

令和元年5月16日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19466

研究課題名(和文) 単一シナプス小胞レベルでの開口放出分子基盤の解明

研究課題名(英文) Investigating molecular mechanisms of exocytosis by visualizing single fusion events

研究代表者

緑川 光春 (Midorikawa, Mitsuharu)

東京女子医科大学・医学部・准講師

研究者番号：60632643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在する数々の分泌現象のうち、最小・最速の現象である神経細胞軸索終末における神経伝達物質の開口放出に着目し、個々のシナプス小胞の開口放出部位における分子メカニズムの解明を目的として研究を行った。全反射蛍光顕微鏡を用いて脳幹聴覚系のカリックス型シナプス終末と海馬苔状線維終末において単一シナプス小胞の開口放出を可視化することに成功した。また、分子操作を容易に行える標本として視床体性感覚野の内側毛帯線維終末から直接電氣的に開口放出を測定する実験系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分泌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、その作用機序を解明することは非常に重要である。中枢神経特有の超高速開口放出を可能にしている分子基盤の実態は未だに不明であり、これを明らかにすることは中枢神経細胞間のシナプス伝達機構を解明する上で重要な基盤情報であるのみならず、脳内の機能異常によって生じる精神・運動疾患を理解するためにも非常に重要である。研究代表者の研究成果は測定が極めて困難である神経細胞における個々のシナプス小胞の開口放出を実測するための手法を進めたものであり、大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：Exocytosis of synaptic vesicles at neurons is the smallest and the fastest secretion in a body. We tried to clarify molecular mechanisms at the site of single synaptic vesicle exocytosis. We succeeded in visualizing single synaptic vesicle exocytosis by using total internal reflection microscopy at two different presynaptic terminals, calyx of Held terminals in auditory brainstem and mossy fiber boutons in hippocampus. For the molecular manipulation using genetic approaches, we also established direct measurements of exocytosis at lemniscal fiber terminals in somatosensory thalamus.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 開口放出 イメージング

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る。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、これらの分泌の異常は病気に関連する。例えばセロトニンの分泌異常はうつ病の、インスリンの分泌異常は糖尿病の、ヒスタミンの分泌異常はアレルギー疾患の原因となる。また、統合失調症や自閉症も神経細胞間の分泌機構の異常が原因の一つと考えられている。このように、開口分泌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、その作用機序を解明することは非常に重要である。研究代表者は生体内の数ある分泌現象のうち、最も小さく、最も速い神経細胞の軸索終末における神経伝達物質の開口放出に着目した。ここでは、直径約 40 nmのシナプス小胞に内包された神経伝達物質が、刺激から 1 ms 以内で開口放出によってシナプス間隙へと放出される。研究代表者はこれまでに開口放出機構の研究を様々な標本を用いて行ってきたが、神経細胞特有のこのような超高速の開口放出を可能にしている分子の基盤の特異性を明らかにしたいと考え、本研究構想へと至った。

2. 研究の目的

哺乳類中枢シナプスでは、直径約 40 nmのシナプス小胞に内包された神経伝達物質が、刺激から 1 ms 以内で開口放出によってシナプス間隙へと放出される。その小ささ、速さ故に、シナプス小胞 1 個 1 個の動態、およびその基盤となる分子メカニズムを実測することは困難であった。個々のシナプス小胞の小ささと神経終末における高密度の集積は従来の光学的顕微鏡で扱える解像限界を超えており、蛍光タンパク質の出現による分子イメージング技術の飛躍的な発展以降もその適用は限定的である。単一の分泌現象の研究は、より大きな小胞様構造である分泌顆粒(直径数百 nm)を持ち、分子的操作もより容易な内外分泌細胞とその株化細胞をモデル標本として主に行われてきた。分泌顆粒は大きく、その密度も一般的な中枢シナプスにおけるシナプス小胞と比較して疎らであるため、従来の光学顕微鏡の解像度でも個々の開口放出部位、およびその部位における蛍光タンパク質の動態をライブイメージングすることが可能であり、そのことが大きな優位性となってシナプスにおける開口放出のモデルとして大いに活用されてきた。

しかし、近年では分泌細胞内でもその分泌物質の違いや機能によって多様な分泌形態を示すことが明らかになりつつあり(Takahashi and Kasai, 2007, *Endocr J.*)、また、分泌細胞からの分泌小胞放出と中枢神経からのシナプス小胞放出ではその分子基盤が異なることも示唆されている(Takahashi et al., 2015, *Nat Commun.*)。したがって、中枢シナプスにおける超高速開口放出の分子基盤を解明するためには、実際の中枢神経を標本として研究する必要があると考えた。

技術的には、研究代表者自身が世界で初となる哺乳類中枢シナプスにおける単一シナプス小胞の開口放出の可視化に成功している(Midorikawa and Sakaba, 2015, *Neuron*)。また、固定標本を用いた超解像イメージング技術として STED、STORM、PALM などの発展に伴い、シナプス前終末における開口放出関連タンパク質のナノスケールでの分子配置が徐々に解明されつつある(Tang et al., 2016, *Nature*)が、開口放出時の動態につ

いては分かっておらず未だに芽生え期の段階である。

そこで、本研究では全反射蛍光顕微鏡を用いて単一シナプス小胞の開口放出と蛍光標識した開口放出関連タンパク質とを同一標本で同時ライブイメージングによって測定し、中枢神経でシナプス小胞が開口放出を起こす際に関連タンパク質がその直下でどのような動態を示すのかを明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

単一シナプス小胞の開口放出とその直下での開口放出関連タンパク質の動態をライブイメージングによって調べるためには、単一シナプス小胞の開口放出を測定可能であり、同時に開口放出タンパク質を蛍光標識することが可能な標本が必要である。研究代表者がすでに単一シナプス小胞の開口放出の可視化に成功したカリックス型シナプスは遺伝学の適用が困難であり、開口放出関連タンパク質を蛍光標識した標本の作製には適していない。

そこで、研究代表者らは中枢神経系シナプスにおける単一シナプス小胞の開口放出が測定可能、かつ分子的操作が可能な標本を模索し、予備実験によって海馬苔状線維終末がこれに適していることを発見した。この標本でもすでに単一シナプス小胞の観察に成功しており、これは世界的に未だに報告されていない研究代表者独自の技術である。海馬は記憶の座と考えられている脳内部位であり、遺伝学の適用も進んでいる領域であるため、開口放出関連タンパク質を蛍光標識した遺伝子改変マウスの入手も比較的容易である。さらに研究代表者らは多種の蛍光標識タンパク質を簡便・迅速に試行できるようにするため、海馬のスライス標本に対して電気穿孔法によって目的とする遺伝子を導入し、その後スライス標本を培養することによって蛍光標識タンパク質を発現させる実験系の構築を目指す。研究代表者は既に予備実験によって、スライス標本を作製した後に電気穿孔法によって遺伝子導入を行い、培養後に海馬神経細胞に蛍光タンパク質を発現させる事に成功している。目的とする蛍光タンパク質を発現させた後に培養スライスから急性単離標本を作成し、開口放出と開口放出関連タンパク質の同時ライブイメージングを目指す。

4. 研究成果

海馬苔状線維終末からの単一シナプス小胞の開口放出を可視化してその動態を詳細に解析した。脳スライス標本内における同終末からの開口放出の電気生理学的解析と合わせて開口放出機構の詳細を明らかにした。また、長期増強時に生じるシナプス前終末側の変化について新たな可能性を提唱することに成功し、成果を論文として発表することに成功した。

また、遺伝的操作については Cre 発現依存的遺伝子発現を用いた実験系が確立されている視床体性感覚野の内側毛帯線維終末に着目し、このシナプス前終末における開口放出動態を直接電気記録によって測定する実験系を確立し、将来的に標的分子の蛍光標識を簡便に行え、開口放出を電氣的・光学的に測定できる実験系の基盤を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Midorikawa, M. (2018). Real-time imaging of synaptic vesicle exocytosis by total internal

reflection fluorescence (TIRF) microscopy. Neurosci Res. 136:1-5. doi: 10.1016/j.neures.2018.01.008.

Midorikawa, M. and Sakaba, T. (2017). Kinetics of Releasable Synaptic Vesicles and Their Plastic Changes at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. Neuron. 96, 1033-1040.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.016.

〔学会発表〕(計 4 件)

緑川光春、宮田麻理子. Presynaptic properties at lemniscal fiber terminals in the somatosensory thalamus. 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会(兵庫県神戸市). 2019年.

Midorikawa M, Miyata M. Investigating presynaptic properties of afferent fibers in the somatosensory thalamus. Core-to-Core program “Nanobiology of neural plasticity based on optical nanoscopy” (京都府京都市). 2018年

Midorikawa, M. and Sakaba T. Measuring dynamics of releasable synaptic vesicles at hippocampal mossy fiber boutons. COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES (兵庫県淡路市). 2018年.

緑川光春、坂場武史. 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解析. 第95回日本生理学会大会(香川県高松市). 2018年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。