

令和 3 年 4 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03548

研究課題名（和文）中枢神経シナプス前終末における小胞動態の超解像ライブイメージング

研究課題名（英文）Super resolution live imaging of synaptic vesicle at neuronal presynaptic terminal

研究代表者

緑川 光春（Midorikawa, Mitsuharu）

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60632643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：性質の異なる複数の中枢神経シナプス前終末において、シナプス小胞動態を超解像ライブイメージングによって測定した。シナプスの機能に応じて小胞動態が異なっていることが明らかになり、シナプス機能の重要な基盤であるシナプス前機能について重要な知見を得ることに成功した。また、学習・発達によってシナプス機能が可塑的に変化する際のシナプス前機構の変化についても複数のシナプスでその詳細を明らかにすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス小胞からの神経伝達物質の放出機構は、中枢神経回路において神経細胞同士の情報伝達を担う重要な細胞機能であり、その詳細を明らかにすることは脳機能を理解する上で避けては通れない命題である。本研究による成果は様々な細胞からの多様な神経伝達物質放出様式を可能にしている基盤現象を示したものであり、将来的にはこれらの異常を原因とする様々な精神疾患の原因究明や治療戦略の創出の萌芽となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：By applying super resolution live imaging to presynaptic terminals at central nervous system, we found that the kinetics of synaptic vesicles were diverse among synapses with distinct functions. We also found some detailed presynaptic mechanisms underlies the plastic changes of the synaptic functions, which is assumed to be crucial for remodeling of the neuronal circuit following learning or development.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 開口放出 ライブイメージング 電気生理

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする多細胞生物では細胞同士の協調が重要であり、そのための細胞間情報伝達機構が高度に発達している。細胞間の情報伝達を行う上で、開口分泌現象は生理活性分子の放出を担う重要な細胞現象であり、その仕組みは細胞内の分泌小胞が細胞外へとつながり分泌小胞内の化学物質が放出されるというものである。**開口放出機構はホルモン、神経伝達物質、酵素などといった様々な化学物質が細胞から放出される際に用いられる共通の分泌機構であり、この機構に異常が生じると精神・運動疾患、糖尿病、アレルギーなどの様々な疾患を引き起こすため、その全貌を明らかにすることはこれらの病態メカニズムの理解や治療戦略の開発にもつながる重要な基礎研究である。**

開口放出部位において、分泌小胞は伝達物質放出部位への動員(**ドッキング**)、伝達物質放出への分子的準備(**プライミング**)、開口放出、エンドサイトーシスによる小胞膜の再取り込み、伝達物質の再充填といった一連のサイクルを経て再利用されると考えられている(Südhof, 2004, *Annu Rev Neurosci*)。研究代表者は生体内の数ある分泌現象の中でも最も速い、中枢神経からの開口放出に着目した。中枢神経では、細胞内小器官の中でも最小の部類に入るシナプス小胞(**直径約 40 nm**)が、活動電位に応じて非常に素早く(**1 ms 以内**)、開口放出を起こす。開口放出自体、あるいはその後に生じるエンドサイトーシスの動態は電気生理学的手法によってかなり解明が進んでいる。その一方で開口放出前、およびエンドサイトーシス後の小胞の動態は電氣的にこれを検出する手段がなく、光学的にも十分な解像度を持つ測定法が存在しなかったため、固定標本を用いた電子顕微鏡による形態研究に依存している状況である。しかし、**これらのダイナミックな現象を捉えるには時間分解能が問題となる。**

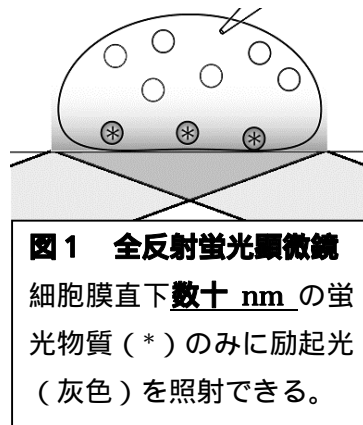


図1 全反射蛍光顕微鏡
細胞膜直下**数十 nm**の蛍光物質(*)のみに励起光(灰色)を照射できる。

この現象を解明するために、全反射蛍光顕微鏡(図1)を用いた光学的測定を試みた。**全反射蛍光顕微鏡はz軸上で数十nm程度の分解能があり、ライブイメージングが可能な光学的検鏡法でありながら電子顕微鏡に迫るレベルでの分解能を実現している(通常の光学顕微鏡の分解能は250~300nm)**。研究代表者らは単離した聴覚系カリックス型神経終末(calyx of Held)において、FM色素で蛍光標識した個々のシナプス小胞を全反射蛍光顕微鏡下で観測することに成功し、**中枢神経細胞からの単一シナプス小胞の開口放出を世界で初めてライブイメージングによって捉えた**(Midorikawa and Sakaba, 2015, *Neuron*)。この標本は、研究代表者が研究開始時に所属していた研究室において長年スライス標本で研究対象としてきたもので、(Sakaba et al. 2005 *Science*, Hosoi et al. 2009 *Neuron*, Okamoto et al., 2016 *eLife* など)シナプス応答から伝達物質放出機構のモデルが構築されており、実験結果の予想がしやすいという利点があった。

一方で、カリックス型シナプスは聴覚系の音源定位を司る重要な神経素子であるという性質上、中枢神経系シナプスの大きな特徴である可塑性をほとんど示さないことが知られている。そこで研究代表者らは可塑性を持ち、単一シナプス小胞の開口放出が測定可能な中枢神経系シナプス標本を模索し、予備実験によって海馬苔状線維終末において単一シナプス小胞の可視化が可能であることを発見した(図2)。海馬苔状線維終末はCA3錐体細胞にシナプスを作っているが、神経線維の連続刺激で伝達物質放出量が増大し、それが数時間の単位で持続する長期増強を起こすことが知られている。

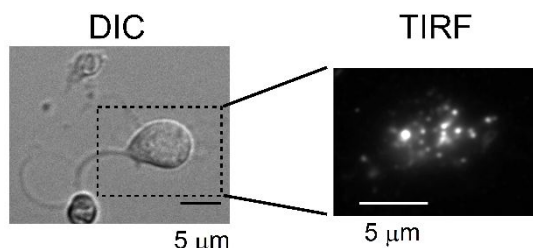


図2 単離した苔状線維終末(左)と全反射蛍光顕微鏡によるシナプス小胞像(右)

2. 研究の目的

全反射蛍光顕微鏡による、回析限界を超えた超解像ライブイメージングによってシナプス小胞の動態を測定し、機能分子の阻害や可塑性や発達による変化によってそれらがどう変化するのかを明らかにすることを目的とした。

開口放出前後に生じる現象として未だにほぼ未解明な問題として、**シナプス小胞の細胞膜へのドッキングとプライミングが、どのような時間経過で、また、何に依存して生じているのか**、というものがある。研究代表者は本研究課題申請時において既に単一シナプス小胞の開口放出を可視化する技術を持っていたので、それぞれの段階における経過時間がどのようになっているのかについて、さらに詳細な測定を行う計画であった。さらには、カリックス型シナプスにおける発達による伝達物質放出機構の成熟に伴う変化、海馬苔状線維終末における可塑性誘導に伴う変化を、単一シナプス小胞動態レベルの変化としてライブイメージングによって捉えるこ

とを目的とした。

また、開口放出された小胞膜はその後エンドサイトーシスによって再び終末内に取り込まれるが、その動態を単一小胞レベルでリアルタイムに測定した研究は報告されていなかった。そこで、エンドサイトーシス部位と開口放出部位との位置関係や、再取り込み小胞が形成される時間経過について、ライブイメージングによって捉えることを目指した。

また、開口放出に重要な役割を果たしていると考えられるタンパク質の候補を絞り、それらのタンパク質の分布や動態を可視化し、超解像度顕微鏡である全反射蛍光顕微鏡、STED、STORM 顕微鏡などによるナノスケールアプローチによって光学限界以上の解像度で測定することを目指した。

3. 研究の方法

直径 5-10 ミクロンの大きさを持つ齧歯動物海馬にある苔状繊維終末を酵素によって急性単離し、終末をガラス面に接着させ、個々のシナプス小胞を全反射蛍光顕微鏡で可視化した。研究代表者らが確立した、小胞膜を標識する FM1-43 を用いた方法で単一シナプス小胞およびそれらの開口放出の可視化を試みた。さらに、遺伝子操作が容易であり、発達・活動依存的に顕著な可塑的機能変化を起こすこと知られていたマウスの視床体性感覚野シナプスに着目した。入力線維である内側毛帯線維のシナプス前終末に対して電気生理学的手法を適用し、開口放出動態が発達・経験依存的にどのように変化するかを解明を試みた。

(1) 海馬苔状繊維終末における単一シナプス小胞開口放出の可視化

図 2 に示したように、研究代表者らは既に海馬苔状繊維終末を急性単離することによって、全反射蛍光顕微鏡下で単一シナプス小胞が可視化できることを発見していた。この標本は直径 5-10 ミクロンほどであるため、パッチクランプ法を直接適用してその性質を電気生理学的に詳しく調べることができるのが大きな利点である。

この標本において単一シナプス小胞開口放出の可視化法を確立するために、FM1-43 によってシナプス小胞を標識し、ホールセルクランプ下での脱分極刺激によって開口放出を誘発できるようにするためのプロトコルを確立することを目指した。分泌細胞やカリックス型シナプス終末における小胞動態と、中枢でより一般的な小型シナプス終末であると考えられる苔状繊維終末の小胞動態に差があるかどうかに着目して実験・解析を行った。海馬苔状繊維終末の開口放出特性は、カリックス型シナプス終末ほどよく分かっているわけではないため、膜容量測定法を用いてこれを詳細に調べた。

また、海馬苔状線維終末は CA3 錐体細胞にシナプスを作っているが、神経線維の連続刺激で伝達物質放出量が増大し、それが数時間単位で持続する長期増強がおこる。しかし、どのようにして長期増強がおこるかは、鍵になる分子の候補があげられているのみでメカニズム自体はわかっていなかった。そこで、全反射蛍光顕微鏡による単一シナプス小胞の直接イメージングによって、長期シナプス可塑性を誘導する刺激を与えた際に小胞動態が変化するかどうかを調べた。

(2) 視床内側毛帯線維終末における開口放出動態の発達・経験依存的変化

マウス遺伝学によって特異的な遺伝子操作が容易であり、発達・経験依存的に顕著な可塑性を示すマウス視床体性感覚野への入力線維である内側毛帯線維終末に注目し、ここから直接パッチクランプ法によって記録を取った。内側毛帯線維終末は直径 2-4 ミクロン程度の小型のシナプス前終末であるため、マウス遺伝学を適用することによって蛍光タンパク質を選択的に発現させることによってこれを可視化し、直接パッチクランプ記録を可能にした。

注目したマウス視床のヒゲ感覚領域では、生後初期には単一の視床ニューロンに対してヒゲ感覚由来の入力線維とヒゲ以外の異所性感覚由来の入力線維が混在して入力しているが、成熟すると一本のヒゲ感覚の入力線維の入力のみになることが知られていたが、その過程でそれぞれの経路の入力線維終末からの開口放出動態がどのように変化するかは分かっていた。そこで、経路別に開口放出動態が発達・経験依存的にどのような可塑的变化を示すのかについて詳細な電気生理学的実験によって詳しく調べた。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) 海馬苔状繊維終末における単一シナプス小胞開口放出の可視化

シナプス前性の可塑性を示すことで知られる海馬苔状線維終末における単一シナプス小胞の開口放出を世界で初めて可視化することに成功し、可塑的变化を起こした際にシナプス小胞動態がどのように変化するかを明らかにした (Midorikawa & Sakaba, 2017 Neuron)。

海馬は記憶の座であると広く考えられており、ここでのシナプス可塑性は記憶・学習と強い連関を持っていることが分かっている。シナプス可塑性の多くはシナプス後部の神経伝達物質受容体の数や性質が変化することによって生じるが、海馬 CA3 領域に存在する苔状線維終末 錐体細胞間のシナプスにおいては例外的にシナプス前部の性質が変化することによってシナプス可塑性の一種である長期増強が生じる。しかし、この際に生じるシナプス前部からの神経伝達物質放出の増強が何に由来しているのかは未解明であった。そこで、この研究では全反射蛍光顕微

鏡を用いて海馬苔状線維終末からのシナプス小胞の開口放出、およびそれ以前の動態を可視化することによって、**長期増強の有無によってシナプス小胞が開口放出される前の細胞膜近傍での振る舞いがどのように変化するかを直接可視化し、測定した。**

まず長期増強が生じていない状態の海馬苔状線維終末におけるシナプス小胞動態を調べたところ、calyx of Heldにおけるシナプス小胞動態と極めてよく類似していた。すなわち、刺激に応じて即時放出されるシナプス小胞の数を大きく上回る数のシナプス小胞が細胞膜直下に係留されており、開口放出が生じて細胞膜直下のシナプス小胞が減少した後の細胞深部からのシナプス小胞の動員速度は電気生理学的手法によって推定された即時放出可能なシナプス小胞の最充填速度よりも大幅に遅かった。Calyx of Heldと苔状線維

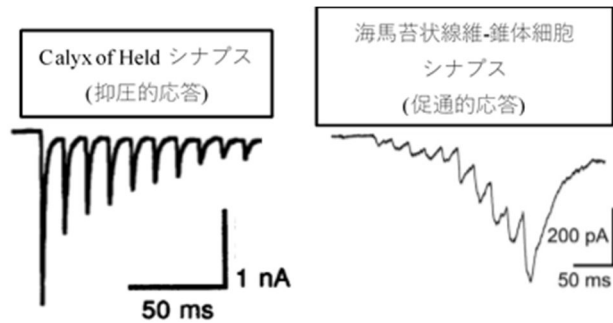


図3 シナプス応答特性の違い

終末 錐体細胞間シナプスは**連発する活動電位に対する応答特性が大きく異なることが知られていたため(図3)**、シナプス小胞の動員速度が両者で類似していたのは大きな驚きであった。

続いて薬理学的処理によって長期増強状態にした海馬苔状線維終末におけるシナプス小胞動態を調べたところ、開口放出の引き金となるカルシウムイオンの流入が生じるカルシウムチャンネル近傍のシナプス小胞の数が増加していることを示唆する結果が得られた。このことから、**苔状線維終末 錐体細胞間シナプスでの長期増強は、カルシウムチャンネル近傍のシナプス小胞が増加することによってシナプス応答が増強されるというメカニズムが明らかになった。**

(2) 視床内側毛帯線維終末における開口放出動態の発達・経験依存的变化

応募者らはマウス遺伝学・ウイルス学を併用することにより、神経回路が成熟する以前の時点から**将来強化・除去されるシナプス前終末を標識し、さらにシナプス前終末から直接電気記録を取る**ことによってその機能の詳細を高度に定量化して評価することを可能にした。これは**世界的にも報告例のない測定系**であり、二種類のシナプス前終末がどのような機能的変容を経て最終的に強化・除去されるに至るのかについて、かつてない精度で直接的・系統的に調べることが可能となった。

強化されるヒゲ由来シナプス前終末(Krox20Cre-Ai34Dマウス)と除去される異所性由来シナプス前終末(脳幹三叉神経核に"Cre-Off" AAV(AAV9-Ef1a-DO-ChETA-EYFP)を感染させたKrox20Cre-Ai34Dマウス)を特異的に蛍光タンパクでラベルした(図4)。脳スライス標本を作成して**ヒゲ由来または異所性由来線維のシナプス前終末をパッチ電極によって直接膜電位固定し、膜容量測定法や、VPmニューロンとの同時記録による興奮性シナプス後電流(EPSC)解析から開口放出能を測定した(図5)**。実

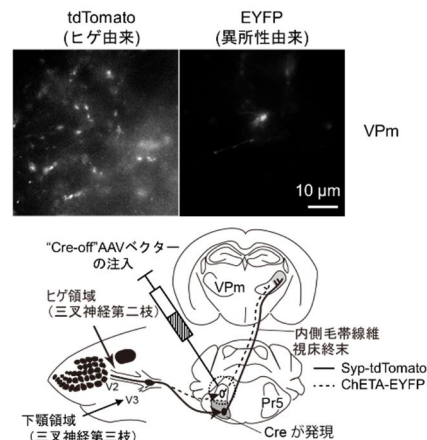


図4 ヒゲ由来、異所性由来入力線維終末の選択的標識

験の結果、ヒゲ由来のシナプス前終末は非常に強い開口放出能(大きな即時放出可能シナプス小胞プール、素早い時定数での開口放出)を発達に伴って獲得するのに対し、異所性由来のシナプス前終末では開口放出能がほとんど成熟しないことが分かった(Midorikawa & Miyata, 2021 PNAS)。

この成果により、遺伝学の適用が容易であり、発達・経験依存性な顕著な可塑的变化を示す神経系のシナプス前終末実験系を確立し、シナプス小胞動態を詳細に調べるための基盤を確立した。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

全反射蛍光顕微鏡を用いた単一シナプス小胞開口放出の超解像ライブイメージングに関しては、応募者自身が哺乳類中枢神経系でこれに初めて成功したものである。本研究期間で海馬苔状線維終末というシナプス前性の可塑性を示す神経終末標本におけるシナプス小胞動態を明らかにしたことは、シナプス前機構・シナプス可塑性の研究分野において大きなインパクトを与えた成果といえる。

一方、視床内側毛帯線維終末における開口放出動態の発達・経験依存的变化については、当初の研究計画には含まれていなかったが、計画途中での研究代表者の異動に伴い、遺伝子操作が容易であり顕著な発達・経験依存的变化を示すシナプス前終末としてここに着目して研究を行っ

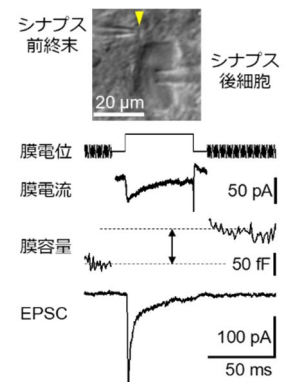


図5 ヒゲ由来線維終末とVPmニューロンからの同時電気記録

た。中枢神経系の神経回路が成熟する過程で広汎に生じる現象である「シナプス刈り込み」が生じる期間を通じてシナプス前機能の発達・経験依存的変化を明らかにしたという点で、開口放出研究の分野にとどまらず、神経発達や神経回路形成にかかわるシナプスオーガナイザーの研究分野に対しても大きなインパクトを与えうる成果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 緑川光春	4. 巻 12月号
2. 論文標題 中枢神経シナプス前終末における小胞動態の超解像ライブイメージング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊「細胞 The CELL」	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Midorikawa M, Sakaba T.	4. 巻 96
2. 論文標題 Kinetics of Releasable Synaptic Vesicles and Their Plastic Changes at Hippocampal Mossy Fiber Synapses.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1033-1040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2017.10.016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Midorikawa M	4. 巻 S0168-0102
2. 論文標題 Real-time imaging of synaptic vesicle exocytosis by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30755-1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2018.01.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miki Takafumi, Midorikawa Mitsuharu, Sakaba Takeshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Direct imaging of rapid tethering of synaptic vesicles accompanying exocytosis at a fast central synapse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14493 ~ 14502
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2000265117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Midorikawa Mitsuharu, Miyata Mariko	4. 巻 118
2. 論文標題 Distinct functional developments of surviving and eliminated presynaptic terminals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2022423118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2022423118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 緑川光春、宮田麻理子
2. 発表標題 Direct measurements of transmitter release from lemniscal fiber terminals in the somatosensory thalamus.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緑川光春、宮田麻理子
2. 発表標題 Direct measurements of transmitter release kinetics at lemniscal fiber terminals in the somatosensory thalamus.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 緑川光春、宮田麻理子
2. 発表標題 Presynaptic properties at lemniscal fiber terminals in the somatosensory thalamus
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合 (FAOPS) 2019年大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 緑川光春、宮田麻理子
2. 発表標題 Investigating presynaptic properties of afferent fibers in the somatosensory thalamus.
3. 学会等名 Core-to-Core program “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緑川光春、坂場武史
2. 発表標題 Measuring dynamics of releasable synaptic vesicles at hippocampal mossy fiber boutons.
3. 学会等名 COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緑川光春、坂場武史
2. 発表標題 中枢神経シナプス前終末における単一シナプス小胞動態の可視化
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 緑川光春、宮田麻理子
2. 発表標題 Sensory input dependent and independent development of presynaptic transmitter release mechanisms at lemniscal fiber terminals in the somatosensory thalamus
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	坂場 武史 (Sakaba Takeshi) (80609511)	同志社大学・脳科学研究科・教授 (34310)	
連携研究者	川口 真也 (Kawaguchi Shinya) (00378530)	京都大学・理学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------