

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19316

研究課題名(和文) 歯状回顆粒細胞における神経伝達物質放出機構の発達変化および可塑性の解明

研究課題名(英文) Analysis of plasticity of neurotransmission in the dentate granule cell synapses

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス伝達効率が長時間に渡って増強する長期増強(LTP)は、記憶・学習の細胞レベルの基盤と考えられている。しかしそのメカニズムはよくわかっていない。歯状回の顆粒細胞の軸索である苔状線維と海馬CA3錐体細胞で形成されるシナプスではシナプス前部の変化によってLTPが起こる。本研究計画では、この特徴的なシナプスをモデルとし、LTP発現によるシナプス前部の分子機構の解明を目的とした。その結果、LTP誘導によって即時放出可能プールのサイズは変化しないが、放出確率が上昇することがわかった。以上の結果からLTP発現によってシナプス小胞の放出確率が增大することによってLTPが起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス伝達効率が長時間に渡って増強する長期増強(LTP)は、記憶・学習の細胞レベルの基盤と考えられている。したがってLTPのメカニズムを細胞・分子レベルで明らかにすることは、記憶・学習の分子機構を理解するうえで極めて重要である。さらに認知症の治療やAI開発にも貢献する可能性がある。

したがってLTPの分子メカニズムを調べた本研究の成果は今後、ヒトでの応用を考慮した場合にも有用な知見を与えると期待される。

研究成果の概要(英文)：Presynaptic long-term potentiation (LTP) is thought to play an important role in learning and memory. However, the underlying mechanism remains elusive because of the difficulty of direct recording during LTP. Hippocampal mossy fiber synapses exhibit pronounced LTP of transmitter release after tetanic stimulation and have been used as a model of presynaptic LTP. Here, we induced LTP by optogenetic tools and applied direct presynaptic patch-clamp recordings. The action potential waveform and evoked presynaptic Ca²⁺ currents remained unchanged after LTP induction. Membrane capacitance measurements suggested higher release probability of synaptic vesicles without changing the number of release-ready vesicles after LTP induction. We propose that dynamic changes in the active zone components may be relevant for the increased fusion competence and synaptic vesicle replenishment during LTP.

研究分野：神経生理学

キーワード：海馬 シナプス可塑性 CA3 苔状線維 LTP

1. 研究開始当初の背景

神経細胞同士の情報伝達はシナプスと呼ばれる神経細胞間の接合部において行われる。活動電位が軸索を伝搬してシナプス前終末に到達すると、細胞外からカルシウムイオン(Ca²⁺)が流入し、シナプス小胞の開口放出が起こる。その結果、神経伝達物質が細胞外に放出され、シナプス後部の受容体を活性化する。このようなシナプス伝達の効率は必ずしも一定ではなく、発達に応じて、あるいは活動依存的に可塑的变化を引き起こし、長期に伝達効率が増強あるいは減弱する。シナプス可塑性は脳の発達期や記憶・学習時、あるいは病態時において引き起こされることから、脳機能を理解するうえで可塑性メカニズムの解明は極めて重要である。

シナプス伝達効率が長時間に渡って増強する長期増強(Long-term potentiation: LTP)は、記憶・学習の細胞レベルの基盤であると考えられ、これまで盛んに研究されてきた。LTPには、シナプス後部で変化する場合とシナプス前部で変化する場合がある。これまで、シナプス後部におけるLTPメカニズムに関しては、シナプス後部のスパインの形態変化やグルタミン酸受容体の数が増えるなど多くの知見が得られている。いっぽう、シナプス前部でのLTPに関しては、グルタミン酸の放出量が上昇することはわかっているが、実験的アプローチの難しさから詳細な解析がこれまでほとんど行われてこなかった。

海馬にある苔状線維とCA3錐体細胞で形成されるシナプスの苔状線維シナプス前終末は大きな瘤状の神経終末を作り(図1)、皮質内のシナプスでは例外的に、直接電気記録が可能である(Geiger and Jonas, Neuron, 2000)。重要なことに、この海馬苔状線維 CA3 シナプスではシナプス前性の変化によってLTPが引き起こされる(Nicoll and Schmitz, Nat Rev Neurosci, 2005)。すなわち苔状線維 CA3 シナプスはLTPのシナプス前終末のメカニズムを調べるうえで格好のモデルシナプスである。このシナプスを解析することによって、これまでよくわかっていなかったシナプス前性変化で起こるLTPの詳細なメカニズムを明らかにすることが可能である。

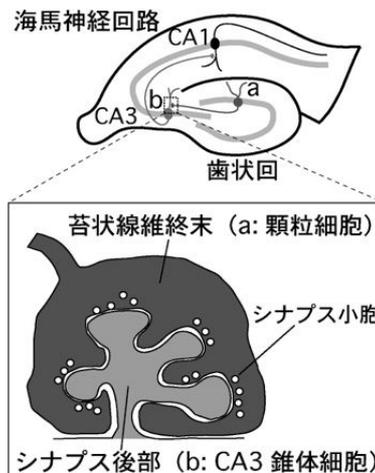


図1. 海馬と苔状線維終末の模式図

2. 研究の目的

本研究では苔状線維シナプス前終末からパッチクランプ法による電気記録を行い、さらに光遺伝学的手法によってLTPを誘導する。この手法によってLTP前後のシナプス前終末の電気的変化を測定することによって、これまで未解明であったシナプス前性LTPのメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では苔状線維LTP(mfLTP)を誘導した顆粒細胞の苔状線維終末から直接パッチクランプすることによって、膜容量、Ca²⁺電流や活動電位を測り、シナプス前終末の可塑的变化を調べた。mfLTP誘導のために従来の細胞外電気刺激ではなく、苔状線維にチャンネルロドプシン(Chronos)を発現させて光刺激によって誘導した。この手法によって広い範囲の苔状線維を刺激し、かつ刺激された線維を可視化できる。アデノ随伴ウィルスを使ってラットの海馬歯状回の顆粒細胞に感染させ、その顆粒細胞の軸索である苔状線維でChronos-GFPを発現させmfLTPを誘導した。

4. 研究成果

光遺伝学的手法による苔状線維 CA3 シナプスでのLTP誘導

苔状線維にチャンネルロドプシン(Chronos)を発現させた急性海馬スライス標本を用いてCA3領域でフィールド電位記録を行なった。青色LED照射によってチャンネルロドプシンを活性化することによってCA3領域においてfield EPSPを記録することができた。安定したベースライン記録を10分測定した後、高頻度で光照射(25 Hzで125発光照射 X2)すると非常に大きなfield EPSPの増大が見られた。その後、徐々に減弱していくがおよそ30分で安定し、ベースラインより大きなfield EPSPが長時間観察された(図2)。以上の様に安定してLTPを誘導する方法を確立することができた。

LTP 誘導後の活動電位の計測

上記の方法で LTP を誘導したことを確認後、フィールド電位記録からパッチクランプ法に測定方法を速やかに変更し、チャンネルロドプシンを発現して GFP の蛍光を発している苔状線維からパッチクランプを行なった。記録電極から電流注入することによって苔状線維終末から活動電位を記録した。その結果、チャンネルロドプシンを発現していない(LTP が起こっていない)control の苔状線維終末と LTP が誘導された苔状線維終末で活動電位の形に大きな変化は見られなかった。すなわち LTP の発現によって活動電位は変化しないことが明らかになった。

LTP 誘導後の膜容量測定

次に LTP を誘導した後に、テトロドトキシンを投与して電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害した状態で苔状線維終末からパッチクランプし、脱分極パルスを与え、膜容量測定を行なった。脱分極パルス幅を様々に変え、膜容量変化が LTP 前後でどのように変化するか調べた。その結果、チャンネルロドプシンを発現していない(LTP が起こっていない)control の苔状線維終末に比べて、LTP が誘導された苔状線維終末で有意に膜容量変化が大きくなることがわかった(図3)。

以上の結果から LTP の発現によってシナプス小胞の開口放出確率が増強されたことによって小胞からのグルタミン酸放出が増えて、その結果として苔状線維-CA3 シナプス伝達応答が長期に渡って増強されたことが示唆された。

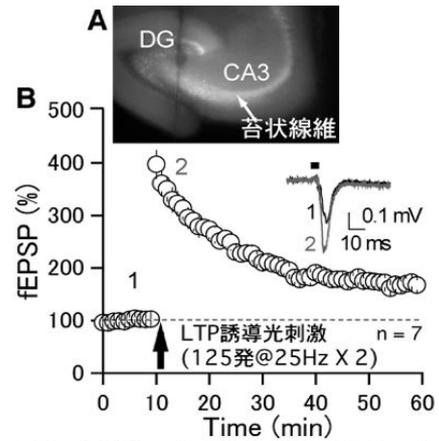


図2. 光刺激による苔状線維-CA3 シナプスでの LTP 誘導 (A) 海馬スライス標本。苔状線維で Chronos-GFP が発現。(B) 連続高頻度光照射(矢印)によって LTP が誘導された。

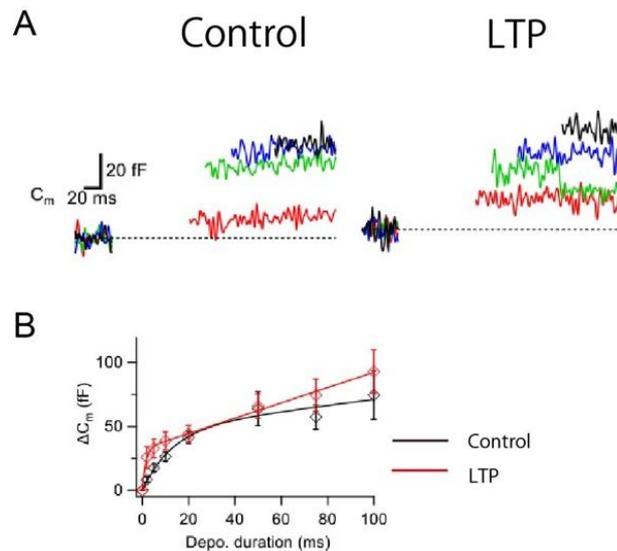


図3. シナプス前終末からの膜容量測定

(A) 脱分極パルス幅を様々に変えて測定した膜容量測定

(B) まとめ図。LTP 誘導後に有意に膜容量変化が増大した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 -

〔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 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-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

〔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〕

-

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