

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500362

研究課題名（和文）シナプス微細構造が定める信号伝達特性の解明

研究課題名（英文）Properties of intercellular signal transmission determined by the fine structure of synapses

研究代表者

松井 広 (MATSUI KO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号：20435530

研究成果の概要（和文）：細胞と細胞の間には間隙が存在し、神経細胞同士はこの間隙を越えて信号のやり取りをしている。本研究では、シナプス小胞内に含まれる伝達物質分子の数、および、この分子が間隙を拡散する速さを推定。続いて、シナプスから溢れる伝達物質による近隣のシナプスへの影響を評価した。視覚伝導路の中継シナプスでは、こういったシナプス間の相互作用を通して、視覚情報を脳に伝えるかどうかの取捨選択がされていることが解明された。

研究成果の概要（英文）：There exists a gap between cells and neurons communicate with each other by crossing signals through this gap. In this study, we estimated the amount of transmitter molecules packed within a synaptic vesicle and the speed of diffusion of these molecules in the extracellular space. Using these estimates, we evaluated the amount of transmitter that would spillover from a synapse and the effect of these transmitters on the neighboring synapses. The visual relay synapse has specific structure that promotes such intersynaptic interactions, and we found that filtering of visual information is accomplished through these interactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脳細胞生理学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：脳・神経、神経科学、生理学、シナプス、伝達物質、シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの神経細胞同士は、1平方ミクロン以下のごく小さい面で、互いに接しており、このシナプス接合部において、信号の受け渡しが行われている。この狭い空間に、脳における情報処理の本質の多くが詰まっているのだが、シナプス形態のわずかな違いや発現

している分子の数・分布等のわずかな揺らぎによって、信号伝達特性が大きく変わることが予想される。しかし、これまでシナプスの微細形態を精緻に解析し、信号を受け取る際に働く受容体の分布を調べ、信号の担い手となる伝達物質の濃度や拡散速度を明らかにする試みは不十分であった。

(2) 特に、従来の研究では、シナプスにおける信号伝達特性を決める二つの重要な因子、シナプス間隙へと放出されるグルタミン酸分子の数、および、細胞間隙におけるグルタミン酸の拡散係数が、どうしても確定できないパラメーターとして残っていた。

(3) また、受容体分布に関しても、脳を薄切りにした切片に、受容体に対する抗体を反応させる従来の方法では、本来、細胞膜上に二次元的に並んでいる受容体分布の全貌を明らかにすることはできない。近年開発された凍結切断レプリカ標識法を用いれば、二次元分布を可視化することができるが、今度は、この二次元分布をどのように定量化して評価すべきかの検討が十分にできてこなかった。

(4) 微細形態上の特徴が、どのように神経細胞間の信号伝達特性に影響するのかを明らかにし、機能上の意味を見出すには、精緻な電気生理学と組み合わせた研究が必要であることが明らかであった。

(5) また、脳の中には神経細胞だけでなく、グリア細胞も信号の担い手として存在する。こういったグリア細胞から放出される伝達物質がどのように神経細胞まで届き、神経細胞間のシナプス伝達に影響するのか。グリアの影響も考慮に入れなければ、シナプスにおける信号伝達の全貌を理解したことにならない。

2. 研究の目的

本研究では、シナプスの微細構造が神経細胞間の信号伝達特性にどのような影響を与えるのかを調べ、生理的機能を果たすのにどのように役立っているのかを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) シナプスにおける信号伝達過程を理解するには、まずは、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸がどのように拡散するのかを明らかにしなければならない。そこで、電気生理学・形態学・シミュレーションの全ての面で精緻な解析のしやすい calyx of Held シナプスを対象にした研究を始めた。このシナプスでは、シナプス後細胞 (MNTB 主要細胞) の細胞体に直接シナプスが形成されているので、細胞体から遠く細い樹状突起の先端にシナプスがある場合に比べて、シナプス部位で流れるシナプス応答電流を、電気生理学的に正確に測定できるという利点があった。こ

の calyx of Held を含む MNTB スライス標本を作製し、活動電位を止めた状態 (TTX 存在下) で、単一シナプス小胞放出に対する素量応答 (mEPSC) を記録した。また、このシナプスでは、細胞体本体から細胞膜の一部を切り剥してこることで、シナプス後膜に発現している受容体の応答特性を詳細に調べられるという利点もある。他の標本で、高速液交換法による受容体応答解析を行った経験を活かして (Matsui* et al., *J Neurosci*, 2005)、MNTB 主要細胞に発現する AMPA 受容体の動態モデルを作製した。シナプス後膜上の AMPA 型グルタミン酸受容体の二次元分布に関しては、凍結切断レプリカ標識法 (SDS-FRL) により解析を進めた。Calyx of Held シナプスに注目したもう一つの理由としては、シナプス前終末部とシナプス後部の膜が、非常に広い範囲で平行に接しているため、伝達物質の拡散が、二次元拡散に近似した形でシミュレーションできるという点が挙げられる。このシナプスを用いて、単一シナプス小胞の放出による素量応答を解析し、AMPA 受容体の二次元分布と照らし合わせることで、シナプス小胞に詰まっているグルタミン酸分子数 (N_{Glu})、およびシナプス間隙におけるグルタミン酸の拡散係数 (D_{Glu}) を推定した。

(2) 続いて、網膜と外側膝状体 (LGN) の中継細胞とのシナプスに着目した。このシナプスも、細胞体近傍の樹状突起にシナプスが形成され、シナプス前終末部とシナプス後部の膜が、比較的広い範囲で平行に接していることが知られている。このシナプスに関しては、シナプス放出の位置によって、シナプス応答にどの程度のばらつきが生じるのか、すでに詳細に検討していた (Tarusawa, Matsui*, et al., *J Neurosci*, 2009)。このシナプスでは放出確率が比較的高く、かつシナプス接合部間の距離が短いという特徴に注目して、本研究では、シナプスの間にどの程度の伝達物質漏出 (スピルオーバー) が生じるのかを調べた。このシナプスは、calyx of Held シナプスと異なり、せいぜい数十 Hz までの信号伝達しか行えないが、これには、シナプス間のスピルオーバーによる受容体の脱感作過程が関わっていると考えた。シナプスの微細構造解析とシミュレーション・電気生理学的記録を組み合わせることで、スピルオーバーによって、信号伝達周波数がいかに制限されているのか明らかにした。

(3) 特定の細胞種だけを光を使って刺激するというオプトジェネティクスという手法を取り入れることで、グリア細胞から放出される伝達物質が何であるか、また、この物質がどのように拡散して、神経間の信号伝達に影響するのかを調べた。神経間の信号伝達を

調べるのと同じアプローチを応用することで、グリア細胞から神経細胞への信号伝達を電気生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞外空間を拡散する伝達物質の振る舞いを明らかにするため、最も単純な構造をした calyx of Held シナプスを選択したので、放出された伝達物質は、概ね、2次元拡散すると見做すことができた。2次元拡散の場合、ごく単純な式で拡散を表現できる。それでも、シナプス小胞に詰まっている伝達物質の分子数 (N_{Glu}) とその拡散係数 (D_{Glu}) が、実験的に直接測定できないパラメーターとして残った。上記二つのパラメーターを求めるために、2つの実験計測データを利用することにした。ひとつは、シナプス小胞ひとつが放出されたときのシナプス後細胞の応答の振幅。もうひとつは、ひとつのシナプスあたり、ひとつしかシナプス小胞が放出されない条件下で記録されたシナプス後電流が、受容体の競合的阻害剤 (γ -DGG) によって、どれだけ阻害されるかの情報である。どちらの値も、シナプス間隙における伝達物質の濃度と拡

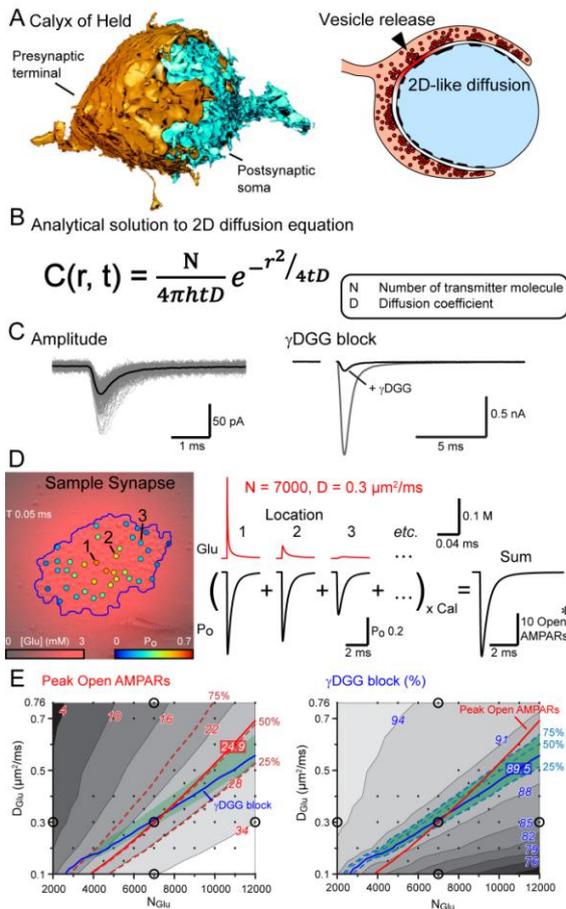


図1 細胞外間隙における伝達物質の2次元拡散の評価。

散速度に依存する。続いて、凍結切断レプリカ標識法によって、標識された受容体の分布を解析した。伝達物質拡散と受容体応答のシミュレーションをすることで、どのパラメーターの組み合わせで、こういった応答が期待できるかを計算することができた。 N_{Glu} と D_{Glu} の組み合わせを様々に変えることで、シナプス応答の振幅および γ -DGG 阻害率の両方を満たす組み合わせを探した。解析の結果、 $N_{Glu} = 7000$, $D_{Glu} = 0.3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ の組み合わせが見つかった (図1; Budisantoso, ..., **Matsui***, *J Physiol*, 2013)。

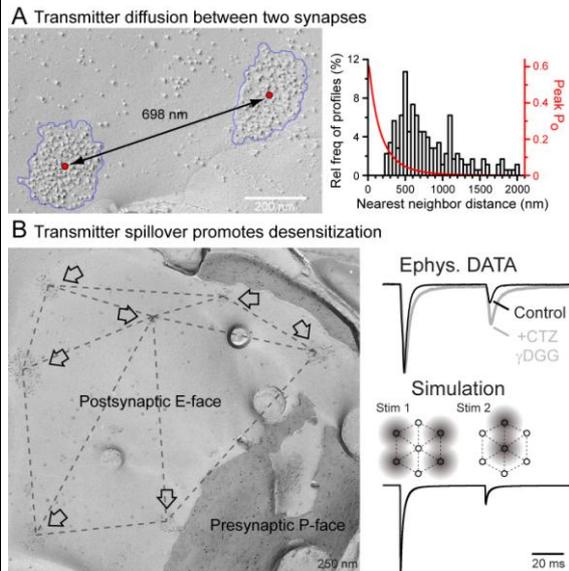


図2 単一シナプスを越える伝達物質拡散の影響。

(2) 続いて、ひとつのシナプスを越えて、隣接するシナプスに伝達物質が拡散した場合の影響を調べるのに、網膜-LGN 間のシナプスを調べた。凍結切断レプリカ標識を使って、最近傍シナプスまでの距離を計測。図1で行ったシミュレーションを拡張して、隣接シナプスへの影響を調べたところ、最近傍シナプスに至るまでに伝達物質の濃度は十分に下がるので、そのシナプスでの受容体の開確率は極めて低いということが分かった。実際には、ひとつではなく複数のシナプスが隣接する。そこで、複数のシナプスからの伝達物質の漏出効果を調べることにした。シミュレーションの結果、複数のシナプスからの漏出があっても、応答の振幅自体を増大させる効果はほとんどないことが明らかになった。一方、低い濃度の伝達物質にさらされることにより、放出の起こらなかったシナプスでも、受容体は一定時間、脱感作することが明らかになった。脱感作によって、二発目の神経刺激

に対する応答が減弱することも明らかになった。このような二連刺激に対して、応答が減弱する様子は、電気生理学的実験でも確かめられ、受容体の脱感作を阻害するような薬物によって、減弱の程度が緩和されることが明らかになった。この研究を通して、伝達物質の漏出は、神経信号伝達のローパスフィルターとしての役割を果たすことが明らかになった(図2; Budisantoso, Matsui*, et al., *J Neurosci*, 2012)。

(3) 神経やグリア細胞等の特定の細胞種を、光を使って刺激するオプトジェネティクスを取り入れるため、光感受性分子(channelrhodopsin-2; ChR2)を高発現する遺伝子改変マウスを作製した(Tanaka*, Matsui*, et al., *Cell Reports*, 2012)。作製したマウスのレポーターのうち、グリア細胞特異的にChR2を発現するマウスを利用。グリア細胞を光刺激すると、神経細胞間の興奮性シナプス伝達に使われるのと同じ、グルタミン酸が放出されることが明らかになった。このグルタミン酸は、シナプスにおけるように素早く一過性で、比較的局所的なグルタミン酸濃度変化を生むのではなく、もう少し、広くゆっくりと拡散することが示唆された。このようなグリア細胞からのグルタミン酸は、近傍のシナプス活動を調節する役割があると考えた。実験の結果、小脳バーグマングリア細胞からのグルタミン酸放出によって、プルキニエ細胞の代謝型グルタミン酸受容体が活性化され、長期抑制といったシナプス可塑性が誘導されることが明らかになった。生体での実験も行ったところ、グリア細胞からのグルタミン酸放出によって、小脳依存性の眼球運動学習が影響され、学習過程が加速されるような現象も観察することができた(Sasaki, ..., Matsui*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012)。

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9件)

- ① Budisantoso T, Harada H, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R Matsui K (2013) Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft of the rat calyx of Held. *Journal of Physiology*, 591: 219-239. 査読有
DOI: 10.1113/jphysiol.2012.241398.
- ② Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K,

Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R (2013) Quantitative localization of Ca(v)2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *Journal of Neuroscience*, 33: 3668-3678. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2921-12.2013

- ③ Sasaki T, Beppu K, Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, Matsui K (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 20720-20725. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1213458109
- ④ Tanaka KF, Matsui K, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Reports*, 2: 397-406. 査読有
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.06.011
- ⑤ Abrahamsson T, Cathala L, Matsui K, Shigemoto R, Digregorio DA (2012) Thin dendrites of cerebellar interneurons confer sublinear synaptic integration and a gradient of short-term plasticity. *Neuron*, 73: 1159-1172. 査読有
DOI: 10.1016/j.neuron.2012.01.027
- ⑥ Kaufmann WA, Matsui K, Jeromin A, Nerbonne J, Ferraguti F (2012) Kv4.2 potassium channels segregate to extrasynaptic domains in amygdala intercalated neurons and influence intrasynaptic NMDA receptor NR2B subunit expression. *Brain Structure and Function*: 1-18. 査読有
DOI: 10.1007/s00429-012-0450-1
- ⑦ Parajuli L, Nakajima C, Kulik A, Matsui K, Schneider T, Shigemoto R, Fukazawa Y (2012) Quantitative regional and ultrastructural

localization of the Cav2.3 subunit of R-type calcium channels in mouse brain. *Journal of Neuroscience*, 32: 13555-13567. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1142-12.2012

- ⑧ Sumegi M, Fukazawa Y, Matsui K, Lorincz A, Eyre MD, Nusser Z, Shigemoto R (2012) Virus-mediated swapping of zolpidem-insensitive with zolpidem-sensitive GABA_A receptors in cortical pyramidal cells. *Journal of Physiology*, 590: 1517-1534. 査読有
DOI: 10.1113/jphysiol.2012.227538
- ⑨ Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R (2012) Mechanisms underlying signal filtering at a multi-synapse contact. *Journal of Neuroscience*, 32: 2357-2376. 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5243-11.2012

[学会発表] (計4件)

- ① 松井 広「Exploring the causal relationship between glial activity and mind」日本生理学会、2013年03月29日、タワーホール船堀（東京）
- ② Ko Matsui “Neuronal activity and behavior driven by astrocytes” Society for Neuroscience, 2012年10月13日, New Orleans, USA
- ③ 松井 広 “Neuronal activity and behavior driven by astrocytes”日本神経科学大会、2012年09月19日、名古屋国際会議場（愛知）
- ④ 松井 広、Timotheus Budisantoso、釜澤尚美、深澤 有吾、重本 隆一「網膜 - 外側膝状体シナプスにおける信号伝達特性を規定する要因の解明」日本神経科学会、2010年9月3日、神戸コンベンションセンター（兵庫）

[その他]

ホームページ等

プレスリリース「目から入ってくる溢れるような視覚情報を“くっきり”させて脳に伝える仕組みの一端を解明」

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2012/02/post-202.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 広 (MATSUI KO)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・准教授

研究者番号：20435530

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

釜澤 尚美 (KAMASAWA NAOMI)

生理学研究所・大脳皮質機能研究系・特任助教

研究者番号：50455218

