

## 論文の内容の要旨

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

高等動物の中樞神経系ではシナプス前終末から開口放出された神経伝達物質がシナプス後部の受容体に結合しシナプス後電位が発生するというシナプス伝達によって神経細胞間での情報伝達が行われている。シナプス伝達の分子基盤についてその詳細を解明することは中枢神経系における情報処理機構を理解する上で非常に重要であると考えられるが、シナプス前終末からの神経伝達物質開口放出についてその分子メカニズムの解明はまだ十分でない。

シナプス小胞からの神経伝達物質の開口放出はアクティブゾーンと呼ばれるシナプス前終末の細胞膜直下領域において起こる。活動電位依存的に即座に放出され得るシナプス小胞の最大個数は即時放出可能な小胞数と呼ばれ、1回の活動電位に対して実際に放出されるシナプス小胞の割合は放出確率と呼ばれる。即時放出可能な小胞数や放出確率は放出される神経伝達物質の量を決定する主要因であるが、その制御機構は未解明の点が多い。

アクティブゾーンに局在するタンパク質は即時放出可能な小胞数や放出確率の制御に深く関与していると考えられている。特に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** はノックアウトマウスにおいて即時放出可能な小胞が大幅に減少することが分かっており重要であると考えられている。また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作る直径数十 nm 程度のナノスケールのクラスター (ナノクラスター) の個数と即時放出可能な小胞数が一致することが分かっている。これらの研究成果は **Munc13-1** が開口放出を直接に制御する極めて重要な分子であることを示すものである。

**Munc13-1** による開口放出制御のメカニズムについてこれまでに **Munc13-1** の各ドメインが果たす機能が調べられてきたが、**C<sub>2</sub>A** ドメインと **Calmodulin** 結合部位との間の領域については知られている機能ドメインとの相同性が低いことから注目されてこなかった。この領域が天然変性領域と呼ばれるタンパク質間相互作用を生じやすい性質を備えた領域である可能性が示唆されたことから、その生理的機能について調べることは非常

に重要であると考えた。そこで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 結合配列との間の領域に着目し、特に開口放出における役割について研究した。

Munc13-1 についてアミノ酸配列から天然変性領域の存在を予測する解析ツール PrDOS を用いた解析を行ったところ、C<sub>2</sub>A ドメインと Calmodulin 結合配列との間の一部が天然変性領域に相当することが示された。天然変性領域の機能を調べるため、shRNA の発現によるノックダウンと変異体の発現によって神経細胞の Munc13-1 を天然変性領域の欠失した変異体に置き換える実験を行った。蛍光グルタミン酸プローブ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可視化したところ、天然変性領域の一部、251 から 320 番目のアミノ酸残基を欠失した変異体 ( $\Delta$ 251-320) に置き換えたシナプスからのグルタミン酸放出は野生型 Munc13-1 を発現するシナプスに比べ少ないことが分かった。即時放出可能な小胞数をグルタミン酸イメージングによって評価したところ、 $\Delta$ 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は野生型を発現するシナプスに比べ少ないことが分かった。以上の結果はこれまで機能未知であった Munc13-1 の天然変性領域が即時放出可能な小胞数の制御に働いていることを示している。

先行研究において個々のシナプスに含まれる Munc13-1 の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明らかになっていたため、 $\Delta$ 251-320 変異体を発現するシナプスにおける即時放出可能な小胞数の減少は Munc13-1 ナノクラスター数の減少を伴っていることが予想された。そこで野生型 Munc13-1 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について STORM による超解像イメージングを行い、両者の微細構造を比較した。その結果、 $\Delta$ 251-320 変異体は野生型 Munc13-1 に比べてアクティブゾーン内で形成するナノクラスター数が少ないことが分かった。また野生型 Munc13-1 はそのほとんどがアクティブゾーン内に局在していたが  $\Delta$ 251-320 変異体ではアクティブゾーン外部に多く局在していることが分かり、Munc13-1 の天然変性領域がアクティブゾーンへの局在化と正常なナノクラスターの形成に必要であることが明らかとなった。

Munc13-1 の天然変性領域が正常なナノクラスター形成に関わるメカニズムを探るため、非神経細胞において Munc13-1 を発現させる実験を行った。Munc13-1 を COS-7 細胞の細胞膜直下に発現させると自律的に集合体を形成する様子が観察されたが、天然変性領域を欠失させた変異体の発現では集合体の形成は観察されなかった。Munc13-1 との相互作用が知られている分子は COS-7 細胞には発現していないことから、Munc13-1 の集合体形成は天然変性領域を介した自己相互作用によるものと解釈することができる。

本研究ではこれまで機能未知であった Munc13-1 の天然変性領域が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必要であること、即時放出可能な小胞数の制御に重要な役割を担っていることを明らかにした。天然変性領域がナノクラスター形成を制御する分子メカニズムとして、天然変性領域を介した自己相互作用がナノクラスター形成

を制御している可能性が考えられる。また **Piccolo** や **CAST** など他のアクティブゾーン局在分子にも天然変性領域が含まれることから、天然変性領域を介して **Munc13-1** と他分子との間で超分子複合体が形成されることがアクティブゾーンにおけるナノクラスター形成に重要である可能性がある。