

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06493

研究課題名（和文）シナプス素量成立時間の生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Physiological impact of synaptic vesicle filling with neurotransmitter

研究代表者

堀 哲也（Hori, Tetsuya）

沖縄科学技術大学院大学・細胞分子シナプス機能ユニット・グループリーダー

研究者番号：70396703

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、シナプス小胞充填時間の修飾機構と、神経活動頻度に及ぼす影響の解明を研究目的とした研究計画を実施した。1型小胞グルタミン酸輸送体欠損マウスを用いて、グルタミン酸シナプス充填時間の修飾機構と、神経活動頻度に及ぼす影響の解明を行った。1型グルタミン酸輸送体欠損マウスでは、野生型動物と比較して中枢神経シナプス前終末シナプス小胞充填速度が著しく(25%)減少するものの、2型グルタミン酸輸送体の働きにより野生型と同等以上のシナプス応答が観察された。中枢神経系興奮性シナプスにおいても、シナプス小胞充填速度が中枢神経機構の重要な律速過程である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

本研究課題では、電気生理学的手法と光学的手法を組み合わせ用い、神経伝達における素量成立時間の重要性について研究を遂行した。本研究課題においては、シナプス小胞充填の普遍性、あるいは部位特異性を解明する点が特に高い学術的独自性を有し、また、これまで変動しないパラメータとして考えられてきた素量 q 値を変動する値として検証しなおす点において高い創造性を持つ研究計画である。また計算機による脳コンピューティングの再構築に必要な正確なパラメータの提供といった応用が見込まれる点において将来的な波及効果が強く期待される。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we carried out a research plan aimed at elucidating the modification mechanism of synaptic vesicle refilling with neurotransmitter and its effect on synaptic transmission. By analyzing vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1)-deficient calyx of Held synapses, we found that VGLUT1 loss causes a drastic reduction in SV refilling rate down to 25% of wild-type value, with only subtle changes in basic synaptic parameters because of VGLUT2 expression. We found that the synaptic vesicle filling rate is an important rate-limiting process in central nervous system excitatory synapses.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 神経伝達物質 グルタミン酸 神経伝達物質輸送体 電気生理学 シナプス伝達 シナプス小胞 バッチクランプ法

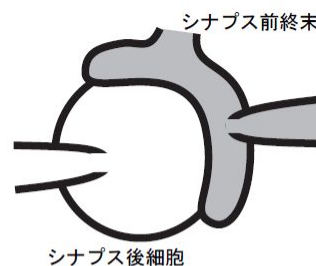
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の研究は技術的な制約から主に後シナプスでの受容体の挙動に着目して発展してきた。神経伝達情報の信号強度は N (シナプス伝達に与しうるシナプス小胞の総数) p (シナプス小胞の放出確率) および q (シナプス素量サイズ) の3つのパラメータの積 Npq で決定する。 q は後シナプス受容体の形質膜上における量により変動し、特に哺乳類における海馬長期可塑性では AMPA 型グルタミン酸受容体の形質膜への挿入と除去に着目した研究が多い。一方、1990年代後半から、シナプス終末におけるシナプス小胞の挙動は計測及び可視化技術の技術革新に伴って急速に注目を集め発展しているものの、軸索終末が微小であるためシナ



脳幹スライス表面の様子 左側:MNTB細胞体、右側:calyx of Held前終末から同時電気記録を行う。



NMIケイジドグルタミン酸を含む溶液で、シナプス前終末をホールセルパッチクランプする。

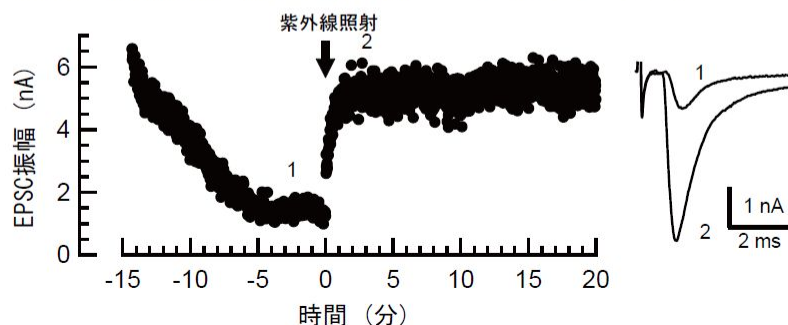


図1 グルタミン酸充填速度の計測実験概要

プス後細胞と比較し未だ直接的な研究知見が少ないのが現状である。

申請者は、げっ歯類脳幹における聴覚系興奮性シナプスにおいて、巨大シナプス前終末 calyx of Held での軸索終末内で光分解グルタミン酸の光分解実験を行った。この結果、シナプス小胞へのグルタミン酸充填時定数が 20 秒前後であり、1 分以内に再放出に備えうることを明らかにした。一方で近年、光遺伝学的手法と急速凍結を組み合わせた電子顕微鏡観察によると、シナプス前終末への活動電位到達に伴う開口放出直後極めて短時間(100 ミリ秒以内)で形質膜からシナプス小胞が回収、再利用され、数秒以内で新たな開口放出に備える結果が報告されている(Watanabe et al., Nature 2013)。この事実から、開口放出される時点でのシナプス小胞内の伝達物質量は完全には担保されず、特に神経が高頻度で活動している最中には不完全な充填状態でもシナプス伝達に動員され、古典的に(前シナプス性には)不変と考えられてきた素量サイズ q が大きく変動している可能性が示唆されるものの、詳細な検証がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題では、素量成立時間の神経伝達への影響を直接観察することで、素量成立時間がシナプス伝達強度を変動させる可能性を解明し、理解する事を研究の主要な目的とした。

より具体的には、電気生理学的手法と光学的手法を組み合わせ用い、神経伝達における素量成立時間の重要性について研究を遂行した。本研究課題においては、シナプス小胞充填の普遍性、あるいは部位特異性を解明する点が特に高い学術的独自性を有し、また、これまで変動しないパラメータとして考えられてきた素量 q 値を変動する値として検証しなおす点において高い創造性を持つ研究計画である。また計算機による脳コンピューティングの再構築に必要な正確なパラメータの提供といった応用が見込まれる点において将来的な波及効果が高く期待される。

3. 研究の方法

興奮性シナプスにおいて、光分解グルタミン酸を用いた電気生理学的測定によるシナプス小胞充填速度の計測手法の確立を行った。また充填速度の変化に伴う組織全体の脳計算能力への影響を網羅的かつ高精度の分解能で解析する事を試みた。

具体的な研究課題と実験方法は以下のとおりである。

小胞型グルタミン酸輸送体ノックアウト動物を用いた小胞神経伝達物質充填速度の計測 Watanabe らの報告と申請者のこれまでの発見を合わせ考えると、特に高頻度の神経活動中は素量サイズ q が著しく減少し、シナプス応答の持続時間や発火パターンの決定に大きく寄与している可能性が考えられる。申請者は、1型小胞型グルタミン酸輸送体(VGLUT1)KO動物を用い、シナプス小胞における輸送体発現量が小胞神経伝達物質充填速度に与える影響を直接観察した。また、高頻度発火中のシナプスにおいて、後細胞活動電位発生成否を観察し、素量成立時間が神経伝達に及ぼす生理学的意義について検証した。

4. 研究成果

申請者は1型小胞グルタミン酸輸送体欠損マウスを用いて、グルタミン酸シナプス充填時間の修飾機構と、神経活動頻度に及ぼす影響の解明を行った。1型グルタミン酸輸送体欠損マウスでは、野生型動物と比較して中枢神経シナプス前終末シナプス小胞充填速度が著しく減少し、高頻度神経活動中の神経伝達効率が破綻することをみいだした。申請者はこの研究成果を、高森らと共同で、興奮性シナプス伝達におけるシナプス小胞グルタミン酸充填速度の重要性を報告した(Nakakubo et al, Cell Reports, 2020)。中枢神経系興奮性シナプスにおいても、シナプス小胞充填速度が中枢神経機構の重要な律速過程であることを明らかにした(図2)。

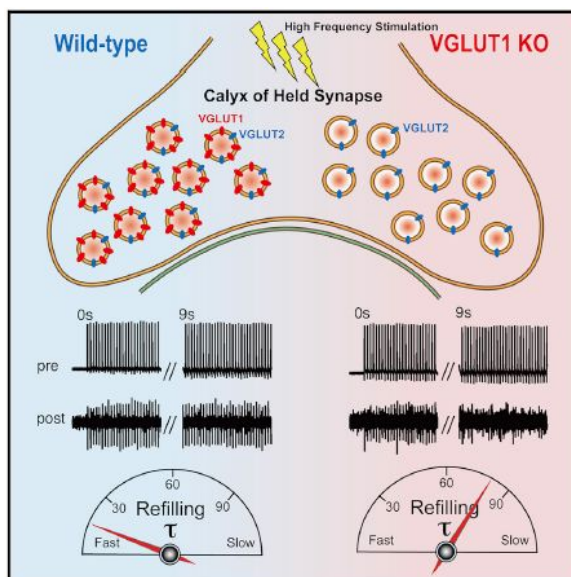


図2 グルタミン酸充填速度の生理学的重要性

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nakakubo Yutaro, Abe Saeka, Yoshida Tomofumi, Takami Chihiro, Isa Masayuki, Wojcik Sonja M., Brose Nils, Takamori Shigeo, Hori Tetsuya	4. 巻 32
2. 論文標題 Vesicular Glutamate Transporter Expression Ensures High-Fidelity Synaptic Transmission at the Calyx of Held Synapses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108040 ~ 108040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108040	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中久保 佑太郎
2. 発表標題 小胞型グルタミン酸輸送体の発現量が中枢神経系シナプス伝達に与える影響
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 阿部 冨華
2. 発表標題 小胞型グルタミン酸輸送体タイプ1(VGLUT1)欠損が神経活動低下を引き起こす様々な要因の検証
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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	マックスプランク研究所			