

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253017

研究課題名(和文) 抑制性神経回路の発達スイッチングの制御機構

研究課題名(英文) Regulation of developmental switching of inhibitory circuits

研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA, Junichi)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授

研究者番号：50237583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,600,000円

研究成果の概要(和文)：代表的抑制性伝達物質であるグリシンが神経終末からの放出開始後に起こるグリシン受容体の集積や動態について、マウス培養脊髄神経細胞標本を用いて電気生理学および分子イメージングを用いて検討した。受容体ブロッカー存在下で培養した脊髄神経細胞において、ブロッカーを除去すると、グリシン作動性微小シナプス電流の漸増と蛍光Qドットでタグしたグリシン受容体のシナプス下での動態速度の低下が観察された。さらに、樹状突起局所においてグリシンが結合したグリシン受容体は側方移動速度が低下していることが判明した。このグリシン結合による受容体移動の低下は細胞内PKC依存性である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We attempted to investigate the postsynaptic receptor dynamics during the formation of glycinergic inhibitory synapses by using electrophysiological and single molecular imaging approach. In spinal cord neurons cultured in the presence of strychnine, a glycine receptor antagonist, miniature inhibitory synaptic currents gradually increased in amplitude after wash-out strychnine. In addition, glycine tagged with Q dot moved much slower at the synaptic sites without strychnine compared with that with the receptor antagonist. In addition, lateral mobility of glycine receptor could be accelerated without glycine receptor. This suggests that glycine receptor at the inhibitory synapses could be limited in the mobility, resulting in the accumulation of glycine receptor at the glycinergic synapses. PKC activation upon the glycine receptor activation might regulate the receptor accumulation.

研究分野：一般生理学

キーワード：グリシン受容体 イメージング スイッチング シナプス

1. 研究開始当初の背景

脳の発達の最終段階において神経回路の再編成が観察される。これは既に機能している神経回路の変化であるため、しばしば感覚、行動、リズムなどの脳機能の発達に伴う大きな変化として表現される。発達期における神経回路機能の可塑的变化に関する研究は、その殆どが中枢神経系におけるグルタミン酸作動性、末梢におけるアセチルコリン作動性に代表させる興奮性シナプスにおいて行われてきた。つまり、感覚系や末梢運動系における興奮性モデル回路において示された“シナプス前終末の活性化 シナプス後細胞活動の上昇 シナプス競合/脱落や、伝達物質受容体の可塑的变化の促進”という理論が広く一般に指示されている。しかし、脳において半数近くをしめる抑制性回路の発達期における remodeling については、多くの抑制性回路が介在ニューロンで形成されているため、回路が複雑であるため、興奮性に比較し報告は非常に少ない。また、GABA やグリシンの放出によってシナプス後細胞の活動を抑制すると考えられてきたため、抑制性回路に関しては、興奮性回路における可塑性の論理は受け入れにくく、その発達再編成およびメカニズムについて未解決な部分が多い。しかし、近年、GABA が海馬などの神経回路の形成や、大脳皮質における臨界期形成に関与する報告され、回路発達に対する役割に注目が集められている。

申請者は、生体において神経回路活動を容易にコントロール可能な聴覚系をモデルに神経回路の発達可塑性を検討してきた。成熟期外側上オリブ核 (LSO) 細胞は同側および対側耳からの音情報をそれぞれグルタミン酸入力およびグリシン入力として受け、生体において抑制性回路活動を選択的にコントロールすることができるため、抑制性回路 remodeling 研究の最適モデル回路として注目されている (Kandler; Nature Neurosci 2010、申請者; J. Neurophysiol 2000, Eur J Neurosci 2007)。

申請者は、LSO への抑制性 (GABA/グリシン) シナプスの発達再編成において、未熟 LSO への主な入力が GABA 作動性であり、生後 2 週間でグリシン作動性へスイッチすることを見出した。そのメカニズムが、同一終末内の伝達物質が GABA から GABA+グリシンの co-release の時期を経てグリシンへ単一終末内でスイッチすることを報告した (Nature Neurosci 2004)。

発達期におけるシナプス機能の再編成のなかで、伝達物質のスイッチングは末梢で汗腺に入力する交感神経においてのみ報告があるが (Landis, 1988) が、中枢神経系では報告がなく、新しい概念の発達期における中枢神経回路の可塑的变化と考えられる。申請者らの報告に引き続き、聴覚系 (Trussell 2007)、脊髄 (Bea 2007, 他)、海馬 (Noebel 2005 他、: 海馬では反論有: Kamiya 2007)

などにおいて、伝達物質自体の発達変化が報告され、神経回路の発達リモデリングとして (1) 余剰シナプスの除去、(2) 伝達物質受容体のサブタイプ・密度の変化、に加えて、伝達物質自体が変化するという大きなカテゴリーが提示された。

2. 研究の目的

本申請では、LSO から NMTB への抑制性回路の伝達物質が GABA からグリシンにスイッチするという結果を受けて、変化する伝達物質を受けて 機能的なシナプスを構成する受容体の変化について、シナプス伝達機能の変化、および受容体動態のダイナミクスを解明する。

神経終末から放出される伝達物質が変化すると、それを受けるシナプス直下における受容体も変化することは予想される。伝達物質のスイッチによって、対応するシナプス下の受容体がどのように変化するのか。(1) 細胞膜 細胞内のリサイクリング、(2) 細胞膜上における側方拡散の 2 つの動的変化について、培養系モデル回路において検討を行う。

3. 研究の方法

スイッチングに対応するシナプス下受容体の動態を明らかにするために、電気生理学、免疫組織学、蛍光ドット (Q-ドット) を用いた量子イメージング技術を駆使して検討を行う。

(1) 伝達物質のスイッチによるシナプス後膜の受容体発現・動態制御。

シナプス伝達の基本理論として、効率化のために、放出される伝達物質の受容体がシナプス直下 (synaptic density) に集積することが予想される。伝達物質の GABA からグリシンへの変化に伴い、シナプス直下のグリシン受容体の集積が観察されるのか、その動態について検討する。

(2) 細胞膜に存在する受容体のシナプス下への集積 (側方移動の観察)。

GABA/グリシンが co-release されている脊髄神経細胞を、グリシン受容体ブロッカーであるストリキニン含有培養液下で培養する (グリシン伝達を長期ブロック)。グリシン受容体抗体を添加した蛍光分子 (量子ドット: Q dot) でグリシン受容体を可視化する (1 分子イメージング)。蛍光顕微鏡観察下で、ストリキニンを wash-out し、シナプス下でグリシン受容体が活性化する状態にする。シナプス下でのグリシン受容体が、活性化により、動きの遅延・停留・集積するのか、Q-dot のトレーシング解析を用いて検討する。

(3) 受容体のリサイクリング。

グリシン伝達の開始によって、細胞内に存在するグリシン受容体がシナプス下膜への移行 (insertion) が促進されるのか調べるために、グリシン受容体 N 末端 (細胞外ドメイン) に蛍光分子 PHluorin を結合させたグリシン受容体を発現させる。細胞内の小胞

(内部は低PHのため pHluorin は蛍光消失)に存在するグリシン受容体が細胞膜に挿入されると、蛍光発生の同定により、動的な変化の検証が可能である。

4. 研究成果

(1) 神経伝達活動依存性のグリシン微小電流の大きさの増大。

シナプス入力形成、または伝達物質スイッチングによりグリシン伝達が始まったのちの機能的シナプス伝達の強化を検証するために、培養脊髄神経細胞を作製し、作成直後からグリシン受容体阻害薬であるストリキニンを培養液に添付した(グリシン伝達未経験群)。パッチクランプ法により神経細胞から電気記録を行いつつ、ストリキニンを細胞外灌流液から除去し、初めてのグリシン伝達入力を記録細胞に対して誘導した。グリシン作動性シナプス微小電流の大きさはストリキニン除去後1時間にわたり漸増した。一方、ストリキニン非含有培養液で培養した群(グリシン伝達経験群)において、記録直前にストリキニンを灌流液に添加しグリシン伝達ブロックした群では、ストリキニンを除去すると、急速にグリシン作動性シナプス電流の大きさは回復し、一定に達した。このことから、グリシン伝達非経験群において、グリシン作動性シナプス電流の漸増はストリキニン除去によるアーチファクトによるものではなく、シナプス電流自体の漸増であることが示された。

このグリシン作動性シナプス電流の大きさの漸増のメカニズムとして、シナプス後膜部において、グリシンという新たな伝達物質が機能を開始するに伴い、シナプス下において、対応する受容体の集積が起こり伝達効率の亢進が起こることが想定される。そこで、グリシン受容体の局在の変化、さらに、その動態についてイメージングを行い、解析を行った。

(2) グリシン受容体と抑制性シナプス前終末マーカーである VIAAT (vesicular inhibitory amino acid transporter) に対する抗体で2重染色を行った結果、グリシン伝達を培養当初からブロックした群(グリシン伝達未経験群)においては、グリシン受容体はシナプス後細胞膜に様に散在していたが、対照群(グリシン伝達経験群)、およびグリシン伝達未経験群においてストリキニン除去を行いグリシン伝達経験開始1時間後群(グリシン伝達経験早期群)において、グリシン受容体はシナプス下に局在するものが有意に増加していた。また、グリシン受容体の集積面積もグリシン非経験群では、対照群に比べて優位に小さかった。この結果から、グリシン受容体はグリシン伝達が行われている局所(シナプス下膜)に集積することが判明した。

(3) グリシン受容体のシナプス下への集積のメカニズムを検討するために、グリシン

受容体の細胞膜における動態の可視化を行った。まず、superecliptic pHluorin (SEP) で蛍光タグしたグリシン受容体を Lipofection で発現させた。細胞膜におけるグリシン受容体の動態を recovery after photobleaching (FRAP) 法、および fluorescence loss in photobleaching (FLIP)法を用いて検討した。

樹状突起の局所に光照射を集中させ、蛍光褪色 (photobleaching) させた。ストリキニンを含まない標準灌流液中では、同部におけるグリシン受容体の蛍光が徐々に回復した。一方で、ストリキニンを添加した溶液内では、蛍光の回復が大きく促進された。この蛍光の回復の差が、細胞膜におけるグリシンの移動の差によるものか、または細胞内からのエクソサイトーシスによるものなのかを検討するために、観察領域の両側に隣接する部位を連続的に光照射して、細胞膜を移動して観察領域に入る蛍光グリシン受容体の蛍光の持続的な褪色を行った。細胞膜の側方移動の影響の影響を除去した状態下では、褪色を行った細胞膜局所におけるグリシン受容体の蛍光回復は、標準灌流液およびストリキニン存在下において、いずれも低下しており、その差はみられなかった。

この結果から、グリシン受容体はグリシン非結合状態では細胞膜における移動速度は高く、グリシンが結合すると移動が低下することが判明した。

(4) グリシン伝達が始まったシナプス下での受容体の移動が減弱することを確認するために、グリシン受容体に蛍光Qドットをタグさせ、グリシン受容体の動態の一分子イメージングを行った。ストリキニンを培養当初から添加したグリシン伝達非経験群においてはグリシン受容体はシナプス部位、非シナプス部位に関係なく移動しているが、標準液中培養群では、シナプス下におけるグリシン受容体移動速度は有意に遅かった。さらに、グリシン伝達非経験群において、灌流液からストリキニンを除去すると短時間後にグリシン受容体はシナプス下において移動速度が有意に低下した。

これらの結果から、グリシン作動性シナプス伝達が始まると、それ以前には細胞膜を側方移動していたグリシン受容体がグリシンシナプス下でトラップされ、受容体密度が増加することが、グリシン作動性シナプス電流の漸増のメカニズムであることが示唆された。

現在、なぜグリシン受容体の活性化がグリシン受容体の側方移動を抑制するのか、グリシン受容体活性に伴う細胞内メカニズムについて検討中である。

予備実験結果として、カルシウム依存性蛋白リン酸化酵素 (PKC) の阻害剤存在下では、グリシン受容体を活性化しても細胞膜上の移動速度は減弱しないことが認められた。グリシン受容体はイオンチャネル型の受容

体であり活性化による塩素イオンの細胞内流入を引き起こす。細胞内塩素イオンとPKCの関係は報告がないが、今度塩素イオン流入による体積変化なども視野にいれた解析を行う予定である。

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19件)

Kim W, Kim SK, Nabekura J. Functional and structural plasticity in the primary somatosensory cortex associated with chronic pain. *J Neurochem*. 査読あり, 141, 2017, 499-506. doi: 10.1111/jnc.14012.

Nakahata Y, Eto K, Murakoshi H, Watanabe M, Kuriu T, Hirata H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Activation-Dependent Rapid Postsynaptic Clustering of Glycine Receptors in Mature Spinal Cord Neurons. *eNeuro*. 査読あり, 4, 2017, pii: ENEURO.0194-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0194-16.2017.

Nakahata Y, Nabekura J, Murakoshi H. Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. *Sci Rep*. 査読あり, 6, 2016, 39564. doi: 10.1038/srep39564.

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun*. 査読あり, 7, 2016, 12540. doi: 10.1038/ncomms12540.

Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura

J. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro*. 査読あり, 3, 2016, pii: ENEURO.0004-16.2016. doi: 10.1523/ENEURO.0004-16.2016.

Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest*. 査読あり, 126, 2016, 1983-97. doi: 10.1172/JCI82859.

Goto K, Kawahara I, Inada H, Misawa H, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M. Activation of 5-HT₄ receptors facilitates neurogenesis from transplanted neural stem cells in the anastomotic ileum. *J Physiol Sci*. 査読あり, 66, 2016, 67-76. doi: 10.1007/s12576-015-0396-1.

Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, Nabekura J. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer. *Sci Rep*. 査読あり, 5, 2015, 15334. doi: 10.1038/srep15334.

Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Sasaki T, Kasai M, Isa T, Kato G, Nabekura J, Mizukami H, Ozawa K, Kawasaki H, Yamamori T. In Vivo Two-Photon Imaging of Dendritic Spines in Marmoset Neocortex(1,2,3). *eNeuro*. 査読あり, 2, 2015, pii: ENEURO.0019-15.2015. doi: 10.1523/ENEURO.0019-15.2015.

Hirao K, Eto K, Nakahata Y, Ishibashi

- H, Nagai T, Nabekura J. Noradrenergic refinement of glutamatergic neuronal circuits in the lateral superior olivary nucleus before hearing onset. *J Neurophysiol*. 査読あり, 114, 2015, 1974-86. doi: 10.1152/jn.00813.2014.
- Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読あり, 112, 2015, 10515-20. doi: 10.1073/pnas.1509879112.
- Ieda N, Hishikawa K, Eto K, Kitamura K, Kawaguchi M, Suzuki T, Fukuhara K, Miyata N, Furuta T, Nabekura J, Nakagawa H. A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読あり, 25, 2015, 3172-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.095.
- Ijiro T, Nakamura K, Ogata M, Inada H, Kiguchi S, Maruyama K, Nabekura J, Kobayashi M, Ishibashi H. Effect of rovatirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on the central noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*. 査読あり, 761, 2015, 413-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.047.
- Shibata AC, Maebashi HK, Nakahata Y, Nabekura J, Murakoshi H. Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern. *PLoS One*. 査読あり, 10, 2015, e0121109. doi: 10.1371/journal.pone.0121109.
- Takatsuru Y, Nabekura J, Ishikawa T, Kohsaka S, Koibuchi N. Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood. *J Physiol Sci*. 査読あり, 65, 2015, 187-94. doi: 10.1007/s12576-015-0361-z.
- Takaki M, Goto K, Kawahara I, Nabekura J. Activation of 5-HT₄ receptors facilitates neurogenesis of injured enteric neurons at an anastomosis in the lower gut. *J Smooth Muscle Res*. 査読あり, 51, 2015, 82-94. doi: 10.1540/jsmr.51.82. Review.
- Watanabe M, Fukuda A, Nabekura J. The role of GABA in the regulation of GnRH neurons. *Front Neurosci*. 査読あり, 8, 2014, 387. doi: 10.3389/fnins.2014.00387.
- Zhao H, Aoshi T, Kawai S, Mori Y, Konishi A, Ozkan M, Fujita Y, Haseda Y, Shimizu M, Kohyama M, Kobiyama K, Eto K, Nabekura J, Horii T, Ishino T, Yuda M, Hemmi H, Kaisho T, Akira S, Kinoshita M, Tohyama K, Yoshioka Y, Ishii KJ, Coban C. Olfactory plays a key role in spatiotemporal pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Host Microbe*. 査読あり, 15, 2014, 551-63. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.008.
- Takatsuru Y, Nabekura J, Koibuchi N. Contribution of neuronal and glial circuit in intact hemisphere for functional remodeling after focal ischemia. *Neurosci Res*. 査読あり, 78, 2014, 38-44. doi:

10.1016/j.neures.2013.07.004.

[学会発表](計 12 件)

鍋倉淳一, 慢性疼痛モデルマウスにおける大脳皮質神経回路再編, 第 24 回日本腰痛学会, 2016.9.3, 甲府富士屋ホテル(山梨県・甲府市)

鍋倉淳一, Remodeling of cortical circuits in chronic pain model: neuron-glia interaction in vivo, Pain Mechanisms and Therapeutics Conference, 2016.6.5, Sicily(Italy)

鍋倉淳一・宮本愛喜子・穂吉亮平・和氣弘明, ミクログリアによる大脳皮質シナプス再編, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016.5.19, 神戸コンベンションセンター(兵庫県・神戸市)

Nabekura J, Remodeling of neuronal circuits in vivo: neuron--glia interaction, International Symposium on Chemosensory signals from the oral cavity to the brain, 2016.3.5, 九州大学医学部キャンパス(福岡県・福岡)

Nabekura J, Remodeling of Cortical Neuronal Circuits in vivo:Neuron-Microglia Interaction, The 3rd International Symposium on Glyco-Neuroscience, 2016.1.14, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県・淡路島)

Nabekura J, Remodeling of Cortical Neuronal Circuits Neuron-glia Interaction in vivo, Annual meeting for Korean Anatomist, 2015.10.15, Seoul(Korea)

Nabekura J, Astrocyte-induced synapse remodeling in chronic pain, 10th International Conference for Neurons and Diseases, 2015.6.22, 西安(中国)

鍋倉淳一, 神経回路の発達再編, 第 57 回日本小児神経学会学術大会,

2015.5.30, 帝国ホテル大阪(大阪府・大阪市)

鍋倉淳一, 発達・障害による大脳皮質シナプス再編:シナプス-グリア連関, 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015.5.22, 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

Nabekura J, Miyamoto A, Wake H, Microglia Surveillance of Neuron-Synapses, 第 37 回日本分子生物学会, 2014.11.25, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

Nabekura J, Cortical synapse remodeling in chronic pain, 18th Thai Neuroscience Society Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium, 2014.12.22, Bangkok(Thailand)

鍋倉淳一, Kim Sun Kwang, 小泉修一, 慢性疼痛時における大脳皮質シナプス再編とアストロサイト連関, 第 37 回日本神経科学学会, 2014.9.13, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

[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

6. 研究組織

(1)研究代表者

鍋倉 淳一 (NABEKURA Junichi)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・教授

研究者番号: 50237583

(2)研究分担者

福田 敦夫 (FUKUDA Atsuo)
浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 50254272

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()