

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650218

研究課題名(和文)単一シナプス前終末の光刺激法の開発

研究課題名(英文)Stimulation of a single presynaptic terminal using confocal spot uncaging

研究代表者

坂場 武史 (Sakaba, Takeshi)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：80609511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小脳介在神経細胞間のシナプスにおいて、スポットCaアンケイジング法によって単一シナプスからの伝達物質放出惹起を起こすことができ、光学的手法による単一シナプス操作という計画目標は達することができた(Trigo et al., 2012, PNAS)。発展として、小脳プルキンエ細胞シナプス前終末からの直接記録により、Caアンケイジング下で、膜容量測定法とシナプス後細胞からのシナプス電流の計測の同時測定を行い、シナプス電流が伝達物質受容体の飽和によって規定されており、シナプス前終末からの伝達物質放出機構の解析には、シナプス小胞イメージングや膜容量測定法の利用が有用であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have used the confocal spot uncaging technique to stimulate a single presynaptic terminal. Specifically, caged Ca compound was introduced to the presynaptic cell via a patch pipette, and the compound was uncaged with spot illumination so that Ca was elevated only at a single presynaptic terminal. We have applied this to the synapses between cerebellar interneurons, and were able to elicit transmitter release and calculate the number of releasable synaptic vesicles at a single bouton (Trigo et al., 2012, PNAS). In addition, we have performed direct patch clamp recordings from the cerebellar Purkinje cell terminal, and applied Ca uncaging, capacitance measurements and postsynaptic recordings. Postsynaptic receptors were saturated and the postsynaptic currents seemed not to be a good indicator for transmitter release. Rather, we suggest that capacitance measurements provide a reasonable readout of the amounts of transmitter release.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

神経シナプスにおいては脱分極にともなうシナプス前終末への Ca^{2+} 流入がシナプス小胞の形質膜への融合を起こし、小胞内に貯蔵された伝達物質が細胞外へ放出される。放出された伝達物質がシナプス後部の受容体に作用することで伝達がおこる。シナプス後部側の伝達物質受容体の特性やその分布に関しては、分子生物学的、電気生理学的な研究が進展している。一方、シナプス前終末の特性に関しては以下のような未解明の点が残されている。(1) 単一シナプスの機能は標的となるシナプス後細胞の種類、シナプスを形成する部位(細胞体からの距離など)などによって機能的に多様性を持つと考えられている。受容体の種類、サブユニットの違いなど、シナプス後部の多様性を媒介するメカニズムについては研究が進捗しているが、シナプス前終末の多様性を媒介するメカニズムについてはよくわかっていない。(2) 短期、長期シナプス可塑性は学習、記憶といった脳の高次機能の細胞分子基盤になると考えられている。シナプス後部の変化を起因とする可塑性もあるが、シナプス前終末の機能特性の変化に起因している場合もあると推定されている。しかしながら、直接の証明に欠けている場合が多い。

哺乳類中枢神経シナプスは、一般に前後部とも1ミクロン程度の大きさしかなく、単一シナプスレベルでパッチ電極などを用いた電気生理学的解析を適用することは困難である。シナプス前終末機能に関しては、形態的に例外的に大きい感覚系リボン型シナプス、脳幹聴覚系のカリックス型シナプス(研究代表者の研究: Sakaba and Neher, 2001; Sakaba et al. 2005; Wadel et al., 2007; Hosoi et al., 2009 など) 小脳バスケット細胞神経終末(坂場、未発表)などにパッチクランプ法を直接適用することで解析がおこなわれてきた。一方、これらの大型シナプス終末の特性や分子メカニズムが小型シナプスにも適用可能かどうかはわからない。たとえば、カリックス型シナプスでは長期シナプス可塑性を誘導するのが難しく、可塑性のモデルには適していないと考えられている。そこで、小型シナプス1個を安定的に刺激する方法を開発し、新たなシナプス前終末の研究法を提供することが必要なのではないかと着想した。

2. 研究の目的

哺乳類中枢神経シナプス、特にシナプス前終末は通常1ミクロン程度で形態的に小さく、単一シナプスレベルの特性については未解明の点が多く残されている。たとえば短期、長期のシナプス可塑性にはシナプス前性のメカニズムが関与していると考えられているが、単一シナプス前終末を直接刺激して応

答を記録する方法が存在しないため、解析することが困難である。この問題を解決するために、単一シナプス前終末を光で刺激する方法を開発することを試みた。ケイジド Ca^{2+} を細胞体の記録電極を介して神経前終末に導入して単一シナプス終末内 Ca^{2+} を局所的に上昇させる局所アンケイジング法を開発した。さらに、この技術を用いて単一微小シナプス前終末の機能特性と伝達物質放出メカニズムを解明することが主要な研究目的である。

本方法は単一チャネル解析のためのシングルチャネル解析のシナプス版と捉える事が出来、シナプス伝達の素過程を解明するための技術である。

また、以下の2点に関して将来的に発展する可能性がある。(1) シナプスの機能的多様性を媒介するメカニズムの理解。シナプスの機能特性はシナプス前細胞、後細胞の種類、軸索、樹状突起上の位置などによって異なると考えられている。単一シナプス前終末の直接刺激法の開発により、多様性がどのようなものであるか、規則が存在するのか、また多様性を媒介するメカニズムを解明することができる。シナプスの計算能力は多様性を導入することにより向上するものと考えられるが、それがどのようなものか理解しなければ計算論的モデルを構築することはできない。(2) シナプス可塑性のシナプス前性メカニズムの解明。単一シナプス前終末の刺激を繰り返し、安定的に行うことができれば、神経刺激によるシナプス可塑性の誘導後にシナプス前終末、特に伝達物質放出機構がどう変化するかを直接測定できる。

3. 研究の方法

2週齢前後のラットから急性小脳スライス標本を作製した。小脳抑制性神経細胞(バスケットないし星状細胞)間のシナプスは多くの場合、単一シナプスないし2~3個のシナプスしか形成しないが、高い確率でシナプス結合をしているため、単一シナプス研究のモデルとなりうるということがわかっている(Auger and Marty, 2000 J Physiol 総説)。また軸索が比較的太いので、細胞体からの薬物導入が比較的簡単である利点を持つ。2つの抑制性神経細胞にパッチクランプ法を適用し、パッチ電極で同時に膜電位固定し、各細胞の膜電流を測定した。一方の神経細胞にケイジド Ca^{2+} および Ca^{2+} 蛍光指示薬を導入した。波長の異なる蛍光色素あるいは Ca^{2+} 指示薬をシナプス前、後細胞に導入することによって、シナプスを作っている可能性の高い領域(異なる蛍光を発する線維がクロスするところ)を同定することができる。シナプス前終末領域にスポット光(直径1から2ミクロン程度)を局所的に照射することにより、ケイジド Ca^{2+} から Ca^{2+} を解離させ、終末内で Ca^{2+} 濃度を強制的に上昇させた。これ

により伝達物質放出をおこさせ、シナプス後細胞の応答から伝達物質放出機構について推定をおこなった。

また、比較として、光学的な方法ではなく、シナプス前終末から直接電気記録をおこなう実験もおこなった。この実験では、分散培養下の小脳プルキンエ細胞シナプス前終末（直径1から3ミクロン）から直接パッチクランプ記録をおこない、さらに膜電位固定法、膜容量測定法や Ca^{2+} アンケイジングを用いることで、伝達物質放出の定量的な測定をおこなった。また、この実験は一部急性スライス標本でもおこない、培養実験の妥当性を確認した。

4. 研究成果

3年間の研究で、スポット Ca^{2+} アンケイジング法による単一シナプスから伝達物質放出惹起させるという初期目標は達することができた (Trigo et al., 2012, PNAS)。また、その発展事項として、シナプス前終末からの直接記録により、 Ca^{2+} アンケイジング下で、膜容量測定法とシナプス後細胞からのシナプス電流の計測の同時測定を行い、シナプス電流が伝達物質受容体の特性で規定され、必ずしも伝達物質放出を線形にモニターしていない可能性を見出した (Kawaguchi and Sakaba, 2015, Neuron)。以上の結果から、現在のところ、いくつかの実験的な方法を併用して伝達物質放出を計測すべきだと考えられる。

(1) スポットアンケイジング法による伝達物質放出の惹起

GABA 作動性である小脳介在神経細胞どうしのシナプス伝達を測定するため、2個の介在神経細胞から同時記録をおこなった。同時記録下でシナプス前細胞側の神経細胞に活動電位を惹起すると、抑制性シナプス応答が観察された。双方の神経細胞に蛍光色素を導入し、樹状突起と軸索がクロスするところを丁寧に観察し、シナプス接合部を探索した。シナプス前細胞側にケイジド Ca^{2+} をパッチ電極を介して導入し、405nm のレーザーをシナプス部位に照射すると、 Ca^{2+} がケイジド試薬から解離し、 Ca^{2+} 濃度が終末内で上昇した。この上昇は蛍光指示薬で観察することができた。 Ca^{2+} 濃度上昇に伴って、シナプス小胞の形質膜融合がおき、シナプス後部でシナプス電流が観察された。

脳のシナプスは多数のシナプス結合をしており、自発的なシナプス入力などで単一シナプスのみの解析をするのが難しい。一方で、小脳介在神経細胞間のシナプスはシナプス後細胞側の GABA 受容体が飽和しやすく、1個の小胞からの伝達物質放出でシナプス応答が飽和する。続いて2個目の小胞からの放出があった場合、シナプス応答の大きさが小

さくなる。この現象が観察されるということは、同じ受容体を繰り返し用いる、すなわち単一シナプス内での伝達物質放出現象を観察していることになる (multivesicular release)。このような特性を利用し、単一シナプス活性化で即時伝達物質放出可能なシナプス小胞数を計測することを試みたところ、平均して2, 3個程度持っていることがわかった。これは単一シナプスで一度に1個のシナプス小胞のみが伝達物質放出可能であるという“single vesicle hypothesis“には反する結果である。また、繰り返しアンケイジングを行い、応答の揺らぎを観察していくと、伝達物質放出部位が存在し、その70%程度にシナプス小胞が接着し、即時伝達物質放出可能になっているのではないかと推論できた。

本方法の開発によって、ケイジド試薬を細胞体から導入することで、脳中枢にみられる小型シナプス（直径1ミクロン程度）を光学的に制御することができるようになった。シナプス前終末の特性を明らかにすべく、ほかのシナプスに適用することが今後の課題であろう。

(2) 単一シナプス前終末からの直接記録

上記に示した方法は伝達物質放出機構の解析には有用であるが、シナプス前終末の電気的特性を明らかにすることはできない。また、シナプス後電流応答を利用する限り、伝達物質受容体の特性に規定されてしまう。膜電位感受性プローブや、シナプス小胞蛍光プローブは有用な技術であるが、時間分解能、感受性などは未だ発展途上にある。そこで当座の解決法として、小型シナプス前終末から直接パッチクランプをおこなうことにした。

分散培養下の小脳プルキンエ細胞シナプス前終末（直径1から3ミクロン）から直接パッチクランプ記録法をおこない、膜電位固定をおこなった。膜容量測定法を適用し、シナプス小胞の形質膜融合量を測定することを試みた。同時にシナプス後部からシナプス電流を記録した。シナプス前終末に脱分極パルスを与えると、膜容量の上昇ほどにはシナプス後電流の大きさは増大しないことが明らかになった。つまり、シナプス後細胞の伝達物質(GABA)受容体が飽和してしまい、伝達物質放出をうまく検出できないのではないかと推論された。

ケイジド Ca^{2+} をパッチ電極から導入し、 Ca^{2+} 濃度を終末内で上昇させると、シナプス小胞の形質膜融合にともない膜容量が上昇した。上昇の時間経過は Ca^{2+} 濃度に依存し、 Ca^{2+} 濃度が高いほど速度が速くなった。 Ca^{2+} 依存性は、グルタミン酸作動性シナプスと同じ程度であったが、時間経過は単一の指数関数で近似できるので、シナプス小胞プールは単一、つまりどの小胞も同じ Ca^{2+} 依存性を持つことがわかった。このような研究

から、GABA 作動性シナプスの伝達物質放出機構について定量的な解析をすることができた。

(3)今後の研究への示唆

本研究では小型シナプスの伝達物質放出特性の解明を GABA 作動性シナプスに焦点を絞っておこなった。技術的には単一シナプスを光で操作する技術ができた。現在のところ、時間分解能、S/N 比で電気生理学的手法が光学的手法よりも未だ優れている点がある。一方で、膜電位感受性プローブや、シナプス小胞蛍光プローブなどの技術開発が進んでいるので、将来的には電気生理学的方法を置き換えることになっていくと思われる。新たな技術を積極的に取り入れるとともに、その長所、短所を定量的に把握することが、シナプスレベル、回路レベルで正しい知見を得るために重要であると考えられる。

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 5 件)

Kawaguchi SY, Sakaba T “Control of inhibitory synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording.” *Neuron*, 査読有, 85:1273-1288, 2015 年 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.013

Midorikawa M, Okamoto Y, Sakaba T, “Developmental changes in Ca²⁺ channel subtypes regulating endocytosis at the calyx of Held.”, *J. Physiol.* 査読有, 592:3495-3510, 2014 年 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.273243

+Lipstein N, +Sakaba T, Cooper BH, Lin KH, Strenzke N, Ashery U, Rhee JS, Taschenberger H, Neher E, Brose N, “Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca²⁺-calmodulin-Munc13-1 signaling.”, *Neuron*, 査読有, 79:82-96, 2013 年 (+: co-first author), DOI: 10.1016/j.neuron.2013.05.011

Sakaba T, Kononenko N, Bacetic J, Pechstein A, Schmoranzler J, Yao L, Barth H, Shupliakov O, Kobler O, Aktories K, Haucke V, “Fast neurotransmitter release regulated by the endocytic scaffold intersectin.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 110:8266-8271, 2013 年, DOI: 10.1073/pnas.1219234110

Trigo FF, Sakaba T, Ogden D, Marty A, “The readily releasable pool of synaptic vesicles measured at single synaptic contacts.”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 109:18138-43, 2012 年, DOI: 10.1073/pnas.1209798109.

[学会発表](計 3 件)

坂場武史 定量的なシナプス生理学、生物物理学、日本解剖学会、日本生理学会合同大会、委員会企画シンポジウム 8、2015.3.23

Sakaba T, “Presynaptic Recordings from an Inhibitory Terminal”、Gordon research conference “Cell Biology of the Neuron”, Waterville Valley, NH, USA 2014.6.24 (Invited speaker)

Sakaba T “Exo-endocytotic coupling at the calyx of Held synapse.” International society for neurochemistry, Cancun, Mexico, 2013.4.23 (Invited speaker)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://brainscience.doshisha.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂場 武史 (SAKABA, Takeshi)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：80609511

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし