

2018年7月

博士論文

単一シナプス小胞の開口放出と シナプス小胞膜タンパク質動態の解析

京都大学大学院理学研究科
生物科学専攻生物物理学系
機能統合学講座機能構造認識分野

船橋 潤一郎

要旨

シナプス伝達は、活動電位の発火により迅速に行われ、高頻度の活動電位にも対応する。そのために、タンパク質が密に集積したシナプス前部の細胞膜近傍領域であるアクティブゾーンには、シナプス小胞を効率的に開口放出して再構築する仕組みがあると考えられている。しかし、アクティブゾーンのどのような分子構築により迅速な開口放出が実現されているのか、また開口放出・小胞取り込み・機能的なシナプス小胞の再構築を制御する仕組みについては不明な点が多い。そこで私は、1つのシナプス小胞の開口放出を観察できる新しい実験手法を開発し、アクティブゾーン内部での開口放出の発生位置とシナプス小胞膜タンパク質である synaptophysin (Syp) の開口放出後の動態について調べ、上記の問題の解決に寄与することを目指した。

アクティブゾーンでの膜タンパク質の動態を詳しく観察するために、まず、細胞間接着分子の1つであり、シナプス前部の形成を誘導することが知られている neurologin でカバーガラスをコートした。そして、その上に海馬神経細胞を分散培養し、アクティブゾーン様構造 (active-zone-like membrane; AZLM) をガラス面の直上に、ガラス面と平行に形成させた。この AZLM を、ガラス面直上の蛍光分子を高いシグナルノイズ比で観察できる全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。そうしたところ、AZLM には bassoon、piccolo、Munc13、RIM といった主要なアクティブゾーンタンパク質が集積しており、電場刺激によって AZLM 内で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、AZLM がアクティブゾーンの主要な特性を有することを確認できた。次に、Syp と GFP 改変型 pH 感受性緑色蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEP) を融合させた Syp-SEP を神経細胞に発現させた。この Syp-SEP は、開口放出によって小胞膜から細胞膜に移動する際に蛍光を発することから、開口放出のマーカーとして用いられてきた分子である。一回の電場刺激と同期してアクティブゾーン内で Syp-SEP の輝度が上昇したこと等から、1個のシナプス小胞の開口放出を記録できたと判断した。そして、この輝度上昇後、Syp-SEP は細胞膜上を拡散した。拡散係数は $0.17 - 0.19 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と推測され、synaptophysin は開口放出後にほぼ自由拡散すると考えられた。さらに、電場刺激の直後に起こる同期放出は、AZLM 内の複数の特定領域で起った。一方で、刺激から遅れて起きる非同期放出はより分散した部位で起きた。これらの結果は、同期放出に適した部位は Ca^{2+} チャネルに近く、非同期放出はそうした部位から離れた場所で起こったと考えることで説明できる。

本研究では、ガラス面直上に作られた AZLM での分子動態を、高いシグナルノイズ比で観察する新しい手法を開発した。そして、開口放出後にシナプス小胞膜タンパク質が細胞膜上を拡散することと、同期放出と非同期放出の発生位置が異なることを明らかにした。

目次

| | |
|---------------------------------|----|
| 要旨 | I |
| 目次 | II |
| 1. 序論 | |
| 1.1. 研究の背景 | |
| 1.1.1. シナプス伝達と開口放出 | 1 |
| 1.1.2. Release site とその数について | 3 |
| 1.1.3. 同期放出と非同期放出の分子機構 | 5 |
| 1.1.4. シナプス小胞の取り込み | 6 |
| 1.1.5. 小胞膜タンパク質の細胞膜上での動態 | 8 |
| 1.1.6. シナプス小胞へのグルタミン酸の取り込み | 9 |
| 1.1.7. アクティブゾーンを支える足場タンパク質 | 10 |
| 1.1.8. シナプス形成に関わる細胞間接着分子 | 13 |
| 1.2. 研究の目的 | 15 |
| 2. 方法と材料 | 18 |
| 3. 結果 | |
| 3.1. アクティブゾーン様構造 (AZLM) の形成 | 23 |
| 3.2. 1回の開口放出の検出 | 25 |
| 3.3. 同期放出後の synaptophysin の側方拡散 | 27 |
| 3.4. 同期放出と非同期放出の発生位置とその分布 | 28 |
| 4. 考察 | |
| 4.1. 全反射蛍光顕微鏡の観察領域内での AZLM の形成 | 31 |
| 4.2. シナプス小胞膜タンパク質の開口放出後の動態 | 32 |
| 4.3. 開口放出の発生位置と非同期放出を引き起こす分子機構 | 32 |
| 4.4. まとめ | 33 |
| 5. 謝辞 | 35 |
| 6. 参考文献 | 36 |

1. 序論

1.1. 研究の背景

シナプス前部でのシナプス小胞の開口放出は、活動電位の発火後ただちに行われ、高頻度の活動電位にも対応する。そのため、シナプス前部には効率的にシナプス小胞を開口放出して再構築する仕組みがあると考えられている。しかしながら、開口放出が特定の場所で起こるのか、開口放出によって細胞膜に移動した小胞膜タンパク質がどのように振舞うのか等は不明である。ここでは、開口放出・小胞取り込み・機能的なシナプス小胞の再構築の過程、および開口放出の制御に関わるタンパク質とシナプス形成に関わる細胞間接着分子等、本研究の背景を説明する。

1.1.1. シナプス伝達と開口放出

神経細胞間の情報伝達はシナプスと呼ばれる微細な構造を介して行われる (図 1)。シナプスでは情報を送るシナプス前部である軸索膨大部と、情報を受け取るシナプス後部の樹状突起がシナプス間隙を挟んで向かい合う。活動電位がシナプス前部に到達すると、タンパク質が密に集積したシナプス前部の細胞膜近傍領域であるアクティブゾーンにおいて、シナプス小胞内の神経伝達物質が開口放出される。そして、伝達物質がシナプス後部に局在する受容体に結合することにより情報が伝えられる。

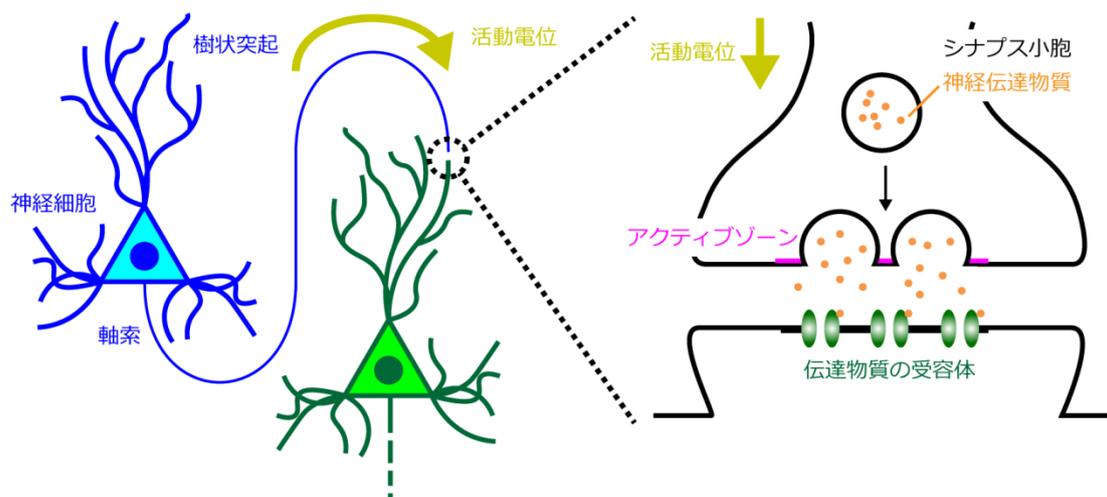


図 1. シナプス伝達の模式図。シナプス前部のアクティブゾーンでは、活動電位に応じてシナプス小胞から神経伝達物質が放出され、この伝達物質がシナプス後部に局在する受容体に結合することにより情報が伝えられる。

シナプス小胞の開口放出は Ca^{2+} に依存する分子機構によって引き起こされる (図 2)。伝達物質を取り込んで放出可能な状態になったシナプス小胞は、小胞膜上の膜タンパク質である synaptobrevin、細胞膜上の syntaxin、そして細胞膜に係留された SNAP25 (synaptosomal-associated protein 25) の 3 種の SNARE タンパク質 (soluble NSF attachment protein receptor protein) の結合によって、細胞膜と docking して放出の準備状態に入る。SNARE タンパク質の結合には SM タンパク質 (Sec1/Munc18-like protein) の 1 つである Munc18 も関与する (Südhof, 2012)。Syntaxin は通常、他の SNARE タンパク質と結合できない閉状態の構造を取り、Munc18 はこの閉状態の syntaxin に結合する。膜融合に備えて syntaxin が開状態を取ると、Munc18 は syntaxin と他の SNARE タンパク質の結合を促す。そうして SNARE/Munc18 複合体の形成が促進され、シナプス小胞の docking が進むと考えられている (Geber et al., 2008; Richmond et al, 2001; Imig et al, 2014)。シナプス前部に活動電位が到達すると、シナプス前部の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルから Ca^{2+} が細胞内に流入する。シナプス前部には N、P/Q、R 型の電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが分布しており、開口放出には N、P/Q 型のチャンネルが働くと考えられている (Catterall, 2011)。細胞内に流入した Ca^{2+} は、docking したシナプス小胞膜上の synaptotagmin と結合して SNARE/Munc18 複合体の構造変化を引き起こし、開口放出を誘導すると考えられている (Südhof, 2013)。

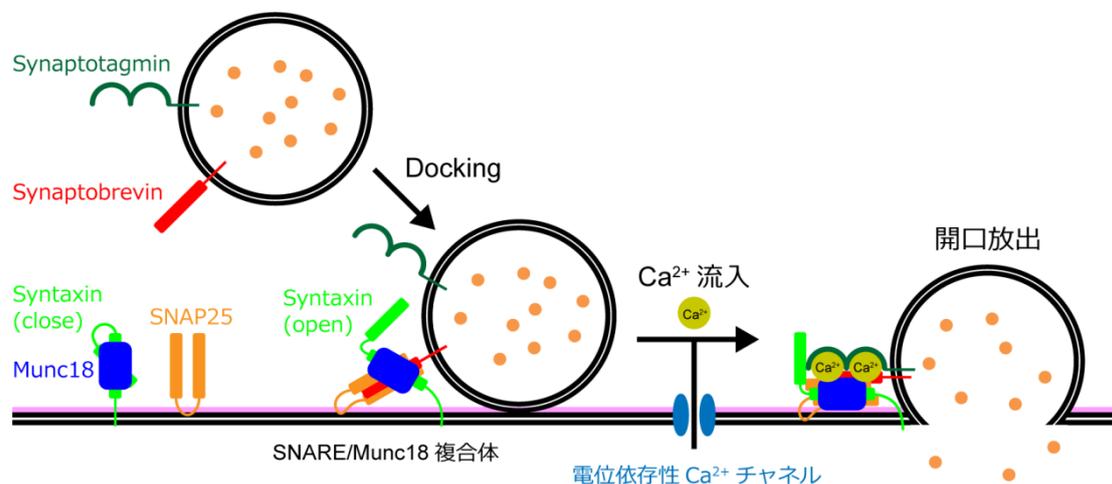
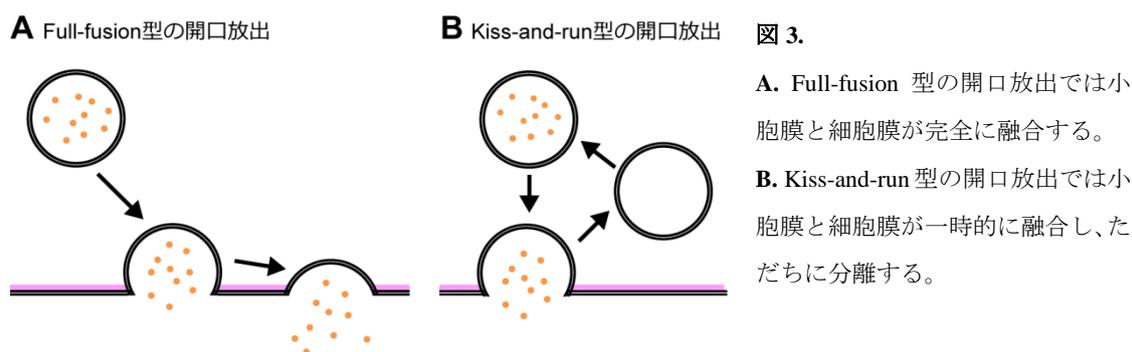


図 2. アクティブゾーンにおける開口放出の模式図。3 種の SNARE タンパク質 (synaptobrevin、syntaxin、SNAP25) と SM タンパク質の 1 つである Munc18 が SNARE/Munc18 複合体を作ることによってシナプス小胞が細胞膜上に docking される。活動電位によって電位依存性 Ca^{2+} チャンネルから Ca^{2+} が流入して小胞膜上の synaptotagmin と結合すると、SNARE/Munc18 複合体の構造が変化して開口放出が起こる。

開口放出については、2通りのパターンがあるとされている (Kononenko and Haucke, 2015)。1つは、シナプス小胞膜と細胞膜が完全に融合する full-fusion である (図 3A)。もう1つは、小胞膜と細胞膜の一時的な融合による kiss-and-run である (図 3B)。Kiss-and-run は pH 感受性蛍光ビーズを用いた生細胞観察や膜容量測定をもとに提唱されたが (He et al., 2006; Zhang et al., 2009)、kiss-and-run はほとんど起こらないと主張する報告もある (Lagnado et al., 2006)。



1.1.2. Release site とその数について

シナプス伝達は 1 つのシナプス小胞を最小単位とする量子的な性質を持つ。この知見は Katz ら (1969) によって量子仮説として提唱され、電子顕微鏡観察によってシナプス小胞が発見されると、シナプス小胞が量子に対応すると考えられるようになった。この量子仮説では、開口放出を起こすための特別な領域である release site がアクティブゾーンに存在するとされ、1つのシナプス前部あたりの release site 数について様々な研究が行われた (Pulido and Marty, 2017)。そして中枢神経系の神経細胞がつくるシナプス前部では、1つの小胞の開口放出が起こると他の開口放出が抑制されるために、1つのシナプス前部では同時に1つのシナプス小胞しか開口放出できないとする one-site one-vesicle 説が唱えられた (Stevens, 2003; 図 4A)。しかし、パッチクランプ法の発展によりシナプス応答を正確に記録できるようになると、1つのシナプス前部から複数のシナプス小胞が放出されうるという multi-vesicular release 説が唱えられ、議論になった (図 4B)。One-site one-vesicle 説に対する反論として、あるシナプス前部から2回の開口放出が同時に起きても、1回目の開口放出によって伝達物質の受容体が飽和してしまうために、2回目の放出が検出できなくなっている、という議論があった。Tong ら (1994) はこの点について考察し、興奮性神経細胞が作る1つのシナプス前部において複数回の開口放出が起きているのならば、シナプス間隙のグルタミン酸濃度が非常に高くなり、グルタミン酸と競合する阻害薬が効きにくくなると考

えた。そして、開口放出の起こりやすい高濃度の Ca^{2+} を含む細胞外液下では、低 Ca^{2+} 外液条件と比較して、グルタミン酸受容体の競合阻害薬である L-AP5 の阻害効果が小さくなることを見出し、1つのシナプス前部で複数個のシナプス小胞の開口放出が起こることを示した。さらに Auger ら (1998) は、1つのシナプス結合を作る2つの抑制性神経細胞からシナプス応答を記録し、1回目の開口放出によるシナプス応答からわずかに遅れて2回目の放出が起きる現象を記録できたと報告した (図 4B)。

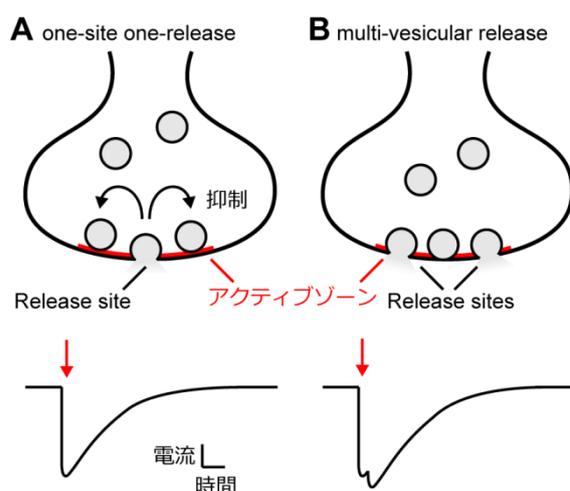


図 4. Release site に関する仮説の模式図。

A. One-site one-vesicle 説では、1つのシナプス前部において、1度に1回の開口放出しか起こらず、単峰性のシナプス後電流が記録される。そのために、ある小胞が放出される際には他の小胞の放出を抑制する仕組みがあると推定された。

B. Multi-vesicular release 説では、1つのシナプス前部から、1度に複数回の開口放出が起こる。1つのシナプスの間で、多峰性のシナプス後電流が記録されたという報告は、この説を支持する。

近年、顕微鏡観察によって multi-vesicular release 説を支持する報告がなされている。Miki ら (2017) は電子顕微鏡観察によって、小脳の平行線維が抑制性介在神経上に作るシナプス前部では、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが複数のクラスターに局在し、このクラスターの数で電気生理学的なデータに基づき推測した release sites の数と一致したと報告した。また Maschi ら (2017) は、開口放出のマーカースとして使われる GFP の変異体である pH 感受性緑色蛍光タンパク質 super-ecliptic pHluorin (SEP) で標識した vesicular glutamate transporter (vGlut) の動態を観察して開口放出の位置を推定し、1つのアクティブゾーンに複数の release sites があつたと報告した。Sakamoto ら (2018) は、超解像蛍光顕微鏡の1つである STED (stimulated emission depleted) 顕微鏡を用いてアクティブゾーンタンパク質の1つである Munc13 の分布を調べ、Munc13 が複数のクラスターを形成しており、そのクラスター数はシナプス間隙に放出されたグルタミン酸と結合して蛍光を発する分子である EOS (glutamate optic sensor) を用いて推測した release sites の数と一致したと報告した。

1.1.3 同期放出と非同期放出の分子機構

シナプス小胞の開口放出は、主に活動電位の発火から 1 ミリ秒以内に起こる。これを同期放出と呼ぶ。しかし時折、活動電位から数十から数百ミリ秒遅れた非同期放出も起こる (図 5A)。この遅延が生じる仕組みとして、 Ca^{2+} に依存した 2 つの機構が提唱されている。1 つは、開口放出を誘導する Ca^{2+} 感受性タンパク質の種類が違うというものである (Kaeser and Regehr, 2014)。遺伝子改変動物を用いた研究により、同期放出には Ca^{2+} センサーとして synaptotagmin (Syt)-1, -2, -9 が必要であるとされた (Xu et al., 2007)。一方で Sun ら (2007) は、Syt2 をノックアウトしたマウスの calyx of Held シナプスを用いて、非同期放出には別の Ca^{2+} 感受センサーが必要であると報告した。なお、calyx of Held シナプスは蝸牛神経核が台形体核主細胞に投射する巨大なシナプスであり、シナプス前部と後細胞からの同時パッチクランプ記録が可能であることから、シナプス伝達の研究においてしばしば用いられてきたモデルシナプスである (von Gersdorff and Borst, 2002)。そして、非同期放出に関わる Ca^{2+} センサーとして、海馬錐体細胞および calyx of Held シナプスでは Syt7 が必要であると報告された (Bacaj et al., 2013; Luo et al., 2017)。

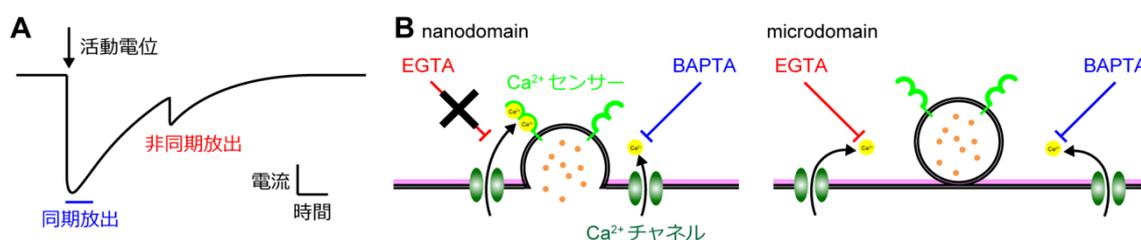


図 5.

A. 同期放出と非同期放出によって生じるシナプス後電流の模式図。同期放出は、活動電位の発火から 1 ミリ秒以内に起こり、非同期放出は数十から数百ミリ秒遅れて起こる。

B. 電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと docking したシナプス小胞の距離は、開口放出の速さと確実性に影響することが知られており、EGTA と BAPTA という 2 種類の Ca^{2+} キレーターを用いて調べられてきた。チャンネルとシナプス小胞が近い時 (nanodomain) は、結合速度の遅いキレーターである EGTA では開口放出を阻害できず、速いキレーターである BAPTA のみが開口放出を阻害する。一方、チャンネルと小胞が遠い時 (100 nm 前後、microdomain) には EGTA と BAPTA のいずれも開口放出を阻害する。

同期放出と非同期放出が生じる機構に関するもう 1 つの説明として、小胞の質は同じであるが、 Ca^{2+} 流入部位からの距離が遠いために非同期放出が生じるという仮説がある (Eggermann et al., 2012)。同期放出では、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと docking したシナプス

小胞は近接していると考えられている。特に、calyx of Held シナプスに代表される聴覚系の速い情報伝達を要するシナプスでは、 Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞は極めて近くに配置されると考えられており、この領域は nanodomain と呼ばれる (図 5B)。一方で他の興奮性シナプスでは、 Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞間の距離が 100 nm を超えている場合があると考えられており、これは microdomain と呼ばれる。ただしこの名称は、 Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞間の距離が 1 μm 程度という意味ではないので注意が必要である。この nanodomain と microdomain については、BAPTA と EGTA という 2 種類の Ca^{2+} キレーターを用いた実験と理論計算により研究されてきた (Bucurenciu et al., 2008; 図 5B)。BAPTA と EGTA では Ca^{2+} との結合の強さは同程度であるが、BAPTA の方が Ca^{2+} との結合速度が速い。そのため、チャンネルと小胞が近い場合は、BAPTA のみが小胞放出に寄与する Ca^{2+} と結合して開口放出を抑え、EGTA は開口放出を抑制できない。一方で、チャンネルと小胞が遠い場合には、BAPTA と EGTA の両者ともに Ca^{2+} をキレートして開口放出を抑制できる。そして、非同期放出は EGTA によって抑制されたという報告がなされており (Hefft et al., 2005)、非同期放出では Ca^{2+} チャンネルとシナプス小胞の位置が遠いと考えられた (Eggermann et al., 2012)。もし非同期放出においてチャンネルと小胞間の距離が遠いのであれば、同期放出と非同期放出の発生位置が異なると推測されるが、これを明確に示した研究報告は無い。

1.1.4 シナプス小胞の取り込み

高頻度の活動電位発火に伴う頻繁な開口放出を支えるため、シナプス前部には効果的に新しいシナプス小胞を作る仕組みがあると考えられている (Südhof, 2004)。特にシナプス小胞膜と細胞膜が完全に融合する full-fusion 型の開口放出後には、clathrin や dynamin に依存した小胞取り込み (Kononenko and Haucke, 2015)、大きなエンドソームを生じる bulk endocytosis (Cheung et al., 2010)、開口放出直後に起こる ultrafast endocytosis (Watanabe et al., 2013) が起こると考えられている (図 6)。

まず、clathrin 依存的な小胞取り込みについて説明する。数十回の活動電位による開口放出によって小胞膜タンパク質は細胞膜に移動し、AP-2 などのアダプタータンパク質と結合する。このアダプタータンパク質にさらに clathrin が結合し、clathrin 被覆ピットが作られる。ピットの陥入が進んで細胞膜が Ω 状の構造を取ると、そのネック部分に endophilin 等の BAR ドメインを持つタンパク質が集積する。これらの BAR ドメインタンパク質は湾曲した脂質と結合して、構造を安定化する。そうするとネック状部分に GTPase である dynamin が集積

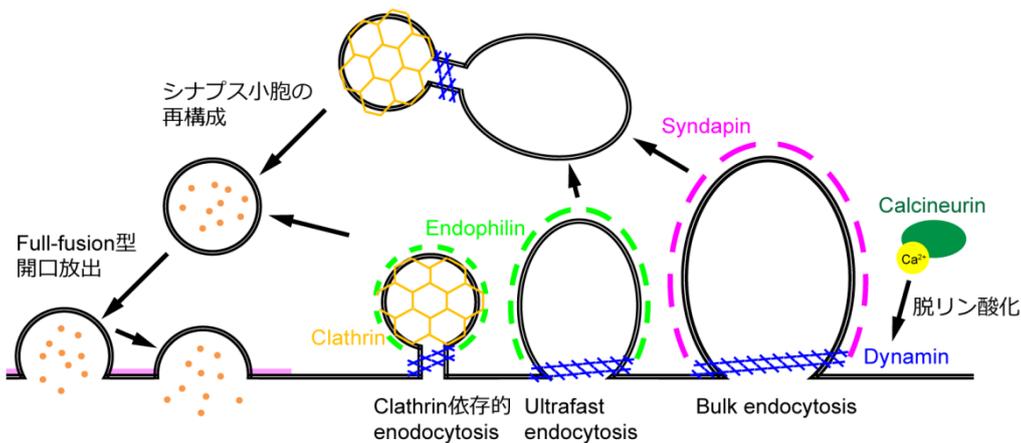


図 6. Full-fusion 型の開口放出により細胞膜と融合したシナプス小胞が再構築されるまでの過程の模式図。開口放出後には、clathrin 依存的に小胞が取り込まれる。また bulk endocytosis や ultrafast endocytosis により大きな endosome が細胞内に取り込まれ、この大きな endosome から clathrin 依存的に小胞が切り取られてシナプス小胞が構築されると考えられている。

してネック状部分が縊り切れ、細胞内に小胞が取り込まれる (Kononenko and Haucke, 2015)。

数百回の活動電位といった強い刺激により多数の開口放出が起こると、急増した細胞膜を減らすために、直径数百 nm の巨大な膜構造が取り込まれる。これを bulk endocytosis と呼ぶ。取り込まれた endosome からは、clathrin 依存的に小胞が切り取られてシナプス小胞が形成されると考えられている (Clayton and Cousin, 2009)。この bulk endocytosis は、脂質二重膜と結合するマーカーである FM 色素や horse radish peroxidase の細胞内への移行を利用した顕微鏡観察によって調べられており (Cheung et al., 2010; Clayton et al., 2008)、次の様な機構によって起こると考えられている。連続した活動電位により電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介して多量の Ca^{2+} が細胞内に流入すると、 Ca^{2+} 依存的にあるいは Ca^{2+} 結合タンパク質である calmodulin 依存的に、シナプス前部に分布する脱リン酸化酵素である calcineurin が活性化される。Calcineurin は膜分離を行う GTPase である dynamin を脱リン酸化し、これにより dynamin が BAR ドメインタンパク質の 1 つである syndapin と結合できるようになる。Syndapin は BAR ドメインを介して細胞膜と結合して細胞膜を大きな円を描くように曲げ、細胞膜を陥入させる。そして syndapin と結合していた dynamin に依存して、陥入した膜構造のネック状部分が縊り切られて bulk endocytosis が完了する (Clayton and Cousin, 2009)。

次に、ultrafast endocytosis について説明する。これは近年、新しく報告された endocytosis の様式であり、1 回から数回の活動電位によって開口放出が起こった直後に、小胞数個分の

大きな小胞が取り込まれるというものである。Watanabe ら (2013) はチャンネルロドプシンと液体窒素を用いた瞬間高圧凍結法を組み合わせた flash-and-freeze 法を開発し、アクティブゾーン周辺領域において活動電位の発火から数百ミリ秒後に、dynamin 依存的に直径約 80 nm の大きなエンドソームが取り込まれることを見出した。さらに Watanabe ら (2014) は、取り込まれた ultrafast endosome を追跡して観察し、活動電位から数秒後に ultrafast endosome から clathrin および dynamin に依存して小胞が形成されると報告した。開口放出の発生から数百ミリ秒という短時間で endosome を形成する分子機構について、BAR ドメインタンパク質の 1 つである endophilin の関与が示唆されているが、詳細は不明である (Kononenko and Haucke, 2015)。

1.1.5 シナプス小胞膜タンパク質の細胞膜上での動態

上述の full-fusion 型の開口放出によって小胞膜タンパク質は細胞膜上に移動するが、小胞膜タンパク質が細胞膜上に長く残存すると、次の SNARE 複合体形成や開口放出を阻害してしまう懸念がある (Neher and Sakaba, 2008; Hua et al., 2013)。このような事態を防ぐため、小胞膜タンパク質は細胞膜に移動した後、直ちにアクティブゾーンから移動しなければならない。この移動について、2つのモデルが提唱されている (Haucke et al., 2011)。1つは、シナプス小胞から細胞膜に移った小胞膜タンパク質はそのまま集団として動くというものであ

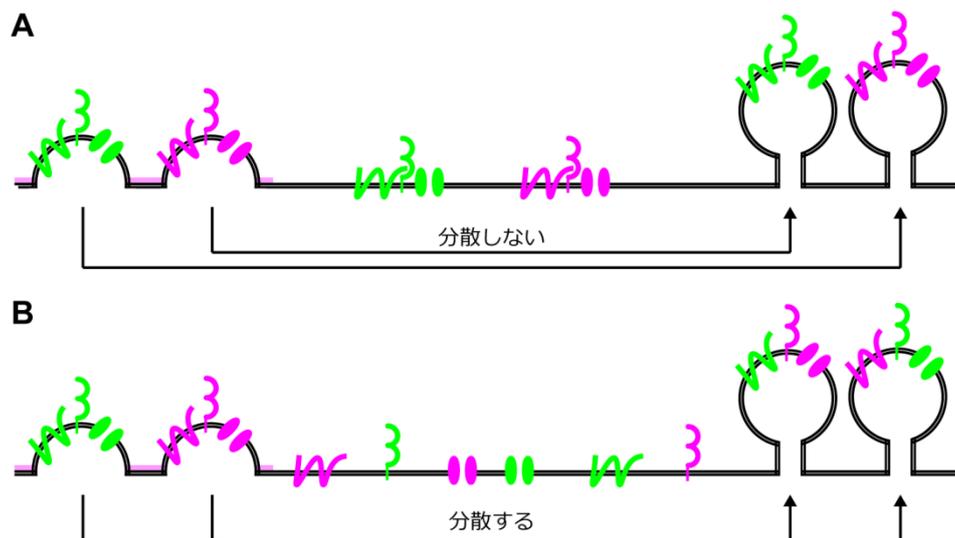


図 7. 開口放出によって細胞膜に移動した小胞膜タンパク質の振る舞いについての模式図。

- A. 小胞膜タンパク質は細胞膜上でも集団を維持し、そのまま取り込まれるとするモデル。このモデルでは必要な膜タンパク質を集めて取り込むことが容易である。
- B. 小胞膜タンパク質が細胞膜上を拡散し、取り込み後に再集合されるとするモデル。

る (図 7A)。シナプス小胞は直径約 40 nm の小胞膜上に多数の膜タンパク質を有しており、このタンパク質の数は種類ごとに一定であると考えられている (Takamori et al., 2006)。こうした小胞膜の分子組成を維持するためには、開口放出によって細胞膜に移った小胞膜タンパク質をそのまま利用することが合理的である。Willig ら (2006) は超解像顕微鏡観察によって、細胞膜上に分布する synaptotagmin は直径約 70 nm のクラスターを作ったと報告しており、これはシナプス小胞膜タンパク質が集団を維持するというモデルを支持する。

一方で、シナプス小胞膜タンパク質は細胞膜に移った後に拡散し、取り込み後に再集合するというモデルもある (図 7B)。Gimber ら (2015) は、pH 感受性蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEP) で標識した synaptobrevin (Syb-SEP) を開口放出のマーカーとして培養神経細胞に発現させた。そして、数十回の連続した電場刺激を与えた際の Syb-SEP のシグナルを観察し、Syb-SEP は軸索膨大部の細胞膜上で拡散したと報告した。しかし、1 回の開口放出の後にシナプス小胞膜タンパク質がどのように動くかについては、取得画像の時空間分解能やシグナルノイズ比の問題から不明である。

1.1.6 シナプス小胞へのグルタミン酸の取り込み

Clathrin 依存的エンドサイトーシス等によって小胞が形成された後、シナプス小胞として働くためには、伝達物質を小胞内に取り込む必要がある。ここでは、主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸の取り込み過程について説明する (図 8)。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸はグリア細胞の excitatory amino acid transporter (EAAT) によって回収されてグルタミンとなり、細胞外へ放出される。そして神経細胞膜上の N 型あるいは A 型アミノ酸輸送体によって細胞内に取り込まれ、再びグルタミン酸が合成される (Blakely and Edwards, 2012)。シナプス前部細胞質中のグルタミン酸は、小胞膜上の vesicular glutamate transporter (vGlut) によって小胞内に取り込まれる。vGlut は同じく小胞膜上の vATPase が作る H^+ によ

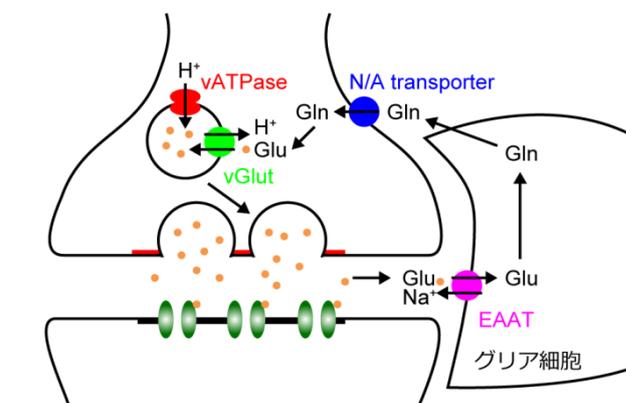


図 8. シナプス小胞から開口放出されたグルタミン酸がシナプス小胞に取り込まれる過程の模式図。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸は、グリア細胞を経由して神経細胞に取り込まれる。そして vATPase の作る H^+ 電気化学勾配に依存して、vGlut の働きによりシナプス小胞内に取り込まれる。

る電気化学勾配を利用してグルタミン酸を小胞内へと輸送する(Schenck et al., 2009; Juge et al., 2010)。抑制性神経細胞のシナプス小胞では、vGlutに変わり vesicular GABA transporter (vGAT) が局在する。vGATもvATPaseが作るH⁺電気化学勾配に従ってGABAを取り込む。グルタミン酸は陰イオンであるがGABAはほぼ中性であるため、vGlutとvGATでは異なる機構でアミノ酸を取り込んでいると考えられている (Farsi et al., 2016)。

1.1.7. アクティブゾーンを支える足場タンパク質

シナプス前部の多様な機能を実現するために、アクティブゾーンの細胞質には様々な足場タンパク質が分布している。ここではそのうちのRIM (Rab3-interacting molecule)、RIM-BP (RIM binding protein)、Munc13、CAST (cytomatrix at the active zone associated structural protein)、bassoon/piccoloについて説明する (図9)。

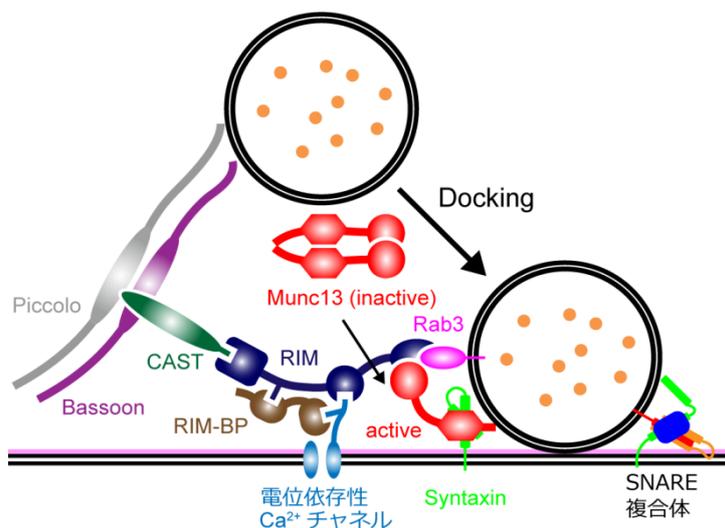


図9. アクティブゾーンに局在するタンパク質の模式図。RIMとRIM-BPはシナプス小胞と電位依存性Ca²⁺チャネルを橋渡しするように結合することで、電位依存性Ca²⁺チャネルをアクティブゾーンに局在させ、その近傍にシナプス小胞をdockingさせると考えられている。Munc13はSNAREタンパク質の1つであるsyntaxinと結合して開口放出を促進する。そして、この機能はRIMにより制御されることが考えられている。CASTは、シナプス小胞を電位依存性Ca²⁺チャネルの近傍にdockingさせる過程に関与すると考えられている。Bassoonおよびpiccoloはアクティブゾーンにシナプス小胞を集め、充填するために必要であると考えられている。

RIMは電位依存性Ca²⁺チャネルに結合するタンパク質として同定され、Ca²⁺チャネルの近傍にシナプス小胞をdockingさせるために必要であると考えられている (Südhof, 2012)。

これは RIM が、シナプス伝達に関わる N 型、P/Q 型の電位依存性 Ca^{2+} チャネルに結合するとともに、膜輸送に関わる小胞膜タンパク質である Rab3 と結合するという知見に基づく (Kiyonaka et al., 2007)。さらに生体内での機能について、RIM をノックアウトしたマウスのシナプス前部では細胞膜に docking するシナプス小胞数が減少し、興奮性、抑制性シナプス後電流が減弱したと報告された (Kaeser et al., 2011)。さらに、活動電位による Ca^{2+} 流入量も減少し、 Ca^{2+} キレーターである EGTA によるシナプス伝達の抑制効果が野生型と比べて大きくなったことから、RIM は電位依存性 Ca^{2+} チャネルをアクティブゾーンに集積させ、その近傍にシナプス小胞を docking させるために必要であると考えられている。また、RIM は synaptotagmin などの SNARE タンパク質とも結合すると報告されたが、その役割は不明である (Coppola et al., 2001)。

RIM-BP は電位依存性 Ca^{2+} チャネルに結合するタンパク質として同定され、RIM とも結合することで、RIM と共にシナプス小胞を Ca^{2+} チャネルの近傍に docking させるために必要であると考えられている (Hibino et al., 2002; Südhof, 2012)。ショウジョウバエの神経筋接合部を超解像顕微鏡で観察すると、DRBP (*Drosophila* RIM-BP) は電位依存性 Ca^{2+} チャネルのクラスターを囲むように局在し、DRBP のノックアウトによって Ca^{2+} チャネルの数が減少した。このことから、RIM-BP は電位依存性 Ca^{2+} チャネルをアクティブゾーンに局在させるために必要であると考えられている (Liu, 2011)。一方で哺乳類の中樞神経系についても研究が行われ、RIM-BP をノックアウトしたマウスであってもシナプス伝達は正常に行われた (Acuna et al., 2015)。しかし同グループは、シナプス後電流の振幅や活動電位の到達から後電流が生じるまでの時間のばらつきが大きくなり、EGTA によるシナプス伝達の抑制効果が野生型と比べて大きくなったことを示し、シナプス伝達の速さと確実性が失われたと報告した。これらから哺乳類の中樞神経系においては、RIM-BP は開口放出に必須ではないが、シナプス小胞と電位依存性 Ca^{2+} チャネルの距離を近づけるために必要であると考えられている。

Munc13 は最初、線虫の変異体から同定されたタンパク質であり、SNARE タンパク質の 1 つである syntaxin に作用してシナプス小胞の docking を促進すると考えられた (Maruyama and Brenner, 1991; Südhof, 2012)。Richmond ら (2001) によると、syntaxin と Munc13 の両方を発現しない変異型の線虫の神経筋接合部ではシナプス伝達が起こらず、これに野生型の syntaxin を発現させても回復しなかった。しかし、開状態の syntaxin を発現させるとシナプス伝達が回復したことから、Munc13 は syntaxin を開状態にしてシナプス小胞を docking さ

せるために必要であると推察された。哺乳類の中枢神経系についても研究が行われ、Munc13 のノックアウトマウスでは細胞膜と docking するシナプス小胞数が減少すると報告された (Imig et al., 2014)。この Munc13 の活性は、前述の RIM によって調整されると考えられている (Südhof, 2012)。Munc13 は N 末端の C2A ドメインによってホモ二量体を作り、syntaxin との結合能を失う。しかし、RIM は Munc13 の C2A ドメインと結合してホモ二量体形成を阻害し、Munc13 が syntaxin と結合できるようにすると考えられている。このモデルは、RIM のノックアウトによって減弱したシナプス伝達が、ホモ二量体を形成しない変異型 Munc13 の発現により部分的に回復したという報告に基づく (Deng et al., 2011)。

CAST は甲状腺がんの研究で細胞増殖に関わる RET 型キナーゼの上流に位置するタンパク質として発見され、ELKS (glutamate, leucine, lysine, serine-rich protein) と名付けられた (Nakata et al., 1999)。そして、trans-Golgi 輸送に関わる Rab6 に結合するタンパク質 Rab6IP (Rab6-interacting protein; Monier et al., 2002) として再発見され、さらに Ohtsuka ら (2002) によってアクティブゾーンに分布するタンパク質として同定されて CAST (cytomatrix at the active zone associated structural protein) と名付けられた。CAST は ELKS2 とも呼ばれるが、ここでは CAST と呼称する。CAST の機能について様々な研究が行われており、ショウジョウバエにおいて CAST の homologue である bruchpilot が電位依存性 Ca^{2+} チャンネルをシナプス前部に局在させ、その近傍にシナプス小胞を集める働きがあるとされた (Kittel et al., 2006; Liu et al., 2011)。一方で、哺乳類における CAST の働きについては不明な点が多い。CAST のノックアウトマウスでは抑制性シナプス後電流の振幅が半減するという報告もあるが (Liu et al., 2014)、1 つのシナプス小胞あたりの伝達強度 (quantal size) が大きくなることで、シナプス伝達の強度が増強されたという報告もある (Kobayashi et al., 2016)。また同グループは、持続的な刺激を与えた後のシナプス小胞の再利用が遅くなったことから、CAST はシナプス小胞の docking 過程にも関与すると報告した。

Bassoon および piccolo はシナプス前部に分布する約 400 kDa の巨大なタンパク質として発見され (Cases-Langhoff et al., 1996; Langnaese et al., 1996)、シナプス小胞をアクティブゾーンに集めるために必要であると考えられている (Gundelfinger et al., 2016)。Bassoon をノックアウトしたマウスでは、苔状線維から小脳の顆粒細胞に投射するシナプスを高頻度で刺激した際のシナプス伝達の減弱が起こりやすくなり、さらに高頻度刺激後の単発刺激に対する応答も小さくなった (Hallermann et al., 2010)。このことから、bassoon はアクティブゾーンへのシナプス小胞の配置に必要であると考えられている。一方で piccolo のノックアウト

ではシナプス伝達に変化は見られず、piccolo と bassoon の両方の発現量を減らすと bassoon の表現型が重篤になったことから、piccolo は bassoon の機能を支えていると考えられている (Mukherjee et al., 2010)。

1.1.8. シナプス形成に関わる細胞間接着分子

シナプスが機能するためには、シナプス後部で神経伝達物質の受容体が局在する領域とアクティブゾーンが向かい合うように形成されなければならない。このシナプス形成には、シナプス前部と後部を橋渡しするように結合する細胞間接着分子が関与する (Pinto and Almeida, 2016)。ここでは、細胞間接着分子のなかでも neurexin と neuroligin について説明する (図 10)。Neurexin はクモ毒に結合する分子として発見されたシナプス前部に局在する膜タンパク質であり (Ushkaryov et al., 1992)、シナプス後部の膜タンパク質である neuroligin と結合する (Ichtchenko et al., 1995)。そして neurexin と neuroligin の相互作用により、シナプス形成が促進されることが知られている。Neuroligin を発現した非神経細胞あるいは neuroligin でコートされたビーズは、neurexin との相互作用を介して近隣の神経細胞でのシナプス前部形成を促進した (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003)。一方で neurexin を表面に持つ非神経細胞やビーズはシナプス後部の形成を誘導した (Graf et al., 2004)。

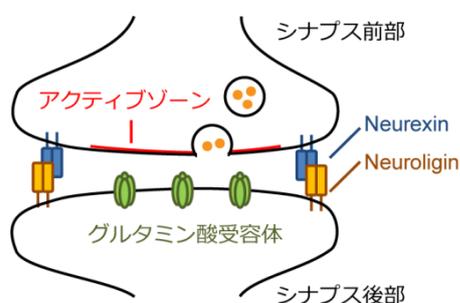


図 10. シナプス後部に局在する neuroligin とシナプス前部に局在する neurexin はシナプス間隙を橋渡しするように結合し、シナプスの形成を誘導する。

Neurexin と neuroligin はどちらも複数の遺伝子にコードされており、さらに選択的スプライシングによって多種のサブタイプが作られる。そしてこのサブタイプにより、形成されるシナプスの種類が異なることが知られている (Craig and Kang, 2007)。特にスプライスサイト 4 番を持たない neurexin -1 β は、スプライスサイト B を持つ neuroligin-1 と結合することで興奮性シナプスの形成を促し、一方で、スプライスサイト 4 を持つ neurexin-1 β は、スプライスサイト B を持たない neuroligin-1 と結合することで抑制性シナプスの形成を促すと報告された (Boucard et al., 2005; Graf et al., 2006; Chih et al., 2006)。Neurexin は 1000 種を超え

るサブタイプを作ることが知られている (Ullrich et al., 1995)。近年ではこの **neurexin** の多様性とシナプスや神経細胞の性質の多様性を関連付けた研究が行われており、ある神経回路は特定のサブタイプの **neurexin** の働きにより形成されるという仮説が提唱されている (Schreiner et al., 2014)。

1.2. 研究の目的

シナプス前部でのシナプス小胞の開口放出は、活動電位の発火後に直ちに行われ、高頻度の活動電位にも対応する (図 1)。頻繁な開口放出を支えるため、シナプス前部のアクティブゾーンには効率的にシナプス小胞を再構築する仕組みがあると考えられる (Haucke et al., 2011; Kononenko and Haucke, 2015; 図 6)。開口放出や小胞取り込み、そしてシナプス小胞の再構築について、電気生理学的な膜容量測定 (von Gersdorff and Matthews, 1994; Yamashita et al., 2005; He et al., 2006) や電子顕微鏡観察 (Heuser et al., 1979; Ferguson et al., 2007; Watanabe et al., 2013)、そして蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察 (Miesenböck et al., 1998; Wienisch and Klingauf, 2006) によって研究が進められてきた。しかしながら、電気生理学的な手法や電子顕微鏡観察ではタンパク質の動態は分からず、また多くの蛍光顕微鏡観察では、シグナルノイズ比を改善するために複数回の開口放出を起こすという方法がとられていた。1つのシナプス小胞からの開口放出を観察した研究も報告されたが (Aravanis et al., 2003; Gandhi and Stevens, 2003; Baraji and Ryan, 2007; Chen et al., 2008; Zhang et al., 2009; Midorikawa and Sakaba, 2015; Tang et al., 2016; Maschi and Klyachko, 2017; Sakamoto et al., 2018)、開口放出に伴うタンパク質の動態までは観察できていなかった。

シナプス小胞と細胞膜が完全に融合する full-fusion 型の開口放出が起こると、シナプス小胞膜タンパク質は細胞膜に移動し、その後再利用のために取り込まれる。この細胞膜上での小胞膜タンパク質の動態について、2つのモデルが立てられている (図 7)。シナプス小胞は、おおよそ一定の数の膜タンパク質を持つと報告されている (Takamori et al., 2006)。そのため、小胞膜タンパク質はある小胞から細胞膜に移動した後に拡散せずに、集合した状態のまま動くというモデルが考えられている (Willig et al., 2006)。一方で、小胞膜タンパク質は細胞膜に移動すると拡散し、取り込み後に再集合するという説もある (Gimber et al., 2015)。しかし、シグナルノイズ比の問題から、1回の開口放出の後に小胞膜タンパク質がどのように動くのかは不明であった。

アクティブゾーン内には、シナプス小胞が docking して細胞膜と融合する特定の領域があると考えられている。この領域は release site と呼ばれ、1つのアクティブゾーンあたりの release sites の数や分子構築について研究が行われてきた (Südhof, 2013; Pulido and Marty, 2017; Liu et al., 2011; 図 4, 9)。近年、1つのアクティブゾーンには複数の release sites があり、この release sites 数は開口放出に関連するタンパク質がアクティブゾーン内で作るクラスター

一の数に近いという報告がなされた (Maschi and Klyachko, 2017; Miki et al., 2017; Sakamoto et al., 2018)。こうした知見から、release site の実態は電位依存性 Ca^{2+} チャネル等の開口放出に関連するタンパク質が集合する場ではないかと推測された (Pulido and Marty, 2017)。ここでアクティブゾーンでの開口放出は、活動電位の到達から 1 ミリ秒以内に起こる同期放出が主であるが、活動電位から数十から数百ミリ秒遅れた非同期放出も起こる (図 5A)。そして、非同期放出が起こる仕組みとして、電位依存性 Ca^{2+} チャネルから docking しているシナプス小胞までの距離が遠いために、 Ca^{2+} 流入から開口放出が起こるまでに遅れが生じるというモデルが提唱されている (Eggermann et al., 2011; 図 5B)。ゆっくりとした Ca^{2+} キレーターである EGTA は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルとシナプス小胞の距離が 100 nm より遠い場合には開口放出を抑制すると考えられており、この EGTA によって非同期放出が特異的に阻害されたという報告は、上記のモデルを支持する (Hefft and Jonas, 2005; Vyleta and Jonas, 2014)。一方で、このモデルに従えば同期放出と非同期放出は異なる領域で起こるはずであるが、この点を直接示した研究は無かった。

これらの開口放出に伴う分子動態や開口放出の発生位置についての問題に答えるために、私は 1 分子観察や内分泌細胞での開口放出の観察等に用いられてきた全反射蛍光顕微鏡に着目した。この顕微鏡では励起光をカバーガラスで全反射させて、エヴァネッセント場と呼ばれるガラス面直上の 100 nm 程度の薄い領域に存在する蛍光分子のみを励起させる。そうすることで背景光を極端に減らし、高シグナルノイズ比と高解像度を実現する (Axelrod, 2001)。ただし、アクティブゾーンでの分子動態の観察に全反射蛍光顕微鏡を適用するには問題点があった。それは、多くの場合、シナプス前部が全反射蛍光顕微鏡の観察領域内に作られないことである。また、観察領域内に作られてもアクティブゾーンがガラス面に平行に位置するとは限らないため、蛍光分子の動態を輝度変化によって正確に定量することが難しかった。こうした問題点を解決するために私は、細胞間接着分子の 1 つである *neuroligin* を用いてガラス面の直上に安定したアクティブゾーン様構造を形成させようと考えた。*neuroligin* はシナプス後部に局在する膜タンパク質であり、*neuroligin* を発現した非神経細胞や *neuroligin* でコートされたビーズは、シナプス前部の形成を促すことが知られている (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003)。この *neuroligin* はシナプス前部に局在する *neurexin* という膜タンパク質とシナプス間隙を橋渡しするように結合することでシナプスの形成を促す (図 10)。私が所属する研究室では、カバーガラスを *neurexin* でコートしてその上に海馬神経細胞を分散培養し、ガラス面の直上にシナプス後部様構造を作らせた。そ

して GFP を変異させた pH 感受性緑色蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEP) でグルタミン酸受容体を標識し、その開口放出やエンドサイトーシスを観察することに成功した (Tanaka and Hirano, 2012; Tanaka et al., 2014; Fujii et al., 2017)。そこで私は、この neurexin コートによるシナプス後部様構造の形成を応用し、neuroligin でガラス面をコートすることでアクティブゾーン様構造 (active-zone-like membrane, AZLM) をガラス面直上に形成させ、そこでの SEP 標識したシナプス小胞膜タンパク質の動態を調べることにした (図 11)。

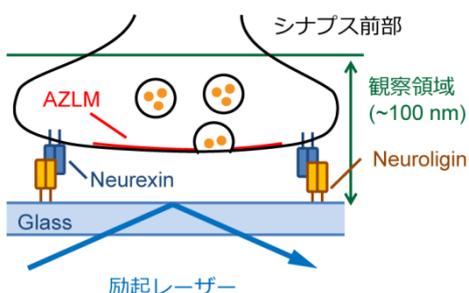


図 11. Neuroligin がシナプス前部を形成させることを利用し、neuroligin でガラス面をコートしてガラス面の直上に、面に対して平行にアクティブゾーン様構造 (active-zone-like membrane, AZLM) を形成させた。そして AZLM でのタンパク質の動態を、ガラス面直上の蛍光分子を高いシグナルノイズ比で観察できる全反射蛍光顕微鏡を用いて観察した。

本研究の目的は、AZLM を用いて (1) 開口放出後のシナプス小胞膜タンパク質の動態を明らかにし、シナプス小胞再構築過程におけるシナプス小胞膜タンパク質の挙動解明に寄与すること、および (2) 同期放出と非同期放出の位置関係を明らかにすることにより、各々の制御機構の解明に寄与することである。

2. 方法と材料

特記しない限り、試薬はナカライテスク社の特級試薬を、酵素はタカラバイオ社または TOYOBO 社の製品を用いた。

2.1. DNA コンストラクトの作製方法

Neurologin-Fc と HA-neurexin の発現ベクターは、先行研究に基づいて作製した (Scheiffele et al., 2000; Chih et al., 2006; Pettem et al., 2013)。Neurologin1 (-A+B) の細胞外ドメイン (1-675 アミノ酸) の C 末端に免疫グロブリンの Fc 領域を結合し、pCAGplayII 発現ベクターに挿入した (Kawaguchi and Hirano, 2006)。シグナルペプチド(1-47 アミノ酸)を欠いた neurexin1 β (-4) の N 末端に、細胞膜移行シグナルペプチドと HA タグを結合し、pDisplay 発現ベクター (Invitrogen) に挿入した。EGFP-CAST は、山梨大学の 大塚教授から頂いた。そして、pTagRFP-C 発現ベクター (Evrogen) から改変した pTagRFPt-C 発現ベクターに CAST の配列を挿入して CAST-RFP を作製した。GCaMP6f は、Addgene を介してジェネリアファーム研究所の Kim 教授から頂いた (Chen et al., 2013; Addgene #40755)。先行研究に基づいて synaptophysin と pH 感受性蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin を融合させ、Syp-SEP を作製した (Granseth et al., 2006)。なお、発現量を減らすために、CMV プロモーターのエンハンサー領域の一部を切り取った (Isomura et al., 2004)。

2.2. Neurologin によるガラス面のコート方法

先行研究に基づいて Fc タグで標識した neurologin (neurologin-Fc) でガラス面をコートした (Tanaka and Hirano, 2012; Tanaka et al., 2014)。まず neurologin-Fc を HEK293T 細胞に発現させ、nProteinA sepharose (GE Healthcare) を用いて精製し、回収した。43 μ M ビオチン化ウシ血清アルブミン (Thermo Scientific) を含んだ buffer A (100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM HEPES-KOH, pH 7.4) にカバーガラスを 4°C で一晩浸し、17 μ M streptavidin (WAKO) を含んだ buffer A に室温 (22-26°C) で 1 時間浸した。そして、ビオチン抱合抗 IgG 抗体 (1:100, Jackson Immuno Reserch) を含んだ buffer A に室温で 1 時間浸し、3-5 μ g/ μ l neurologin-Fc を含む buffer A に室温で 5 時間浸した。各々の処理後に buffer A で 3 回洗浄した。最後に、カバーガラスを 0.2 mg/ml poly-D-lysine (Sigma) を含んだ純水に 37°C で一晩浸し、純水で洗浄した。

2.3. 海馬神経細胞の初代培養と遺伝子導入の方法

胎生 18-20 日目のラット胎児から海馬神経細胞を取り出し、neuroligin-Fc と poly-D-lysine でコートしたガラス面上に初代培養した (Tanaka and Hirano, 2012; Tanaka et al., 2014; Fujii 2017)。培養液として neurobasal medium electro (GIBCO) を用いた。培養 10-12 日目に lipofectamin 2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子を導入した (Tanaka and Hirano, 2012; Tanaka et al., 2014; Fujii 2017)。全ての実験は遺伝子導入から 2-3 日後に行った。

2.4. 免疫蛍光染色法

4% パラホルムアルデヒドと 4% スクロースを含むリン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) を用いて室温で 5 分間、細胞を固定した。PBS で細胞を洗浄し、5% ヤギ血清と 0.2 % Triton X-100 を含む PBS を用いて室温で 30 分間、非特異的な抗体の結合を阻害した。そして 1 次抗体を 4°C で一晩、2 次抗体を室温で 1 時間結合させた。用いた抗体は以下の通り。マウス由来抗 bassoon 抗体 (1:1000, Enzo)、ウサギ由来抗 piccolo 抗体 (1:1000, Synaptic Systems)、ウサギ由来抗 Munc13 抗体 (1:1000, Synaptic Systems)、ウサギ由来抗 RIM1/2 抗体 (1:1000, Synaptic Systems)、マウス由来抗 HA 抗体 (1:1000, Roche)、ヤギ由来 FITC 抱合抗ヒト IgG 抗体 (1:1000, Jackson Immuno Reserch)、ヤギ由来 Alexa488 抱合抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体 (1:1000, Invitrogen)、ヤギ由来 Alexa568 抱合抗マウス IgG 抗体 (1:1000, Molecular Probes)。蛍光画像は共焦点顕微鏡 FV1000 (Olympus) あるいは全反射蛍光顕微鏡 IX-71 (Olympus) を用いて撮影した。

2.5. 全反射蛍光顕微鏡を用いた生細胞の観察方法

全反射蛍光顕微鏡観察には、EMCCD カメラ (iXon+, Andor) 、×150 倍対物レンズ (NA 1.45)と×1.6 倍中間レンズを装備した全反射蛍光顕微鏡 IX-71 (Olympus) を用いた。光源として 488 nm レーザー (Melles Griot) と 561 nm レーザー (Santa Clara) を用いた。細胞外液 (119 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 30 mM Glucose, 25 mM HEPES; NaOH で pH7.4 に調整) に、AMPA 型グルタミン酸受容体を阻害するために 10 μM CNQX を加えた。

2.6. Ca²⁺イメージングと解析の方法

培養神経細胞に GCaMP6f、CAST-RFP、HA-neurexin を遺伝子導入して全反射蛍光顕微鏡

で観察した。CAST 陽性の AZLM (active-zone-like membrane) を中心に 35×35 ピクセルの領域を定め、この領域で 100Hz で 5 回の電場刺激を与えた際の GCaMP6f の輝度変化を記録した。露光時間は 35 ミリ秒で、4 ミリ秒の転送時間後に次の画像取得を始めた。GCaMP6f の輝度変化は ImageJ (NIH) を用いて解析した。まず刺激前の 6 枚の画像を平均して背景画像とし、1 回の記録の中のそれぞれの画像から差し引いた。そして CAST 陽性の AZLM を囲む 15×15 ピクセルの関心領域を定め、この領域での平均輝度を各時間で求めた。

2.7. Syp-SEP の観察と解析方法

Syp-SEP、CAST-RFP、HA-neurexin を発現した神経細胞に 50Hz で 5 回の電場刺激を与え、Syp-SEP の輝度上昇の起こる CAST 陽性の AZLM を探した。この AZLM を中心として 35×35 ピクセルの関心領域を定めて、30 秒から 60 秒の励起光照射を行い、細胞膜表面の Syp-SEP を退色させて Syp-SEP の開口放出を検出しやすくした。そして 1 回の電場刺激を与えた際の Syp-SEP の輝度変化を、1 つの AZLM につき 150 回から 300 回記録した。1 回の記録では刺激前に 3 枚、刺激後に 6 枚の画像を取得した。1 枚の画像取得には 35 ミリ秒の露光時間と 4 ミリ秒の転送時間を要した。また、各記録は 6 秒間隔で行った。これはエンドサイトーシスされた小胞の内部はすぐに酸性にならず、この小胞が細胞内で移動して全反射蛍光顕微鏡の観察領域に入ると、Syp-SEP の蛍光が検出されてしまうと考えられたためである (Midorikawa and Sakaba, 2015)。およそ 140 回ほど記録を繰り返すと、Syp-SEP の輝度上昇が観察される確率が下がったため、これ以降の記録は解析には用いなかった。また、およそ 1 分ごとに CAST-RFP の画像も取得してドリフト補正に用いた。

電場刺激を与えた際の Syp-SEP の輝度変化を、先行研究をもとに MATLAB (Mathworks) で解析した (Tang et al., 2016)。刺激前の 3 枚の画像を平均して背景画像とし、1 回の記録の各画像から差し引いた。刺激直後 (2-37 ミリ秒) の画像に注目し、輝度のピークを囲む 15×15 ピクセルの領域での Syp-SEP の輝度分布に対して 2 次元ガウス関数を用いて近似した。この時にガウス関数のピークの高さが 100 a.u. (arbitrary unit、任意単位) 以上かつ分散が 0.4 から 3 ピクセルの間であれば、ガウス関数のピーク的位置を中心とする 3×3 ピクセルを関心領域とした。次に、関心領域における Syp-SEP の輝度変化を求めて、刺激前の 3 時点での平均輝度と分散を計算した。刺激直後の時点で、この平均輝度と 3 倍の分散の和より大きく、かつ 1000 a.u. より大きな輝度上昇が起これば、次の解析に用いた。刺激直後 (2-37 ミリ秒) とその次の時点 (41-76 ミリ秒) での、関心領域における Syp-SEP の輝度を比較した。

2-37 ミリ秒時点での輝度と比べて、41-76 ミリ秒時点での輝度が 20% 以上残っていれば、同期した開口放出が起きたと判定した。これは、41-76 ミリ秒時点で輝度が急速に減る現象が稀に観察されたためである。この一過性の輝度変化は、新しく作られた Syp-SEP が蛍光を発している状態の小胞が全反射蛍光顕微鏡の観察領域内に入り込んだことに起因すると考えている (Midorikawa and Sakaba, 2015)。また、全記録の内 4 つの記録では、ピーク間が 300 nm 以上離れた 2 つのガウス関数の和で輝度分布を近似できた。こうした例では、2 つの離れた位置で同期放出が起こったと考え同期放出として数えたが、他の解析には用いなかった。非同期放出については、ピーク位置を求める時点を変えて同様に解析した。同期放出を 15 回以上検出できた AZLM のみを解析に用いた。

2.8. 開口放出の発生位置の解析手法

開口放出を検出できた記録を用いて、放出の起こった位置とその分布について調べた。開口放出が起きた時点での画像に注目して、輝度のピークを含む 15×15 ピクセルの領域での Syp-SEP の輝度分布に対して 2 次元ガウス関数で近似し、そのピークの位置を開口放出が起きた位置と定めた。開口放出が AZLM 内でランダムな位置で起こるか否かを調べるために、大津法 (ImageJ, NIH) を用いて AZLM 領域を定めた。そして観察できた開口放出と同じ数の点を AZLM 内にランダムに配置し、最も近い点間の距離を求めた。これを 100 回繰り返して実際のデータと比較した (Miki et al., 2017)。開口放出の発生位置が同じ領域に集まるか否かを調べるために、先行研究に基づきクラスターの直径を 50nm として階層クラスター解析を行った (Maschi and Klyachiko, 2017)。そして、それぞれの開口放出の発生位置と最も近いクラスターの中心までの距離を求めた。

2.9. 拡散係数の推定方法

拡散係数を求めるために、先行研究をもとに MATLAB (Mathworks) を用いて分子動態についてのシミュレーションを行った (Sochacki et al., 2012)。1 万個の分子を直径 80 nm の円の中にランダムに配置し、各分子を $\sqrt{2D\Delta t}$ nm ずつ、上下左右のどちらかの方向にランダムに動かした。ここで D は拡散係数であり、 Δt は 0.5 ミリ秒とした。各時間での分子の分布をもとにして輝度分布を求め、実際の露光時間に相当する 35 ミリ秒間で積分した。このシミュレーションを様々な D で行った。そして輝度のピークを中心とする 3×3 ピクセルの関心領域での輝度変化をシミュレーションと実際のデータで比較し、最小二乗法を用いて拡

散係数を推定した。また、刺激から 41-76 ミリ秒時点での Syp-SEP の輝度の広がりをシミュレーションと実際のデータで比較し、最小二乗法を用いて拡散係数を比較することも行った。

2.10. 統計解析の手法

特筆しない限り、値は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計解析ソフトには MATLAB (Mathworks) を用いた。2 標本の平均値の検定には Mann-Whitney の U 検定を用いた。3 つの平均値を比較する際には Wilcoxon の符号順位検定あるいは U 検定を行い、Bonferroni 補正を行った。

3. 結果

3.1. アクティブゾーン様構造 (AZLM) の形成

先行研究を参考にして Fc タグで標識した neuroigin (NLG-Fc) でカバーガラスをコートした (Tanaka and Hirano, 2012; Tanaka et al., 2014)。そしてその上で、HA タグで標識した neurexin (HA-NRX) を発現した HEK (human embryonic kidney) 細胞を培養し、neuroigin と neurexin を免疫染色して共焦点顕微鏡で観察した。そうしたところ、カバーガラスに付着した多数の HEK 細胞を観察でき (図 12A)、これらの HEK 細胞の突端は扇状に肥大化していた (図 12B)。また、免疫染色において細胞膜透過処理を行わずに観察したところ、HEK 細胞の直下の neuroigin からの蛍光シグナルを観察できなかった (図 12B)。これは neuroigin と neurexin の密な結合により、染色に用いた抗体が細胞膜直下に入り込めなかったためと考えられる (Tanaka and Hirano, 2012)。一方で neurexin と結合する cholinesterase-like domain を欠いた neuroigin (Δ ChE) でコートしたガラス面上では、HEK 細胞を見つけられなかった (図 12A)。これらは、ガラス面をコートする neuroigin が細胞膜表面に発現した neurexin との結合能を持つことを示している。

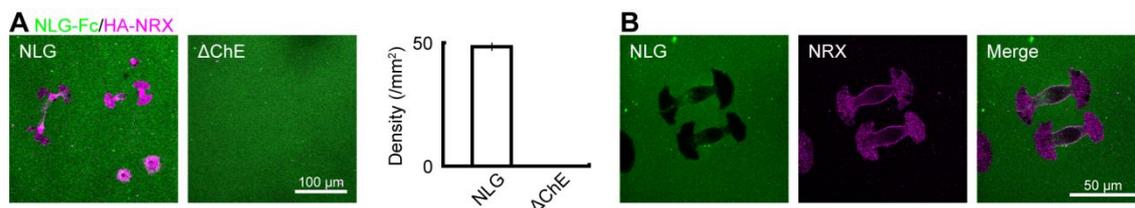


図 12.

A. Neuroigin あるいは neurexin と結合しない変異型 neuroigin (Δ ChE) でコートしたガラス面上で HA-neurexin を発現した HEK 細胞を培養し、neuroigin (緑) と neurexin (マゼンタ) を免疫染色した。そうしたところ、neuroigin でコートしたガラス面上では多数の HEK 細胞が観察されたが (左)、変異型 neuroigin コートガラス上では HEK 細胞は認められなかった (右)。

B. Neuroigin コートガラス上の HEK 細胞の突端は扇状に肥大化していた。また、免疫染色の過程で細胞膜透過処理を行わなかったところ、HEK 細胞の直下の neuroigin の蛍光シグナルが観察されなかった。

次に、neuroigin と Poly-D-lysine でコートしたガラス面上でラットの海馬錐体細胞を分散培養した (図 13A)。アクティブゾーンに局在するタンパク質である CAST と赤色蛍光タンパク質である tagRFPt を融合した CAST-RFP と EGFP を神経細胞に発現させ、樹状突起にスパインを持つ興奮性の錐体細胞 (Ishizuka et al., 1995) を探して全反射蛍光顕微鏡で観察し

た (図 13B)。そうしたところ、一般的な落射蛍光照明下で神経細胞の軸索上に多数の CAST 陽性の粒状の領域を見つけられ、これらの多くは全反射蛍光照明下でも観察できた。これは、CAST 陽性の領域がガラス面の直上に位置していることを示している。また、CAST 陽性の領域の多くは、ガラス面直上の単一焦点面でのみ観察できたことから、ガラス面に対して平行して形成されたと考えられる。一方で *neuroigin* でコートしていないガラス面上で神経細胞を培養すると、落射蛍光照明下では CAST 陽性のアクティブゾーンを見つけられたが、全反射蛍光照明のもとではほとんど認められなかった (図 13B)。

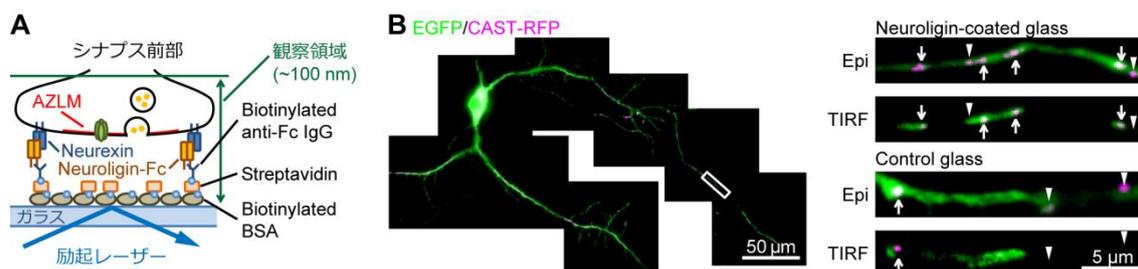


図 13.

A. ガラス面上に形成された AZLM の模式図。ヒト免疫グロブリン Fc タグ付きの *neuroigin* (*neuroigin*-Fc) は、biotin-streptavidin 結合と抗体抗原反応によりガラス面に結合させた。

B. RFP で蛍光標識した CAST (CAST-RFP) と EGFP を神経細胞に発現させて、軸索領域を全反射蛍光顕微鏡で観察した (左図中の長方形領域の拡大図を右上に示す)。そうしたところ、落射蛍光照明下 (Epi) で観察された CAST 陽性領域の多くが、全反射蛍光照明下 (TIRF) でも観察された (矢印)。一方で *neuroigin* でコートしていないガラス面上では、落射蛍光照明下で観察された CAST 陽性の領域の多くは、全反射蛍光照明下ではほとんど認められなかった (矢頭)。

次に、CAST 陽性の領域にアクティブゾーンのタンパク質が集積しているか否かを調べた。アクティブゾーンのタンパク質である *bassoon*、*piccolo*、*Munc13*、*RIM* を免疫染色して全反射蛍光顕微鏡で観察したところ、これらのタンパク質は CAST-RFP と共局在した (図 14A)。さらに CAST 陽性の領域の内外では電場刺激によって Ca^{2+} 指示タンパク質である *GCaMP6f* の輝度が上昇した。このことは電場刺激によって細胞内に Ca^{2+} が流入したことを示す (図 14B)。これらは、*neuroigin* でコートしたガラス面の直上にシナプス前部のアクティブゾーン様構造 (active-zone-like membrane, AZLM) が形成されたことを示している。

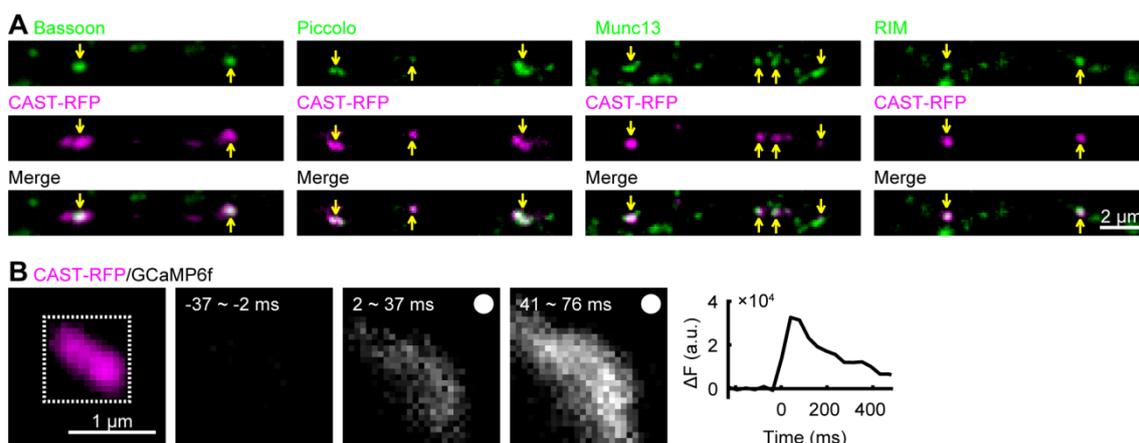


図 14.

A. CAST-RFP を発現した神経細胞の免疫染色画像。CAST 陽性の領域 (マゼンタ) では、主要なアクティブゾーンタンパク質である bassoon、piccolo、Munc13、RIM (緑) が局在していた (黄矢印)。

B. CAST 陽性の AZLM (左) では、100Hz で 5 回の電場刺激によって Ca^{2+} 指示蛍光タンパク質である GCaMP6f の輝度が上昇した (中央)。刺激は 0 ミリ秒に与え、GCaMP6f 蛍光画像の右上の白丸は刺激を与えた時点を示す。CAST 蛍光画像上に示した関心領域 (白点線で囲んだ正方形領域) での輝度変化のグラフを右に示す。a.u. は arbitrary unit の略語であり、任意単位を意味する。

3.2. 1 回の開口放出の検出

AZLM で開口放出が起こるか否かを調べるために、神経細胞に synaptophysin を GFP 改変型 pH 感受性緑色蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEP) で標識した Syp-SEP を発現させた。Synaptophysin は小胞膜タンパク質の 1 つであり、その役割はよく分かっていない。しかしながら、シナプス小胞およびシナプス前部のマーカーとしてしばしば用いられてきた。Syp-SEP は、酸性のシナプス小胞内では蛍光を発せず、開口放出によって中性の細胞外液に触れると蛍光を発する (図 15)。そのため、シナプス小胞の開口放出の検出にも用いられてきた (Miesenböck, 1998)。

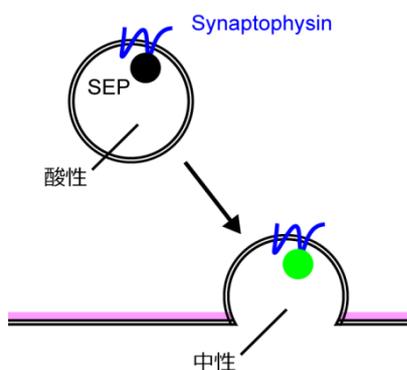


図 15. 小胞内外の pH の違いを利用した開口放出の可視化手法についての模式図。小胞膜タンパク質である synaptophysin と pH 感受性緑色蛍光タンパク質である super-ecliptic pHluorin (SEP) を融合させた Syp-SEP は、酸性条件の小胞内では蛍光を発せず、開口放出によって細胞膜に移動すると蛍光を発する。このことから、開口放出の検出に用いられてきた。

50Hz で 5 回の電場刺激を与えた際の AZLM 内部での Syp-SEP の輝度変化を記録したところ、刺激と同期して Syp-SEP の輝度が大きく上昇した (図 16)。これは、AZLM でいくつかのシナプス小胞の開口放出が起きたことを示す。次に、1 回の電場刺激で開口放出が起こるか否かを調べた。そうしたところ、刺激の直後に Syp-SEP の輝が一過的に上昇し、そのシグナルが散らばっていく様子をしばしば観察できた。

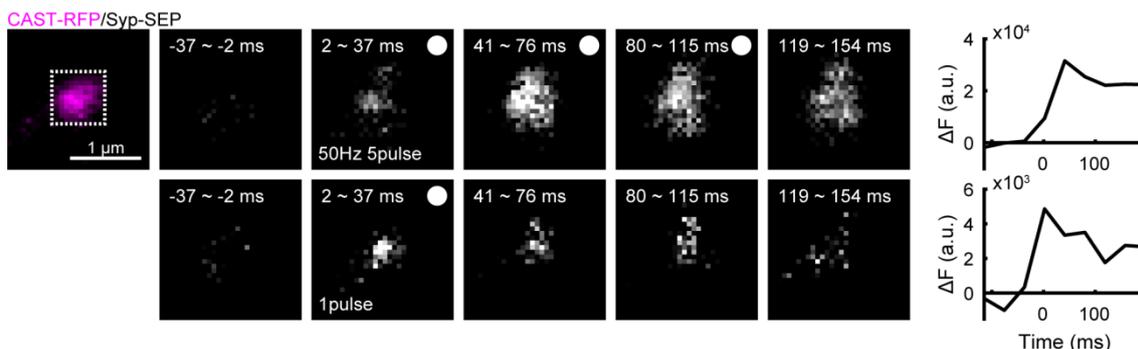


図 16. CAST 陽性の AZLM (左) では、50Hz で 5 回 (上) あるいは 1 回 (下) の電場刺激により、刺激と同期して Syp-SEP の輝度が上昇した (中央)。刺激は 0 ミリ秒に与え、Syp-SEP 蛍光画像の右上の白丸は刺激を与えた時点を示す。CAST 蛍光画像上に示した関心領域での輝度変化のグラフを右に示す。a.u. は arbitrary unit の略語であり、任意単位を意味する。

多くの輝度上昇は刺激と同期していたが、刺激から遅れた輝度上昇 (非同期放出) も稀に観察できた (図 17A,B)。この非同期放出は一つのシナプス小胞の開口放出に相当すると考えられている。そこで同期放出が一つのシナプス小胞の開口放出であるか否かを調べるために、同期放出と非同期放出での Syp-SEP の輝度変化幅を比較した。放出が起きた時点での Syp-SEP の輝度分布に対して 2 次元ガウス分布を近似して、輝度分布のピークの位置を求めた。このピークを中心として 3×3 ピクセル (200 × 200 nm) の関心領域を定めて、この領域での輝度上昇幅を求めた (図 17C)。そうしたところ、同期放出と非同期放出で Syp-SEP の輝度上昇幅は同等であった (同期放出では 2237 ± 72 a.u. となり、非同期放出では 2115 ± 94 a.u. となった。10 個の AZLM から得られた 226 回の同期放出と 99 回の非同期放出の記録から求め、U 検定で $p = 0.50$ となった)。加えて、同期放出の検出確率が低い ($17 \pm 1\%$; 10 個の AZLM から得られた 1350 回の記録の内 226 回) ことから、同期放出の大部分は 1 つのシナプス小胞からの開口放出であるとみなした。なお 300 nm 以上離れた位置で、同時に複数のシナプス小胞からの開口放出が観察される例もあったが、解析には用いなかった (1350 回の記録の内 4 回)。

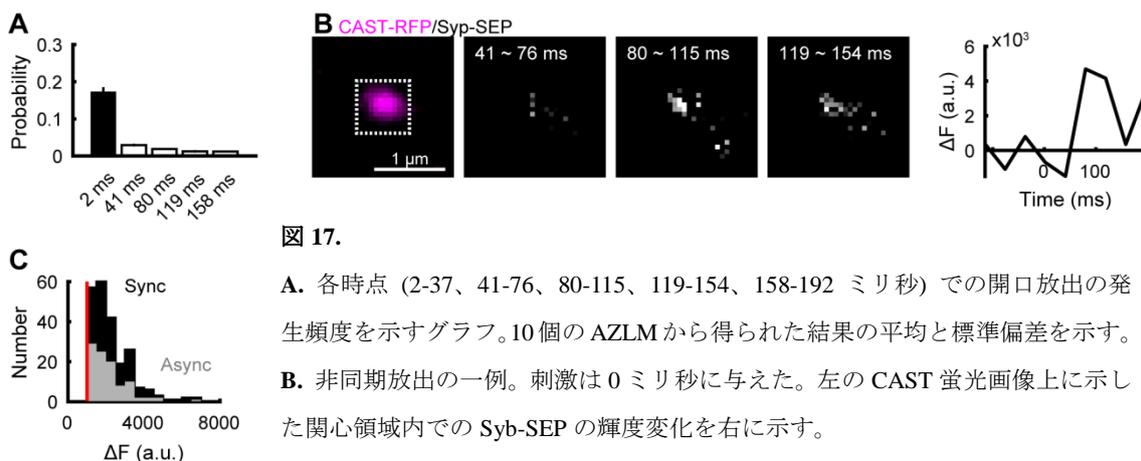


図 17.

A. 各時点 (2-37、41-76、80-115、119-154、158-192 ミリ秒) での開口放出の発生頻度を示すグラフ。10 個の AZLM から得られた結果の平均と標準偏差を示す。
 B. 非同期放出の一例。刺激は 0 ミリ秒に与えた。左の CAST 蛍光画像上に示した関心領域内での Syb-SEP の輝度変化を右に示す。
 C. 輝度のピークを含む 3×3 ピクセルの関心領域における Syb-SEP の輝度上昇幅のヒストグラム。黒は同期放出、灰色は非同期放出を示す。10 個の AZLM から得られた 226 回の同期放出と 99 回の非同期放出の記録から作成した。

3.3. 同期放出後の synaptophysin の側方拡散

次に、同期放出によって細胞膜へと移った Syb-SEP の動態について調べた。刺激直後の時点 (2-37 ミリ秒) とその次の時点 (41-76 ミリ秒) での Syb-SEP の輝度分布に 2 次元ガウス関数を近似して輝度上昇のピーク位置を求め、このピークを含むピクセルからの距離に対する Syb-SEP 輝度の分布を求めた (図 18A)。そうしたところ、2-37 ミリ秒時点での分布に比べ、41-76 ミリ秒時点での分布は裾野が広がっていた。このことは、Syb-SEP が細胞膜上を側方拡散することを示唆する。次に、ピーク位置を中心とする 3×3 、 7×7 、 11×11 ピク

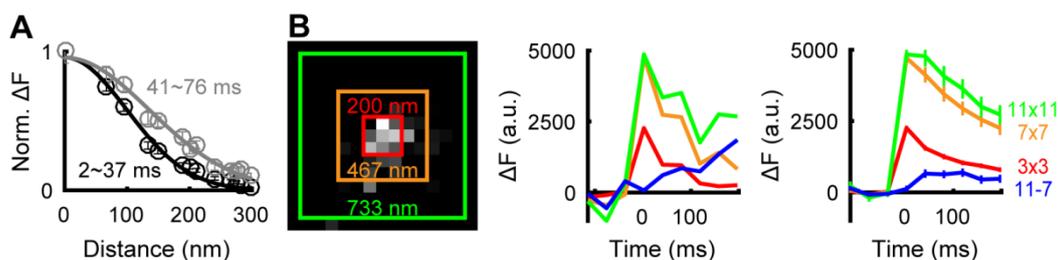


図 18. A. Syb-SEP の輝度のピークを含むピクセルを中心として、中心からの距離に対する Syb-SEP の輝度をグラフにした。Syb-SEP の輝度はピークとなる点から遠ざかるほど減少した。この広がりには 2-37 ミリ秒の時点 (黒) より、41-76 ミリ秒時点 (灰) の方が大きかった。なお、丸印は 10 個の AZLM から得られた 226 回の同期放出の結果の平均と標準偏差を示し、曲線は近似曲線である。

B. 3×3 (赤、 200×200 nm)、 7×7 (橙、 467×467 nm)、 11×11 (緑、 733×733 nm)、 $11 \times 11 - 7 \times 7$ (青) の関心領域における Syb-SEP の輝度変化。領域が広がるほど Syb-SEP の輝度減少は遅くなり、また $11 \times 11 - 7 \times 7$ の領域における輝度は緩やかに上昇した。左に示した AZLM は図 15 で示した AZLM と同じであり、中央のグラフはこの AZLM での結果を示す。右の図は 10 個の AZLM から得られた 226 回の結果の平均と標準偏差を示す。

セルの関心領域を定め、それぞれの関心領域における Syp-SEP の輝度の和の時間変化を求めた (図 18B)。そうしたところ、いずれの領域においても輝度は一過的に上昇して減少したが、関心領域が広くなるほど輝度の減少は緩やかになった。さらに、11×11 ピクセルの領域から 7×7 ピクセルの領域を除いたドーナツ型の領域での輝度変化をみると、刺激後にゆるやかに上昇した。このことも Syp-SEP の側方拡散を支持する。

Syp-SEP の拡散速度を評価するために、シミュレーションを用いて拡散係数を推定した。シミュレーションでは、シナプス小胞膜の表面積に相当する直径 80 nm の円盤状の領域にランダムに分子を配置し、この領域から拡散係数に応じて分子を拡散させ、各時点での分子の分布を元に輝度分布を推定した。輝度のピークを中心とする 3×3 の関心領域での輝度の減少速度についてシミュレーションと実際の結果を比べたところ、拡散係数は $0.17 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ と推定された。また、41-76 ミリ秒時点での Syp-SEP の輝度の広がりについてシミュレーションと実際の結果を比較したところ、拡散係数は $0.19 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ と推定された。

3.4. 同期放出と非同期放出の発生位置とその分布

近年、アクティブゾーンの中で開口放出の起こりやすい領域が複数あるという仮説が提唱されている (Miki et al., 2017; Maschi and Klyachiko 2016)。そこでこの仮説を検証するため

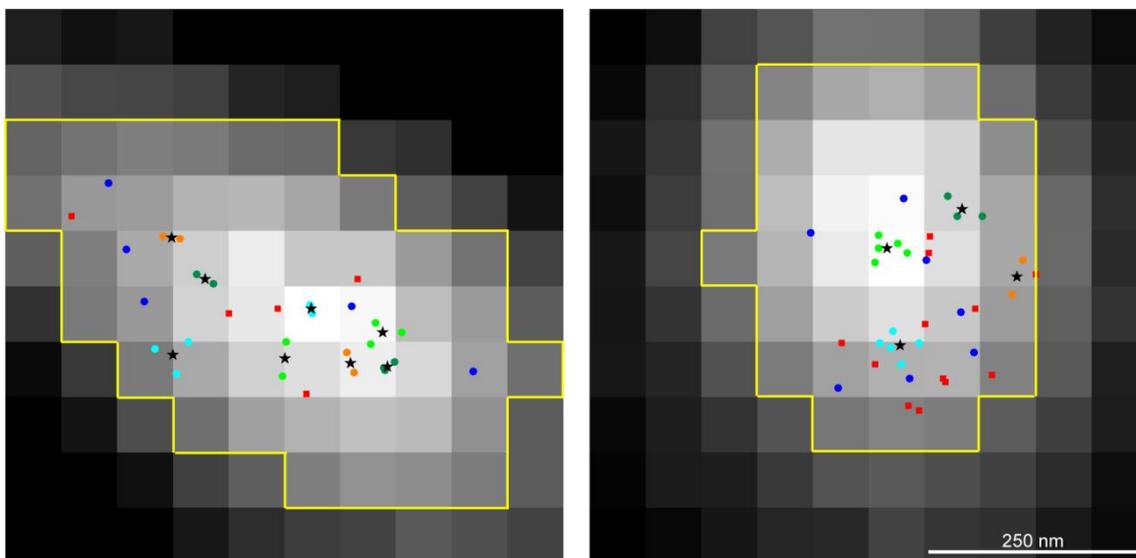


図 19.

CAST 陽性の AZLM における同期放出と非同期放出の発生位置の分布。AZLM 領域を大津法を用いて定め、黄線で囲った。同期放出の発生位置を直径 50 nm のクラスター (水色、黄緑色、深緑色、橙色) に分け、各々のクラスターの中心を星印で示した。また、クラスターに属さなかった同期放出の発生位置を青丸で示し、非同期放出の位置を赤四角で示した。

に、開口放出の発生位置がいくつかの領域に集まっているか否かを調べた。まず、大津法 (ImageJ、NIH) を用いて AZLM 領域を定めた ($0.13 - 0.34 \mu\text{m}^2$)。そして先行研究に基づき、輝度が最も明るくなる時点での Syp-SEP の輝度分布のピーク位置を求め、開口放出の発生位置とした (Tang et al., 2016; 図 19)。開口放出の発生位置が AZLM 内で均一である否かを調べるため、AZLM 領域内でランダムに分布する点の最近隣距離と実際の開口放出の発生位置の最近隣距離を比較した。そうしたところ、開口放出の発生位置の最近隣距離はランダム分布のものより短かった (図 20)。これは、開口放出の発生位置は AZLM 内で均一ではないことを示す。

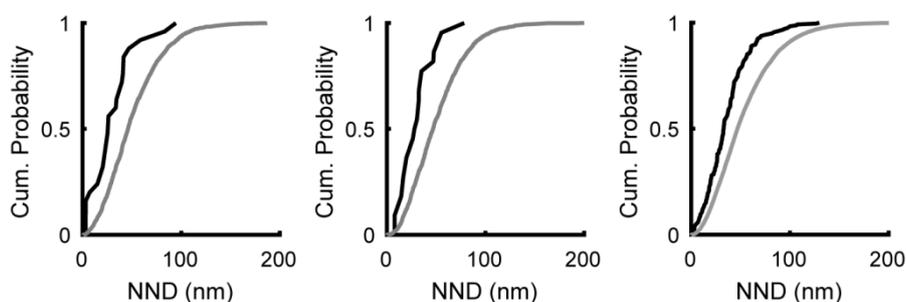


図 20.

AZLM 内での同期放出の位置の最近接距離 (nearest neighbor distance, NND; 黒) と、シミュレーションにより求めた AZLM 内をランダムに分布する点の最近接距離 (灰) の累積度数分布。左の 2 つのグラフは図 19 で示した 2 つの AZLM におけるデータであり、右は 10 個の AZLM から得られたデータをまとめたものである。

また、同期放出の発生位置が特定の領域に集中しているように見えたので、先行研究に基づいてクラスター直径を 50 nm とした階層クラスター分析を行った (Maschi and Klyachiko, 2016)。そうしたところ、同期放出は一つの AZLM につき 5.9 ± 0.6 (3 ~ 8) 個のクラスターに分けられ、同期放出のうち $68 \pm 0.5\%$ がクラスター内で起きていた (6/16 ~ 17/19 回; 10 個の AZLM から得られた 226 回の記録の内 154 回; 図 21A)。これは、同期放出は複数の特定の領域で起こりやすいという先行研究を支持する (Tang et al., 2016; Maschi and Klyachiko, 2016; Miki et al., 2017; Sakamoto et al., 2018)。一方で非同期放出では、 $14 \pm 6\%$ のみが同期放出のクラスター内で起き、これは同期放出と比べて少なかった (0/12 ~ 2/4 回; 10 個の AZLM から得られた 99 回の記録の内 12 回; U 検定で $p < 0.01$)。さらに、同期放出の発生位置から最も近いクラスターの中心までの距離 (40 ± 3 nm; 10 個の AZLM から 226 回) は、各非同期放出の発生位置からクラスター中心までの距離より短かった (68 ± 4 nm; 10 個

の AZLM から 99 回; U 検定で $p < 0.001$; 図 21B)。このことは、非同期放出は同期放出より分散した場所で起こるということを示唆する。ただし、本研究の記録条件では 2-37 ミリ秒までの露光時間の中のどの時点で開口放出が起きたかについては分からない。そのため、私が同期放出として判断した記録の中に、同期放出は活動電位から数ミリ秒以内に起こるとする電気生理学的な基準では、同期放出と見なされないものが混入している可能性が考えられる (Kaesler and Regehr, 2014)。クラスター外で起きた同期放出の発生位置からクラスターの中心までの距離 (90 ± 5 nm; 10 個の AZLM から 72 回) が、非同期放出より遠かった (U 検定で $p < 0.001$; 図 21B) のは、このためかもしれない。

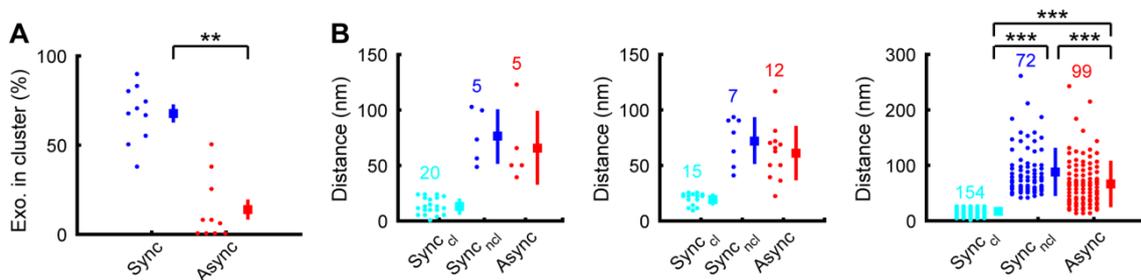


図 21.

- A.** 同期放出のクラスター内で起こった同期放出 (青) と非同期放出 (赤) の割合。小さな点は各 AZLM での値に相当し、四角と線は平均と標準偏差を表す。**は U 検定で $p < 0.01$ であったことを表す。
- B.** 各開口放出の位置と最も近い同期放出クラスターの中心まで距離。水色はクラスターに属する同期放出、青はクラスターに属さない同期放出、赤は非同期放出を示す。図中の数字はそれぞれの記録の数を示す。また、左の 2 つのグラフは図 19 で示した AZLM のデータであり、右は 10 個の AZLM すべてから得たデータを示す。***は U 検定と Bonferroni 補正を行って $p < 0.001$ であったことを表す。

4. 考察

4.1. 全反射蛍光顕微鏡の観察領域内での AZLM の形成

本研究では、neuroigin でコートしたガラス面の直上に AZLM を形成させて全反射蛍光顕微鏡で観察し、1 回の開口放出に伴うシナプス小胞膜タンパク質の動態を、高いシグナルノイズ比かつ高時空間分解能で記録した。この AZLM はガラス面直上の単一焦点面でのみ観察されたことから、ガラス面に平行に形成されたと推測され、アクティブゾーンの傾きによる蛍光輝度への影響を受けにくいと考えられる。AZLM には主要なアクティブゾーンタンパク質が集積しており、電場刺激によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇や開口放出が起こったことから、AZLM はアクティブゾーンとしての基本的な機能を有していると考えられる。

しかし AZLM は人工的な構造であり、成熟したシナプス前部本来の機能の一部を失っている可能性がある。細胞外液の Ca^{2+} 濃度が 4 mM の条件のもとで、1 回の刺激に対するシナプス前部あたりの放出確率が 0.17 というのは、先行研究と比べて低い。Sakamoto ら (2018) は、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸と結合して蛍光を発する EOS 分子 (glutamate optic sensor) を用いて 1 つの release site あたりの放出確率を 0.51 と報告した。また、AZLM では 150 回以上繰り返して記録すると開口放出が起こりにくくなった。これは長時間撮影によって Syp-SEP が退色してしまったことによるとも考えられるが、Syp-SEP を取り込んで新しいシナプス小胞を再構築する機構が未成熟な可能性もある。AZLM が未成熟な状態である原因として、neuroigin 以外のシナプス間接着分子の不足が考えられる。シナプス後部に発現する SynCAM (synaptic cell-adhesion molecule) はシナプス前部に発現する SynCAM と、LRRTM (leucine-rich repeat transmembrane protein) は neurexin と、cadherin は同種の cadherin と結合してシナプスの形成に寄与することが知られている (Gerrow and El-Husseini, 2006; Pinto and Almeida, 2016)。これらのタンパク質がガラス面上になかったために、AZLM が未成熟になったのかもしれない。また、この論文で全反射蛍光顕微鏡を用いて観察された AZLM の面積 ($0.13 - 0.34 \mu\text{m}^2$) は、先行研究において電子顕微鏡を用いて観察されたアクティブゾーンと比べて大きく ($0.04 \mu\text{m}^2$; Holderith et al., 2012)、その一部でしか開口放出が起こらなかった。この大きさの違いが生じた原因として、蛍光顕微鏡での回折と CAST-RFP の過剰発現により CAST 陽性の領域が広がったことが考えられる。そして、CAST 以外のアクティブゾーンタンパク質が不足して、放出を起こせない領域が生じたのかもしれない。

4.2. シナプス小胞膜タンパク質の開口放出後の動態

シナプス小胞は直径 40~50 nm の微細な構造であるが、多種のタンパク質をその膜上に有しており、このタンパク質の数は種類ごとに一定であると考えられている (Takamori et al., 2006)。そのため、シナプス小胞膜タンパク質は開口放出によって細胞膜に移った後にも 1 つの集団として残り、そのまま取り込まれるというモデルが提唱されている (Willig et al., 2006; Opazo et al., 2010)。一方で、細胞膜に移った小胞膜タンパク質は拡散し、その後再集合するというモデルも提唱されている (Gimber et al., 2015)。これらの 2 つの説に対して、私の結果は Syp-SEP が細胞膜上を拡散することを示しており、後者を支持するものとなった (図 22A)。そして、Syp-SEP の拡散係数をシミュレーションを用いて推測したところ、 $0.17 - 0.19 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ となった。これは、Gimber ら (2015) の推測した synaptobrevin の細胞膜上での拡散係数と近い値であり ($0.2 - 0.35 \mu\text{m}^2/\text{秒}$)、1 分子追跡法で求めた細胞膜上を自由拡散する syntaxin の拡散係数とも近い値となった ($0.25 \mu\text{m}^2/\text{秒}$; Ribault et al., 2011)。これらの知見から、細胞膜上の synaptophysin は他の分子と強い結合などをせずに、ほぼ自由拡散すると考えられる。しかし、synaptotagmin (Syt) や vesicular glutamate transporter (vGlut) 等の他の小胞膜タンパク質がどのような動態を示すかは不明であり、今後の課題である。

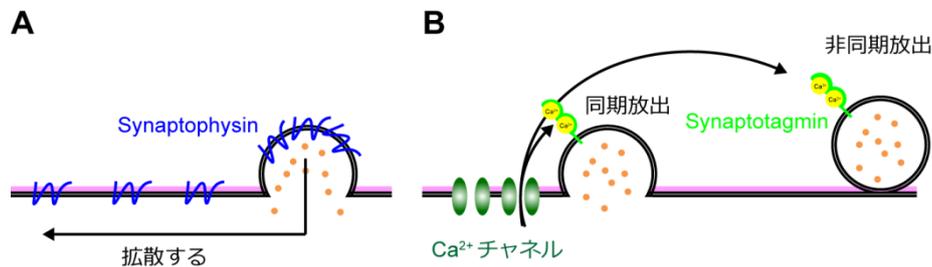


図 22. 開口放出後の小胞膜タンパク質の動態と、開口放出と非同期放出の位置についてのモデル。

A. 本研究の結果では Syp-SEP は細胞膜上を拡散し、その拡散係数は細胞膜を自由拡散する分子の拡散係数に近かった。このことから、synaptophysin は細胞膜に移動した後、他の分子との結合等をせずに、ほぼ自由拡散すると考えられる。

B. 本研究の結果では同期放出の発生位置はクラスター状に分布し、非同期放出の発生位置は同期放出より分散していた。このことから、AZLM には同期放出に適した Ca^{2+} チャンネル近くの部位があり、非同期放出はそこから離れた場所で起こると考えられる。

4.3. 開口放出の発生位置と非同期放出を引き起こす分子機構

近年、アクティブゾーンの内部では開口放出に関連する分子が集積して release sites を作っており、この release sites は 1 つのアクティブゾーンあたり複数個あるという主張がなさ

れている。Miki ら (2017) は、小脳平行線維から抑制性介在神経細胞に投射するシナプス前部には約 3 個の電位依存性 Ca^{2+} チャネルのクラスターがあり、この数は電気生理学的なデータに基づいて推測した release sites 数と一致すると報告した。Maschi ら (2017) は SEP で標識した vGlut を蛍光顕微鏡で観察して開口放出の位置を求め、海馬錐体細胞のシナプス前部には約 10 個の release sites があつたと報告した。また Sakamoto ら (2018) は、海馬錐体細胞のシナプス前部では開口放出に関連するタンパク質である Munc13 が約 6 個のクラスターを作り、この数はグルタミン酸に結合して蛍光を発する EOS 分子を用いた生細胞観察により推測した release site 数と一致したと報告した。私の結果では、同期放出の発生位置は 1 つのシナプスあたり 3~8 個のクラスターを作っており、この値は上述した先行研究とほぼ一致するものとなった。

非同期放出と同期放出の違いは Ca^{2+} に依存した分子機構により生じると考えられている。ゆっくりとした Ca^{2+} キレートを行う EGTA を細胞内に導入すると、非同期放出が特異的に起こりにくくなるという報告から (Hagler et al., 2001)、非同期放出は docking したシナプス小胞と電位依存性 Ca^{2+} チャネルが遠いため生じるという説がある。また、 Ca^{2+} を感知して開口放出を誘導する Syt のサブタイプの違いにより同期放出と非同期放出が決まるといふ説もある。これは海馬抑制性神経細胞において Syt1 の発現量を減らすと同期放出が減り、Syt7 の発現量を減らすと非同期放出が減るといふ報告に基づく (Bacaj et al., 2013)。興味深いことに私の実験結果では、非同期放出の発生位置は同期放出より分散していた。これは、同期放出に適した部位は Ca^{2+} チャネルに近く、非同期放出はそうした部位から離れた場所で起こったためと考えることができる (図 22B)。ただしこの結果は、同期放出と非同期放出で異なるサブタイプの Syt が用いられるという説とも矛盾しない。ところで、私の実験では非同期放出の一部を同期放出として分類している可能性がある。同期放出は活動電位の到来から数ミリ秒以内に起こるのに対して、本研究での撮影頻度は 39 ミリ秒に 1 枚と遅い。そのため、刺激直後の時点 (2-37 ミリ秒) で開口放出が検出され、同期放出が起きたと判断された記録の中には、2-37 ミリ秒の期間の後半で非同期放出が起きたものを含んでいる可能性がある。

4.4. まとめ

本研究では、(1) 開口放出後のシナプス小胞膜タンパク質の動態を明らかにすること、(2) 同期放出と非同期放出の位置関係を調べて各々の制御機構の解明に寄与することを目的と

して、neurologin でコートされたガラス面の直上に AZLM を形成させて、全反射蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング実験を行った。そして、1 回の開口放出に伴う AZLM 内での Syp-SEP の動態を観察し、開口放出後に synaptophysin が細胞膜上を自由拡散することと、非同期放出の発生位置は同期放出と比べて分散していることを示した。この結果は、同期放出に適した部位は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに近く、非同期放出はそうした部位から離れた場所で起こったと考えることで説明できる。

私が開発した AZLM を全反射蛍光顕微鏡で観察するという手法は、蛍光標識する方法を変えることで様々なタンパク質に容易に応用でき、シナプス前部での分子動態を高シグナルノイズ比かつ高時空間分解能で解析できる。最近、私の所属する研究室で既に開発された、細胞外液の pH を短時間で変える手法 (Fujii et al., 2017) を組み合わせれば、AZLM 周辺でのシナプス小胞膜タンパク質のエンドサイトーシスも観察できるだろう。従って、全反射蛍光顕微鏡を用いて AZLM での SEP 標識されたタンパク質を観察する手法は、アクティブゾーンの基本的な機能と性質を調べるに際して優れた実験方法であると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり根気強い指導をいただきました平野丈夫教授に、深く感謝します。田中洋光助教には、学部生の頃から実験手法を教えていただき、また進路のこと等についても相談に乗っていただきました。厚く御礼申し上げます。川口真也准教、大槻元准教、鹿児島大学に移られました田川義晃教授からは、研究に対する姿勢やアカデミックという世界について、また研究に関するアドバイスなど様々なことを教えていただきました。秘書の田中優子さん、北村彩子さんには円滑な研究をサポートしていただきました。エリザベス中島さんには論文の英語を添削していただき、また英語論文の書き方についてアドバイスをいただきました。感謝申し上げます。井下君をはじめとする研究室のメンバーや既に就職されました藤井先輩には、研究や就職についての意見を頂き、居室や飲み会などの研究生生活を盛り上げていただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

最後に、経済的に、精神的に支えていただいた家族に深く感謝します。

船橋 潤一郎

参考文献

- Acuna, C., Liu, X., Gonzalez, A., Südhof, T.C. (2015). RIM-BPs mediate tight coupling of action potentials to Ca^{2+} -triggered neurotransmitter release. *Neuron* 87, 1234-1247.
- Aravanis, A.M., Pyle, J.L., and Tsien, R.W. (2003). Single synaptic vesicles fusing transiently and successively without loss of identity. *Nature* 423, 643-647.
- Auger, C., Kondo, S., and Marty, A. (1998). Multivesicular release at single functional synaptic sites in cerebellar stellate and basket cells. *J. Neurosci.* 18, 4532-4547.
- Axelrod, D. (2001). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic* 2, 764-774.
- Bacaj, T., Wu, D., Yang, X., Morishita, W., Zhou, P., Xu, W., et al. (2013). Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron* 80, 947-59.
- Balaji, J., and Ryan, T.A. (2007). Single-vesicle imaging reveals that synaptic vesicle exocytosis and endocytosis are coupled by a single stochastic mode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 20576-20581.
- Blakely, R.D., and Edwards, R.H. (2012). Vesicular and plasma membrane transporters for neurotransmitters. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, doi: 10.1101/cshperspect.a005595.
- Boucard, A.A., Chubykin, A.A., Comoletti, D., Taylor, P., Südhof, T.C. (2005). A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48, 229-236.
- Bucurenciu, I., Kulik, A., Schwaller, B., Frotscher, M., and Jonas, P. (2008). Nanodomain coupling between Ca^{2+} channels and Ca^{2+} sensors promotes fast and efficient transmitter release at a cortical GABAergic synapse. *Neuron* 57, 536-545.
- Cases-Langhoff, C., Voss, B., Garner, AM., Appeltauer, U., Takei, K., Kindler, S., et al. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 214-223.
- Catterall, W.A. (2011). Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, doi: 10.1101/cshperspect.a003947.
- Chen, X., Barg, S., and Almers, W. (2008). Release of the styryl dyes from single synaptic vesicles

- in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 28, 1894-1903.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S L., Baohan, A., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300.
- Cheung, G, Jupp, O.J., and Cousin, M.A. (2010). Activity-dependent bulk endocytosis and clathrin-dependent endocytosis replenish specific synaptic vesicle pools in central nerve terminals. *J. Neurosci.* 30, 8151-8161.
- Chih, B., Gollan, L., and Scheiffele, P. (2006). Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51, 171-178.
- Clayton, E.L., and Cousin, MA. (2009). The molecular physiology of activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurochem.* 111, 901-914.
- Clayton, E.L., Evans, G.J., and Cousin MA. (2008). Bulk synaptic vesicle endocytosis is rapidly triggered during strong stimulation. *J. Neurosci.* 28, 6627-6632.
- Coppola, T., Magnin-Luthi, S., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Schiavo, G., Regazzi, R. (2001). Direct interaction of the Rab3 effector RIM with Ca²⁺ channels, SNAP-25, and synaptotagmin. *J. Biol. Chem.* 276, 32756-32762.
- Craig, A.M., and Kang, Y. (2007). Neurexin-neuroligin signaling in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 43-52.
- Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., et al. (2003). Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* 6, 708-716.
- Deng, L., Kaeser, P.S., Xu, W., Südhof, T.C. (2011). RIM proteins activate vesicle priming by reversing autoinhibitory homodimerization of Munc13. *Neuron* 69, 317-331.
- Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S.P., and Jonas P. (2011). Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 7-21.
- Farsi, Z., Preobraschenski, J., van den Bogaart, G., Riedel, D., Jahn, R., Woehler, A. (2016). Single-vesicle imaging reveals different transport mechanisms between glutamatergic and GABAergic vesicles. *Science* 351, 981-984.
- Ferguson, S.M., Brasnjo, G., Hayashi, M., Wölfel, M., Collesi, C., Giovedi, S., et al. (2007). A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* 316, 570-574.

- Fujii, S., Tanaka, H., and Hirano, T. (2017). Detection and characterization of individual endocytosis of AMPA-type glutamate receptor around postsynaptic membrane. *Genes Cells*, 22, 583-590.
- Gandhi, S.P., and Stevens, C.F. (2003). Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. *Nature* 423, 607-613.
- Gerber, S.H., Rah, J.-C., Min, S.-W., Liu, X., de Wit, H., Dulubova, I., et al. (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* 321, 1507-1510.
- Gerrow, K., and El-Husseini, A. (2006). Cell adhesion molecules at the synapse. *Front. Biosci.* 11, 2400-2419.
- Gimber, N., Tadeus, G., Maritzen, T., Schmoranzer, J., and Haucke, V. (2015). Diffusional spread and confinement of newly exocytosed synaptic vesicle proteins. *Nat. Commun.* 6, 8392. [https://doi: 10.1038/ncomms9392](https://doi:10.1038/ncomms9392)
- Graf, E.R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M.W., and Craig, A. M. (2004). Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 119, 1013-1026.
- Granseth, B., Odermatt, B., Royle, S.J., and Lagnado, L. (2006). Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron* 51, 773-786.
- Gundelfinger, E.D., Reissner, C., Garner, C.C. (2016). Role of bassoon and piccolo in assembly and molecular organization of the active zone. *Front. Synaptic Neurosci.* 7, doi: 10.3389/fnsyn.2015.00019
- Hallermann, S., Fejtova, A., Schmidt, H., Weyhersmüller, A., Silver, R.A., Gundelfinger, E.D., et al. (2010). Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse. *Neuron* 68, 710-723.
- Haucke, V., Neher, E., and Sigrist, S.J. (2011) Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 127-138.
- He, L., Wu, X.-S., Mohan, R., and Wu, L.-G. (2006). Two modes of fusion pore opening revealed by cell-attached recordings at a synapse. *Nature* 444, 102-105.
- Hefft, S., and Jonas, P. (2005). Asynchronous GABA release generates long-lasting inhibition at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. *Nat. Neurosci.* 8, 1319-1328.
- Heuser, J.E., Reese, T.S., Dennis, M.J., Jan, Y., Jan, L., Evans, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81, 275-300.

- Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaja, M., Hudspeth, A.J., Lesage F. (2002). RIM binding proteins (RBPs) couple Rab3-interacting molecules (RIMs) to voltage-gated Ca^{2+} channels. *Neuron* 34, 411-423.
- Hua, Y., Woehler, A., Kahms, M., Haucke, V., Neher, E., Klingauf, J. (2013). Blocking endocytosis enhances short-term synaptic depression under conditions of normal availability of vesicles. *Neuron* 80, 343-349.
- Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C., et al. (1995). Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell* 81, 435-443.
- Imig, C., Min, S.W., Krinner, S., Arancillo, M., Rosenmund, C., Südhof, T.C., et al. (2014). The morphological and molecular nature of synaptic vesicle priming at presynaptic active zones. *Neuron* 84, 416-431.
- Isomura, H., Tsurumi, T., and Stinski, M.F. (2004). Role of the proximal enhancer of the major immediate-early promoter in human cytomegalovirus replication. *J. Virol.* 79, 12788-12799.
- Juge, N., Gray, J.A., Omote, H., Miyaji, T., Inoue, T., Hara, C., et al. (2010). Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68, 99-112.
- Kaesler, P.S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J. et al. (2011). RIM proteins tether Ca^{2+} channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell* 144, 282-295.
- Kaesler, P.S., and Regehr, W.G. (2014). Molecular mechanisms for synchronous, asynchronous, and spontaneous neurotransmitter release. *Ann. Rev. Physiol.* 76, 333-363.
- Katz, B. and Miledi, R. (1969). Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J. Physiol.* 203, 689-706.
- Kavalali, E.T., and Jorgensen, E.M. (2014). Visualizing presynaptic function. *Nat. Neurosci.* 17, 10-16.
- Kawaguchi, S.-Y., and Hirano, T. (2006). Integrin $\alpha 3\beta 1$ suppresses long-term potentiation at inhibitory synapses on the cerebellar Purkinje neuron. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 416-426.
- Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., et al. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca^{2+} channel clustering, and vesicle release. *Science* 312, 1051-1054.
- Kiyonaka, S., Wakamori, M., Miki, T., Uriu, Y., Nonaka, M., Bito, H., et al. (2007). RIM1 confers

- sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nat. Neurosci.* 10, 691-701.
- Kobayashi, S., Hida, Y., Ishizaki, H., Inoue, E., Tanaka-Okamoto, M., Yamasaki, M., et al. (2016). The active zone protein CAST regulates synaptic vesicle recycling and quantal size in the mouse hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 44, 2272-2284.
- Kononenko, N.L., and Haucke, V. (2015). Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron* 85, 484-496.
- Langnaese, K., Seidenbecher, C., Wex, H., Seidel, B., Hartung, K., Appeltauer, U., et al. (1996). Protein components of a rat brain synaptic junctional protein preparation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42, 118-122.
- Liu, C., Bickford, L.S., Held, R.G., Nyitrai, H., Südhof, T.C., Kaeser, P.S. (2014). The active zone protein family ELKS supports Ca^{2+} influx at nerve terminals of inhibitory hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 34, 12289-12303.
- Liu, K.S., Siebert, M., Mertel, S., Knoche, E., Wegener, S., Wichmann, C., Matkovic, T., et al. (2011). RIM-binding protein, a central part of the active zone, is essential for neurotransmitter release. *Science* 334, 1565-1569.
- Luo, F., Südhof, T.C. (2017). Synaptotagmin-7-mediated asynchronous release boosts high-fidelity synchronous transmission at a central synapse. *Neuron* 94, 826-839.
- Maruyama, I.N., and Brenner, S. (1991). A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the *unc-13* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5729-5733.
- Maschi, D., and Klyachko, V. A. (2017). Spatiotemporal regulation of synaptic vesicle fusion sites in central synapses. *Neuron* 94, 65-73.
- Midorikawa, M., and Sakaba, T. (2015). Imaging exocytosis of single synaptic vesicles at a fast CNS presynaptic terminal. *Neuron*, 88 492-498.
- Miesenböck, G., De Angelis, D.A., and Rothman, J.E. (1998). Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394, 192-195.
- Miki, T., Kaufmann, W.A., Malagon, G., Gomez, L., Tabuchi, K., Watanabe, M., et al. (2017). Numbers of presynaptic Ca^{2+} channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single cell synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E5246-E5255.
- Monier, S., Jollivet, F., Janoueix-Lerosey, I., Johannes, L., Goud, B. (2002). Characterization of

- novel Rab6-interacting proteins involved in endosome-to-TGN transport. *Traffic* 3, 289-297.
- Mukherjee, K., Yang, X., Gerber, S.H., Kwon, H.B., Ho, A., Castillo, P.E., et al. (2010). Piccolo and bassoon maintain synaptic vesicle clustering without directly participating in vesicle exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 6504-6509.
- Nakata, T., Kitamura, Y., Shimizu, K., Tanaka, S., Fujimori, M., Yokoyama, S., et al. (1999). Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 25, 97-103.
- Neher, E., and Sakaba, T. (2008). Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59, 861-872.
- Ohtsuka, T., Takao-Rikitsu, E., Inoue, E., Inoue, M., Takeuchi, M., Matsubara, K. et al. (2002). CAST: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and Munc13-1. *J. Cell Biol.* 158, 577-590.
- Opazo, F., Punge, A., Bückers, J., Hoopmann, P., Kastrop, L., Hell, S.W., et al. (2010). Limited intermixing of synaptic vesicle components upon vesicle recycling. *Traffic*, 11, 800-812.
- Pettem, K.L., Yokomaku, D., Takahashi, H., Ge, Y., and Craig, A.M. (2013). Interaction between autism-linked MDGAs and neuroligins suppresses inhibitory synapse development. *J. Cell Biol.* 200, 321-336.
- Pinto, M.J., Almeida, R.D. (2016). Puzzling out presynaptic differentiation. *J. Neurochem.* 139, 921-942.
- Pulido, C., and Marty, A. (2017). Quantal fluctuations in central mammalian synapses: functional role of vesicular docking sites. *Physiol Rev.* 97, 1403-1430.
- Ribrault, C., Reingruber, J., Petković, M., Galli, T., Ziv, N.E., Holcman, D., et al. (2011). Syntaxin 1A lateral diffusion reveals transient and local SNARE interactions. *J. Neurosci.* 31, 17590-17602.
- Richmond, J.E., Weimer, R.M., Jorgensen, E.M. (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412, 338-341.
- Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N., Sugao, K., Taiko, I., Takikawa, K., et al. (2018). Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat. Neurosci.* 21, 41-49.
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R., and Serafini, T. (2000). Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657-669.

- Schenck, S., Wojcik, S.M., Brose, N., Takamori, S. (2009). A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* 12, 156-162.
- Schoch, S., and Gundelfinger, E.D. (2006). Molecular organization of the presynaptic active zone. *Cell Tissue Res.* 326, 379-391.
- Schreiner, D., Nguyen, T.M., Russo, G., Heber, S., Patrignani, A., Ahrné, E., et al. (2014). Targeted combinatorial alternative splicing generates brain region-specific repertoires of neurexins. *Neuron* 84, 386-398.
- Shaner, N.C., Lin, M.Z., McKeown, M.R., Steinbach, P.A., Hazelwood, K.L., Davidson, M.W., et al. (2008). Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods* 5, 545–551.
- Sochacki, K.A., Larson, B.T., Sengupta, D.C., Daniels, M.P., Shtengel, G., Hess, H. F., et al. (2012). Imaging the post-fusion release and capture of a vesicle membrane protein. *Nat. Commun.* 3, 1154. [https://doi: 10.1038/ncomms2158](https://doi.org/10.1038/ncomms2158)
- Stevens, C.F. (2003). Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 40, 381-388.
- Südhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11-25.
- Südhof, T.C. (2013). Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron* 80, 675-90.
- Sun, J., Pang, Z.P., Qin, D., Fahim, A.T., Adachi, R., and Südhof, T.C. (2007). A dual-Ca²⁺-sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature* 450, 676-682.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., et al. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127, 831-846.
- Tanaka, H., and Hirano, T. (2012). Visualization of subunit-specific delivery of glutamate receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. *Cell Rep.* 1, 291-298.
- Tanaka, H., Fujii, S., and Hirano, T. (2014). Live-cell imaging of receptors around postsynaptic membranes. *Nat. Protoc.* 9, 76-89.
- Tang, A.-H., Chen, H., Li, T.P., Metzbower, S.R., MacGillavry, H.D., and Blanpied, T.A. (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature* 536, 210–214.
- Tong, G., and Jahr, C.E. (1994). Multivesicular release from excitatory synapses of cultured hippocampal neurons. *Neuron* 12. 51-59.
- Ullrich, B., Ushkaryov, Y.A., Südhof, T.C. (1995). Cartography of neurexins: more than 1000

- isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron* 14, 497-507.
- Ushkaryov, Y.A., Petrenko, A.G., Geppert, M, Südhof, T.C. (1992). Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science* 257, 50-56.
- von Gersdorff, H., and Matthews, G. (1994). Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature* 367, 735-739.
- von Gersdorff, H., and Borst, J.B.G. (2002). Short-term plasticity at the calyx of held. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 53-64.
- Vyleta, N.P., and Jonas, P. (2014). Loose coupling between Ca^{2+} channels and release sensors at a plastic hippocampal synapse. *Science* 343, 665-670.
- Watanabe, S., Rost, B.R., Camacho-Pérez, M., Davis, M.W., Söhl-Kielczynski B, Rosenmund, C., et al. (2013). Ultrafast endocytosis at mouse hippocampal synapses. *Nature* 504, 242-247.
- Watanabe, S., Trimbuch, T., Camacho-Pérez, M., Rost, B.R., Brokowski, B., Söhl-Kielczynski, B. et al. (2014). Clathrin regenerates synaptic vesicles from endosomes. *Nature* 515, 228-233.
- Wienisch, M., and Klingauf, J. (2006.) Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical. *Nat. Neurosci.* 9, 1019-1027.
- Willig, K.I., Rizzoli, S.O., Westphal, V., Jahn, R., and Hell, S.W. (2006). STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* 440, 935-939.
- Wu, L.-G., Hamid, E., Shin, W., and Chiang, H.-C. (2014). Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 301-331.
- Xu, J., Mashimo, T., and Südhof T.C. (2007). Synaptotagmin-1, -2, and -9: Ca^{2+} sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron* 54, 567-581.
- Yamashita, T., Hige, T., and Takahashi, T. (2005). Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse. *Science* 307, 124-127.
- Zhang, Q., Li, Y., and Tsien, R.W. (2009). The dynamic control of kiss-and-run and vesicular reuse probed with single nanoparticles. *Science* 323, 1448-1453.