

シナプスの情報量を定める超分子ナノ構造

1. 発表者：

廣瀬 謙造（東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻神経生物学分野 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆脳の神経伝達物質であるグルタミン酸が、シナプスで放出されている様子を個別のシナプスで直接観測することに成功しました。
- ◆観測結果の解析により、ひとつのシナプスにはグルタミン酸放出を起こす箇所（放出サイト）が複数存在することでシナプスの持つ情報量を高めることが明らかとなりました。また、この放出サイトの実体はシナプス内タンパク質分子が自己集合することで形成されるナノサイズの超分子集合体であることを突き止めました。
- ◆今回の発見はシナプス伝達の根本的仕組みに迫るもので、脳の計算原理の解明や精神神経疾患の理解や克服にとって重要な知見となると考えられます。

3. 発表概要：

シナプス伝達は神経回路における情報処理の素過程です。哺乳類の脳には数十兆から数百兆に及ぶシナプスが形成されていると言われていたのですが、個々のシナプスが持ち得る情報量はどの程度なのかよく分かっていませんでした。また、シナプスの情報量を決定する分子構造はこれまで同定されていませんでした。

今回、東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生物学分野の廣瀬教授らの研究グループは、脳の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸のイメージング技術とシナプス分子の超解像可視化技術を組み合わせて、タンパク質分子 Munc13-1 を中心とした超分子集合体の個数が個々のシナプスの情報量を決定している事を明らかにしました。本研究成果は、分子と細胞内小器官の中間のサイズにあたるナノサイズの超分子構造とシナプス機能とを結びつけた重要な成果であります。今回の発見はシナプス伝達の根本的仕組みの一端を明らかにするものであり、脳の仕組みの理解や精神神経疾患の理解や克服にとって重要な知見であると考えられます。また、タンパク質の超分子集合現象は、シナプス機能だけではなく、さまざまな生理機能を実現するための生命の本質であると考えられます。

本研究成果は「Nature neuroscience」（オンライン版：12月11日）に掲載されました。

4. 発表内容：

① 研究の背景

シナプス伝達はシナプス前終末から放出される神経伝達物質がシナプス後細胞の受容体と結合することによって成立します。神経伝達物質はシナプス小胞と呼ばれる直径 40 ナノメートル程度の脂質二重膜で構成された小さな袋（小胞）の中に充填されており、シナプス小胞と細胞膜との融合を介して放出されます（開口放出、注1）。一般に神経伝達物質放出の強度は、1) シナプス小胞放出サイトの個数、2) 放出確率及び 3) 充填される神経伝達物質の量の三つの特性によって決まることが示されています。しかしながら、これらの特性がシナプス前終末に局在する分子群によってどのように実装されているのかまだよ

く分かっていません。特に、放出サイト（開口放出が起こる場所）の個数はシナプス伝達強度を規定するものですが、一つのシナプスにいくつ存在するのか、どのような分子実体によって形成されているのかという点はこれまで不明でした。

② 研究内容

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生物学分野の廣瀬教授らの研究グループは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での蛍光イメージング技術を構築し、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ました（図1）。この計測技術はグルタミン酸蛍光センサー (**glutamate (E) Optical Sensor: EOS**)を使った蛍光可視化技術であり、素量的放出過程、すなわち単一のシナプス小胞から放出されるグルタミン酸をも高精細に捉えられるほど感度の高いものでした。さらに、電気生理学的解析に広く用いられている分散分析法 (**variance-mean 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三つのパラメータを定量的に抽出することに成功しました。特に、シナプス小胞放出サイトの個数はシナプス毎に大きく異なる（2~18個）ことが明らかとなり、個々のシナプスの情報量は1か0の二進数ではなく、複数ビットの情報量を持ちうるということが明確に示されました。

シナプス前終末には数多くのタンパク質が局在していますが、神経伝達物質の放出において、**Munc13s**（注2）は最も重要なタンパク質群の一つであると考えられています。研究グループは蛍光色素で直接標識された抗体を用いて**Munc13-1**の分子数を定量したところ、シナプスあたり平均で**50**個以上の**Munc13-1**分子が神経伝達物質の放出面に存在することが分かりました。また、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サイトの個数と**Munc13-1**の分子数が強く相関する事を見出しました。**STORM**（注3）と呼ばれる超解像顕微鏡を用いてシナプス内の**Munc13-1**の局在をさらに詳細に見たところ、**Munc13-1**分子はナノメートルサイズの複数の集合体を形成していることが分かりました（**Munc13-1**超分子集合体、図2）。**Munc13-1**超分子集合体はそれぞれ**10**個程度の**Munc13-1**分子で形成され、およそ**100**ナノメートルの間隔で秩序を持って配置されていました。さらに、**Munc13-1**超分子集合体はシナプス小胞の開口放出に必須の**syntaxin-1**（注4）というタンパク質を捕捉する機能があることが分かりました。特筆すべきポイントは、シナプス小胞放出サイトの個数と**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す。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操作したところ、**Munc13-1**超分子集合体の個数とシナプス小胞放出サイトの個数は同数だけ減少することが分かり、シナプス小胞放出サイトの個数と**Munc13-1**超分子集合体の個数には因果関係があることが示されました。すなわち、**Munc13-1**超分子集合体がシナプス小胞の放出サイトの物理的実体であり（図3）、シナプス重み付けの分子メカニズムとして極めて重要であることが明らかになりました。

③ 社会的意義・今後の予定 など

本研究で確立されたグルタミン酸イメージングによるシナプスの機能解析法は、従来のシナプス機能計測技術では得ることができなかった単一シナプスレベルの精細な情報を抽出できる非常に独創的な技術として今後のシナプス研究において広く普及していく技術であると考えられます。また、超解像顕微鏡による**Munc13-1**超分子集合体の定量はシナプスの重みを既存の煩雑な機能解析法に抛らず、構造・形態学的に容易に調べられるという点で魅力的です。また、神経回路や脳の機能を形態学的視点から調べる上で**Munc13-1**超分子集合体はシナプスの重みを示す重要なマーカーになると言えます。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プラットフォームは統合失調症やうつ病等の精神疾患、アルツハイマー病等の神経変性疾患の病態解明への貢献が期待されます。

タンパク質の超分子集合現象がシナプスの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ます。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を（細胞運動、神経細胞の可塑的变化、遺伝子情報の保存・読み出し等）、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ています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature neuroscience」（オンライン版：12月11日）

論文タイトル：Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies

著者：Hirokazu Sakamoto, Tetsuroh Ariyoshi, Naoya Kimpara, Kohtaroh Sugao, Isamu Taiko, Kenji Takikawa, Daisuke Asanuma, Shigeyuki Namiki, and Kenzo Hirose*

DOI 番号：10.1038/s41593-017-0041-9

アブストラクト URL：<http://dx.10.1038/s41593-017-0041-9.org/>

6. 問い合わせ先：

<研究内容に関すること>

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生物学分野

教授 廣瀬 謙造（ひろせ けんぞう）

TEL：03-5841-0575

Email：kenzoh@m.u-tokyo.ac.jp

<広報に関すること>

東京大学医学部総務係

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL：03-5841-3303 FAX：03-5841-8585

Email:ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

7. 用語解説：

（注1）開口放出：シナプス小胞などの小胞膜と細胞膜を融合させ、小胞の内容物を細胞内から細胞外に放出する機構。小胞膜に存在する v-SNARE (soluble NSF attachment protein receptor) と細胞膜に存在する t-SNARE が強く結合することによって膜融合を引き起こす。

（注2）Munc13: Munc13-1, -2 及び-3 からなるマルチドメインタンパク質。神経細胞を持つ動物種において進化的に強く保存されている。Munc13-1 は興奮性シナプスにおいて特に重要な働きをしており、ノックアウトモデル動物ではグルタミン酸の放出がほぼなくなることが報告されている。

（注3）STORM: STochastic Optical Reconstruction Microscopy の略語。確率的に発光させた蛍光色素の位置をナノメートル解像度で決定し、決定したすべての分子の位置座標を再構築

することで高解像度イメージを得る手法。一分子計測法の超解像可視化技術への応用例のひとつ。

(注4) **Syntaxin-1**: シナプス小胞の開口放出に関わる **SNARE** タンパク質のひとつ。ボツリヌス毒素によって切断される標的タンパク質であり、**syntaxin-1** が切断されると開口放出が抑制されることが知られている。

8. 添付資料 :

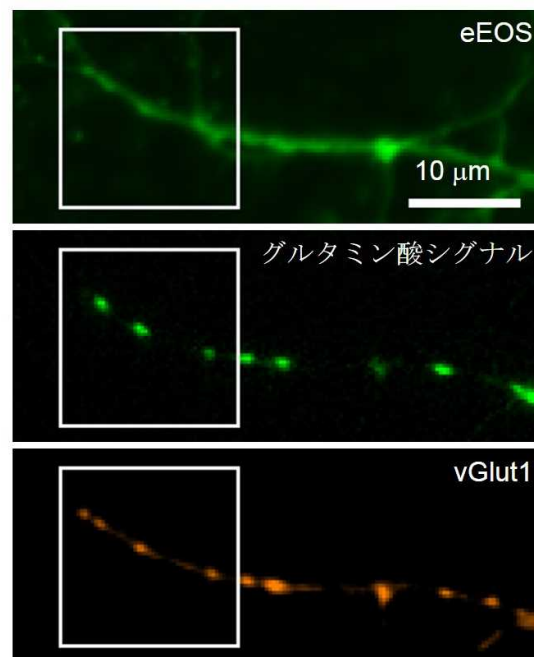


図1 グルタミン酸放出の可視化解析

上段、海馬培養神経細胞に標識したグルタミン酸蛍光センサー (glutamate (E) Optical Sensor: EOS)の蛍光画像。

中段、電気刺激によって誘発されたグルタミン酸シグナル (EOSの蛍光強度変化)の画像。

下段、グルタミン酸作動性シナプスマーカーである vesicular glutamate transporter 1 (vGlut1)の蛍光免疫細胞化学像。vGlut1の染色パターンとグルタミン酸シグナルの空間パターンが良く一致しており、EOSによって単一のシナプスから放出されたグルタミン酸が捉えられた事を示している。

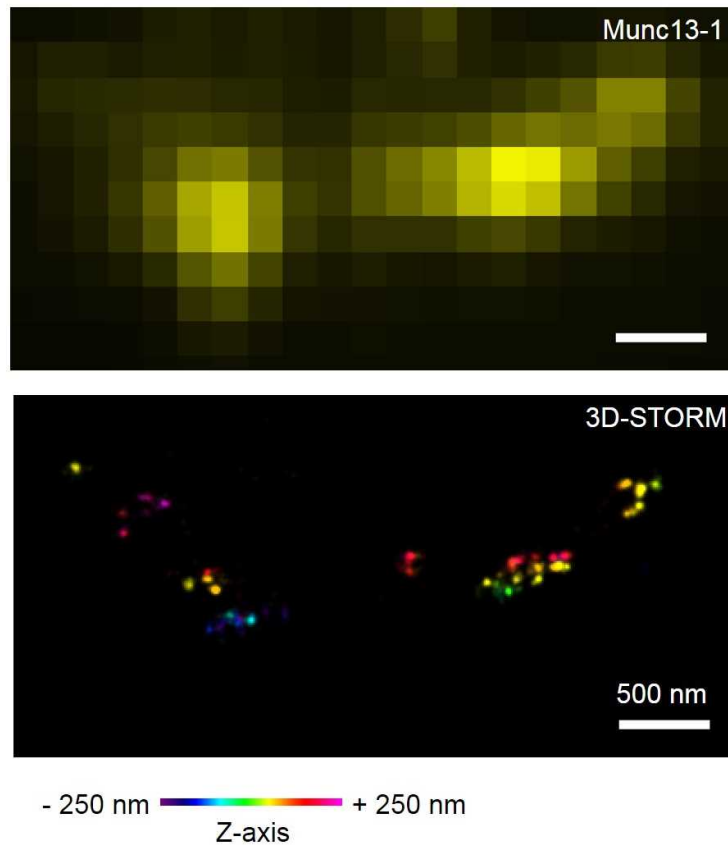


図2 シナプスにおける Munc13-1 分子の超解像可視化解析

上段、落射蛍光顕微鏡で観察した Munc13-1 の蛍光免疫細胞化学像。

下段、STORM 顕微鏡で観察した Munc13-1 の蛍光免疫細胞化学像。上段と同一の視野。

STORM 顕微鏡によって Munc13-1 分子分布がナノメートルスケールで鮮明に観察され、Munc13-1 超分子集合体がシナプス内に複数個存在していることが明らかとなった。カラーコードは z 軸方向の距離を示している。

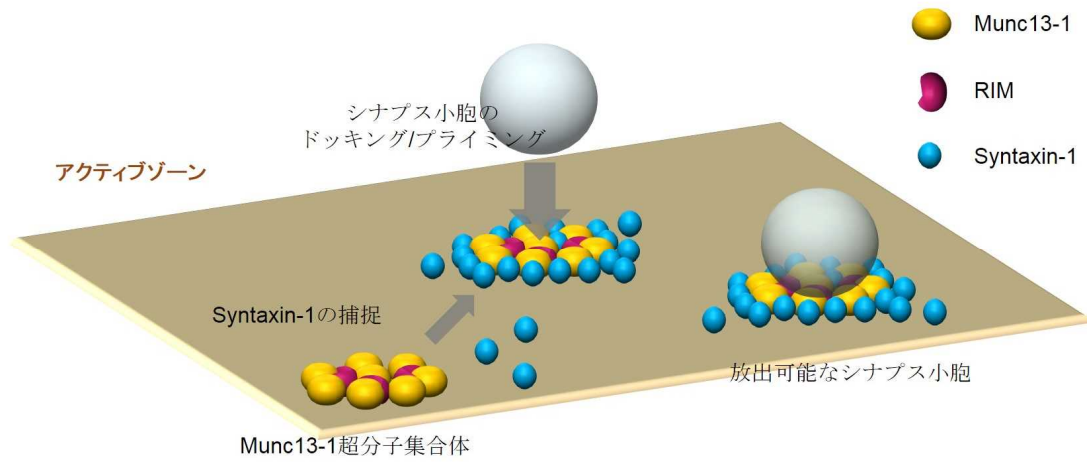


図3 シナプス小胞放出サイトの分子実体：Munc13-1 超分子集合体

シナプス小胞の放出サイトを決める超分子モデル。アクティブゾーンにおいて Munc13-1 分子は自己集合し、複数の syntaxin-1 分子を限定した領域に集め、シナプス小胞のドッキング・プライミング部位を決定する。各ステップが超分子的に制御されることによって安定したシナプス機能・神経回路を実現している。