

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06472

研究課題名(和文) 中枢シナプスにおける同期・非同期性放出の統一的理解

研究課題名(英文) Understanding mechanisms for synchronous and asynchronous release of neurotransmitters at central synapses

研究代表者

三木 崇史 (Miki, Takafumi)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：10598577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経シナプスにおいて、神経活動に同期・非同期して起こるシナプス小胞の放出パターンは、神経細胞間情報伝達の性質を決める重要な因子である。しかし、そのパターンを決めるメカニズムは不明な点が多かった。本研究では、シナプス前終末からのシナプス小胞放出数の定量的・統計学的解析とシミュレーションから、同期・非同期性放出パターンを説明する統一的な数理モデルの構築に成功した。このモデルから、(1)シナプス小胞は放出までに再充填プール、充填部位、放出部位を経由すること、(2)放出・充填部位に存在する小胞が同期性放出を、再充填プールに存在する小胞が非同期性放出を担うことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脳神経伝達を担う伝達物質放出の同期・非同期性放出パターンを説明する統一的な数理モデルを提唱した。同期性放出は、速く正確な神経伝達に必須である。一方、非同期性放出は持続的な神経伝達を担う。このような異なる特徴と生理的意義を持つ神経伝達を統一したモデルで理解できたことは、これまで様々な説により理解されてきた中枢シナプスの多様なシナプス特性を一般化して理解することにつながり学術的に意義深い。またこの同期・非同期性放出パターン異常は神経疾患との関連も示唆されており、今後シナプス機能改善といった疾患治療に向けた応用研究への足掛かりになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Synchronous and asynchronous release of neurotransmitters at synapses play important roles in information processing in the central nervous systems. However the mechanism for synchronous and asynchronous release remains elusive. In this study, we constructed a release model to explain temporal patterns of vesicular events upon action potentials, based on quantitative analysis of the number of released vesicles detected by the deconvolution method. From the results of the model simulation, we proposed that synaptic vesicles transit through recycling pool, replacement site and docking site before exocytosis, and that synchronous release derives from the vesicles located at docking and replacement site before an action potential arriving at presynaptic terminals, while asynchronous release derives from the vesicles located in recycling pool.

研究分野：分子神経生理学

キーワード：シナプス シナプス小胞 神経伝達物質放出

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳神経機能の基盤となる素子であるシナプスで起こる神経伝達物質放出には、活動電位に同期または非同期して起こる 2 種類の伝達物質放出パターンが存在する (synchronous、asynchronous release)。このパターンは、シナプス特性すなわち神経細胞間情報伝達の性質に影響する重要因子である。同期性放出は、シナプス前細胞の活動に同期した速い情報伝達により、正確にシナプス後細胞に情報を伝え、神経情報伝達の主となる役割を担っている。一方で、非同期性放出は、持続的なシナプス後細胞の興奮・抑制を担う。例えば、興奮性神経伝達の非同期性放出は複数の活動電位をシナプス後細胞に起こし、抑制性の非同期性放出は投射先神経細胞群を長期的に抑制することでこの細胞群の神経活動を同期させる役割を担う。この同期・非同期性放出パターンは、疾患との関連も示唆されている。アルツハイマー病やてんかん等の病態下では、シナプス伝達が同期性から非同期性に変化することが示唆されている[1,2]。このように、同期・非同期性放出は生理的・機能的に重要であるが、この放出パターンを決定しているメカニズムは不明な点が多い。本研究では、このメカニズム解明を行った。

### 2. 研究の目的

シナプスにおける神経伝達物質の同期・非同期性放出を媒介するメカニズム解明のため、シナプス小胞放出タイミングを定量的に解析し、同期・非同期性放出の割合に影響する因子を探索し同定した。さらに我々が独自に開発した数理モデルでシミュレーションを行うことで、同期・非同期性放出の割合を決定するパラメータを明らかにした。

### 3. 研究の方法

同期・非同期性放出が共に見られる小脳平行線維シナプスをモデル標本とし、以下の(1)~(3)について研究を行った。

(1) 我々が近年開発した新 deconvolution 法を用いて小脳平行線維シナプス応答からのシナプス小胞放出タイミングを見積もり、同期・非同期性放出を定量した。

(2) 異なる測定条件で薬理実験を行い、同期・非同期性放出割合の変化を観測した。

(3) 我々が近年提唱した 2 ステップ小胞放出モデルを用いて、同期・非同期性放出割合を決定するパラメータを同定した。

はじめに、同期性放出が主にみられる単発もしくは 2 発刺激についてシナプス小胞放出キネティクスを求めた。次に同期・非同期性放出が見られる 8 発刺激を行い、同様に放出キネティクスを求め、刺激ごとに同期・非同期性放出の割合が変化する様子を測定した。これら 1、2、8 発刺激の実験結果をもとに、我々が以前提唱した 2 ステップ小胞放出モデルを改良し[3]、実験結果を再現した。さらに、小胞充填を阻害したり放出確率を変化させたときの同期・非同期性放出の変化を観察し、これらが構築したモデルによって説明できるか検証することで、モデルの有効性と頑強性を示した。最後にモデルシミュレーションから、同期・非同期性放出の仕組みについて考察し、同期・非同期性放出を統一的に説明する新たな説を提唱した。

### 4. 研究成果

(1) 小脳平行線維シナプスでの単発刺激時のシナプス小胞放出キネティクス解析

小脳平行線維シナプスのシナプス応答からシナプス小胞放出キネティクスを求めるために、小脳スライス標本の分子層抑制性神経細胞をパッチクランプし、対象細胞に平行線維シナプスを形成する顆粒細胞の細胞体を単一電極にて細胞外刺激しシナプス後電流を記録した。形態学的に、分子層抑制性神経細胞には 1 本の平行線維から 1 つのブートン型シナプスを形成することが知られているため、シナプス結合のある顆粒細胞を 1 つ刺激することで 1 シナプスからのシナプス応答を記録することが可能である。この系を用いて得られた単発刺激時のシナプス後電流に、我々が近年開発した deconvolution 法を適用し、放出されたシナプス小胞の放出数・タイミングを検出した。検出した小胞放出数・タイミングから小胞の放出速度変化を求めた。累積小胞放出数の時間変化を単一指数関数で適合解析したところ、時定数 0.36 ms を得た。次に、この小胞放出キネティクスを説明するためにモデルを構築した。放出部位に確率  $\delta$  (小胞占有率) で存在するシナプス小胞が、確率  $\text{Pr}$  (小胞放出確率) で放出されるという単純なモデルを考えた。それぞれのパラメータ値の時間変化をシミュレーションにより設定し、実験データを再現した。小胞占有率については、過去の我々の研究から初期値を 0.3 とした。放出確率は、細胞内局所カルシウム濃度とアロステリックモデルから求めた。細胞内局所カルシウム濃度は、過去の研究から得た小脳平行線維シナプス前膜の電位依存性カルシウムチャネル配置と、活動電位時のカルシウムチャネルの開口確率を用いたシナプス前終末内の 3 次元シミュレーションのより求めた[4]。以上から、単発刺激時の小胞放出キネティクスを単純なモデルで再現できることが分かった。

(2) 2 発刺激時の小胞放出キネティクス解析

3~80msの刺激間隔で2発刺激を行った時のシナプス小胞放出タイミングを(1)と同様の手法で求めた。累積小胞放出数の時間変化を二重指数関数で適合解析し、時定数0.5msと6.8msを得た。2発目の遅い成分(時定数6.8ms)の割合は、刺激間隔が短いほど大きくなる傾向が見られた。2発刺激時の放出キネティクスを説明するため、(1)で構築したモデルを発展させ、充填部位(RS)から放出部位(DS)への小胞の補充ステップを追加した。補充速度は、カルシウム濃度(シナプス前終末内の平均カルシウム濃度)に依存した反応式(ミカエリス・メンテン式)で与えた。この発展させたモデルは、2発刺激時の小胞放出数と放出キネティクスをよく再現できた[4]。

### (3) 8発刺激時の小胞放出キネティクス解析

200Hzで8発刺激を行った際のシナプス小胞放出タイミングを(1)と同様の手法で求めた。刺激回数に従って、非同期性放出の増大が見られた。図1に示すように、2発目以降の刺激直前まで持続する放出を非同期性放出と定義し、これを差し引いた残りの成分を同期性放出とした。この同期性放出の累積小胞放出数の時間変化を二重指数関数で適合解析したところ、時定数0.5msと2msを得た。この2つの成分をそれぞれ同期性放出の速い成分(fast component)、遅い成分(slow component)とし、その割合を刺激回数に対してプロットした(図1b)。速い成分は刺激1発目ではほぼ全ての同期性放出を占めるが、刺激に従って割合が減少し、刺激3発目では速い成分が遅い成分よりも少なくなった。その後、刺激8発目まで遅い成分が優位になることが分かった。この8発刺激の放出キネティクスを説明するために、(2)のモデルの充填部位に補充ステップを追加した(図2a)。この充填部位へ小胞を補充する小胞プールをリサイクリングプールとし、無限の小胞数を持つと仮定した。この充填部位への補充ステップも(2)と同様にカルシウム濃度に依存した反応式で与え、最小二乗法による適合解析からパラメータ値を設定した。その他のパラメータ値は(1)(2)で得た数値を用いた。以上により、1、2、8発刺激時の小胞放出数と放出キネティクスを全て再現できるモデルの構築に成功した[4]。

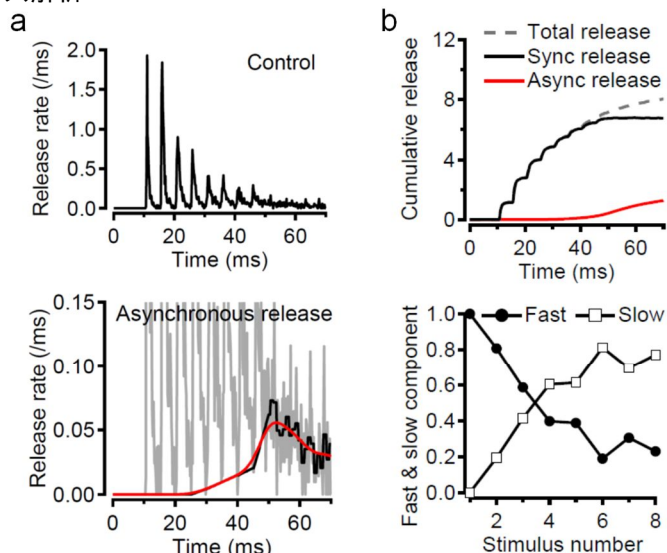


図1) 8発刺激時の小胞放出キネティクスの解析  
a: シナプス小胞放出レートの時間変化(上)、非同期性放出レート(下、赤)、b: 各累積小胞放出数の時間変化(上)、同期性放出の速い・遅い成分の刺激回数に対する変化(下)

### (4) 異なる測定条件下での8発刺激時の小胞放出キネティクス解析

(3)で構築したモデルの有効性を検証するために、8発刺激実験を異なる測定条件下で行い、図2aで示したモデルで再現できるかを検討した。まず、過去の研究から充填部位から放出部位への小胞充填を抑制することが分かっていたアクチン重合阻害剤のlatrunculinB(LatB)の影響について検討した。LatB(15 μM)を細胞外液に加え記録を行ったところ、過去の報告と同様に2発目以降の小胞放出数が減少した。小胞放出キネティクスを解析したところ、刺激回数に依存した遅い成分の増加がコントロールに比べ減少した。次に、放出確率や小胞充填速度を決める細胞内へのカルシウム流入を変化させる細胞外カルシウム濃度変化や、カリウムチャネルの非選択的阻害剤であるtetraethylammonium(TEA)の投与による小胞放出キネティクスへの影響を調べた。結果、細胞外カルシウム濃度を3 mMから1.5 mMに減少させると、刺激回数に依存した速い成分の減少と遅い成分の増加が抑制された。一方で、TEA(1 mM)存在下では、それぞれの成分の変化が促進された。最後に(3)で構築したモデルを用いて、これらの異なる条件下で測定した放出キネティクスが再現できるかどうかを検証した。LatBに関しては、充填部位から放出部位への充填速度を遅くすることで、実験データをよく再現した。また細胞外カルシウム濃度とTEAに関しては、それぞれカルシウム電流のピーク値と半値幅を変更することで実験データを再現することができた。以上のように、構築したモデルで異なる測定条件下での放出キネティクスを再現できたことから、モデルの有効性・頑強性を示すことができた[4]。

### (5) モデルを用いた同期・非同期性放出メカニズムの解明

同期・非同期性放出メカニズムについて理解するため、構築したモデルを用いて小胞放出キネティクスの各成分について調べた。刺激前に放出部位に存在したシナプス小胞の放出レート(赤線)、充填部位に存在した小胞の放出レート(青線)、リサイクリングプールに存在した小胞の放出レート(黄線)の時間変化をプロットし、実験結果と比較した(図2)。リサイクリングプールからの小胞の放出キネティクスと放出数は、非同期性放出と類似していた。放出部位・充填部

位から放出された小胞の累積小胞放出数の時間変化を刺激回数ごとにそれぞれ単一指数関数で適合解析し、時定数を求めた。その結果、放出部位の小胞は時定数 0.4 ~ 1 ms で放出された。一方で充填部位の小胞は時定数 1.3 ~ 2.5 ms をもつことが明らかになった。この値は、同期性放出の速い成分と遅い成分の時定数にそれぞれ類似していた。以上のことから、同期性放出の速い成分は刺激後放出部位から直接放出された小胞から成り（1 ステップ放出）、遅い成分は充填部位から放出部位を経て放出された小胞（2 ステップ放出）、非同期性放出はリサイクリングプールから充填部位と放出部位を経て 3 ステップで放出された小胞から成る可能性が示唆された（図 3）。刺激回数が増えるに従って放出部位に存在する小胞が減少し、続いて充填部位に存在する小胞も減少する。このため、同期性放出の速い成分と続いて遅い成分の枯渇が起こり、刺激回数依存的な放出キネティクスの遅延が観察されると推察された。この 2 つの成分が減少すると、非同期性放出が増加する。以上のことから、充填部位から放出部位への補充ステップとリサイクリングプールから充填部位へのステップが、それぞれ同期性放出の速い成分→遅い成分の遷移と、同期性放出→非同期性放出への遷移に重要な因子であることが示唆された[4]。

今回提唱したモデルは、同期・非同期性放出をそれぞれ放出キネティクスの異なる放出可能プールで説明する既存のモデルとは異なり、同期・非同期性放出の全ての放出キネティクスを説明できる逐次モデルであり、シナプス小胞放出に関して統一した新規モデルになりうる。

構築したモデルを用いた発展研究として、放出部位の小胞占有率の細胞外カルシウム濃度依存性を見出すことにも成功した[5]。また、モデルで示されたシナプス小胞の補充ステップがシナプス前終末内のシナプス小胞のどのような挙動にあたるかといった物理的・分子的相関研究も行った[6]。今後、このモデルの物理的・分子的基盤の詳細が明らかになれば、将来シナプス機能操作や機能改善といった応用研究への足掛かりになると期待される。

#### < 引用文献 >

1. Yang L, Wang B, Long C, Wu G, Zheng H. Increased asynchronous release and aberrant calcium channel activation in amyloid precursor protein deficient neuromuscular synapses. *Neuroscience* 149, 768-778 (2007).
2. Jang M, Zhu J, Liu Y, Yang M, Tian C, Jiang S, Wang Y, Guo H, Wang K, Shu Y. Enhancement of asynchronous release from fast-spiking interneuron in human and rat epileptic neocortex. *PLoS Biol* 10, e1001324 (2012).
3. Miki T. What we can learn from cumulative numbers of vesicular release events. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 257 (2019).
4. Miki T, Nakamura Y, Malagon G, Neher E, Marty A. Two-component latency distributions indicate two-step vesicular release at simple glutamatergic synapses. *Nat. Commun.* 9, 3943 (2018).
5. Malagon G, Miki T, Tran V, Gomez LC, Marty A. Incomplete vesicular docking limits synaptic strength under high release probability conditions. *Elife* 9, e52137 (2020).
6. Miki T, Midorikawa M, Sakaba T. Direct imaging of rapid tethering of synaptic vesicles accompanying exocytosis at a fast central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 14493-14502 (2020).

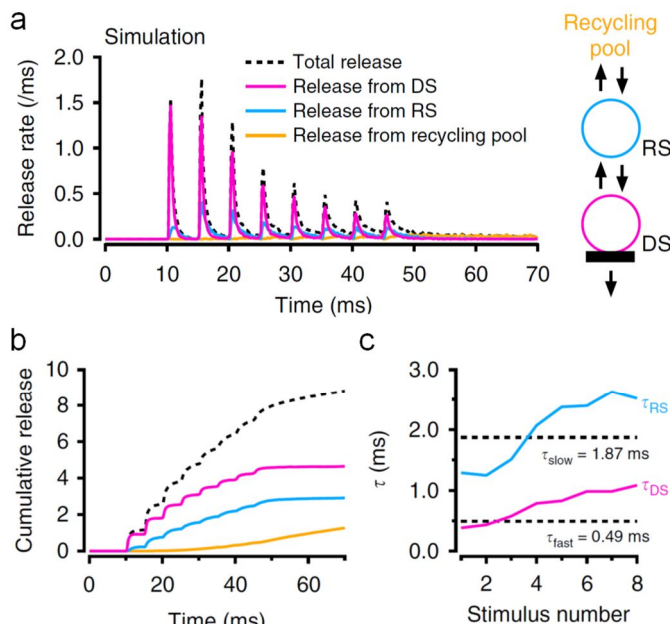


図 2) モデルを用いた小胞放出キネティクスの解析  
a: モデルの各プールに存在する小胞の放出レート (左)、2 ステップ放出モデル (右、DS: 放出部位、RS: 充填部位)、b: 累積小胞放出数の時間変化、c: 各プールからの放出の時定数。

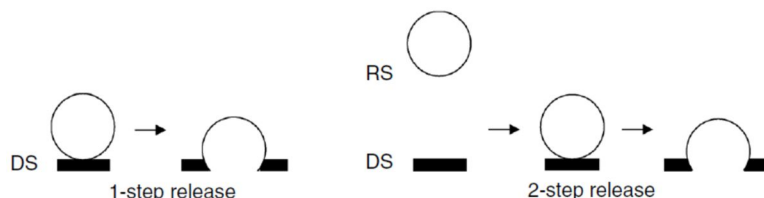


図 3) 1 ステップ放出と 2 ステップ放出

## 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 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miki T.	4. 巻 13
2. 論文標題 What we can learn from cumulative numbers of vesicular release events	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front. Cell Neurosci.	6. 最初と最後の頁 257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2019.00257	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 R., Miki T., Sakaba T.	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 J. Physiol.	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 Malagon G., Miki T., Tran V., Gomez G., Marty A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Incomplete vesicular docking limits synaptic strength under high release probability conditions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.52137	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, Nakamura Yukihiro, Malagon Gerardo, Neher Erwin, Marty Alain	4. 巻 9
2. 論文標題 Two-component latency distributions indicate two-step vesicular release at simple glutamatergic synapses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06336-5	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 T., Midorikawa M., Sakaba T.	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 of the United States of America	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三木崇史
2. 発表標題 小脳苔状線維シナプスにおけるシナプス小胞動態の解析
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takafumi Miki, Yukihiro Nakamura, Gerardo Malagon, Isabel Llano, Erwin Neher, Alain Marty
2. 発表標題 Two-component release latency distributions during presynaptic action potential trains at simple synapses
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木崇史
2. 発表標題 シナプス機能を規定する分子
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三木崇史
2. 発表標題 小脳苔状線維シナプスにおけるシナプス小胞の高速動員メカニズム解明
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社大学脳科学研究科ホームページにおける研究成果の公表 <a href="https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2018/0926/news-detail-153.html">https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2018/0926/news-detail-153.html</a> <a href="https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2019/0624/news-detail-177.html">https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2019/0624/news-detail-177.html</a> <a href="https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2020/0609/news-detail-203.html">https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2020/0609/news-detail-203.html</a>
---

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		
フランス	Paris Descartes		
ドイツ	Max Plank Institute		