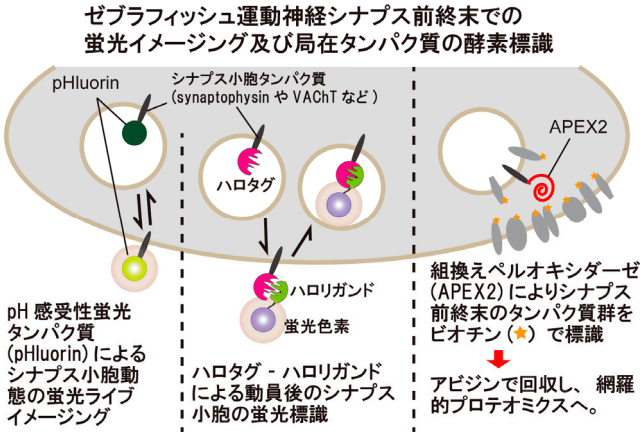
133　小型魚類を用いた自発性シナプス伝達制御機構の解析	江頭　良明

【目的】シナプス伝達には、通常の活動電位依存的な誘発性伝達とは別に、自発性伝達と呼ばれ、神経細胞の発火とは無関係に生じる応答も存在する。近年、自発性伝達が神経回路の形成や維持に重要な役割を果たしていることが分かってきているが、その独自の分子機構にはいまだ不明な点が多い。本研究では、神経筋接合部において自発性伝達を選択的に欠損する完全麻痺ゼブラフィッシュをモデルとして、自発性伝達を特異的に制御する分子実体を同定することを目指す。そのために、ゼブラフィッシュの運動神経終末からの伝達物質放出を直接かつ簡便に計測する手法を確立することを第一に行う。さらに、完全麻痺を示す変異体ゼブラフィッシュを解析対象として、自発性シナプス伝達の欠損に関わる分子群の同定を目指す。そのために本研究課題では、酵素反応によるタンパク質標識技術を利用して、プレシナプスに限局した網羅的プロテオーム解析を目指し、必要となるトランスジェニック（Tg）ゼブラフィッシュを作製する。

【方法】1. 蛍光イメージングによるシナプス伝達の評価系の確立：神経筋接合部の小胞動態を解析する実験系として、蛍光イメージングによって直接的にシナプス小胞の開口放出を可視化する系を確立する。そのために pH に感受性をもつ蛍光タンパク質（pHluorin）とハロタグと呼ばれるタンパク質をシナプス小胞分子に融合することで、それぞれシナプス小胞内部に局在化するようにした Tg 動物を作製する。pHluorin は小胞動態のライブ観察を可能にし、ハロタグはスナップショットながら高感度の観察を可能にする（下図）。2. 神経筋接合部でプロテオミクスを行うための Tg フィッシュの作製：最近、特定のタンパク質に組換えペルオキシダーゼ（APEX2 など）を融合して発現させ、酵素と基質の反応を利用して、そのタンパク質のごく近傍にある他のタンパク質を選択的に標識する技術が細胞内で実用化された。これにより、あるタンパク質と相互作用するタンパク質群や、特定のオルガネラに存在するタンパク質群に的を絞ってプロテオミクスが可能となっている。本研究では運動ニューロンのシナプス終末に局在する小胞型アセチルコリン輸送体（VAChT）などを標的に APEX2 との融合タンパク質を発現するような Tg フィッシュを作製する（下図）。

【結果】シナプス小胞の動態をイメージングする分子プローブとして、小胞型 GABA 輸送体（VGAT）の C 末端に pHluorin とハロタグをタンデムに融合したタンパク質が有用であることを確認し、このタンパク質とレポーター蛍光タンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製に成功した。この Tg フィッシュの pHluorin の蛍光ライブイメージングを行うことで、ゼブラフィッシュ神経筋接合部でのエンドサイトーシスのキネティクスを初めて解析することに成功した。またハロリガンド化した蛍光色素によるシナプス小胞のラベリング実験を行うことで、自発的放出に動員されるシナプス小胞は脱分極刺激によって放出される全シナプス小胞の 10〜15%に限られていることが明らかになった。

また、APEX2 を VAChT の C 末端に融合したタンパク質を運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュの作製にも成功した。この Tg フィッシュにおいて、APEX2 の酵素活性を利用して近傍タンパク質のビオチン化を行い、蛍光標識したストレプトアビジンによって検出したところ、神経筋接合部が特異的にラベルされることが確認できた。



133. 小型魚類を用いた自発性シナプス伝達制御機構の解析

江頭　良明

大阪医科大学 医学部 生命科学講座 生理学教室

Key words：シナプス小胞，神経筋接合部，自発的シナプス伝達，ゼブラフィッシュ

緒　言

神経筋接合部はこれまでシナプス機能の解析モデルとして重要な役割を果たしてきた。シナプス伝達の量子的性質や、線虫やショウジョウバエの変異体解析によるシナプス伝達関連分子群の同定など、歴史的研究の多くが神経筋接合部の研究によっている。本研究で用いるゼブラフィッシュは、脊椎動物モデルとして唯一、大規模な変異体探索が行われており、神経筋接合部の異常による運動障害を示す変異体が複数解析されてきている。そのため、ゼブラフィッシュの神経筋接合部は、シナプス機能の解析系として大きな注目を集めている［1］。

なかでも、大阪医科大学の小野富三人教授により解析されてきた sofa potato（sop）という変異体は特に興味深い表現型を示す。sop はニコチン型アセチルコリン受容体のサブユニットの 1 つに変異をもっているために、筋肉の完全麻痺を示す［2］。この表現型は筋肉側の異常に由来するが、その時の運動神経終末の機能を解析すると、活動電位依存的な誘発性シナプス伝達は生じている一方で、活動電位に依存しない自発性シナプス伝達が選択的に欠損していることが示唆された［3］。この結果はシナプス前部の機能に逆行性に影響する何らかのシグナルが存在することを示す点でも大変興味深いが、その結果二次的に生じた自発性シナプス伝達の選択的欠損という表現型が極めて注目に値する。

これまでシナプス伝達の分子機構の研究は、シナプスに局在する各分子のノックアウト動物の解析に依存してきたが、自発性伝達のみが消失する表現型を示すものは、どの動物種においても報告例がない。シナプス小胞の膜融合に関わる SNARE タンパク質やカルシウムセンサータンパク質の中には自発性伝達への特異性を示すものが報告されているが［4，5］、それらを欠損させても sop のように自発性応答が消失することはない。したがって、sop の神経筋接合部は自発性シナプス伝達に特異的でかつ必要不可欠な分子実体を同定するための唯一のモデル系となると期待される。本研究では、sop のように電気生理学的に運動神経終末でのシナプス伝達を記録できない標本においても、効率的にシナプス機能を解析できる系として、蛍光イメージングを利用した実験系の構築を第一に行った。さらに、タンパク質レベルでの変動をプロテオミクスによって網羅的に解析するための実験系の構築にも取り組んだ。

方法および結果

1.　蛍光イメージングによるシナプス伝達の評価系の確立

まずハロタグや pHluorin をシナプス小胞内に局在化させるための融合タンパク質として、ゼブラフィッシュのシナプス小胞膜タンパク質であるシナプトファイジン b、シナプトブレビン及び小胞型 GABA 輸送体（zfVGAT）をクローン化し、それぞれの融合タンパク質の神経系での発現を確認した。予備実験より、小胞型 GABA 輸送体（zfVGAT）でシナプスへの局在性と発現効率ともに良好な結果が得られたため、その C 末端側にハロタグと pHluorin を連続して融合させた遺伝子（zfVGATHalopH）をレポーター遺伝子となる赤色蛍光タンパク質（TagRFP）とともに運動ニューロン特異的に発現する Tg フィッシュを作製した（図 1）。魚が生きた状態では、シナプス小胞内は液胞型プロトン ATP アーゼの活性により約 pH 5.8 と酸性環境にあるため、pH 感受性をもつ pHluorin の蛍光は確認できない。

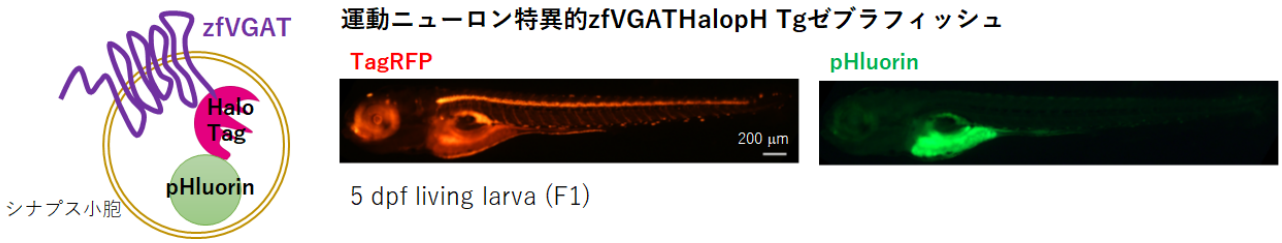


図 1. zfVGATHalopH のシナプス小胞上でのトポロジーを示した模式図（左）と運動ニューロン特異的に zfVGATHalopH を発現するように遺伝子組換えを行ったゼブラフィッシュの蛍光写真（右）
レポーター遺伝子である TagRFP の発現が脊髄の運動ニューロンに強く見られる。一方、pHluorin の蛍光は生きた状態では確認することができない。

そこで、蛍光標識したヘビ毒素（α-Btx CF633）によりポストシナプスのニコチン性アセチルコリン受容体を標識した後で、パラホルムアルデヒド固定を行いシナプス小胞内外の pH 勾配を消失させたうえで pHluorin の蛍光を観察した。図 2 に示すように、pHluorin の蛍光は組織中に点状にまばらに存在し、それらはα-Btx CF633 と共局在していたため、zfVGATHalopH は神経筋接合部へと正しく局在していることが確認できた（図 2）。

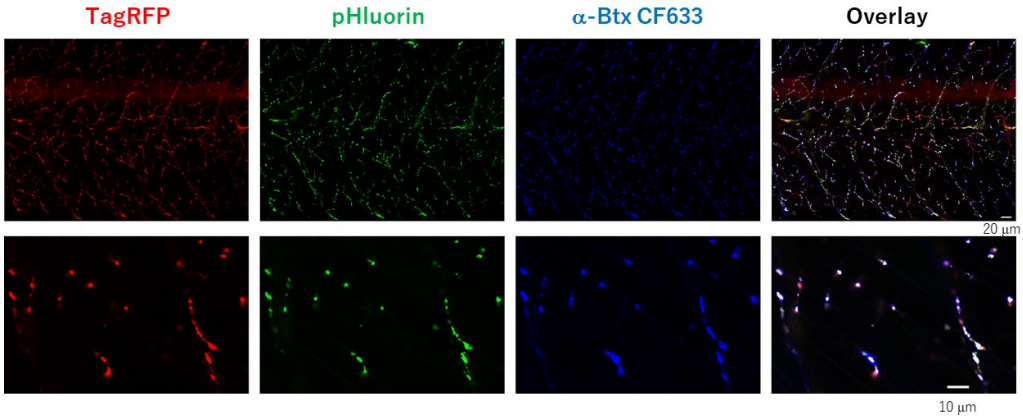


図 2. 骨格筋上のニコチン性アセチルコリン受容体を可視化した zfVGATHalopH Tg フィッシュの共焦点レーザー顕微鏡画像
運動ニューロンの軸索が TagRFP の蛍光（赤）により示されている。pHluorin の蛍光は緑で、またアセチルコリン受容体の分布は青で示されている。pHluorin はプレシナプスに特徴的な形態である bouton 様の構造に集積しており、それらはすべてアセチルコリン受容体と共局在しているため、神経筋接合部に正しく局在していることが分かる。

続いて、zfVGAThalopH を発現していると考えられるシナプス小胞が、神経活動によって正常にリサイクリングされているかどうかを調べるために、電気刺激により運動ニューロンを活性化させたときの pHluorin の蛍光強度変化を共焦点レーザー顕微鏡によりライブイメージングした（図 3）。コリン作動性ニューロンである運動ニューロンは当然ながら本来 zfVGAT は発現していないため、zfVGAT を過剰発現させた場合、シナプス小胞が正常にリサイクリングしない可能性も考えられる。しかし、ライブイメージングの結果、刺激中にはシナプス小胞のエキソサイトーシスによる蛍光の増大が、また刺激完了後からはエンドサイトーシスに伴う蛍光の減衰が見られた。刺激中の蛍光増大は、シナプス小胞内の酸性環境下にあった pHluorin 分子が、活動電位の到達に伴うエキソサイトーシスにより細胞表面へと露出し、中性 pH に近い細胞外液にさらされた結果である。一方その後の消光は、エンドサイトーシスとその後に続くシナプス小胞の再酸性化によるものである。この現象は、培養神経細胞等で行われている同様のライブイメージングと様相がよく一致している［6］。したがって、活動電位に伴うシナプス伝達は、zfVGATHalopH Tg フィッシュの神経筋接合部で問題なく生起していると考えられる。事実、野生型のゼブラフィッシュと比較して、遊泳パターンに違いがあるということはない。

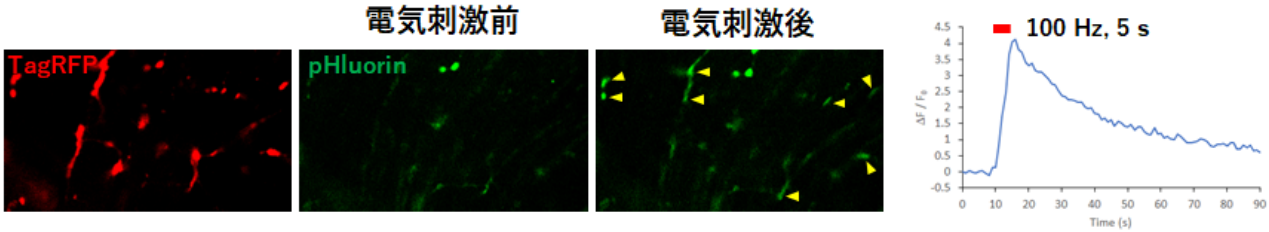


図 3. zfVGATHalopH Tg フィッシュの神経筋接合部における pHluorin のライブイメージング

代表写真（左）と標準化した平均蛍光強度のトレース（右）。TagRFP（赤）の蛍光をもとに刺激電極の位置（細胞体近傍）と観察視野を決定し、pHluorin の蛍光（緑）を 1 秒に 1 フレームでタイムラプスイメージングした。写真は 100 Hz、5 秒の電気刺激の前と後の蛍光を示す。この 2 枚の写真の差分を求めることで、特に蛍光強度が変化したシナプスを容易に同定できる。8 つの黄色の矢頭はそれらを示している。これらのシナプスでの蛍光強度を定量し、背景の蛍光強度を差し引いて、平均の蛍光強度変化を求めた。さらに、蛍光強度の変化率をわかりやすくするために、ベースラインの蛍光強度を F0 とし、そこからの変化分 ΔF を F0 で標準化した ΔF／F0 を表示してある。

上記のライブイメージングでは、100 Hz という高頻度刺激に伴ったシナプス活動を評価しているが、本研究課題では、自発的なシナプス伝達もあわせて解析することに研究の主眼がある。そのため、zfVGATHalopH Tg フィッシュの自発的シナプス伝達についても、プローブタンパク質の過剰発現が悪影響を及ぼしていないか確認する必要がある。そこで、骨格筋にパッチクランプを行い、電気生理学的に微小終板電流（mEPC）を測定し、野生型のそれと比較した。結果は、mEPC の発生頻度、振幅ともに優位な差は見られなかった（図 4）。したがって、zfVGATHalopH Tg フィッシュは、自発的シナプス伝達をイメージングするツールとしても不備はないといえる。

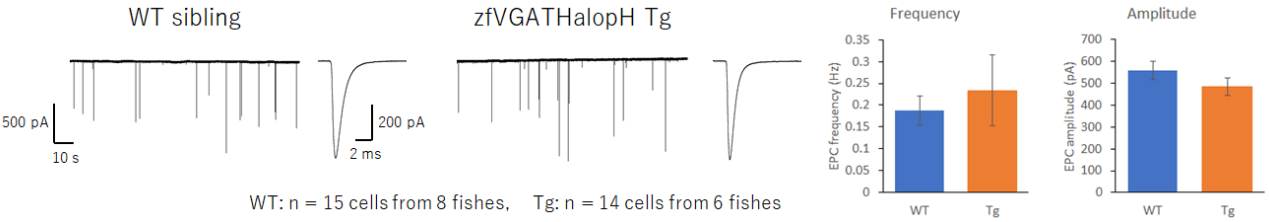


図 4. zfVGATHalopH Tg フィッシュと野生型ゼブラフィッシュの骨格筋より測定した mEPC

1μM のテトロドトキシン存在下で測定したトレースには複数の mEPC イベントが見られる。ソフトウェアを使ってすべてのイベントを検出し、平均化したトレースをその右側に示す。mEPC の発生頻度（frequency）、振幅（amplitude）のいずれのパラメーターでも野生型と Tg フィッシュの間に優位な差は見られなかった。

次に、zfVGATHalopH のハロタグ分子を用いて、リサイクリングしたシナプス小胞を標識する実験を行った。まずは、活動依存的なシナプス小胞のリサイクリングを観察するために、30 mM の KCl を含む High K^+溶液での刺激を与え、その時にハロタグ分子の標識を行った。標識物質として、近赤外蛍光色素 Cy5 を結合したハロリガンドを用いた。この物質は、九州大学薬学部の王子田彰夫教授との共同研究として合成した。対照実験として、0mM Ca^{2+}溶液中でハロリガンド Cy5 標識を行った。それに対し、実験群としては、High K^+溶液刺激 2 分と 4 分を試した。図 5a に示すように、0 mM Ca^{2+}溶液中ではほとんどハロタグのラベリングは見られないのに対して、High K^+溶液刺激を行うと Cy5 の強いシグナルが現れていることがわかる。

標識されたシナプス小胞プールのサイズを定量するために、Cy5 の蛍光強度（F_{Cy5}）と pHluorin の蛍光強度（F_{pH}）を複数のシナプスについて計測し、その比（F_{Cy5}／F_{pH}）の平均値を求めた（図 5b）。グラフに示されるように、脱分極刺激が長くなるほど、標識されるシナプス小胞が多くなっていることがわかる。

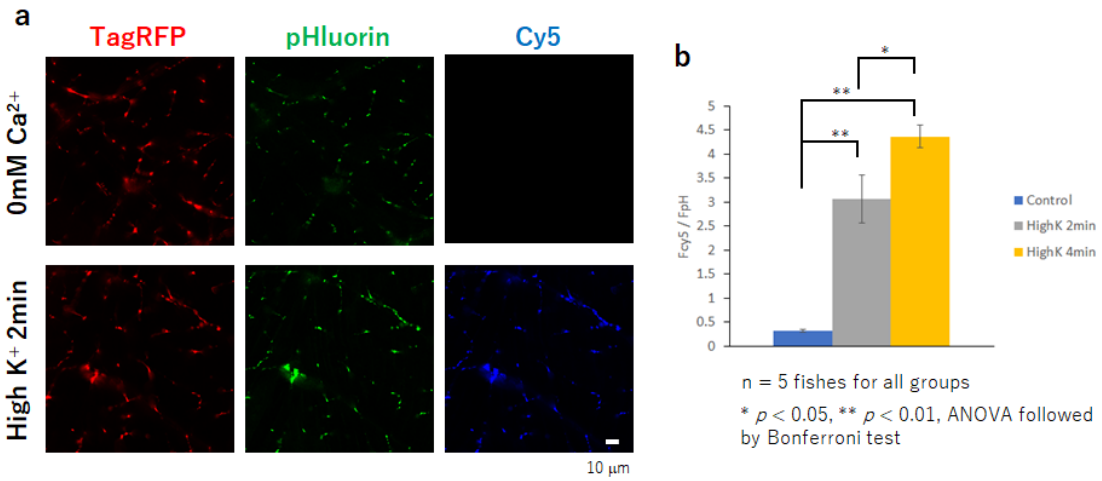


図 5. zfVGATHalopH Tg フィッシュを用いたハロリガンド Cy5 による活動依存的なシナプス小胞のラベリング

a）代表的写真

b）定量化された活動依存的に使用されるシナプス小胞プールの大きさ。Cy5 の蛍光強度（F_{Cy5}）を小胞プールの総量を反映する pHluorin の蛍光強度（F_{pH}）で標準化することで、シナプスごとの総シナプス小胞数のばらつきを相殺することができる。

最後に、zfVGATHalopH Tg フィッシュに対するハロリガンド標識を TTX 存在下で行うことで、自発的にリサイクリングされるシナプス小胞のみを標識する実験を行った。1 μM の TTX とハロリガンド Cy5 を含む溶液中で最長 180 分の標識を行い、図 5 と同様の画像解析及び定量化を行った（図 6）。120 分にかけて自発的放出によってラベルされるシナプス小胞が増えているのがわかる。また 120 分以降の増大がないため、120 分までの間に標識が完了していることも判明した。つまり、自発的放出に関わるシナプス小胞は 120 分以内にリサイクリングの過程を一巡することを示している。また、定量した数値を図 5 に示す活動依存的に使われるシナプス小胞プールサイズと比較することで、自発的放出に使われる小胞は最大でもその 5 分の 1 以下と、かなり限られていることがわかる。この結果は、自発的放出と活動依存的放出のそれぞれに使われるシナプス小胞が異なるプールに属している可能性を強く示唆している。

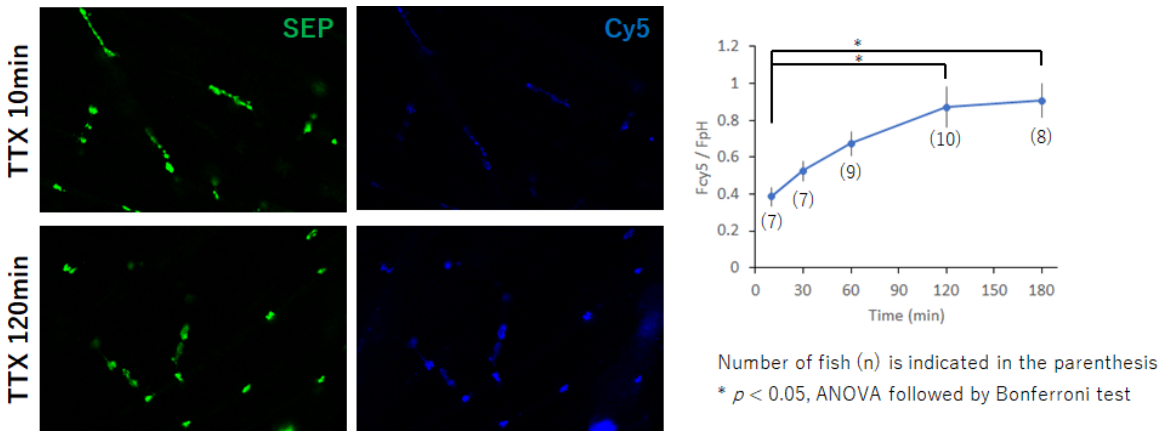


図 6. zfVGATHalopH Tg フィッシュを用いたハロリガンド Cy5 による自発的シナプス伝達の標識

標識時間 10 分と 120 分の代表写真（左）。ハロリガンド標識によって定量化した自発的放出に使用されたシナプス小胞プールの時間による推移（右）。

2. 神経筋接合部でプロテオミクスを行うための Tg フィッシュの作製

運動ニューロン終末において、APEX2 による酵素反応を利用したシナプス局在タンパク質の標識を可能にするために、VAChTa 及びシナプトファイジン b の C 末端に APEX2 を融合させた遺伝子（VAChTa-APEX2 及び Sypb-APEX2）の構築を行い、運動ニューロン特異的に発現させた Tg フィッシュを作製した。いずれの Tg フィッシュも上述の zfVGATHalopH と同様に、TagRFP をレポーターとして発現している。VAChTa-APEX2 Tg フィッシュについては、APEX2 近傍のタンパク質のビオチン化標識を行い、それらを蛍光標識ストレプトアビジンにより検出することで、組織表面に限られてはいるが神経筋接合部特異的なタンパク質標識ができていることが確認できている。今後、ビオチン化基質の濃度や浸透時間等の条件検討を行い、組織深部の神経筋接合部まで標識できるようにしたい。

考　察

本研究で当初計画していた 2 つの課題のうち、「蛍光イメージングによるシナプス伝達の評価系の確立」については、十分に目的を達成できたと言える。pHluorin を用いたシナプス伝達の可視化については、過去にシナプトブレビンとの融合タンパク質をプローブとして発現するトランスジェニックフィッシュを用いて神経筋接合部の機能解析がなされているが［7］、これと比較して今回作製した zfVGATHalopH Tg フィッシュは 15 倍程度感度が良くなっていた。したがって、これまで検出できなかった弱い刺激のもとでのシナプス伝達を可視化できるようになっている。一方、ハロタグを利用したシナプス小胞標識技術の確立は、ゼブラフィッシュ神経筋接合部では世界的にも本研究が初めてである。事実、自発性シナプス伝達をハロリガンドにより可視化することによって、一部のシナプスに限って自発性伝達が活発に見られることが今回初めて明るみになった。これは複数のシナプスからの応答の総和を検出する電気生理学的実験からは分からない事実である。今後はまず、pHluorin とハロタグのそれぞれの利点を生かして、活動電位依存的伝達と自発的伝達に関わるシナプス小胞プールの割合など、従来の研究手法ではアプローチが難しかったパラメーターをしっかりと記述する必要がある。その次に、本研究課題立案のきっかけともなった、自発性シナプス伝達を欠損すると報告されている sop フィッシュの神経筋接合部について、zfVGATHalopH を利用してシナプス機能を解析したい。sop は筋肉上のアセチルコリン受容体を完全に欠損しているので、zfVGATHalopH によるイメージング解析が極めて有用であり、新たに明らかになる性質が多数あると期待される。

2 つ目の課題である「神経筋接合部でプロテオミクスを行うための Tg フィッシュの作製」については、ビオチン化標識の条件検討をさらに行う必要がある。また、作製した Tg フィッシュの神経筋接合部の形態及び機能が、野生型と比較して異常がないことを確認しなくてはならない。その上で、APEX2 を利用したシナプス近傍タンパク質の酵素標識とプロテオーム解析に進みたい。最終的には、sop の神経筋接合部でも同様のプロテオーム解析を行い、zfVGATHalopH を使ったイメージングによって明らかとなる機能異常と分子変動とを対応づけて理解する研究に発展させたいと考える。

共同研究者・謝辞

本研究は、九州大学大学院薬学研究科の王子田彰夫教授との共同研究として行った。

文　献

1) Egashira Y, Zempo B, Sakata S, Ono F. Recent advances in neuromuscular junction research prompted by the zebrafish model. Current Opinion in Physiology.　2018;4:70-5. DOI: 10.1016/j.cophys.2018.06.005
2) Ono F, Mandel G, Brehm P. Acetylcholine receptors direct rapsyn clusters to the neuromuscular synapse in zebrafish. J Neurosci. 2004 Jun 16;24(24):5475-81. PMID: 15201319 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0851-04.2004
3) Mott M, Luna VM, Park JY, Downes GB, Epley K, Ono F. Expressing acetylcholine receptors after innervation suppresses spontaneous vesicle release and causes muscle fatigue. Sci Rep. 2017 May 10;7(1):1674. PMID: 28490756 DOI: 10.1038/s41598-017-01900-3
4) Ramirez DM, Khvotchev M, Trauterman B, Kavalali ET. Vti1a identifies a vesicle pool that preferentially recycles at rest and maintains spontaneous neurotransmission. Neuron. 2012 Jan 12;73(1):121-34. PMID: 22243751 DOI: 10.1016/j.neuron.2011.10.034
5) Yao J, Gaffaney JD, Kwon SE, Chapman ER. Doc2 is a Ca^{2+} sensor required for asynchronous neurotransmitter release. Cell. 2011 Oct 28;147(3):666-77. PMID: 22036572 DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.046
6) Egashira Y, Takase M, Takamori S. Monitoring of Vacuolar-Type H^+ ATPase-Mediated Proton Influx into Synaptic Vesicles. J Neurosci. 2015 Feb 25;35(8):3701-10. PMID: 25716867 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4160-14.2015
7) Wen H, Hubbard JM, Rakela B, Linhoff MW, Mandel G, Brehm P. Synchronous and asynchronous modes of synaptic transmission utilize different calcium sources. Elife. 2013 Dec 24;2:e01206. PMID: 24368731 DOI: 10.7554/eLife.01206