

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02530

研究課題名(和文) 哺乳類中枢シナプス伝達・短期可塑性メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of transmission and plasticity at mammalian central synapses.

研究代表者

坂場 武史 (Sakaba, Takeshi)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：80609511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類中枢シナプスの伝達、可塑性メカニズムを明らかにするため、海馬苔状線維-CA3シナプスの前後部記録を中心技術として研究をおこなった。伝達物質放出のCa依存性を調べたところ、ほかの中枢シナプスと差がなかった。伝達物質放出確率の低さはCaチャンネルクラスターと伝達物質放出部位の緩いカップリングによるものであることがわかった。短期・長期シナプス可塑性と関連するcAMP依存性伝達物質放出量の増大は、Caチャンネルが集積することによってCaチャンネルクラスターが拡大し、伝達物質放出部位付近の局所Ca濃度が増大するためであることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、哺乳類中枢シナプスのシナプス前後部記録によって、厳密に伝達特性を測定し、それによって、伝達、可塑性の分子細胞メカニズムを明らかにした。海馬苔状線維シナプスではCa-伝達物質放出連関が特殊であり、それが伝達効率の低さの主要因となっていること、また可塑性因子であるcAMPによってCaチャンネルクラスターが拡大し、それによって伝達物質放出量増大によってシナプス増強などの可塑性がおこることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the cellular mechanisms of transmission and plasticity at mammalian central synapses, we have applied simultaneous pre- and postsynaptic patch clamp to hippocampal mossy fiber synapses. We found that the intra-cellular Ca sensitivity for transmitter release was similar to the one at other synapse types, but the local Ca concentration at the transmitter release site was much lower, explaining low release probability of release at mossy fiber synapses. In addition, we found that cAMP-induced potentiation of transmitter release, important for short- and long-term plasticity, was mediated by accumulation of Ca channels near release sites, thereby increasing the local Ca concentration at the release site.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス

1. 研究開始当初の背景

シナプスは神経細胞間の伝達を担う。シナプスはシナプス前細胞から後細胞へ情報をすばやく伝達するだけでなく、伝達強度が可塑的な変化を示すことで、神経回路の情報処理容量を飛躍的に増大させる役割を担う。また、シナプス伝達強度の可塑性は素子レベルの記憶痕跡であると考えられている。哺乳類中枢シナプス伝達・可塑性メカニズムのうち、シナプス前終末からの神経伝達物質放出メカニズムに関しては未だ理解が進んでいない。異なるシナプス種間ではシナプス伝達や可塑性が顕著に異なる(シナプス間機能多様性)。また、同一シナプスでも活動パターンによって異なる時間経過で様々な可塑性が起こる(シナプス内機能多様性)。本研究はこれらの多様性のシナプス前性の細胞分子メカニズムを統一的に理解することを目指した。

申請者はげっ歯類聴覚伝導路にある大型シナプスである calyx of Held シナプスにおいてシナプス前後部記録をおこない、シナプス前終末の伝達物質放出、短期可塑性メカニズムを定量的に調べてきた (Neher and Sakaba, 2008)。また最近、シナプス前終末が比較的大きい海馬苔状線維—CA3 シナプスを新たなモデルシナプスとして研究を進めている (Midorikawa and Sakaba, 2017)。Calyx of Held シナプスはシナプス強度が大きく、連発刺激で強度が弱まっていく (synaptic depression)。一方で、苔状線維シナプスはシナプス強度が小さく、連発刺激で促進現象を示す (synaptic facilitation)。また、苔状線維は連発刺激で終末内 cAMP 濃度が上昇すると、短期、長期のシナプス可塑性を示すことが知られており、可塑性のモデルシナプスとして有効である。一方で、苔状線維シナプス前後部からの記録を用いた定量的な研究は限られている。本研究では、この2つのシナプスを比較しながら定量的な電気記録法に依拠した伝達・可塑性メカニズムの理解をおこなうことにした。

2. 研究の目的

本研究では、海馬苔状線維シナプスの伝達メカニズムと cAMP 依存性の可塑性メカニズムを明らかにし、calyx of Held シナプスとを比較することで、中枢シナプス共通の伝達物質放出メカニズムと、それぞれのシナプス種の伝達特性を決定するメカニズムを理解することを主たる研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学：ラット海馬急性スライス標本 (3-4 週齢) を作製し、シナプス前終末とシナプス後細胞 (CA3 錐体細胞) から正立顕微鏡下でパッチクランプ記録をおこなった。膜電位固定をおこない、シナプス前終末への脱分極パルスに対するシナプス応答 (EPSCs) を測定した。また、シナプス前終末に膜容量測定法を適用し、脱分極に対する開口放出量を測定した。一部の実験ではシナプス前終末に caged Ca (DM-Nitrophen) と Ca 指示薬 Fura2FF を導入し、UV フラッシュ光を与えて caged Ca から Ca を解離させ、シナプス前終末の Ca 濃度を一様に上昇させたときの伝達物質放出をシナプス応答 (EPSCs) ないし、膜容量変化として検出した。

一部の実験では、スライス標本から苔状線維シナプス前終末を急性単離し、顕微鏡下でシナプス前終末からのパッチクランプ記録をおこなった。シナプス前終末におけるシナプス小胞開口放出に伴う形質膜面積の変化量を膜容量測定法を用いて検出した。また、伝達物質放出部位付近の局所 Ca 濃度について、全反射蛍光顕微鏡を用い、単離シナプス前終末において Ca 蛍光指示薬で測定した。

(2) STED 顕微鏡：ベルリン自由大学 Stephan Sigrist 研究室との共同研究で、苔状線維シナプス前終末における Ca チャネル (P/Q 型) Munc13 (伝達物質放出部位のマーカー, Sakamoto et al., 2018) の分布を、STED 顕微鏡を用いて解像した。

すべての実験は同志社大学の動物実験委員会、DNA 実験委員会の審査を経て行った。

4. 研究成果

(1) 海馬苔状線維シナプス前終末からの伝達物質放出の時間経過 (Miyano et al., 2019, J. Physiol.): 苔状線維シナプス前終末の膜容量測定法を適用し、脱分極に対する開口放出の時間経過を測定した。伝達物質放出の時間経過を指数関数でフィットすると時定数が数十 ms 程度であり、500 個のシナプス小胞が直ちに伝達物質放出可能であった (放出可能小胞プール, readily-releasable pool)。時定数は calyx of Held に比べると 10 倍程度遅く、活動電位に対する伝達物質放出確率は 1 % 以下であることがわかった。また、Ca バッファーに対する感受性が高く、5 mM EGTA を終末内に導入すると開口放出が顕著に抑制された。BAPTA に対しては短い脱分極パルスに対しては EGTA よりも強い抑制効果があったが、長い脱分極パルスで抑制効果が解除

された。Ca チャンネルと伝達物質放出部位のカップリングが緩いと Ca に対する結合速度の速い BAPTA は局所的な飽和を起こすことが予想されている(Neher, 1998)。よって、海馬苔状線維シナプス前終末はカップリングが緩いと推測された。

放出可能なシナプス小胞が枯渇した後、秒単位の時定数で放出可能小胞プールは回復する。Calyx of Held シナプスの場合、回復過程は Ca/calmodulin 依存性である。海馬苔状線維シナプスにおいて回復が Ca 依存性かを調べるため、高濃度の Ca バッファ (EGTA) を導入して小胞プールの回復への影響を調べたところ、EGTA による効果は見出されなかった。よって、Ca 依存性である可能性は低いと考えられた。また、シナプス小胞エンドサイトーシスは calyx of Held の場合 Ca 依存性であるが (Hosoi et al., 2009)、海馬苔状線維で検討したところ、Ca 非依存性である可能性が示唆された。

以上の結果から、海馬苔状線維では、開口放出の時間経過が遅いこと、これが Ca チャンネルと伝達物質放出部位とのカップリングが緩いためであることが示唆された。また、シナプス小胞の動員やエンドサイトーシス過程が calyx of Held と異なる可能性が示唆された。これらの分子メカニズムを明らかにすることが次の課題である。

(2) 海馬苔状線維シナプス前終末からの伝達物質放出の終末内 Ca 依存性 (Fukaya et al., 2021, PNAS): 海馬苔状線維の低い伝達物質放出確率は Ca チャンネルと伝達物質放出部位との緩いカップリングだけでなく、放出の Ca 濃度感受性が低いためである可能性がある。これを直接的に調べるため、caged Ca をシナプス前終末に直接パッチ電極を介して導入し、caged Ca を光解離して終末内 Ca 濃度を一様に上昇させた。Ca 濃度を蛍光指示薬でモニターし、伝達物質放出はシナプス前終末膜容量測定法ないしシナプス電流から測定した。Ca 濃度と伝達物質放出との関係を調べると、calyx of Held の場合 (Schneppenburger and Neher, 2000) とあまり変わらなかった。これらは小脳抑制性シナプス前終末 (Sakaba, 2008; Kawaguchi and Sakaba, 2015) の場合と同様の結果であり、放出の Ca 感受性のメカニズムはシナプスの種類に関わらず共通している可能性が高いと考えられた。

活動電位時の伝達物質放出部位付近の局所 Ca 濃度を caged Ca によって得られた Ca—伝達物質放出の関数から (逆) 推定すると、5 μM 程度であることが推定された。これは、calyx of Held の半分以下であり、また Ca チャンネルと伝達物質放出部位のカップリングが緩いことを支持する実験結果でもある。つまり、カップリングが放出確率の決定要因であることを示す。またここで推定された局所 Ca 濃度のレンジでは、Ca 濃度と放出の関係がべき乗の関係になる。これは、わずかな終末内 Ca 濃度変化が大きな伝達物質放出量の変化をもたらすことを示唆しており、可塑性メカニズムを理解するうえで重要である。

(3) cAMP 依存性可塑性メカニズムの解明 (Fukaya et al., 2021, PNAS): 海馬苔状線維シナプスでは連発刺激による終末内への Ca 流入に対して cAMP 濃度が上昇し、伝達物質放出亢進を伴う短期・長期のシナプス増強をおこす。cAMP 依存性の伝達物質放出増強メカニズムを調べるため、シナプス前後部からの同時記録をおこない、シナプス前終末に caged Ca を導入してパッチ電極を介して cAMP 濃度を上昇させたときの放出の Ca 依存性の変化を調べた。cAMP 濃度存在下でもコントロール条件下でも Ca 依存性に変化は見られなかった。よって、cAMP による伝達物質放出増強は放出の Ca 感受性以外の要因であること、つまり、cAMP によって伝達物質放出部位付近の局所 Ca 濃度上昇をとまなう可能性が示唆された。Ca 濃度依存性から放出部位付近の局所 Ca 濃度を推定すると、コントロール条件が 5 μM 程度、cAMP 条件が 7-8 μM 程度であると推定された。伝達物質放出はこのレンジでは終末内 Ca 濃度の 3-4 乗に比例する。よって、わずかな局所 Ca 濃度の変化が伝達物質放出量の変化をもたらすことが示唆された。

局所 Ca 濃度の変化の原因として、Ca チャンネルクラスターの大きさの変化が考えられる。伝達物質放出部位付近には Ca チャンネルが集積しており (チャンネルクラスター) ここを介した局所的な Ca 流入が伝達物質放出を制御する。クラスターの大きさが変化した可能性を検討するため、苔状線維シナプス前終末を単離し、ガラス面に貼り付けて、全反射蛍光顕微鏡を適用した。シナプス前終末にパッチ電極を介して Ca 蛍光指示薬を導入した。脱分極パルスを与えると、放出部位付近の局所 Ca 流入を蛍光指示薬を介してモニターすることができた。また、cAMP 濃度を上昇させた条件では、局所 Ca 流入量が増大した。終末全体で観察できる Ca チャンネル電流の振幅には変化がなかったため、単一 Ca チャンネル電流振幅の増大、あるいは終末全体の Ca チャンネル数の増加ではなく、Ca チャンネルの分布が変化して、放出部位付近の Ca チャンネル集積が促進されてチャンネルクラスターが拡大した可能性が高いことは示唆された。また、伝達物質放出に対する P/Q 型、N 型 Ca チャンネルの寄与をシナプス応答の Ca チャンネル阻害剤感受性を用いて調べたところ、cAMP 濃度上昇条件下ではコントロール条件よりも P/Q 型チャンネルの寄与が大きくなっていった。このことは、P/Q 型 Ca チャンネルクラスターが拡大している可能性を示唆する。

Ca チャンネルクラスター拡大を直接可視化するため、ベルリン自由大学 Sigrist 研究室との共同研究により、STED 顕微鏡によるチャンネルクラスター可視化をおこなった。P/Q 型 Ca チャンネルクラスターの大きさは cAMP 濃度上昇条件で拡大した。一方、伝達物質放出部位を標識する Munc13 のクラスターの大きさには変化がなかった。さらに、Ca チャンネルクラスターと Munc13 クラスターの距離には変化がなかった。

以上の結果をまとめると、海馬苔状線維シナプス前終末では cAMP 濃度上昇に伴い、Ca チャ

ネル集積により Ca チャネルクラスターが大きくなり、伝達物質放出部位付近の局所的な Ca 流入量が増大する。これによって、伝達物質放出量が増大することがわかった(図 1)。Calyx of Held シナプスでは cAMP 濃度上昇に伴って、Ca 感受性の高いシナプス小胞群 (superprimed vesicles) が産生され、伝達物質放出量を増大させることがわかっている (Yao and Sakaba, 2010; Taschenberger et al., 2015)。よって、cAMP 依存性の修飾メカニズムとはいつでも、calyx of Held シナプスと海馬苔状線維シナプスでは異なることがわかった。この分子メカニズムを調べることは今後の課題である。

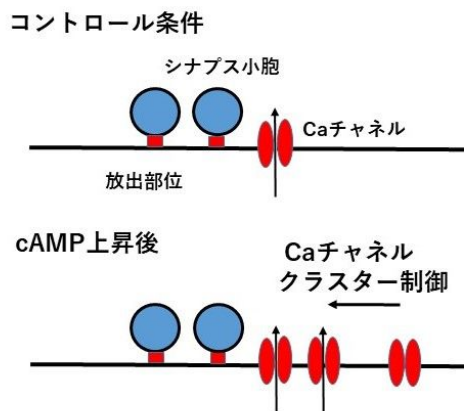


図 1 : cAMP による Ca チャネルクラスター制御

(4)その他の研究：研究期間中の研究として、calyx of Held シナプスにおいて、伝達物質放出後、シナプス小胞タンパク質が伝達物質放出部位からどのように除去されるかに注目した研究をおこなった (Japel et al., 2020, Cell Rep.)。この研究では、Intersectin1 によってシナプス小胞タンパク質 Synptobrevin がどのように除去されるかを検討し、持続的な伝達物質放出にこの過程が重要であることを示した。また、小脳プルキンエ細胞—深部小脳核シナプスにおいてペリニューラルネットを構成する Bral2 がシナプス伝達に重要な役割を示すことを KO マウスを用いて明らかにした (Edamatsu et al., 2018, J. Neurochem.)。さらに、げっ歯類聴覚系の下丘への入力シナプスの特性を電気生理学的に解析し、報告した (Kitagawa and Sakaba, 2019, Eur. J. Neurosci.)。

以上のように、本研究課題では、cAMP によって、伝達物質放出機構を修飾するのではなく、Ca チャネルクラスターの制御という新たなメカニズムを提唱するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukaya Ryota, Maglione Marta, Sigrist Stephan J., Sakaba Takeshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Rapid Ca ²⁺ channel accumulation contributes to cAMP-mediated increase in transmission at hippocampal mossy fiber synapses	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 e2016754118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016754118	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 該当する
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 Kitagawa Mako, Sakaba Takeshi	4. 巻 50
2. 論文標題 Developmental changes in the excitatory short term plasticity at input synapses in the rat inferior colliculus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2830 ~ 2846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.14422	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 Miyano Rinako, Miki Takafumi, Sakaba Takeshi	4. 巻 597
2. 論文標題 Ca dependence of synaptic vesicle exocytosis and endocytosis at the hippocampal mossy fibre terminal	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 4373 ~ 4386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP278040	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 Jaepel Maria, Gerth Fabian, Sakaba Takeshi, Bacetic Jelena, Yao Lijun, Koo Seong-Joo, Maritzen Tanja, Freund Christian, Haucke Volker	4. 巻 30
2. 論文標題 Intersectin-Mediated Clearance of SNARE Complexes Is Required for Fast Neurotransmission	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 409 ~ 420.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Edamatsu M, Miyano R, Fujikawa A, Fujii F, Hori T, Sakaba T, Oohashi T.	4. 巻 147
2. 論文標題 Hapln4/Bral2 is a selective regulator for formation and transmission of GABAergic synapses between Purkinje and deep cerebellar nuclei neurons.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurochem	6. 最初と最後の頁 748-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14571	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 Sakaba T	4. 巻 596
2. 論文標題 Optimal dissection of a model circuit.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Physiol	6. 最初と最後の頁 4807-4808.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP276895	査読の有無 無
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6件(うち招待講演 4件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Comparison of the transmitter release properties between the calyx of Held synapse and mossy fiber-CA3 synapse.
3. 学会等名 Quantitative Aspects of Membrane Fusion and Fission, Biophysical Society thematic meeting, Padova, Italy (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Kinetics of transmitter release at hippocampal mossy fiber synapses
3. 学会等名 日米脳：シナプス 回路シンポジウム、御殿場（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Regulation of exocytosis by cAMP at hippocampal mossy fiber terminals.
3. 学会等名 日本神経科学学会 神戸
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Biophysics of Neurotransmitter Release at Central Synapses.
3. 学会等名 NIH Neuroscience seminar series, National Institute for Health, USA, Invited talk, (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Biophysics of transmitter release at the mossy fiber synapse.
3. 学会等名 BMI seminar, EPFL Lausanne, Swiss (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakaba T
2. 発表標題 Ca-secretion coupling at mammalian CNS
3. 学会等名 FAOPS meeting, 神戸 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://brainscience.doshisha.ac.jp/ NIH neuroscience seminar series (2018.12) https://videocast.nih.gov/summary.asp?Live=28085&bhcp=1

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

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		
ドイツ	ベルリン自由大学	FMP (ベルリン)	