

機関番号：88001

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20700357

研究課題名 (和文) 2光子励起法を用いた単一アクティブゾーンの構造・機能の解析

研究課題名 (英文) Analysis of the structure and function of single active zone using two-photon microscopy

研究代表者

山下 貴之 (YAMASHITA TAKAYUKI)

沖縄科学技術研究基盤整備機構・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：40466321

研究成果の概要 (和文)：シナプス伝達における個々の伝達物質部位 (アクティブゾーン) の役割については不明な点が多く残されている。本研究では、従来不可能であった単一アクティブゾーンレベルでのシナプス小胞動態の解析を可能とし、個々のアクティブゾーンの構造・機能を明らかにすることを目指した。当初の計画では、2光子励起顕微鏡を用いた光学的手法を取り入れる予定だったが、実験上困難であったため、薬理的にアクティブゾーン周辺とそれ以外とを分離して解析する手法を用いた。その結果、アクティブゾーンの中心部に位置すると考えられる Ca チャネルの近傍において、伝達物質放出とその維持が精緻にコントロールされることを初めて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：Role of active zone, the site from which transmitter is released, in synaptic transmission is poorly understood. In this study, I attempted to investigate the structure and function of each active zone which had never been explored. Although I planned at the beginning to apply an optical method using two-photon microscopy, it was found not to be feasible experimentally. Therefore, I used a pharmacological approach to distinguish between active zones and other areas in a presynaptic terminal. Our novel findings indicated that transmitter release and its maintenance are finely controlled in the vicinity of each Ca channel which is thought to locate in the center of active zone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス、シナプス伝達、エンドサイトーシス、カルシウム、2光子励起顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系シナプス前末端は一般に極めて微小で、ガラス電極などを用いた電気生

理的アプローチが困難である。一方、延髄台形核に存在する calyx of Held シナプスは、例外的に大きなシナプス前末端を持ち、脳幹スライス上にて直接パッチクランプ記録が

可能である。その長所を利用して、これまでに、伝達物質放出に関する重要命題が次々と解かれてきた。しかしながら、calyx of Held シナプス前末端が持つ約 600 個のアクティブゾーン（伝達物質放出部位）の各々におけるシナプス小胞動態を捉えた研究は前例がなかった。そのため、個々のアクティブゾーンの伝達物質放出における役割については不明な点が多く残されていた。

(2) 単一アクティブゾーンからの伝達物質放出は後シナプス細胞からの電気記録によりとらえられる。しかしながら、伝達物質放出に伴い後シナプス受容体が飽和してしまうと、放出量を正しく定量化することができない。しかしながら、calyx of Held シナプスにおいては、特に、実験上よく使われる未成熟な発達段階において、この問題が未解決であった。

2. 研究の目的

本研究では、中枢神経系シナプス前末端における単一アクティブゾーンの構造・機能を解析する新手法の開発と、その新手法により伝達物質放出機構に関する新知見を得ることを目的とした。また、それに先立ち、単一アクティブゾーンからの伝達物質放出を後シナプス反応の振幅より定量できるか否かを検討するため、伝達物質による後シナプス反応の飽和メカニズムを調べることにした。

3. 研究の方法

生後 7-15 日のラット脳幹スライス標本を微分干渉顕微鏡下にて観察し、calyx of Held シナプスを同定の上、前後シナプスよりパッチクランプ記録を行った。パッチ電極より 2 光子励起刺激が可能なケージド Ca 試薬 (NDBF-EGTA) および Ca 蛍光指示薬 (Oregon Green BAPTA2 など) をシナプス前末端に注入し、Ca 濃度を経時的に測定しながら 2 光子励起刺激を行った。その他の実験にも同様の標本を用い、パッチ電極からシナプス前末端への薬剤および阻害ペプチドの投与、シナプス前末端膜容量測定、前後シナプスからの同時パッチクランプ記録を随時組み合わせた。

4. 研究成果

(1) 伝達物質による後シナプス受容体の飽和とメカニズム (*J. Physiol.* 2009)

生後 7-8 日目の calyx of Held シナプス前末端に高濃度の伝達物質グルタミン酸を注入することにより、小胞内伝達物質質量を増加させたところ、単一小胞のエキソサイトーシスに伴う後シナプス反応が増大した。しか

しながら、活動電位誘発性の後シナプス反応は増大せず、複数小胞が同時にエキソサイトーシスすることにより伝達物質が後シナプス受容体を飽和することが示された。

また、後シナプス受容体の脱感作を阻害剤によって抑制すると、後シナプス反応の飽和が解除されることから、受容体の飽和には脱感作が必要であることが示唆された。

このように、本研究により、伝達物質による受容体飽和のメカニズムが詳細に明らかになった。今後、幼若 calyx of Held シナプスを用いて単一アクティブゾーンの動態を後シナプス反応を指標として解析するためには、受容体脱感作を抑制しておく必要がある。

また、中枢神経系では、シナプス前末端からの伝達物質放出量が増加することによって後シナプス反応がしない例がしばしば観察されているが、本研究により、受容体脱感作がその現象に関与していることが初めて示された。

(2) 2 光子励起刺激法によるシナプス小胞動態の解析

シナプス前末端内に注入したケージド Ca 試薬を 2 光子励起刺激すると、局所的な Ca 濃度上昇が誘発され、Ca 濃度測定によってそれを捉えることができた。しかしながら、局所的 Ca 濃度上昇は直径 2 マイクロメートル以上に及び、単一アクティブゾーンのシナプス小胞動態を追跡するには、Ca 濃度上昇の空間的範囲をより小さく限定する必要が生じた。Ca 指示薬の種類や濃度、ケージド Ca 試薬の濃度を増減させるだけではこの問題は解決しなかったため、以下に記述する薬理学的な方法によって、単一アクティブゾーンレベルの小胞動態の解析を目指すことにした。

(3) 膜容量測定によるシナプス小胞動態の解析 (*Nat. Neurosci.* 2010)

EGTA と BAPTA は両者とも選択性の高い Ca キレーターとして知られているが、EGTA の Ca 結合速度は BAPTA のそれに比べて数百倍遅い。そのため、シナプス前末端に注入した BAPTA は Ca 濃度上昇をほとんどすべて抑制できるのに対し、EGTA は Ca 流入口である Ca チャネル近傍では効果が弱い。したがって、Ca チャネル近傍で起きる Ca 依存性の現象は、BAPTA で抑制されるが EGTA では抑制されない。この原理を利用して、膜容量測定法によって追跡した小胞エンドサイトーシスの Ca 依存性を調べたところ、生後発達によって、EGTA の効果が劇的に減少することが明らかになった (図)。

一方で、BAPTA は小胞エンドサイトーシスを完全にブロックすることから、生後発達を経たシナプス前末端では、Ca チャネル近傍の

Ca によって小胞エンドサイトーシスが誘発されることが示唆された。Ca 依存性小胞エキソサイトーシスによる伝達物質放出も Ca チャネル近傍で起きることが明らかになっていることから、Ca チャネル近傍での Ca 濃度上昇が小胞のエキソサイトーシスとエンドサイトーシスを同時に誘導し、小胞の再利用を高効率化する働きがあると考えられる。

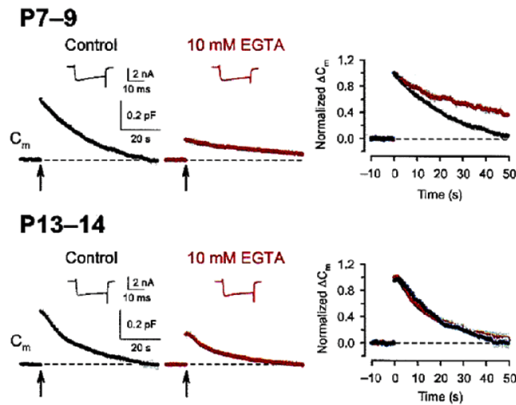


図. 小胞エンドサイトーシスの EGTA 感受性の生後発達に伴う消失

また、これまでシナプス小胞エンドサイトーシスに関わる Ca^{2+} に依存して活性化する一連のタンパク質として、カルモジュリン・カルシニューリンが重要と考えられていたが、活性阻害剤をシナプス前末端に注入して膜容量の記録を行ったところ、これらのタンパク質の小胞エンドサイトーシスへの関与は未成熟シナプスに限局しており、シナプスの成熟に伴いその関与が失われることが明らかになった。

これらの結果より、シナプス前末端では生後発達により小胞エンドサイトーシス制御機構が変化し、より Ca チャネル近傍（アクティブゾーン中心部）に局所化した効率的な機構を持つに至ることが示唆された。今後は、成熟シナプスの小胞エンドサイトーシスに関わる Ca^{2+} の下流にある分子を明らかにして、それに連なる分子との相互作用について研究を展開することが重要となる。 Ca^{2+} に依存して活性化する一連のタンパク質による小胞動態機構を解明することによって、認知症やパーキンソン病などの難治性神経疾患の分子基盤の一端が明らかになり、治療法の開発が可能になることが期待される。今回の研究成果はそのための第一歩と位置づけられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 山下 貴之 「Dynamin 依存性シナプス小胞エンドサイトーシス」 生体の科学 61, 548-549, 2010. 査読無
- ② Takayuki Yamashita^{CA}, Kohgaku Eguchi, Naoto Saitoh, Henrique von Gersdorff, and Tomoyuki Takahashi.
Developmental shift to a mechanism of synaptic vesicle endocytosis requiring Ca^{2+} nanodomain.
Nature Neuroscience 13, 838-844, 2010.
(^{CA}, Co-corresponding authors) 査読有
- ③ Hiroyasu Watanabe, Takayuki Yamashita, Naoto Saitoh *et al.*
Involvement of Ca^{2+} channel synprint site in synaptic vesicle endocytosis.
The Journal of Neuroscience 30, 655-660, 2010. 査読有
- ④ Takayuki Yamashita, Takeshi Kanda, Kohgaku Eguchi, and Tomoyuki Takahashi.
Vesicular glutamate filling and AMPA receptor occupancy at the calyx of Held synapse of immature rats.
The Journal of Physiology (London) 587, 2327-2339, 2009. 査読有
- ⑤ Maki Koike-Tani, Takeshi Kanda, Naoto Saitoh, Takayuki Yamashita, and Tomoyuki Takahashi.
Involvement of AMPA receptor desensitization in short-term synaptic depression at the calyx of Held in developing rats.
The Journal of Physiology (London) 586, 2263-2275, 2008. 査読有
- ⑥ Takeshi Nakamura*, Takayuki Yamashita*, Naoto Saitoh, and Tomoyuki Takahashi.
Developmental changes in calcium/calmodulin-dependent

inactivation of calcium currents at the rat calyx of Held.

The Journal of Physiology (London)

586, 2253-2261, 2008. (* Co-first authors) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① Yamashita T. “Mechanisms underlying synaptic vesicle endocytosis at a fast central synapse” 『Synapses & Circuits Seminar』 Lausanne, Switzerland (5th Feb. 2010) 査読無
- ② 山下 貴之、江口 工学、齋藤 直人、高橋 智幸 「シナプス小胞エンドサイトーシスにおけるナノドメイン・カルシウムの役割」 『第 87 回日本生理学会大会』 盛岡、2010 年 5 月 20 日、査読無
- ③ Yamashita T., Eguchi K., von Gersdorff H., and Takahashi T. “Developmental rearrangements of the mechanisms underlying vesicular endocytosis at the calyx of Held” 『第 39 回北米神経科学会』 Chicago, USA (19th Oct. 2009) 査読無
- ④ 山下 貴之、江口 工学、齋藤 直人、Henrique von Gersdorff、高橋 智幸 「シナプス小胞エンドサイトーシスにおけるカルシウム依存性分子機構の生後発達変化」 『平成 20 年度生理学研究所研究会「シグナル伝達の動的理解を目指す新戦略」』 岡崎、2009 年 10 月 2 日、査読無
- ⑤ 山下 貴之、江口 工学、Henrique von Gersdorff、高橋 智幸 「活動依存的シナプス小胞エンドサイトーシス加速機構の生後発達」 『第 32 回日本神経科学大会』 名古屋、2009 年 9 月 17 日、査読無

- ⑥ Yamashita T., Eguchi K., and Takahashi T. “Calmodulin-dependent endocytosis of synaptic vesicles at a fast central synapse” 『第 38 回北米神経科学会』 Washington DC, USA (17th Nov. 2008) 査読無
- ⑦ Watanabe H., Yamashita T., Saitoh N. and Takahashi T. “Direct binding of AP-2 to calcium channel synprint site is essential for clathrin-coated synaptic vesicle endocytosis” 『第 38 回北米神経科学会』 Washington DC, USA (17th Nov. 2008) 査読無
- ⑧ 山下 貴之、江口 工学、高橋 智幸 「シナプス小胞エンドサイトーシス活動依存性加速メカニズムの生後発達」 『平成 19 年度生理学研究所研究会「新たなコンセプトでシナプス伝達を考える」』 岡崎、2008 年 9 月 19 日、査読無
- ⑨ 渡邊博康、山下 貴之、齋藤 直人、高橋 智幸 「カルシウムチャンネルシンプ rint サイトと AP-2 の直接結合は、シナプス小胞のエンドサイトーシスを制御する。」 『第 31 回日本神経科学大会』 東京、2008 年 7 月 9 日、査読無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 貴之 (YAMASHITA TAKAYUKI)

沖縄科学技術研究基盤整備機構・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：40466321