

機関番号：63905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700417

研究課題名（和文）シナプス小胞放出ダイナミクス（確率・多重性・同期性）の制御分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying the release dynamics of synaptic vesicles

研究代表者：

佐竹 伸一郎 (SATAKE SHIN'ICHIRO)

生理学研究所・生体情報研究系・助教

研究者番号：30360340

研究成果の概要（和文）：ラット小脳顆粒細胞（上向性線維）の 2 回連続刺激（ペアパルス刺激）に伴い、分子層介在ニューロンから記録される興奮性シナプス後電流（EPSC）の 2 回目 EPSC の振幅値と減衰時定数（ τ ）が一過性（30–100 ミリ秒）に増大する現象を発見した（ペアパルス増強：paired-pulse facilitation, PPF）。キネティクス解析、シミュレーション解析ならびに薬理的検討を行い、①振幅 PPF はシナプス小胞の放出確率と放出多重性が増大したこと、②減衰時間 PPF は放出多重性増大に伴い大量に放出された伝達物質グルタミン酸がシナプス外領域に拡散・蓄積したことにより引き起こされたことを示唆する結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Using the whole-cell patch clamp recording in rat cerebellar slices, we found different forms of paired-pulse facilitation (PPF) at the excitatory synaptic transmission from granule cells (GCs) to molecular-layer interneurons (INs). Paired-pulse activation of GC ascending axons at short intervals (30–100 ms) caused a significant facilitation not only in the peak amplitude (PPF_{amp}) but also in the decay-time constant (PPF_{decay}) of the excitatory postsynaptic currents (EPSCs) recorded from INs. The results of pharmacological tests, kinetics analyses and computer simulations suggest that the mechanisms underlying the respective types of PPF were different. PPF_{amp} was elicited by dual increase in the probability of the vesicular release and in the multiplicity of released vesicles. On the other hand, PPF_{decay} was caused by extrasynaptic spillover of the GC transmitter glutamate and following their intersynaptic pooling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ラット、小脳、分子層介在ニューロン、顆粒細胞、ペアパルス増強、シナプス前性制御、スライスパッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

中枢神経の軸索終末では、活動電位の伝播に伴い、1 個のシナプス小胞が開口放出されると考えられてきた（単一性放出：

monovesicular release)。一方、1 回の活動電位当たり、複数のシナプス小胞が複数の放出部位（release site）から同期的に、もしくは単一の放出部位から連続的に放出される、多重性放出（multivesicular release）の存在

も指摘されている。これまでに、単一小胞放出性シナプスの例として海馬放線状層 - CA1 錐体細胞間興奮性シナプス (Hanse E. and Gustafsson B., *J. Physiol. (Lond)* 531, 467–480. 2001) が、多重放出性シナプスの例として小脳登上線維 - プルキンエ細胞間興奮性シナプス (Wadiche J. I. and Jahr C. E., *Neuron* 32, 301–313. 2001) が報告されている。シナプス小胞の単一性/多重性放出の違いは、神経終末の Ca^{2+} 動態や放出機構 (release machinery) の性質の差異によって生じると推定されてきた。しかしながら、神経終末のシナプス小胞放出ダイナミクス (単一性・多重性) を制御する分子メカニズムは、まだほとんど解明されていないのが現状である。また、各放出部位において単一性放出⇔多重性放出の相互遷移が起きる可能性についても詳しく検討されていない。

小脳皮質において顆粒細胞の軸索は2つに分岐した後、平行線維としてプルキンエ細胞の遠位樹状突起にグルタミン酸作動性の興奮性シナプス結合を作る。同時に顆粒細胞は、籠細胞や星状細胞(分子層の GABA 作動性介在ニューロン) の樹状突起にもシナプス結合している。長期増強・長期抑圧の研究例を挙げるまでもなく、平行線維 - プルキンエ細胞間シナプスの情報伝達特性は古くから精力的に研究されてきた。しかしながら、非常に多くの平行線維が単一プルキンエ細胞にシナプス入力するため、個々の顆粒細胞 (平行線維) 軸索終末におけるシナプス小胞放出の単一性・多重性を検討することはきわめて困難であった。

一方、顆粒細胞は平行線維への分岐点よりも細胞体に近い軸索領域において、介在ニューロン (籠細胞) の軸索起始部に少数の瘤状のシナプス結合 (7~8 本の顆粒細胞軸索に由来) を形成することが報告されている (上向性線維: Hátori J., *Cell Tiss. Res.* 217, 553–562. 1981)。こうした形態的特徴 (小型細胞の細胞体へのシナプス結合ならびに入力線維の少なさなど) から、上向性線維 (顆粒細胞) - 介在ニューロン (籠細胞) 間興奮性シナプスは、小胞放出単一性・多重性の制御基盤を検討する優れた実験系になると考えた。

2. 研究の目的

このような背景に基づき、顆粒細胞上向性線維 - 分子層介在ニューロン間軸索起始部型興奮性シナプス伝達について詳細な解析を行った。その過程で、上向性線維の2回パルス刺激 (30~100 ミリ秒間隔) に伴い、介在ニューロンにおいて記録される興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current, EPSC) の2回目の振幅値と減衰時

定数 (decay-time constant, τ) が、刺激間隔に依存して著しく増大する現象を見出した (ペアパルス増強 paired-pulse facilitation, PPF: 図1)。

これまでに実施した予備実験により、振幅 PPF、減衰時間 PPF とともにシナプス小胞の放出多重性の変化 (即ち、単一小胞放出から多重小胞放出への可逆的变化) を介したシナプス前性機構により惹起されたことを示唆する結果を得た。しかしながら、EPSC の振幅ならびに減衰時間がシナプス前性機構によって制御されるという現象はこれまで報告がなく、その分子的基盤や生理的意義は現在のところ全く不明である。こうした理由から、顆粒細胞 - 介在ニューロン間シナプスにおいて活動電位の連続発生がシナプス小胞放出ダイナミクス (放出確率ならびに放出単一性・多重性、放出同期性) を変化させるメカニズムを明らかにすることは、脳の情報処理に関わる基礎過程を理解するためにも重要な課題であると考えた。

3. 研究の方法

本研究では、自然科学研究機構・動物実験センターの指針に従い動物実験を実施した。当機構の動物実験委員会で審査の上、許可された計画に基づき実験を行った。また、実験動物に苦痛を与えないよう麻酔・安楽死処置には十分な注意を払った。

実験には、幼若ラット (Wistar 種、出生後2~3 週齢) を用いた。小脳スライスパッチクランプ法 (Satake S. et al., *Nat. Neurosci.* 3, 551–558. 2000; *J. Neurosci.* 26, 2278–2289. 2006; *Eur. J. Neurosci.* 32, 1843–1853. 2010) に薬理学的手法を適用することにより、顆粒細胞 - 介在ニューロン間 EPSC ペアパルス増強の発現メカニズムを追究した。

(1) キネティクス解析

顆粒細胞 - 介在ニューロン間シナプスの基本的性質を明らかにするため、EPSC のペアパルス比 (刺激間隔を 30~1000 ミリ秒に設定) を比較した。また、EPSC を初期相・ピーク相・減衰相に分けて詳細に解析した。減衰相のキネティクス解析には、単純指数関数 (single-exponential fitting procedure) を適用した。

(2) 薬理学実験: ペアパルス増強の発現メカニズムの検討

シナプス小胞放出過程や細胞内シグナル伝達経路に関わる各種モジュレータ試薬を脳スライス標本に灌流投与して、顆粒細胞 - 介在ニューロン間シナプス伝達のペアパル

ス増強におけるシナプス前/後性機構の関与を検討した。特に、 Ca^{2+} はシナプス小胞の開口放出ダイナミクスを制御する主要因子の一つであること (Catterall W. A. and Few A. P., *Neuron* 59, 882–901. 2008) から、 Ca^{2+} チャンネルサブタイプ選択的阻害薬が、PPF (振幅・減衰時間) におよぼす影響を重点的に観察した。

さらに、スライス灌流液 (人工脳髄液) の Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換して誘発した微小シナプス後電流 (miniature EPSC, Sr^{2+} -mEPSC) を記録し、神経伝達物質の放出確率や後シナプス性グルタミン酸受容体の性質についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) 小脳顆粒細胞 - 介在ニューロン間 EPSC ペアパルス増強の発現メカニズム

ペアパルス増強の発現機序を明らかにするため、EPSC を初期相、ピーク相、減衰相に分けて詳しく解析した。2 回目 EPSC (刺激間隔: 30 ミリ秒) では、刺激から EPSC 開始までの反応潜時 (latency) が 1 回目 EPSC よりも顕著に短縮していた。一方、EPSC 開始点からピークまでの到達時間 (time to peak) は延長していた。また、2 回目 EPSC 減衰相について、二重指数関数 (double-exponential fitting procedure) を適用して急速減衰成分 (τ_{fast}) と緩徐減衰成分 (τ_{slow}) に分離して解析を行い、減衰時間のペアパルス増強は τ_{slow} の構成比率 ($\%_{\text{slow}}$) 増大により惹起されていることを明らかにした (図 1)。

さらに薬理学的手法を用いて、ペアパルス増強の分子基盤について検討を行った。グルタミン酸輸送体阻害薬 TBOA (30 μM) は、 τ_{slow} と $\%_{\text{slow}}$ をともに増大させて減衰時間のペアパルス増強を亢進した。一方、グルタミン酸受容体の低親和性競合阻害薬 γ -DGG (200 μM) は、振幅のペアパルス増強を促進するとともに、 $\%_{\text{slow}}$ を減少させて減衰時間のペアパルス増強を減弱した。また、ペアパルス刺激に伴い、 Sr^{2+} -mEPSC の頻度は増大した。しかし、mEPSCs の平均振幅や減衰時間に有意な変化は認められなかった。

こうした観察結果に基づき、①振幅増大はシナプス小胞の放出確率と放出多重性が増大したこと、②減衰時間増大は放出多重性増大に伴い大量に放出された伝達物質グルタミン酸がシナプス外領域に拡散・蓄積したことにより引き起こされたと結論した。また、この PPF 発現メカニズムは、コンピュータシミュレーションを用いた解析によっても強く支持された。

(2) 多重性シナプス小胞放出のカルシウムチャンネルサブタイプ依存性

神経終末に流入する Ca^{2+} はシナプス小胞の開口放出を促す直接的因子であることから、顆粒細胞神経終末の Ca^{2+} チャンネルに着目して、減衰時間 PPF (即ち、多重性放出) の発現メカニズムを検討した。減衰時間 PPF は、 $\text{Ca}_v2.1$ チャンネル選択的阻害薬 ω -agatoxin-IVA (AgTX, 0.1 μM) によって有意に減弱した (図 2)。このとき、 τ_{fast} や τ_{slow} の成分には有意な変化は認められず、 $\%_{\text{slow}}$ のみが減少していた。一方、 $\text{Ca}_v2.2$ チャンネル阻害薬 ω -conotoxin-GVIA (CgTX, 1 μM) ならびに $\text{Ca}_v2.3$ チャンネル阻害薬 SNX-482 (0.1 μM) は、減衰時間 PPF に無効であった (図 2)。こうした結果は、 Ca_v2 チャンネルサブタイプに依存した放出多重性制御機構が存在することを示唆している。

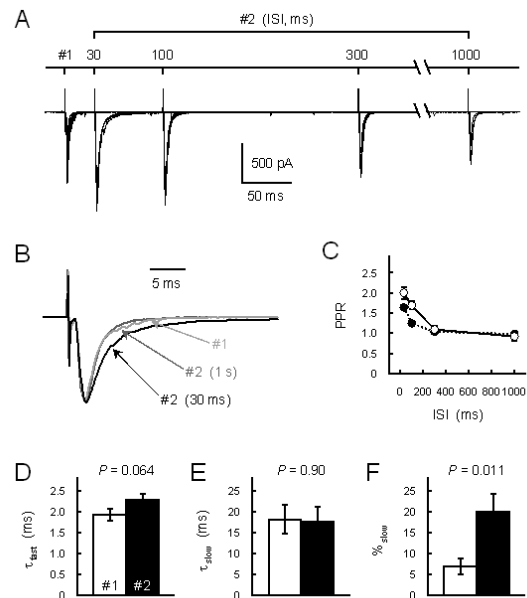


図 1: 小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間興奮性シナプス伝達におけるペアパルス増強。(A) 顆粒細胞 (上向性線維) のペアパルス刺激に伴い、介在ニューロンから記録される 2 回目 EPSC の振幅値と減衰時定数 (τ) が一過性 (刺激間隔 interstimulus interval, ISI: 30–100 ミリ秒) に増大した。(B) 1 回目 EPSC と 2 回目 EPSC の振幅を揃えた平均トレース。(C) 刺激間隔とペアパルス比の相関性プロット (○: 振幅値, ●: 減衰時定数)。(D–F) 1 回目 (#1) ならびに 2 回目 EPSC (#2: ISI, 30 ミリ秒) の減衰相に二重指数関数を適用して急速減衰成分 (τ_{fast}) と緩徐減衰成分 (τ_{slow}) に分離して比較した。減衰時間 PPF は τ_{slow} の構成比率 ($\%_{\text{slow}}$) 増大により惹起されていることが分かる。

(3) $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性の存在

シナプス前性制御と PPF の関係について検討を行い、減衰時間 PPF を指標にして $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介する複数のシナプス前抑制機構が存在することを発見した。

$G_{i/o}$ 共役型受容体作用薬の灌流投与に伴い、顆粒細胞 - 介在ニューロン間 EPSC は、振幅が減弱するとともに振幅 PPF が亢進した。しかし機能する受容体サブタイプに依存して、減衰時間 PPF におよぼす影響は著しく異なっていた。例えば、① mGluR4/6-8 作用薬 L-AP4 (20 μ M)、GABA_BR 作用薬 baclofen (1 μ M) ならびにアデノシン A1R 作用薬 CPA (1 μ M) は、減衰時間 PPF の減弱を伴うシナプス前抑制を惹起した (図 3) が、② カンナビノイド CB1R 作用薬 WIN55212-2 (2 μ M) は、減衰時間 PPF に影響しない様式でシナプス前抑制を引き起こした (図 4)。また、これら受容体サブタイプに依存した異なるシナプス前抑制は、神経細胞に条件刺激

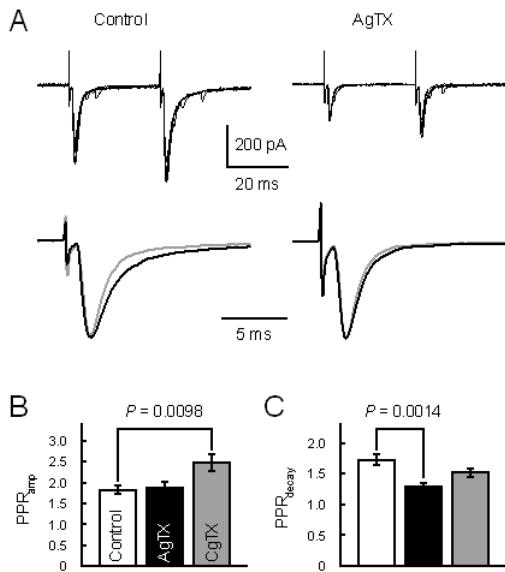


図 2: ペアパルス増強のカルシウムチャネルサブタイプ依存性。(A) Cav2.1 チャネル阻害薬 AgTX (0.1 μ M) は小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間 EPSC を減弱させた。このとき、減衰時間 PPF が有意に減少した。一方、振幅 PPF に著しい変化は認められなかった。1 回目 EPSC (灰色) と 2 回目 EPSC (黒色) の振幅を揃えた平均トレースを下段に示す。(B, C) Cav2.1 チャネル阻害薬 AgTX ならびに Cav2.2 チャネル阻害薬 CgTX (1 μ M) が振幅 (B) と減衰時間 (C) のペアパルス比 (PPR_{amp} ならびに PPR_{decay}) におよぼす影響。ペアパルス刺激は 30 ミリ秒間隔で付与した。

を付与して各受容体を活性化させることで再現された [① 上向性線維相互間のグルタミン酸拡散性抑制 heterosynaptic inhibition (mGluR/GABA_BR 依存性) ならびに② 介在ニューロンの脱分極に伴う内在性カンナビノイドと CB1R に依存した逆行性抑制 depolarization-induced suppression of excitation; DSE]。

こうした観察結果は、 $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制には複数の発現メカニズムが存在することを示唆している。引

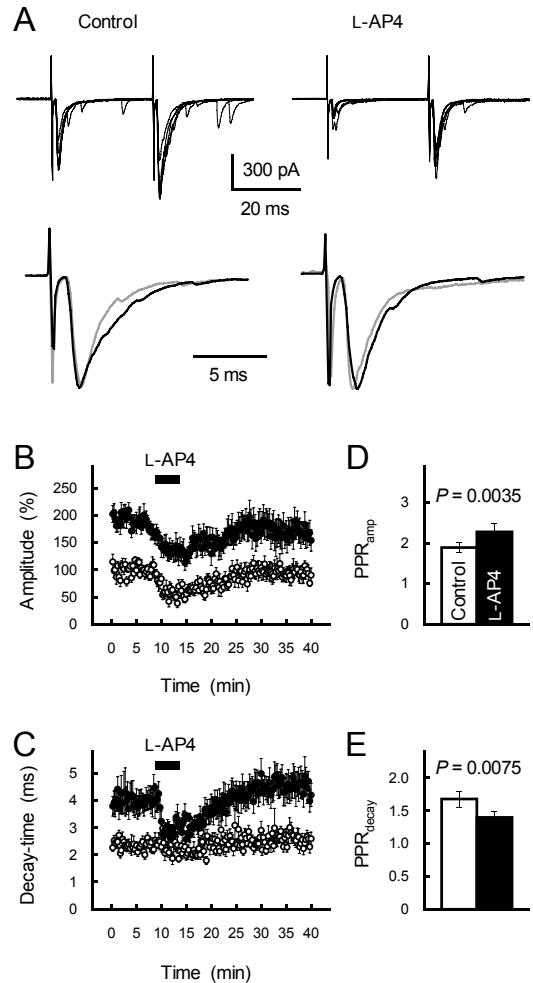


図 3: GluR4/6-8 作用薬 L-AP4 が顆粒細胞 - 介在ニューロン間興奮性シナプス伝達におよぼす影響。(A) L-AP4 (20 μ M) の灌流投与に伴い、EPSC は可逆的に減弱した。このとき、振幅のペアパルス比が増大するとともに、2 回目 EPSC の減衰時間は減少した。1 回目 EPSC (灰色) と 2 回目 EPSC (黒色) の振幅を揃えた平均トレースを下段に示す。(B, C) L-AP4 が振幅 (B) と減衰時間 (C) におよぼす影響 (○: 1 回目 EPSC, ●: 2 回目 EPSC)。ペアパルス刺激は 30 ミリ秒間隔で付与した。(D, E) L-AP4 が振幅 (D) と減衰時間 (E) のペアパルス比におよぼす影響。

き続き、シナプス前抑制とシナプス小胞放出ダイナミクスの関係やシナプス小胞の放出確率・放出多重性の決定に関わる分子的基盤について検討を行っている。

(4) 結果の考察ならびに今後の展望

小脳顆粒細胞軸索（上向性線維）の連続刺激（ペアパルス刺激）に伴い、分子層介在ニューロン（籠細胞、星状細胞）から記録され

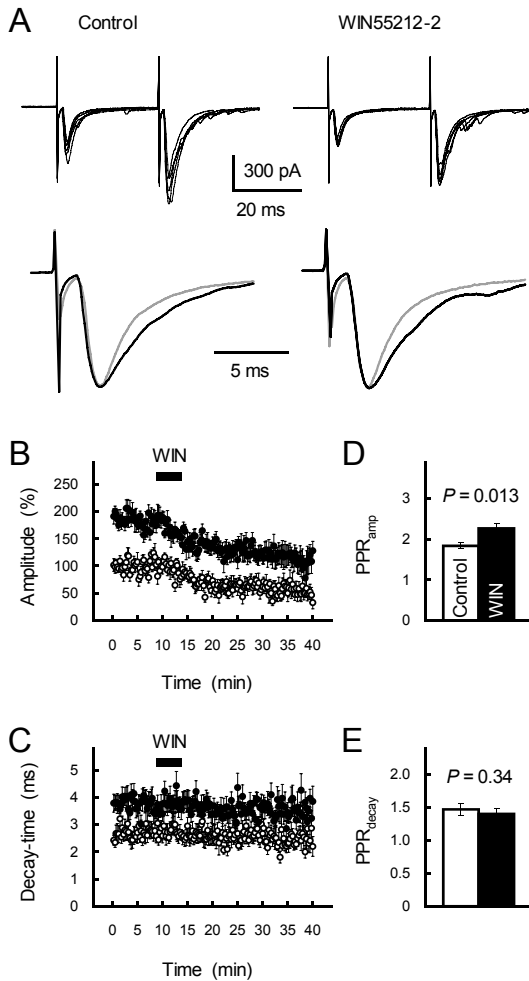


図4: CB1R作用薬WIN55212-2が顆粒細胞-介在ニューロン間興奮性シナプス伝達におよぼす影響。(A) WIN55212-2 (2 μ M)の灌流投与に伴い、EPSCは不可逆的に減弱した。このとき、振幅のペアパルス比は増大したが、2回目EPSCの減衰時間に有意な変化は認められなかった。1回目EPSC(灰色)と2回目EPSC(黒色)の振幅を揃えた平均トレースを下段に示す。(B, C) WIN55212-2が振幅(B)と減衰時間(C)におよぼす影響(○: 1回目EPSC、●: 2回目EPSC)。ペアパルス刺激は30ミリ秒間隔で付与した。(D, E) WIN55212-2が振幅(D)と減衰時間(E)のペアパルス比におよぼす影響。

る興奮性シナプス後電流(EPSC)の2回目EPSCの振幅値と減衰時定数(τ)が一過性に増大する現象を発見した。キネティクス解析、コンピュータシミュレーション解析ならびに薬理的検討により、①振幅増大は、シナプス小胞の放出確率と放出多重性が増大したこと、②減衰時間増大は、放出多重性増大に伴い大量に放出された伝達物質グルタミン酸がシナプス外領域に拡散・蓄積したことにより惹起されたことを示唆する結果を得た(図1)。また、連続した神経活動がEPSCキネティクスを変化させる分子的背景について検討を行い、 Ca^{2+} チャネルサブタイプに依存したシナプス小胞放出多重性制御機構の存在を見出した(図2)。こうした結果に基づき、今後はシナプス小胞の放出確率・放出多重性の決定に関わる分子メカニズムを解き明かしていくとともに、放出確率と放出多重性の関係(階層性と独立性)を深く追究していきたいと考えている。

顆粒細胞-介在ニューロン間EPSCは、 $G_{i/o}$ 共役型受容体の活性化に伴い振幅が減弱する(このとき、振幅ペアパルス比が増大したことから、振幅減弱はシナプス前抑制の様式により惹起されたと考えられる)。減衰時間PPFを追究する過程で、 $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制に多様性があることを発見した。第1のタイプにはGABA_B受容体、代謝型グルタミン酸受容体(group 3)、アデノシンA1受容体などが属し、これら受容体の活性化に伴いEPSCの振幅が減弱するとともに減衰時間PPFは消失した(図3)。第2のタイプにはカンナビノイドCB1受容体が属し、EPSC減衰時間に影響することなく振幅のみが減弱した(図4)。こうした結果は、① $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制には、複数の発現メカニズムが存在すること、ならびに②シナプス前抑制が、脳の情報処理システムの多様性形成に関わっていることを強く示唆している。現在も引き続き、シナプス前抑制各タイプの発現機構(例えば、 Ca_v2 チャネルサブタイプとの関係)や、これら多様なシナプス前抑制が担う生理的役割の解明を目指して研究を進めている。

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1件)

- ① Shin'Ichiro Satake, Si-Young Song, Shiro Konishi, Keiji Imoto (2010) Glutamate transporter EAAT4 in Purkinje cells controls intersynaptic diffusion of climbing fiber transmitter

mediating inhibition of GABA release from interneurons. *European Journal of Neuroscience* 32, 1843–1853. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 佐竹 伸一郎、井上 剛、井本 敬二「シナプス小胞放出ダイナミクス (放出確率・放出多重性) の階層性と独立性」生理学研究所研究会『シナプス伝達概念志向型研究』、2010年12月7日、岡崎
- ② 佐竹 伸一郎、井本 敬二「エタノールはラット小脳異種シナプス間拡散性クロストークを阻害する」(社)日本動物学会第81回大会、2010年9月25日、東京
- ③ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「エタノールは登上線維刺激に伴う小脳GABAシナプス伝達抑制を阻害する」Neuro2010 (第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学学会大会・第20回日本神経回路学会大会合同大会)、2010年9月2日、神戸
- ④ 佐竹 伸一郎、井本 敬二「 $G_{i/o}$ 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性」Neuroscience 2009 (第32回日本神経科学大会)、2009年9月17日、名古屋
- ⑤ Shin'Ichiro Satake, Tsuyoshi Inoue, Keiji Imoto「Multiple and Ca_v2 channel subtype-dependent forms of paired-pulse facilitation at cerebellar granule cell-interneuron synapses」36th International Congress of Physiological Sciences (第36回国際生理学会世界大会)、2009年7月29日、Kyoto Japan

[図書] (計 1 件)

- ① 佐竹 伸一郎 (2011) 神経伝達物質の細胞膜型トランスポーター. トランスポーターソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—(金井 好克、竹島 浩、森 泰生、久保 義弘編) 京都廣川書店. 214–225.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 伸一郎 (SATAKE SHIN'ICHIRO)
生理学研究所・生体情報研究系・助教
研究者番号：30360340