

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2013

課題番号：21500372

研究課題名(和文) 脳海馬における記憶・学習神経回路の解析：単一苔状線維シナプス可塑性のメカニズム

研究課題名(英文) Analysis of the neuronal circuit for learning and memory in the hippocampus: the mechanism of the plasticity at a single mossy fiber synapse

研究代表者

森 正弘 (Mori, Masahiro)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：60294203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：記憶・学習に重要な脳部位、脳海馬の神経回路の第二番目のシナプス、苔状線維シナプスでの、記憶・学習の細胞モデルと考えられているシナプス伝達長期増強(long-term potentiation: LTP)のメカニズムの解明を目指し、パッチクランプ法を用いた電気生理学的実験を行った。苔状線維シナプスLTPの誘発には、単一ではなく多数の苔状線維からの同時情報入力が必要であり、苔状線維シナプスLTPは協力的であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Electrophysiological experiments were performed using the patch-clamp technique to clarify the mechanism of long-term potentiation (LTP) of the synaptic efficacy, a cellular model of learning and memory, at the mossy fiber synapse, the second synapse of the neuronal circuit of the hippocampus, an important brain area for learning and memory. Mossy fiber LTP turned out to be cooperative that simultaneous multiple inputs of the information rather than a single fiber input are required for its induction.

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：神経科学 シナプス 神経回路 脳組織培養 海馬

1. 研究開始当初の背景

記憶形成の過程に関連して脳海馬、中でも特に CA3 野は、注目されている。そこでは反回側枝により錐体細胞が相互に密に結合し、連合学習の元となる回路を形成している。この特徴的な神経組織構築は、パターン完成とパターン分離という、エピソード記憶や空間記憶の貯蔵と再生という重要な二つの特性の理想的な基礎になるものと考えられている (Nakazawa et al., 2004; Papp et al., 2007)。CA3 野錐体細胞のネットワークは、歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維を介して大脳皮質からの情報を受け取っている。それぞれの苔状線維終末は特に大きい構造となっており、45 個の神経伝達物質放出部位と 20000 個の伝達物質顆粒を有している (Rollenhagen et al., 2007)。その突出した大きさ、錐体細胞細胞体近位の樹状突起にシナプスを形成すること、そして、そのシナプス伝達の強い促進性から、苔状線維終末が CA3 野錐体細胞と成すシナプスは、シナプス後細胞に活動電位を発生させる可能性が高い、起爆シナプスと考えられている (Henze et al., 2000)。これらの特性により、単一の苔状線維は独立してネットワーク全体を駆動し、学習時の入力刺激を際立たせることになるが、一方、無制御時には、CA3 野がけいれん波を誘発し易くなることにもなる。そして過度の興奮を防ぐ強力な抑制システムが苔状線維入力には備わっている。過去の多くの研究により苔状線維を介した応答の性質が報告されているが (Nicoll & Schmitz, 2005)、海馬における神経ネットワークの特性を生み出す、CA3 野連合回路内での相互作用はいまだ明らかにされていない。同定された神経細胞対からの記録により研究代表者らは、苔状線維 CA3 野錐体細胞シナプスが抑制優位の信号を送ることを発見した。その信号は単シナプス性興奮が 2 シナプス性抑制を伴った回路により起動されていることも明らかにした。興味深いことに、この応答は神経細胞の発火頻度が増すと興奮優位の信号に変換されることも明らかになった (Mori et al., 2004)。単一神経細胞が、単位神経回路を介し神経伝達のスイッチを担うこのメカニズムは、電気回路における典型的な構成素子であるハイパスフィルターと同等の役割を果たすものと考えられる。この成果に続き、研究代表者は、このシナプスにおける短期シナプス伝達増強について調べた。そして、苔状線維シナプスは伝達物質放出確率が低いいため、顆粒細胞での低頻度 (0.1 Hz) の活動電位発火ではシナプス伝達成功率は低いものの、高頻度の活動電位発火では CA3 野錐体細胞および抑制性介在ニューロンに対してグルタミン酸の放出確率が増加した。そして、その後は低頻度の活動電位発火でも興奮に抑制が続く 2 相性の応答が、CA3 野錐体細胞に惹起された。この現象は顆粒細胞から介在ニューロンへのシナプスにおいて活

動電位スパイクの伝達が高率に起こること、苔状線維が錐体細胞よりも介在ニューロンに数多くシナプス結合していること、そして介在ニューロンが多い CA3 野錐体細胞に抑制性出力を送っていることによると考えられる (Mori et al., 2007)。この、一過性に抑制性ネットワークを動員する特性は、高度に結合している CA3 野の過度な興奮を抑制し、また、新しく形成されつつある記憶情報を余分な神経細胞の活動から保護している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題の第一目的は、CA3 野錐体細胞での苔状線維シナプスの長期可塑性の誘発に必要な条件を同定することである。シナプスの長期増強現象 (LTP) は、学習に関連した細胞レベルのモデルと考えられているので、この鍵となる海馬シナプスでの LTP の特性を明らかにすることは大変重要である。初期の研究により苔状線維での LTP は、神経伝達物質放出確率が増加するシナプス前の過程の増強によるものであることが示されている (Nicoll & Schmitz, 2005)。対照的に、他のほとんどの LTP は、シナプス後細胞における、受容体の伝達物質に対する感受性や数の増加に起因する、シナプス後の過程の変化によるものである。一般には苔状線維シナプスでの可塑性は個々のシナプスに備わった特性と考えられている。苔状線維が刺激されれば、短期のシナプス伝達増強が認められることはよく知られている。多数の苔状線維を細胞外刺激するとパッチクランプ記録した CA3 野錐体細胞で LTP が誘発されることも多く報告されている。しかし、苔状線維シナプス LTP は、いまだかつて単一のシナプスで示されたことはない。苔状線維シナプス LTP が単一線維刺激では誘発されない場合、LTP の誘発には苔状線維終末間での相互作用に基づく新たなメカニズムが必要であることが示唆される。LTP の際には起こり、短期のシナプス伝達増強では起こらない、この新たなシナプス間作用のメカニズムを解明することも目標とする。

3. 研究の方法

実験標本としては、研究代表者がかつて共同研究を行った Gähwiler 博士が開発した、ローラーチューブ法に基づく培養海馬切片を用いる (Gähwiler et al., 1998)。本培養脳切片標本では海馬歯状回や CA3 野の構造がよく保たれ、また、急性脳切片標本に伴う、多くの神経軸索路が切断されているという問題からは、無縁である。さらにローラーチューブ法に基づく培養脳切片標本では、神経細胞の単層構造により容易に異なるタイプの細胞を同定、確認することができる。シナプス結合した神経細胞対からの記録は、研究代表者が考案した「Potassium puff search」を用いる (Mori et al., 2004)。まず、シナ

プス後細胞となる CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、次に歯状回顆粒細胞層を高濃度カリウム内液で満たしたパッチ電極でシステムチックに走査する。このパッチ電極は、電極先端から至近の顆粒細胞を脱分極させるので、シナプスで連絡した顆粒細胞が脱分極した時は、同時に記録している CA3 野錐体細胞に応答が現れる。これをモニタし、同定した連絡顆粒細胞をパッチクランプ記録し、連絡した顆粒細胞 CA3 野錐体細胞対の記録が可能となる。この方法により、従来、不可能であった歯状回顆粒細胞 CA3 野錐体細胞対の記録が約 10%の成功率で可能となった。単一苔状線維シナプス可塑性の誘発は、上記連絡細胞対記録で顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコル(100Hz 1 秒間を 10 秒毎に 3 回)で活動電位を惹起し、その後、CA3 野錐体細胞から記録される応答をモニタする。一方、細胞外刺激による苔状線維シナプス可塑性の誘発は、歯状回に刺激電極を設置した後、CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、そして LTP 誘発のためのプロトコル(100Hz 1 秒間を 10 秒毎に 3 回)で複数の顆粒細胞に刺激を与えた後、CA3 野錐体細胞から記録される応答の増大を記録する。

4. 研究成果

(1) 苔状線維シナプスでの LTP を誘発するために必要な条件を明らかにすることを目標として、研究を行った。単一顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコル(100Hz 1 秒間を 10 秒毎に 3 回)で活動電位を惹起し、その後、CA3 野錐体細胞から記録される応答をモニタするものの、LTP は誘発されなかった。一方、歯状回に刺激電極を設置した後、CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、複数の顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコルで刺激を与えた後、CA3 野錐体細胞から記録される応答をモニタすると、LTP が記録された。最小細胞外刺激法の標準的なプロトコルを用いた場合、LTP は誘発されなかった。以上のことから、苔状線維シナプス LTP の誘発には複数の苔状線維が刺激される必要があることが明らかになった。今後は、この協力作用による LTP に、どのようなメディエータが介在するのかなど、そのメカニズムの解明を進める計画である。

(2) 単一苔状線維刺激と多数の苔状線維刺激の機能的な相互作用を調べることを目標として、研究を行った。歯状回に細胞外刺激電極を設置した後、シナプス後細胞となる CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、次に連絡した顆粒細胞 CA3 野錐体細胞対の記録を行った。そして、単一顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコルで活動電位を惹起し、同時に、細胞外刺激電極により同様の LTP 誘発プロトコルで他の複数の顆粒細胞に刺激を与えた後、CA3 野錐体細胞

から単一顆粒細胞刺激により記録されるシナプス応答の変化をモニタし、単一苔状線維 CA3 野錐体細胞シナプスでの可塑性が修飾を受けるか調べたところ、有意な差を認めなかった。以上のことから、単一苔状線維 CA3 野錐体細胞シナプスでの可塑性は、他の苔状線維シナプスでの可塑性誘発により修飾を受けない可能性が考えられた。

(3) LTP を誘発する高頻度刺激の際に、フィードフォワード抑制がどのような役割を果たすのかを追求することを目標として、研究を行った。連絡した顆粒細胞 CA3 野錐体細胞対の記録を行った。単一顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコルで活動電位を惹起し、その後、CA3 野錐体細胞から記録される応答の抑制性成分をモニタすると、一過性に抑制性成分の増大が認められた。一方、歯状回に細胞外刺激電極を設置した後、CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、細胞外刺激電極により複数の顆粒細胞に同様のプロトコルで刺激を与えたところ、CA3 野錐体細胞から記録される応答の抑制成分増大が認められ、それは、単一顆粒細胞を刺激した際の増大の程度と差は認められなかった。苔状線維回路出力において、高頻度入力後のフィードフォワード抑制増大に抑制性介在神経細胞が動員されるメカニズムは、刺激される苔状線維の数には依存しない可能性が示唆された。

(4) CA3 野錐体細胞における苔状線維シナプス伝達効率の変化と介在神経細胞における苔状線維シナプス伝達効率の変化とで、その特性に違いがあるかを解析し、海馬苔状線維シナプス可塑性のメカニズムの解明を目標として、研究を行った。連絡した顆粒細胞 CA3 野錐体細胞(あるいは介在神経細胞)対の記録を行った。単一顆粒細胞に LTP 誘発のためのプロトコルで活動電位を惹起し、その後、CA3 野錐体細胞から記録される興奮性シナプス後電流 (EPSC) 応答をモニタすると、CA3 野錐体細胞あるいは介在神経細胞どちらの場合も LTP 誘発刺激直後は EPSC の増大が認められたが、それらは一過性であり、LTP 誘発刺激後 30 分には刺激前の大きさに戻った。CA3 野錐体細胞からパッチクランプ全細胞記録を行い、歯状回に設置した細胞外刺激電極により複数の顆粒細胞に同様のプロトコルで刺激を与えたところ、CA3 野錐体細胞から記録される応答の EPSC 増大が認められ、それは、LTP 誘発刺激後 30 分後も認められた。刺激電極による複数の苔状線維刺激では、抑制性介在神経細胞に LTP が誘発されないことが示されている (Maccaferri et al., 1998)。以上のことから、苔状線維顆粒細胞からの苔状線維は CA3 野錐体細胞と抑制性介在神経細胞にシナプスを形成するが、それらは協力的に、総じて苔状線維回路出力として興奮性信号を促進する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Toyoshima, D., Mandai, K., Maruo, T., Supriyanto, I., Togashi, H., Inoue, T., Mori, M., Takai, Y. Afadin regulates puncta adherentia junction formation and presynaptic differentiation in hippocampal neurons. PLoS One, 査読有, 9, 2014, e89763. (DOI:10.1371/journal.pone.0089763).

Watt, A. J., Cuntz, H., Mori, M., Nusser, Z., Sjöström, P. J., Häusser, M. Traveling waves in developing cerebellar cortex mediated by asymmetrical Purkinje cell connectivity. Nature Neuroscience, 査読有, 12, 2009, 463-473

〔学会発表〕(計 2 件)

丸尾知彦、豊嶋大作、萬代研二、富樫 英、井上貴仁、山本昆明、三好 淳、イルワンスプリヤント、森 正弘、高井義美。アファディンの海馬神経細胞におけるシナプス形成への関与。Neuro2013 (第36回日本神経学大会) 2013年6月20日～23日、京都

森 正弘、Electrical coupling between motoneurons in spinal cord, 国際生理学学会、2009年7月31日、京都

〔図書〕(計 2 件)

Mori, M., Rikitake, Y., Mandai, K., Takai, Y. Roles of nectins and nectin-like molecules in the nervous system. In Cell adhesion molecules: implications in neurological diseases, Advances in Neurobiology (Berezin, V. and Walmond, P.S., eds.), Springer, 2014;8:91-116.

Shimono, Y., Rikitake, Y., Mandai, K., Mori, M., Takai, Y. Immunoglobulin superfamily receptors and adherens junctions. Subcell Biochem. 2012;60:137-170.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/neuron>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 正弘 (MORI, Masahiro)

神戸大学・大学院保健学研究科・准教授