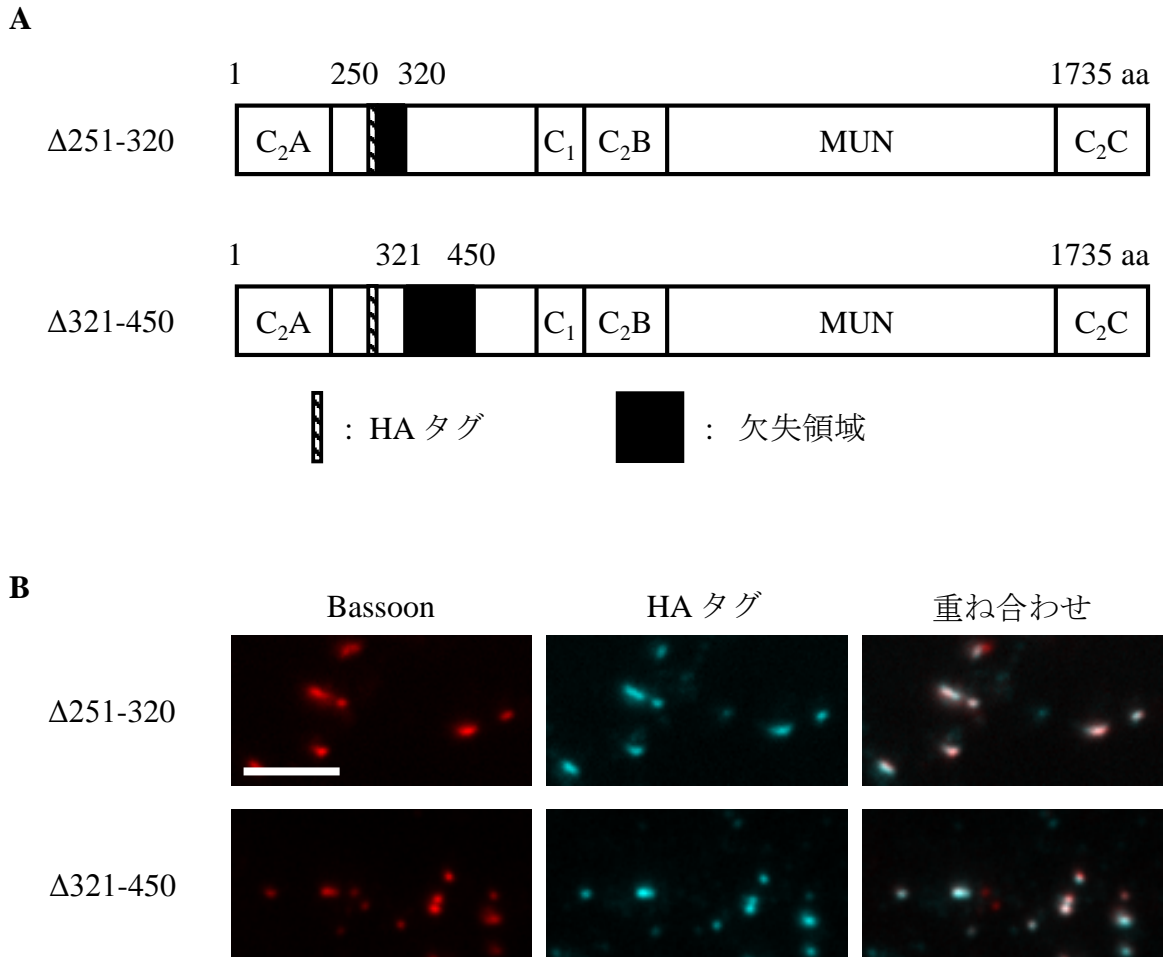
**C**

PRALSPTGSSRYASSGELSQGSSQLSEDFDP  
 DEHSLQGSELDDERDRDSYHSCHSSVSYH  
 KDSPRWDQDEEDLEDLEDEELPEEEEL  
 EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEVPDDLASYT  
 QQEDTTVAEPKEFKRISFPTAAPQKEDKVS  
 AVPIEAPDVSKGIPKAATPEEKAAAECAQE  
 AEPKSEESFRSREAEEG

## 図 5. Munc13-1 の天然変性領域

- A. PrDOS による Munc13-1 の変性予測解析。縦軸に示された変性確率が高いほどその領域が天然変性である確率が高いと考えられる。上に図 1 で示した Munc13-1 のドメイン構造を表す模式図を載せた。C<sub>2</sub>A ドメインと Calmodulin 結合部位の間、網掛で示した領域（251 から 450 番目のアミノ酸残基）あたりで変性確率が 0.5 を超えていることが分かる。
- B. PrDOS による Munc13-2 の変性予測解析。Munc13-1 において見られるような 200 アミノ酸以上に渡って 0.5 を超える変性確率を示す領域は存在しなかった。A, B とともに縦軸は 15 アミノ酸残基の幅で移動平均をとったものを示す。
- C. 251 から 450 番目のアミノ酸配列。グルタミン酸 (E)、アスパラギン酸 (D) の酸性アミノ酸残基を多く含む配列であることが分かる。251 から 320 番目のアミノ酸残基 (赤字) と 321 から 450 番目のアミノ酸残基 (青字) の 2 領域に分割して研究を進めた。

図 6



**図 6. Munc13-1 部分欠失変異体の発現確認**

- A.** 本研究において外来性に発現させた 2 種類の部分欠失変異体 ( $\Delta$ 251-320、 $\Delta$ 321-450) の構造を示す模式図。内因性 Munc13-1 との識別のため、250 番目と 251 番目のアミノ酸残基の間に HA タグ (YPYDVDPDYA) を挿入した。
- B.** Bassoon と HA タグの共免疫染色像。Munc13-1 のノックダウンと  $\Delta$ 251-320 の発現を行った標本及び  $\Delta$ 321-450 の発現を行った標本での染色像を示す。内因性 Munc13-1 の局在と同様 (図 2A、図 4A)、Munc13-1 部分欠失変異体が Bassoon 陽性シナプス前終末に局在している様子が観察された。スケールバーは 5  $\mu$ m。

図 7

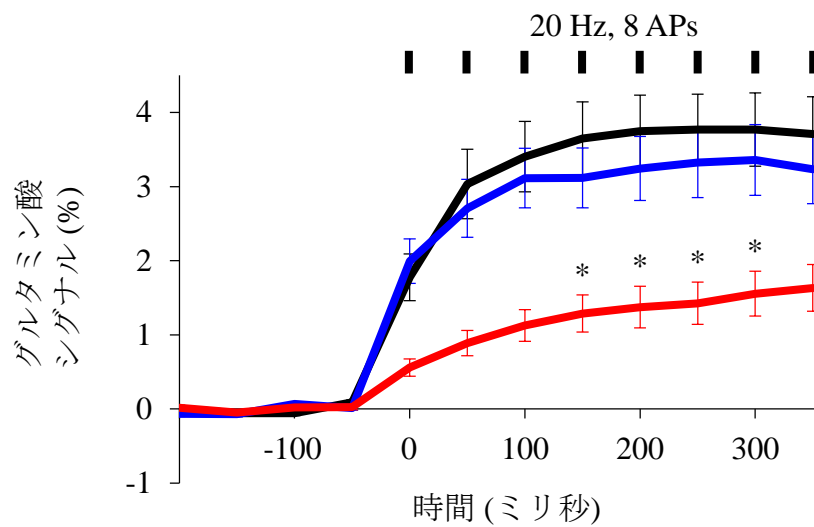
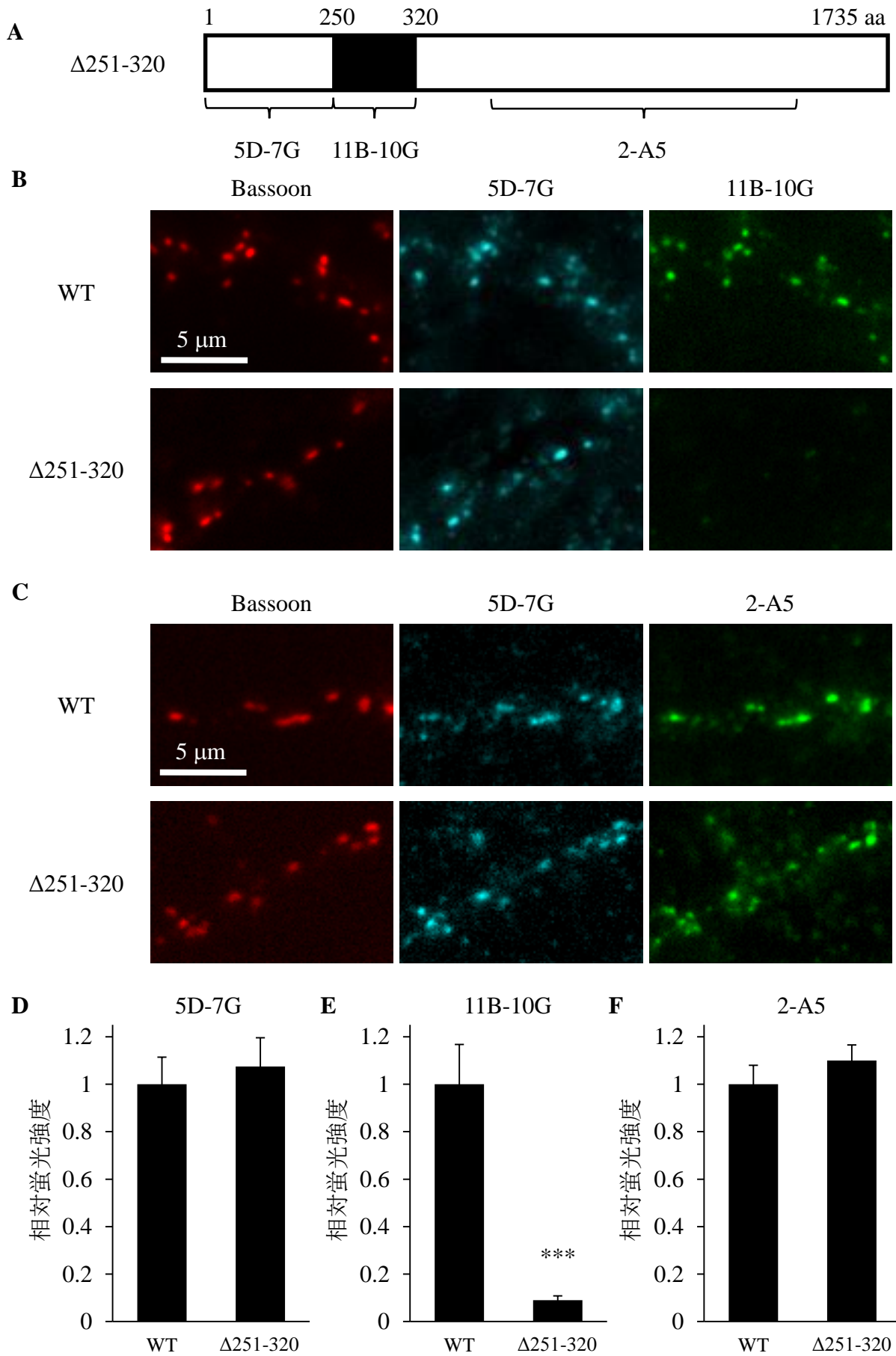


図 7. 部分欠失 Munc13-1 変異体に置き換えたシナプスでのグルタミン酸開口放出興奮性シナプス前終末におけるグルタミン酸シグナルの時間推移を示すグラフ。黒線はノックダウン後野生型 Munc13-1 (WT) でレスキューした標本、赤線は  $\Delta 251-320$  変異体でレスキューした標本、青線は  $\Delta 321-450$  変異体でレスキューした標本におけるデータを示す。 $\Delta 251-320$  変異体でレスキューした標本におけるグルタミン酸シグナルは WT でレスキューした標本におけるグルタミン酸シグナルよりも小さかった。エラーバーは標準誤差を示す。

图 8





## 図 8. $\Delta$ 251-320 変異体の発現確認

- A.  $\Delta$ 251-320 変異体の発現量を確認するため使用したマウスモノクローナル抗体のエピトープを示す模式図。11B-10G は変異体において欠失させた領域（251 から 320 番目のアミノ酸残基）を認識する。
- B. 抗 Bassoon 抗体及びクローン 5D-7G、11B-10G を用いて行った免疫染色の結果。 $\Delta$ 251-320 変異体でレスキューした標本では 11B-10G に由来するシグナルが検出されなかった。
- C. 抗 Bassoon 抗体及びクローン 5D-7G、2-A5 を用いて行った免疫染色の結果。どちらの抗 Munc13-1 抗体でも Bassoon 陽性シナプス前終末に局在したシグナルが見られた。
- D. クローン 5D-7G に由来するシグナルの WT と  $\Delta$ 251-320 での比較。両者に差は見られなかった。
- E. クローン 11B-10G に由来するシグナルの WT と  $\Delta$ 251-320 での比較。 $\Delta$ 251-320 ではシグナルがほとんど検出されなかった。
- F. クローン 2-A5 に由来するシグナルの WT と  $\Delta$ 251-320 での比較。両者に差は見られなかった。D、E、F の縦軸は全て WT での平均値を 1 とした相対蛍光強度を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

図 9

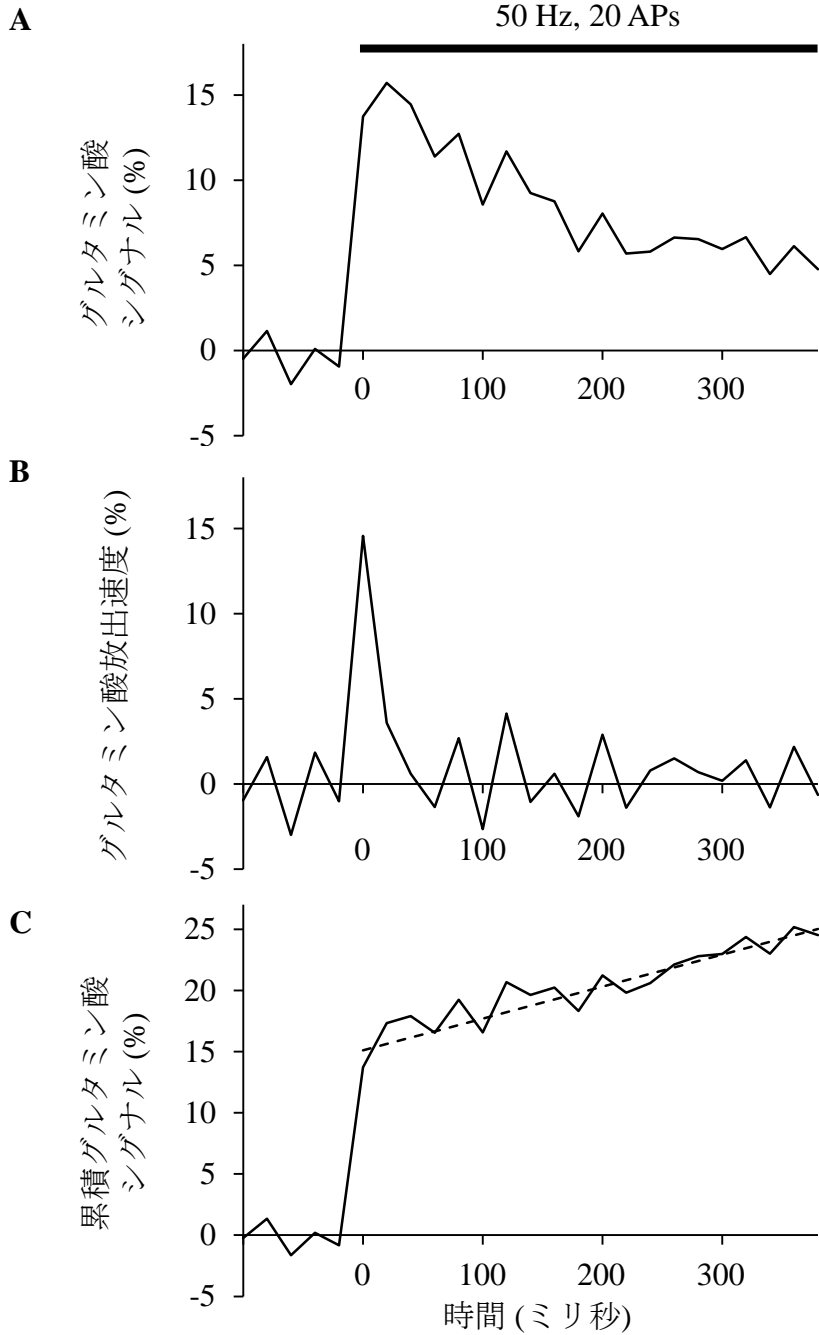


図 9. 高頻度刺激下でのグルタミン酸イメージングによる  $RRP_{Glu}$  の求め方  
A. 4 mM カルシウム、4-アミノピリジン存在下で 50 Hz、20 回の電気刺激を与えるという条件において興奮性シナプス前終末で観察されたグルタミン酸シグナルの時間推移。ある単一シナプスにおける例を示す。  
B. グルタミン酸シグナルにデコンボリューション解析を施すことで求めたグルタミン酸放出速度。  
C. グルタミン酸放出速度を積分することで求めた累積グルタミン酸シグナル。点線は x 軸の値が 200 ミリ秒から 380 ミリ秒の間について線形近似を行った結果を示す。近似曲線の y 切片の値が注目したシナプスにおける  $RRP_{Glu}$  に相当する。

図 10

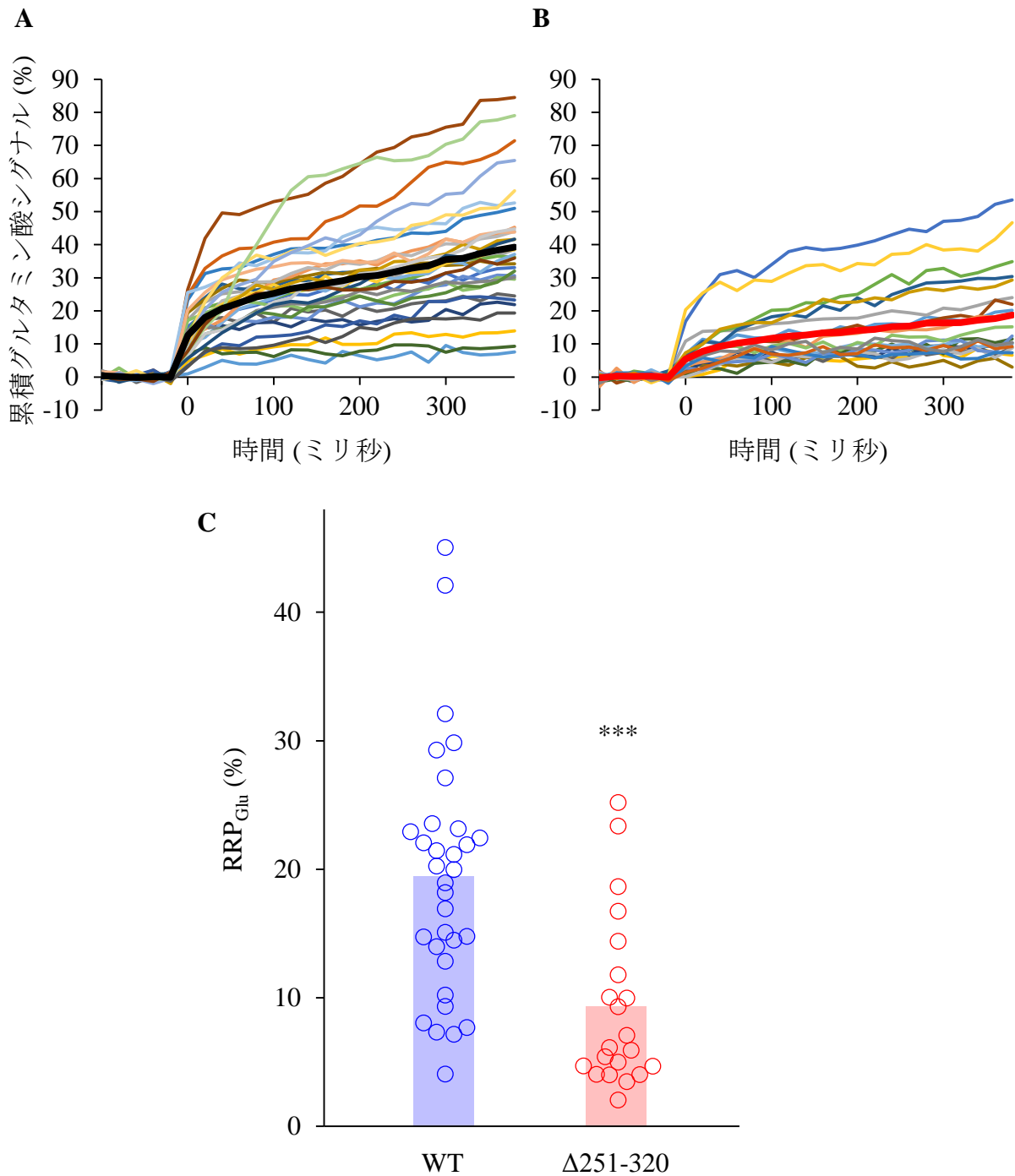


図 10.  $RRP_{Glu}$  の比較

- A. 4 mM カルシウム、4-アミノピリジン存在下で 50 Hz、20 回の電気刺激を与えるという条件における累積グルタミン酸シグナルの時間推移。野生型 Munc13-1 を発現する 32 個の興奮性シナプス前終末についてのデータを示したグラフ。
- B. A と同様の条件における累積グルタミン酸シグナルの時間推移を  $\Delta 251-320$  で置き換えた 21 個のシナプスについて示したグラフ。A、B 共に太線は平均値。
- C. 野生型 Munc13-1 (WT) を発現するシナプスと  $\Delta 251-320$  で置き換えたシナプスの  $RRP_{Glu}$  の比較。丸は 1 シナプスにおけるデータを、縦棒は平均値を示す。 $\Delta 251-320$  で置き換えたシナプスの  $RRP_{Glu}$  は WT を発現するシナプスよりも小さかった。

図 11

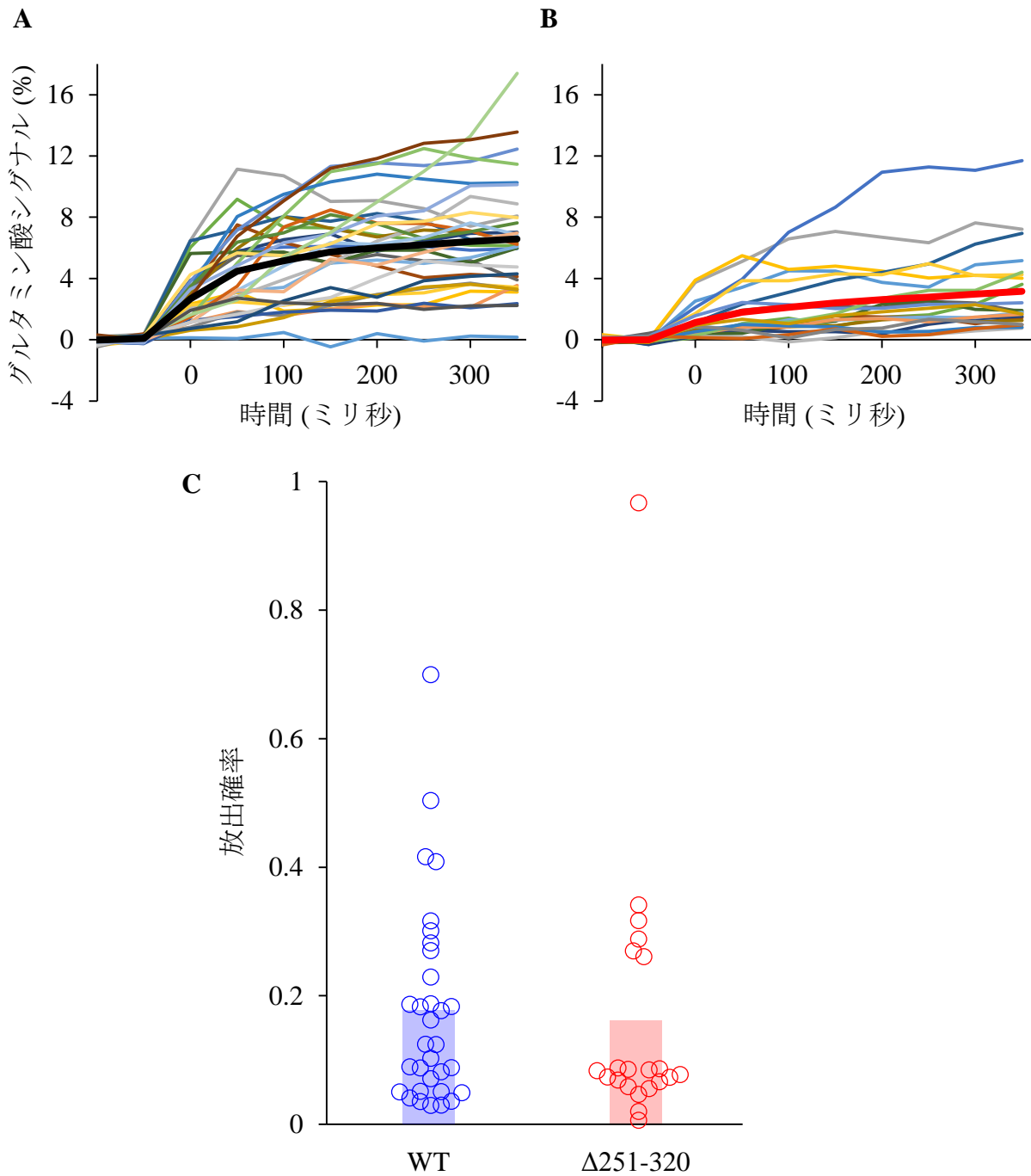


図 11. 放出確率の比較

- A. 2 mM カルシウムを含む細胞外液で 20 Hz、8 回の電気刺激を与えるという条件におけるグルタミン酸シグナルの時間推移。野生型 *Munc13-1* を発現する 32 個の興奮性シナプス前終末についてのデータを示したグラフ。
- B. A と同様の条件におけるグルタミン酸シグナルの時間推移を  $\Delta 251-320$  で置き換えた 21 個のシナプスについて示したグラフ。A、B 共に太線は平均値を示す。
- C. 野生型 *Munc13-1* (WT) を発現するシナプスと  $\Delta 251-320$  で置き換えたシナプスの放出確率の比較。2 mM カルシウムの状態で 1 回目の電気刺激に応答して得られたグルタミン酸シグナルを  $RRP_{Glu}$  で割ることで求めた。丸は 1 シナプスにおけるデータを、縦棒は平均値を示す。WT を発現するシナプスと  $\Delta 251-320$  で置き換えたシナプスの間に差は見られなかった。

図 12

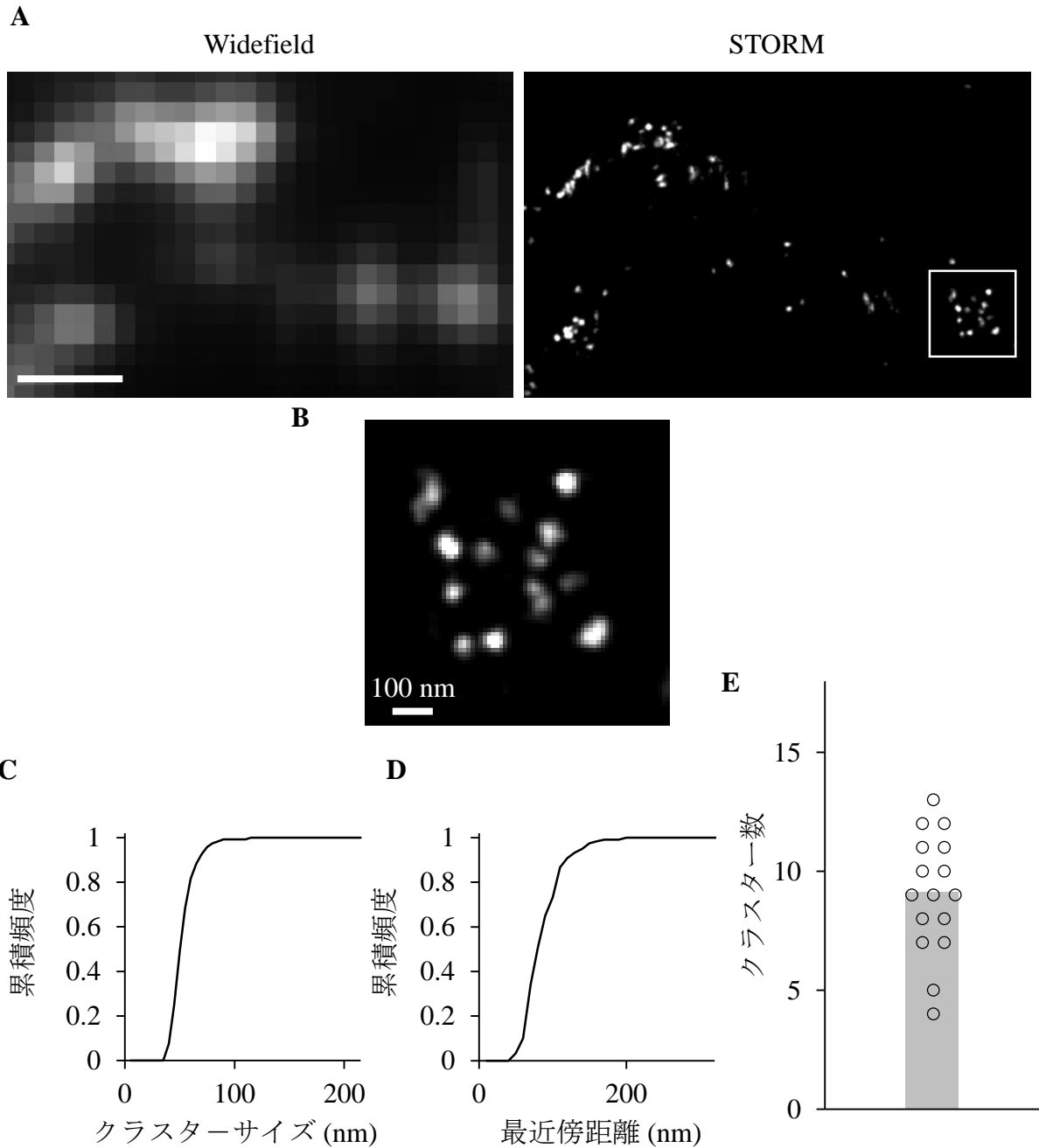
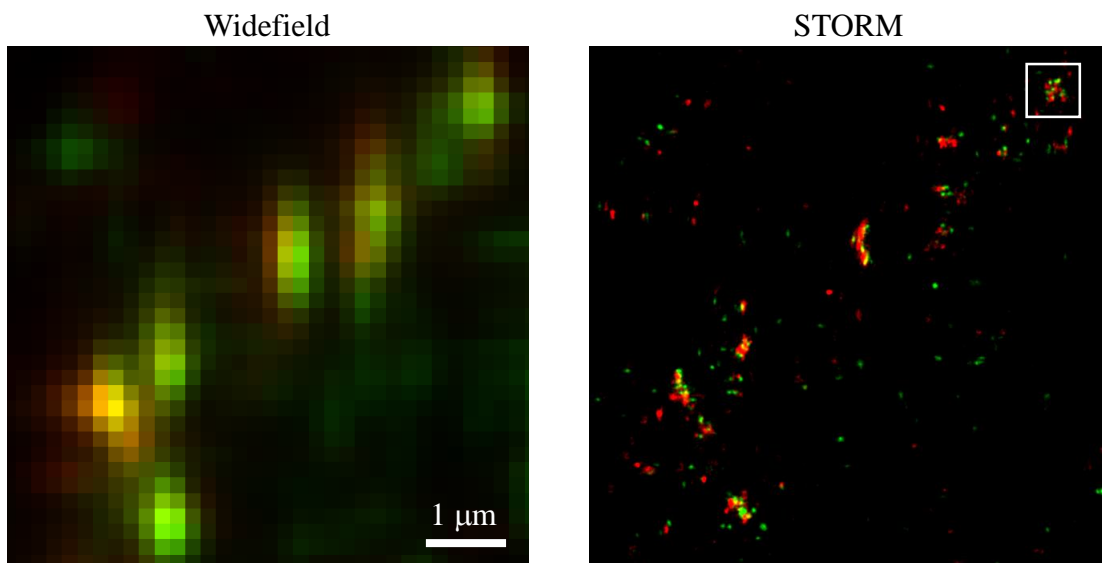


図 12. アクティブゾーンにおける Munc13-1 の微細構造

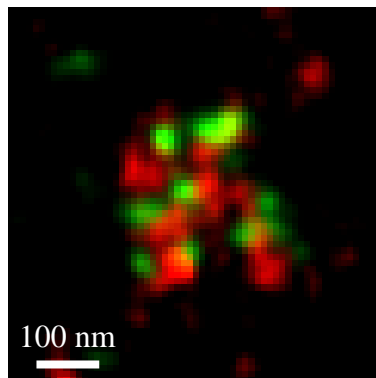
- A. 神経細胞における Munc13-1 の免疫染色像。スケールバーは 500 nm。左は通常の顕微鏡による観察像 (Widefield)、右は STORM による観察像。
- B. A の枠内の拡大図。Munc13-1 がナノメートルスケールのクラスターを形成している。
- C. Munc13-1 ナノクラスターのクラスターサイズの累積度数分布。平均値は  $47.6 \pm 1.0$  nm であった。
- D. Munc13-1 ナノクラスターの最近傍距離の累積度数分布。平均値は  $84.7 \pm 2.4$  nm であった。
- E. アクティブゾーンあたりナノクラスター数の分布。丸は 1 シナプスにおけるデータを、縦棒は平均値を示す。平均値は  $9.1 \pm 0.6$  個であった。値はすべて平均  $\pm$  標準誤差を示す。

図 13

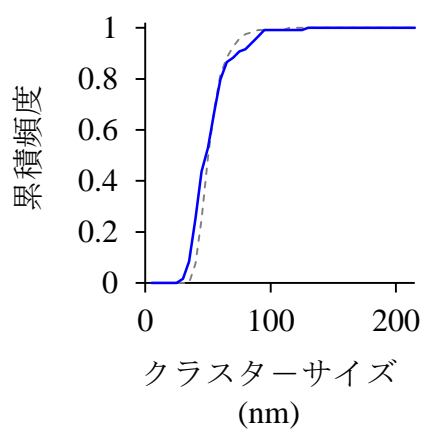
A



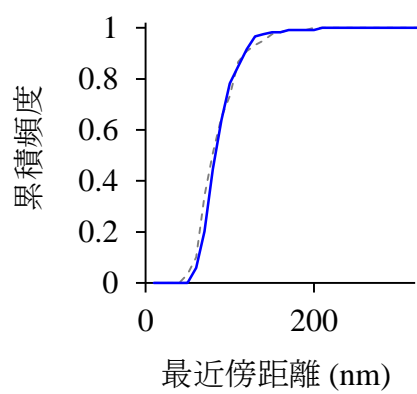
B



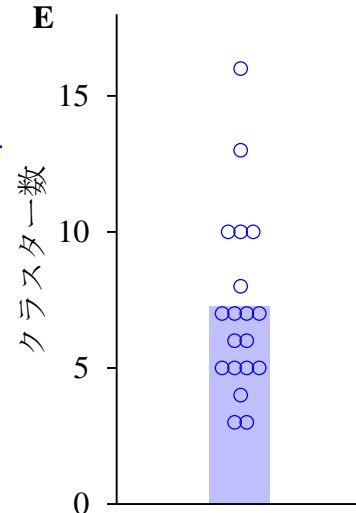
C



D



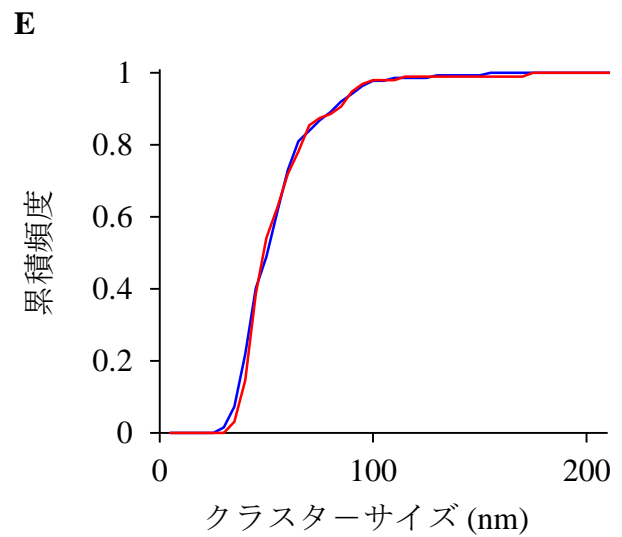
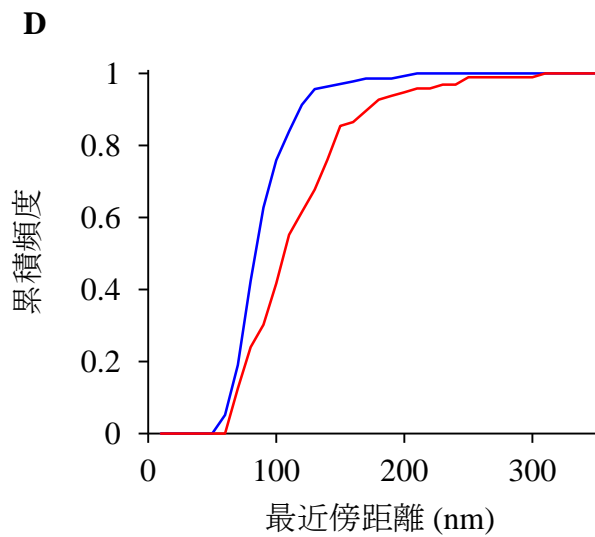
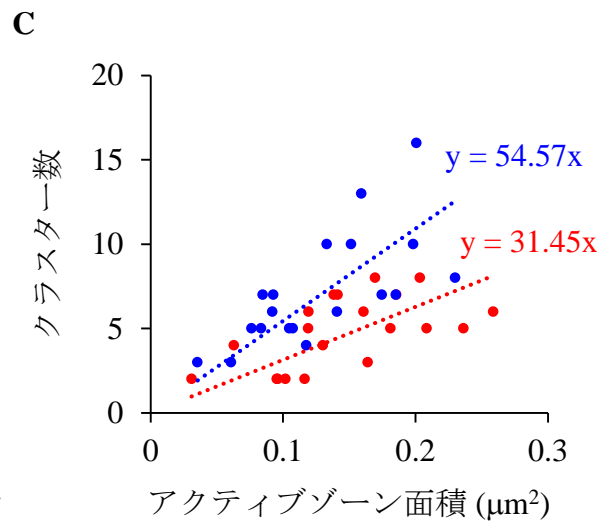
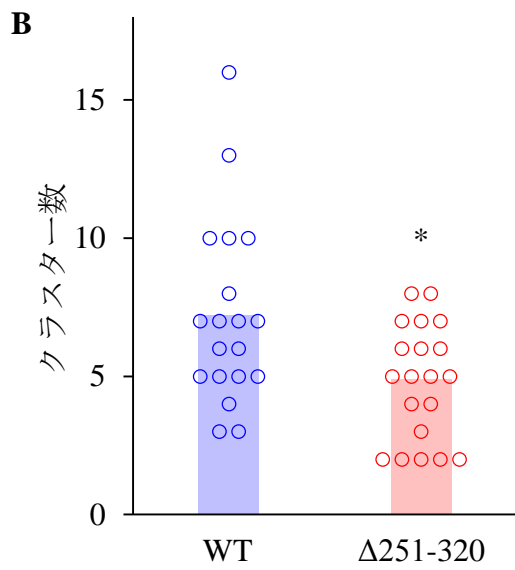
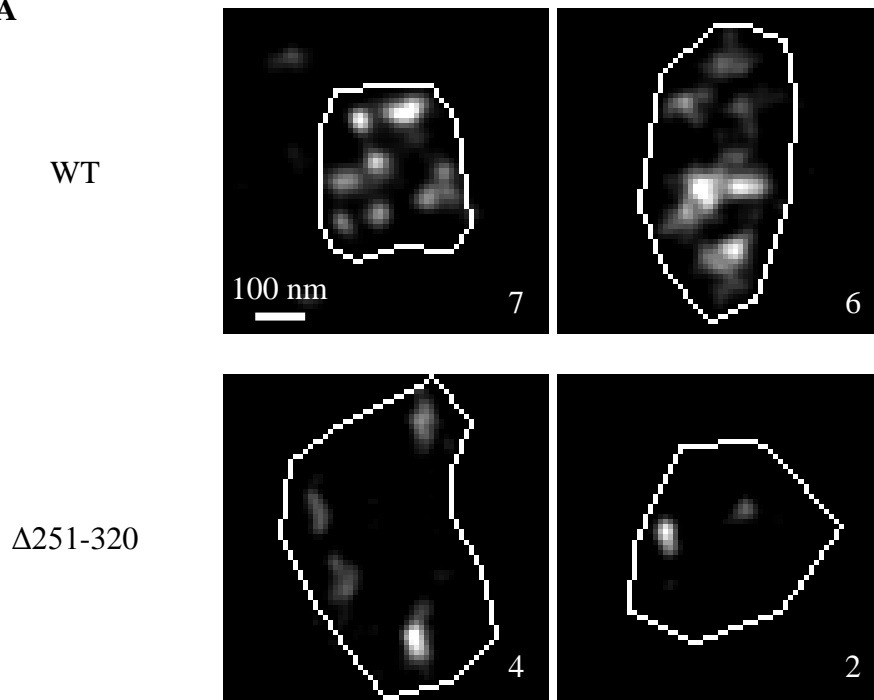
E



### 図 13. アクティブゾーンにおける外来性 Munc13-1 の微細構造

- A.** ノックダウンと野生型 Munc13-1 の発現を行った標本の免疫染色像。緑は抗 HA タグ抗体でのシグナルを、赤はアクティブゾーンマーカ分子に対する抗体（抗 Bassoon 抗体、抗 RIM 1/2 抗体）でのシグナルを示す。（左）通常の顕微鏡による観察像。外来性に発現させた野生型 Munc13-1 に由来する HA タグのシグナルがシナプスに局在している様子が分かる。（右）STORM での観察像。
- B. A** 右図の白枠内の拡大図。赤で示されるアクティブゾーン内で Munc13-1 がクラスター状に存在している様子が分かる。
- C.** Munc13-1 ナノクラスターのクラスターサイズの累積度数分布。青線は外来性 Munc13-1 ナノクラスターのデータを示す。平均値は  $51.4 \pm 1.5$  nm であった。薄い点線は図 12 C で示した内因性 Munc13-1 ナノクラスターのデータを重ね合わせたもの。両者に差は見られなかった。
- D.** Munc13-1 ナノクラスターの最近傍距離の累積度数分布。青線は外来性 Munc13-1 ナノクラスターのデータを示す。平均値は  $87.2 \pm 2.2$  nm であった。薄い点線は図 12 D で示した内因性 Munc13-1 ナノクラスターのデータを重ね合わせたもの。両者に差は見られなかった。
- E.** アクティブゾーンあたりナノクラスター数。丸は 1 アクティブゾーンにおけるデータを、縦棒は平均値を示す。平均値は  $7.2 \pm 0.8$  個であった。

図 14 A





#### 図 14. アクティブゾーンにおける $\Delta 251-320$ 変異体の微細構造

- A. HA タグ抗体によって検出した野生型 (WT) 及び  $\Delta 251-320$  のアクティブゾーンにおける微細構造。白枠はアクティブゾーンマーカー分子によって可視化されたアクティブゾーン領域を示す。WT、 $\Delta 251-320$  ともにアクティブゾーン内でナノクラスターを形成しているが、 $\Delta 251-320$  のナノクラスター密度は WT のナノクラスター数に比べて低い様子が分かる。図中右下の数字は観察されたナノクラスターの数を示す。
- B. アクティブゾーンあたりナノクラスター数の WT と  $\Delta 251-320$  の比較。丸は 1 アクティブゾーンにおけるデータを、縦棒は平均値を示す。 $\Delta 251-320$  がアクティブゾーン内で作るナノクラスター数は WT に比べて少なかった。
- C. 横軸にアクティブゾーン面積を、縦軸にナノクラスター数をプロットしたグラフ。直線と数式は y 切片を 0 とした時の線形近似曲線を示す。青丸と青線は WT におけるデータを、赤丸と赤線は  $\Delta 251-320$  におけるデータを示す。 $\Delta 251-320$  の方が単位面積あたりのナノクラスター数が少ないことが分かる。
- D. ナノクラスター間の最近傍距離の累積度数分布。青線は WT におけるデータを、赤線は  $\Delta 251-320$  におけるデータを示す。 $\Delta 251-320$  が作るナノクラスターの最近傍距離の方が大きい。
- E. WT と  $\Delta 251-320$  の作る Munc13-1 ナノクラスターサイズの累積度数分布。青線は WT におけるデータを、赤線は  $\Delta 251-320$  におけるデータを示す。両者に差は見られなかった。

図 15

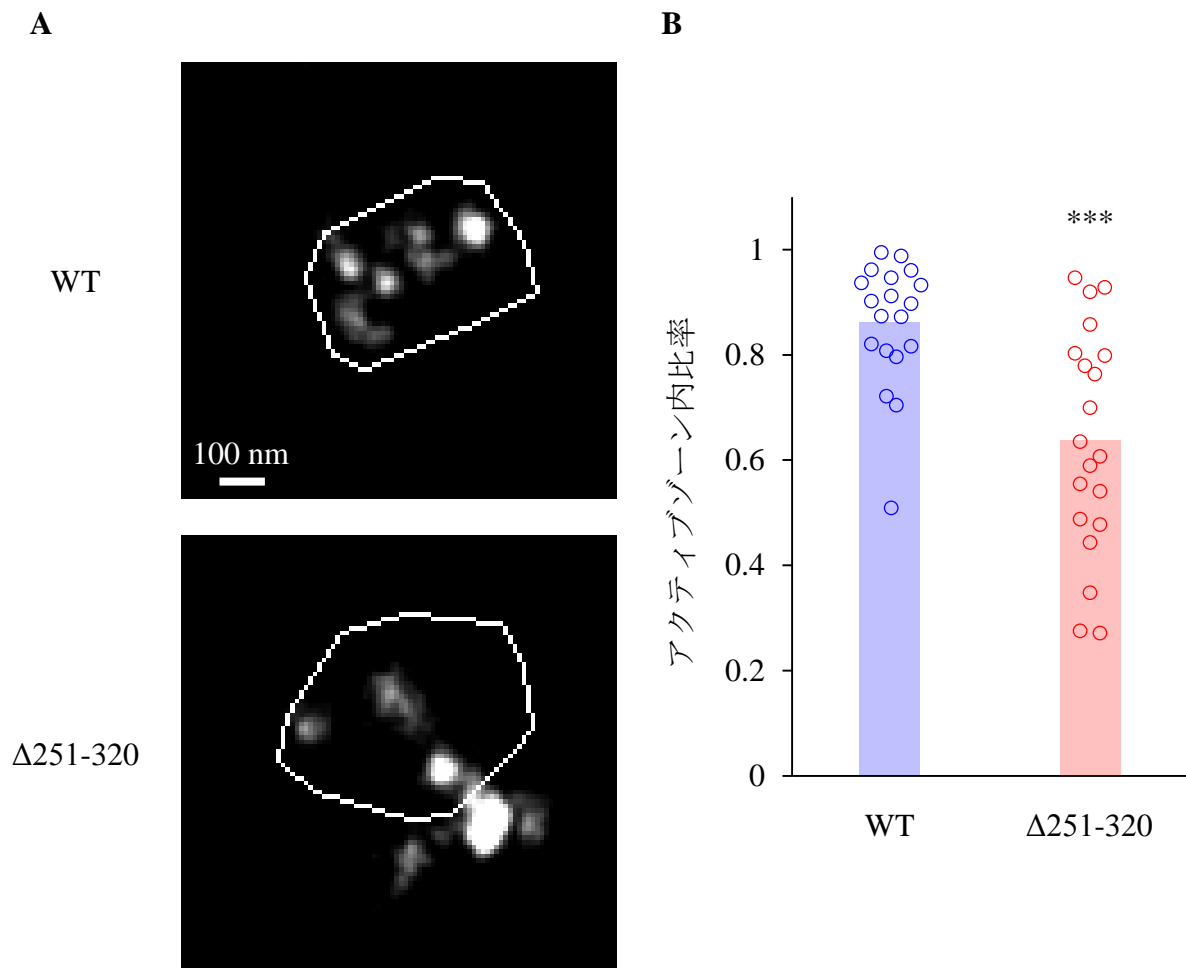
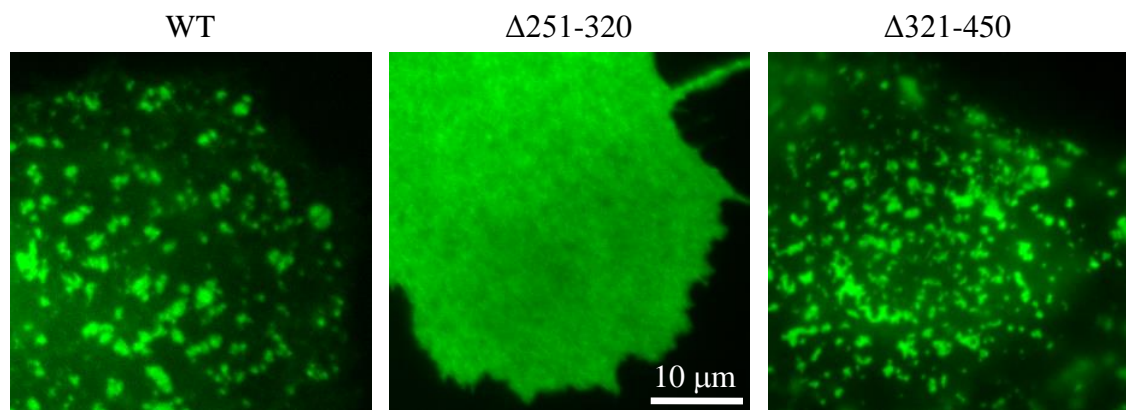


図 15. Δ251-320 変異体のアクティブゾーンへの局在

- A.** 抗 HA タグ抗体によって検出した WT 及び Δ251-320 の微細構造。白枠はアクティブゾーンマーカー分子によって示されたアクティブゾーン領域を示す。Δ251-320 ではアクティブゾーンに局在しないシグナルが多いことがわかる。
- B.** 抗 HA タグ抗体に由来するシグナルのうちアクティブゾーンに局在しているシグナルの比率を WT と Δ251-320 で比較した。Δ251-320 ではアクティブゾーン内に存在するシグナルの比率が低下していることが分かった。

図 16

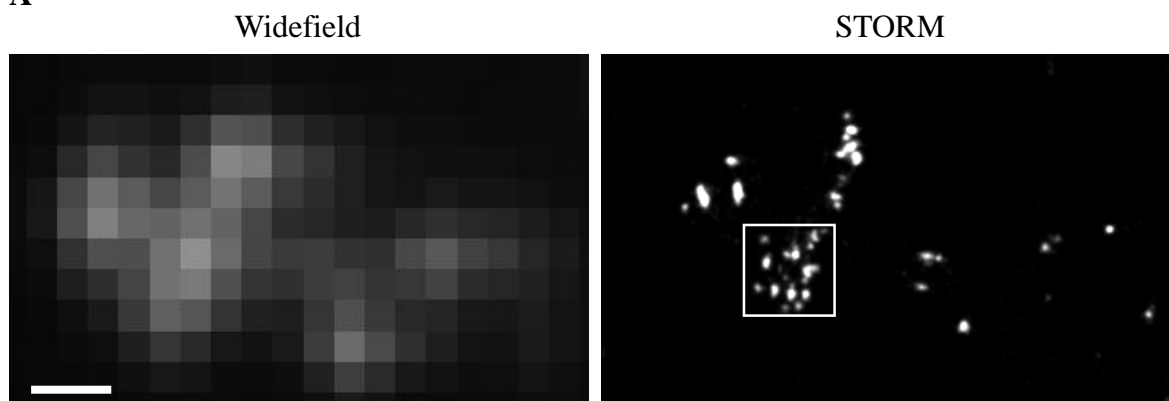


**図 16. COS-7 細胞における Munc13-1 の集合体形成**

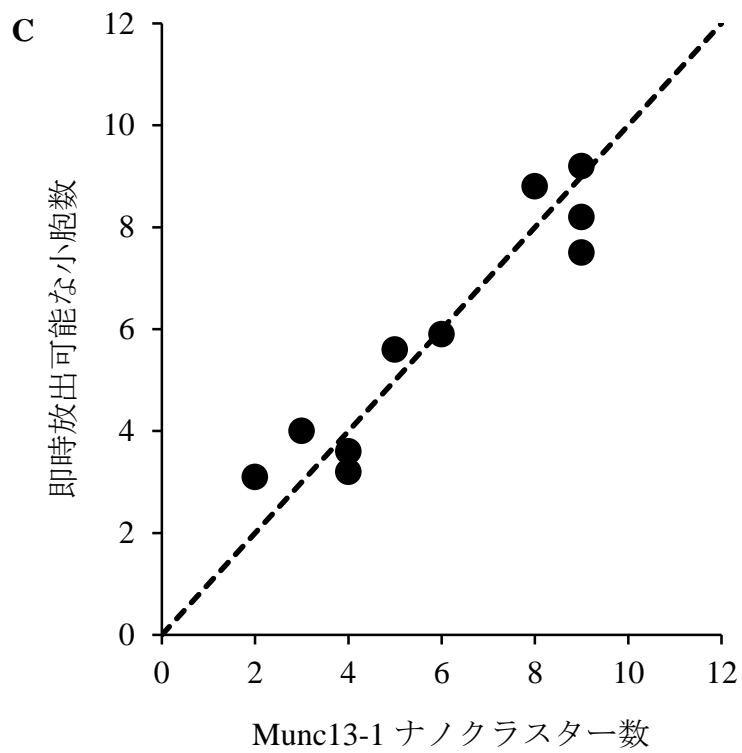
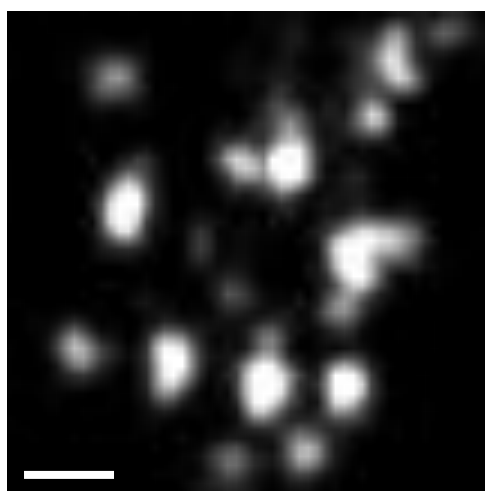
COS-7 細胞の膜直下に WT、 $\Delta 251-320$  変異体または  $\Delta 321-450$  変異体と単量体緑色蛍光タンパク質 (mEGFP) の融合タンパク質を発現させ発現パターンを観察した。WT 及び  $\Delta 321-450$  変異体では非連続的な集合体の形成が見られたが、 $\Delta 251-320$  変異体では細胞膜全体に拡散した連続的な分布が観察された。

付録

A



B



付録（共同研究者坂本寛和による研究）

- A. 神経細胞における Munc13-1 の免疫染色像。スケールバーは 500 nm。左は通常の顕微鏡による観察像（Widefield）、右は STORM による観察像。
- B. A の枠内の拡大図。Munc13-1 がナノメートルスケールのクラスターを形成している様子が分かる。スケールバーは 100 nm。
- C. STORM によって求めた Munc13-1 ナノクラスター数を横軸に、グルタミン酸イメージングによって求めた即時放出可能な小胞数を縦軸にプロットしたグラフ。1 つの点は 1 つのシナプスについてのデータを示す。両者の値がほぼ一致していることがわかる。 $R^2 = 0.87$

## 謝辞

本研究を遂行する機会を与えてくださり、常に熱心なご指導を賜りました廣瀬謙造先生に厚く御礼申し上げます。また、研究計画から論文執筆まで様々な場面でご助言頂きました助教の並木繁行先生に心から感謝致します。共同研究者として快くデータを提供して頂いた坂本寛和氏、ならびに様々な場面でご助力頂いた神経生物学教室の皆様に深く感謝しております。