

令和 6 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：2020～2023

課題番号：20H03358

研究課題名(和文) 中枢シナプスにおけるグルタミン酸とGABA共放出の可塑性とその役割

研究課題名(英文) Synaptic plasticity of co-release of glutamate and GABA in the central nervous system

研究代表者

橋本谷 祐輝 (Hashimotodani, Yuki)

同志社大学・研究開発推進機構・准教授

研究者番号：50401906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：グルタミン酸とGABA共放出シナプスの可塑性メカニズムを明らかにするために、乳頭体上核と海馬歯状回にある顆粒細胞とのシナプスにおける共放出の可塑性研究を行なった。顆粒細胞を脱分極させて細胞内カルシウム流入を誘導するとグルタミン酸作動性伝達において長期増強が引き起こされた。いっぽうでGABA作動性伝達では変化しなかった。この興奮と抑制比の変化により乳頭体上核の長期増強によって顆粒細胞の発火が変化することがわかった。さらにこのシナプスではスパイクタイミング依存性の長期増強も引き起こされることを明らかにした。このようにグルタミン酸・GABA共放出シナプスでは多様な可塑性が誘導されることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

興奮性を持つグルタミン酸と抑制的作用を持つGABAが同じ神経細胞の同一の神経終末から同時に放出されることは異例であり、これまであまり調べられてこなかった。本研究ではグルタミン酸とGABA共放出シナプスにおいて、長期に渡ってシナプス伝達が増強する、長期増強が起こることを初めて明らかにした。興味深い特徴として興奮性のグルタミン酸によるシナプス伝達でのみ増強し、GABAでは変化がなかったことから、より興奮にシフトすることを明らかにした。本研究はよくわかっていないグルタミン酸とGABA共放出シナプスの生理的役割を解明するうえで重要な示唆を与える研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanisms of synaptic plasticity of glutamate and GABA co-release, we examined the synaptic plasticity at the supramammillary nucleus (SuM) to dentate granule cell (GC) synapses. By postsynaptic depolarization, we found that glutamatergic SuM inputs exhibit long-term potentiation (LTP), while GABAergic co-transmission is not influenced. Owing to the dynamic change of excitatory and inhibitory balance of SuM inputs after induction of LTP, SuM inputs effectively discharge GCs. We further found that SuM-GC synapses exhibit spike-timing-dependent plasticity. Our findings indicate that SuM-GC synapses elicit different forms of plasticity and modulate GC outputs.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 シナプス可塑性 LTP 共放出

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一般に神経系において「1つのニューロンは1種類の神経伝達物質を合成・放出する」と考えられてきた。これをデールの原理と呼び、長らく信じられてきた。しかし近年の研究によると、必ずしもこの原理に当てはまらない事例が多々あり、予想以上に「1つのニューロンが複数の神経伝達物質を合成・放出する」ことがわかってきた(Burnstock, *Curr Opin Pharmacol*, 2004)。特に多いのがグルタミン酸や GABA などの主要な神経伝達物質と神経ペプチド、あるいはドーパミンなどのモノアミン系との共放出である。おそらく速い作用をもつ神経伝達物質とともに、こういったニューロモジュレーター作用を持つ神経伝達物質が放出されることによってシナプス伝達が様々に調節されると考えられる(Hnasko and Edwards, *Annu Rev Physiol*, 2012)。いっぽう、興味深いことに最近の研究によると、成熟したげっ歯類の脳でグルタミン酸と GABA という2つの速い作用をもつ興奮性と抑制性の神経伝達物質が同一の神経終末から放出される例が腹側被蓋野と外側手綱核で見つかり注目されている(Shabel et al, *Science*, 2014; Root et al, *Nat Neurosci*, 2014)。

最近、申請者は視床下部に位置する乳頭体上核から海馬への投射回路を解析した結果、乳頭体上核は歯状回の主要出力細胞である顆粒細胞および抑制性ニューロンに投射し、これらのシナプスでグルタミン酸と GABA が共放出されることを明らかにした(Hashimoto et al, *Cell Reports*, 2018)。さらに最近申請者は、乳頭体上核 顆粒細胞シナプスで顆粒細胞を脱分極させるとグルタミン酸放出によって生じる興奮性シナプス後電流(EPSC)が一過性に増強することを見出した。いっぽうで共放出される GABA による抑制性シナプス後電流(IPSC)は増加しなかった。すなわち、この現象は乳頭体上核入力との興奮と抑制のバランスを一過性に興奮側にシフトさせる効果がある。この結果は、共放出の可塑性が歯状回内の情報処理および海馬機能において重要な役割を担う可能性を示唆する。このような興奮/抑制のダイナミックな変化に着目し、共放出の可塑性を誘導、あるいは阻害することによって、これまで未解明のグルタミン酸と GABA 共放出の生理的役割の解明に迫れるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が見出した乳頭体上核 顆粒細胞シナプスにおける、グルタミン酸-GABA 共放出の生理的役割を分子・シナプスレベルで明らかにする。特に長期可塑性で起こる共放出比の変化を含めた興奮/抑制バランスのダイナミックな変化がシナプスや歯状回神経回路に与える効果を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では主に光遺伝学と電気生理学的手法を用いた。光遺伝学的手法を用い、乳頭体上核線維を光刺激するために、チャンネルロドプシン-2 (ChR2)を VGluT2-Cre マウスの乳頭体上核にアデノ随伴ウイルスを用いて発現させた。ウイルス注射後三週間のマウスの海馬急性スライス標本を作成し、ホールセルパッチクランプ法によって歯状回顆粒細胞から記録を行なった。光照射には LED を用いて5ミリ秒間照射した。

4. 研究成果

(1) 脱分極によって誘導される長期増強

記録細胞である顆粒細胞を予備的実験とは異なったパターンで脱分極させると、乳頭体上核からの EPSC シナプス応答が短期ではなく長期に渡って増強する長期増強(long-term potentiation: LTP)が誘導されることがわかった。この LTP は NMDA 受容体の阻害剤存在下でも起こったことから NMDA 受容体非依存的な LTP であることがわかった。さらに電位固定法ではなく電流固定法で膜電位記録を行い、電流注入によって顆粒細胞にバースト発火を引き起こすことによって LTP が誘導されることが明らかになった。二発ペア刺激による実験の結果、この LTP による変化はシナプス後部での変化を伴うことがわかった。

(2) 入力および標的細胞依存的な長期増強

興奮性入力を遮断して GABA による抑制性入力と同様の脱分極刺激を行なった場合、LTP は IPSC では起きないことがわかった。また乳頭体上核 抑制性ニューロン間シナプスでも LTP が起こらなかった。さらに乳頭体上核 CA2 錐体細胞シナプスでも起きなかった。すなわち脱分極誘導性 LTP は乳頭体上核 顆粒細胞間シナプスでの興奮性入力特異的に引き起こされることが明らかになった。

(3) 脱分極誘導長期増強の分子メカニズム

記録細胞内にカルシウムキレーターである BAPTA を入れると脱分極誘導性 LTP が阻害されることがわかった。さらに L 型電位依存性カルシウムチャンネルを阻害しても LTP が起きないことがわかった。すなわち脱分極による顆粒細胞内へのカルシウム流入が LTP 誘導に必須であること

がわかった。

さらにカルシウム下流のシグナル経路を明らかにするために PKC, PKA の寄与を調べたが、LTP に変化は認められなかった。次に CaMKII を調べたところ、その阻害剤で LTP が阻害されることがわかった。また小胞分泌に必須の SNARE 複合体を顆粒細胞内で阻害する処置を行うと LTP が起きなくなることがわかった。以上の結果から脱分極が引き金となり顆粒細胞にカルシウムが流入し、CaMKII を介してグルタミン酸受容体の一種である AMPA 受容体の細胞膜への輸送が起き、最終的に LTP が引き起こされることが明らかになった。

(4) 脱分極誘導性長期増強が顆粒細胞出力に与える役割

LTP 誘導による顆粒細胞出力の影響を明らかにするために顆粒細胞の発火頻度を調べた。乳頭体上核の単独の入力では顆粒細胞はいっさい発火しなかった。いっぽう、LTP 誘導刺激を与えて LTP を誘導すると乳頭体上核の単独入力によって高頻度で顆粒細胞を発火させることがわかった。さらに GABA 入力を阻害しておくと LTP によって乳頭体上核入力はさらに強く顆粒細胞を発火させることがわかった。すなわち LTP によって乳頭体上核入力のうち興奮性入力が増強することによって顆粒細胞を効率的に発火させることがわかった。さらに共放出する GABA は乳頭体上核入力を負に制御することが明らかになった。

(5) スパイクタイミング依存性の長期増強

脱分極性 LTP では NMDA 受容体非依存的であることがわかった。いっぽうで、本研究によって NMDA 受容体依存的な LTP も見出した。この LTP は乳頭体上核入力と顆粒細胞の発火をペアで刺激するいわゆるスパイクタイミング依存性の手法によって生じる LTP であることがわかった。そのメカニズムとして NMDA 受容体依存的であり、さらに CaMKII の活性化が必須であり、シナプス後部の変化で誘導されることがわかった。この LTP も脱分極性 LTP と同様に興奮性の乳頭体上核入力で起こり、GABA 入力では変化しないことがわかった。さらに乳頭体上核入力と顆粒細胞の発火のペア刺激の順番を逆にすると変化がないことがわかった。すなわち 10 ミリ秒から 20 ミリ秒間隔での乳頭体上核入力と顆粒細胞の発火のペア刺激によってのみ LTP が誘導された。

(6) スパイクタイミング依存性長期増強の入力依存性

NMDA 受容体依存的な LTP には入力依存性のあることが知られている。そこでスパイクタイミング依存性 LTP も入力依存性があるかどうか調べた。そのために青色光で活性化される一般的な Chr2 と赤色光によって活性化される ChrimsonR の 2 種類のチャンネルロドプシンを使って別々の集団の乳頭体上核ニューロンに発現させた。これにより 2 波長の光によって別々の乳頭体上核線維を刺激仕分けすることが可能となった。その結果、乳頭体上核入力と顆粒細胞の発火のペア刺激を行なった入力でのみ LTP が誘導され、ペア刺激を行わなかった対照の入力では LTP が起きないことがわかった。すなわち乳頭体上核 顆粒細胞シナプスにおけるスパイクタイミング依存性 LTP は入力依存性があることが明らかになった。

同様の方法を用いて、脱分極性 LTP についても調べた。興味深いことに脱分極性 LTP では赤色光刺激と青色光刺激のどちらでも LTP が誘導されることがわかった。すなわち脱分極性 LTP は脱分極した顆粒細胞に入力されるすべての乳頭体上核入力で入力非依存的に LTP が引き起こされることがわかった。

(7) スパイクタイミング依存性長期増強の顆粒細胞出力に与える役割

最後にスパイクタイミング依存性 LTP が顆粒細胞出力にどのような影響を与えるか調べた。以前の研究で乳頭体上核入力と嗅内皮質から投射される入力同期すると効率的に顆粒細胞が発火することがわかってきた。そこでスパイクタイミング依存性 LTP 前後で顆粒細胞発火に変化があるかどうか調べた。その結果、LTP が誘導されるとより効率的に顆粒細胞が発火することがわかった。すなわちスパイクタイミング依存性 LTP 誘導によって乳頭体上核入力のうち興奮性入力が増強することによって顆粒細胞を効率的に発火させることがわかった。以上の結果から乳頭体上核入力の興奮性シナプス入力における LTP は歯状回情報処理を制御する役割があることが明らかになった。

以上の成果は PNAS(2022)と Cell Reports(2022)誌に発表した。

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirai Himawari, Sakaba Takeshi, Hashimotodani Yuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Subcortical glutamatergic inputs exhibit a Hebbian form of long-term potentiation in the dentate gyrus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111871 ~ 111871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111871	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 -
1. 著者名 Fukaya Ryota, Hirai Himawari, Sakamoto Hirokazu, Hashimotodani Yuki, Hirose Kenzo, Sakaba Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased vesicle fusion competence underlies long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.add3616	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 -
1. 著者名 Tabuchi Eri, Sakaba Takeshi, Hashimotodani Yuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Excitatory selective LTP of supramammillary glutamatergic/GABAergic cotransmission potentiates dentate granule cell firing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2119636119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119636119	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 Kuboyama Kazuya, Inoue Takafumi, Hashimotodani Yuki, Itoh Takuya, Suzuki Tohsuke, Tetsuzawa Aya, Ohtsuka Yosuke, Kinoshita Ryo, Takara Ren, Miyazawa Tohru, Gusain Pooja, Kano Masanobu, Yamada Maki K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Traceable stimulus-dependent rapid molecular changes in dendritic spines in the brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-72248-4	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 -

1. 著者名 Kesner AJ, Mozaffarilegha M, Thirtamara Rajamani K, Arima Y, Harony-Nicolas H, Hashimotodani Y, Ito HT, Song J, Ikemoto S	4. 巻 43
2. 論文標題 Hypothalamic Supramammillary Control of Cognition and Motivation.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7538-7546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1320-23.2023	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

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 橋本谷祐輝、田淵詠梨、坂場武史
2. 発表標題 乳頭体上核一歯状回顆粒細胞シナプスにおける脱分極誘導性 LTP
3. 学会等名 第45回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本谷祐輝、平井向日葵、坂場武史
2. 発表標題 乳頭体上核一歯状回顆粒細胞シナプスで誘導される NMDA 受容体依存性の長期増強
3. 学会等名 第100回 日本生理学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本谷祐輝、田淵詠梨、坂場武史
2. 発表標題 乳頭体上核 歯状回顆粒細胞シナプスにおけるシナプス可塑性の解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Hashimotodani
2. 発表標題 Long-term plasticity in the supramammillary-dentate gyrus circuit.
3. 学会等名 The Spring Hippocampal Research Conference, Verona, Italy. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Hashimotodani
2. 発表標題 Hebbian and non-Hebbian forms of long-term potentiation at the supramammillary-dentate granule cell synapses.
3. 学会等名 Neuroscience 2023, Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC, USA. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takafumi Miki, Yuki Hashimotodani and Takeshi Sakaba	4. 発行年 2022年
2. 出版社 IOP Publishing	5. 総ページ数 372
3. 書名 Exocytosis: From Molecules to Cells	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>EurekaAlert https://www.eurekaalert.org/news-releases/977915 新着ニュース https://brainscience.doshisha.ac.jp/news/2023/0106/news-detail-279.html</p>
--

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
---------	---------