

## 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：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870895

研究課題名(和文) シナプス前・後部の機能変化を担うシグナル動態の可視化

研究課題名(英文) Visualization of signaling mechanism underlying pre- and postsynaptic functional modification

研究代表者

川口 真也 (Kawaguchi, Shin-ya)

同志社大学・高等研究教育機構・准教授

研究者番号：00378530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光タンパク質標識した培養プルキンエ細胞の軸索終末から直接パッチクランプ記録する方法を開発し、プルキンエ細胞の軸索終末は膨大な放出可能小胞プールを有し、個々の小胞の放出確率は低いことが分かった。また、プルキンエ細胞の軸索終末は膜興奮性が低いため、高頻度活動時の活動電位が負に調節され、その結果シナプス伝達が減弱するユニークなシナプス前部の可塑性メカニズムを明らかにした。シナプス後部可塑性の可視化については、運動学習に寄与する抑制性シナプス増強に重要な役割を担うCaMKIIの活性をモニターするFRETプローブを作成し、可塑性発現と密接に関連したシグナル動態を可視化できるようにした。

研究成果の概要(英文)：We developed a method to directly patch-clamp record from the fluorescently labeled axon terminals of cultured Purkinje cells. We found that an axon terminal of a Purkinje cell contains large releasable pool of synaptic vesicles, and that the release probability of each vesicle upon a single action potential is low. In addition, our data clarified a unique presynaptic plasticity mechanism that the low membrane excitability at the axon terminal of a Purkinje cell attenuates action potential amplitudes during high frequency activation, resulting in short-term depression. We developed a FRET probe monitoring the CaMKII activity mediating the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses on a Purkinje cell, which contributes to motor learning. Thus, our probe might enable to real time image the intracellular signaling closely associated with the learning-related plasticity.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス シナプス可塑性 小脳 プルキンエ細胞 軸索 可視化 培養 シナプス前部

### 1. 研究開始当初の背景

小脳プルキンエ細胞の平行線維シナプスでの長期抑圧は、分子・細胞レベルでの理解が進み、また遺伝子改変マウスを用いた研究から運動学習における重要性も示されてきた。一方で、長期抑圧を障害したマウスにおいても運動学習が起こると主張する研究報告もある。したがって、個々のシナプス入力 of 可塑的变化が、いかに細胞の出力変化に繋がり、それが神経回路の情報処理にどのように柔軟性を生み出すかを究明することが重要であると考えられる。また、小脳皮質における他のシナプスでの可塑性も運動学習に寄与する可能性も考えられるが、ほとんどそれについては解析が進んでいない状況であった。

### 2. 研究の目的

神経細胞間のシナプス伝達はその履歴に応じて変化するシナプス可塑性は、記憶・学習の基盤と考えられているが、決定的な証明はない。特に、学習・記憶を達成させる神経回路変化の実体はよく分かっていない。この点を解明することを最終目標として、本研究では、運動学習の細胞分子基盤として解析されてきた小脳プルキンエ細胞でのシナプス可塑性に焦点をあて、可塑性の発現を単一シナプスレベルで高解像度かつ長時間にわたり可視化する技術確立する。特に、シナプス後部およびシナプス前部の両方での可塑性の性質について、電気生理学的解析と蛍光イメージング法を組み合わせた実験系を構築する。そして、シナプス前部と後部で神経細胞の電気的活動が化学的な細胞内分子シグナルに変換されて機能調節される仕組みを理解する基盤をつくることをめざして研究を行う。

### 3. 研究の方法

#### **プルキンエ細胞の軸索および終末からの直接パッチクランプ記録による機能解析**

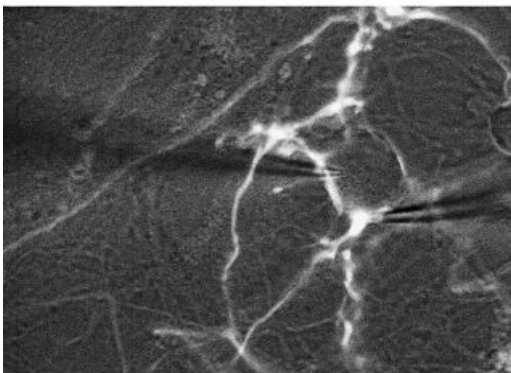


図 1

抑制性シナプス前終末から直接パッチクランプ記録する方法をつくる。図 1 に示すように、EGFP 標識したプルキンエ細胞軸索終末部とそのシナプス後細胞（おそらく小脳核ニューロン）両方から、同時にパッチクランプ記録する。そして、終末を脱分極して惹起した  $Ca^{2+}$  電流、開口放出による膜容量増加、およびシナプス後電流を同時記録する(図 2)。

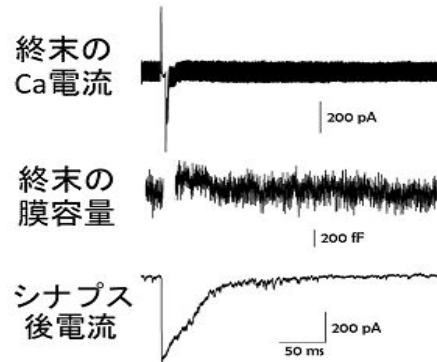


図 2

この模索中の手法を確立し、軸索終末部での伝達物質放出機構に関して、 $Ca^{2+}$  依存性、放出可能プールのサイズとその特性、連発刺激時の放出の可塑的变化、および付随するシナプス後部の  $GABA_A$  受容体応答の変化を関連付けて解析する。そして、興奮性シナプス前終末の聴覚系カリックス型シナプスの知見と比較して類似点・相違点を究明し、抑制性シナプス前終末のモデル系としてプルキンエ細胞の軸索終末を確立し、機能解析する。

#### **運動学習基盤となるシナプス可塑性の可視化プローブの開発**

運動学習の基盤と考えられてきた長期抑圧は、シナプス後部でリン酸化酵素 PKC が AMPA 型グルタミン酸受容体の細胞内への取り込みを促進することにより発現する。PKC の効果的な活性化には、PKC、Raf、MEK、MAPK、PLA2、アラキドン酸 (AA) が形成するシグナルネットワークの正のフィードバック反応が、重要な役割を果たす。このフィードバック機構の神経活動依存的な駆動を検出する分子プローブを作成することにより、長期抑圧が起こったシナプス部位を特異的かつ長時間にわたり標識する。具体的にはリン酸化酵素 PKC に遺伝子改変を施すことにより、長期抑圧が惹起されたであろう部位に、高 S/N 比で集積する蛍光プローブ分子を作成する。

そして、このプローブ分子の持続的局在変化が、長期シナプス可塑性の基盤シグナルで

ある PKC-MAPK のポジティブフィードバック駆動を反映するか否かを、分子操作に優れた分散培養系を用いて検討する。次に、変異 PKC プローブの局在変化を惹起する  $\text{Ca}^{2+}$  閾値や mGluR1 などの入力依存性が、長期抑圧と一致するかを、電気生理学的手法を併用して検証する。さらに、ケージト  $\text{Ca}^{2+}$  を用いた単一シナプスの紫外光刺激やケージトグルタミン酸の光スポット活性化により、局所的に長期抑圧を誘導し、その部位に蛍光シグナルが集積するか否かを調べる。さらに、シナプス結合をもつ顆粒細胞とプルキンエ細胞から同時に電気記録を行い、顆粒細胞の神経終末を蛍光標識により同定した上で、刺激した終末に面する単一のシナプス後部に変異 PKC が集積するかを調べる。これら一連の実験により、長期抑圧を個々のシナプスレベルで可視化できるようにする。

また、プルキンエ細胞の興奮性シナプスでの可塑性だけでなく、抑制性シナプスでの可塑性も運動学習に寄与することが我々の研究から分かりつつある。この抑制性シナプス可塑性の発現と密接に関連するシグナルを同定し、その活性化を検出する蛍光タンパク質を開発することにより、抑制性シナプス可塑性が運動学習に寄与する過程も可視化できるようにすることも試みる。

#### 4. 研究成果

##### **軸索終末からの直接記録による短期シナプス抑圧のメカニズム解明**

初代分散培養した小脳プルキンエ細胞に、蛍光タンパク質 GFP を発現させて蛍光標識し、その情報出力部である軸索終末に直接パッチクランプ法を適用した。具体的には、シナプス小胞の放出を直接的に膜容量測定により計測し、シナプス伝達の電流応答の大きさと合わせて解析した。その結果、プルキンエ細胞の軸索終末部には、1000 個以上の放出可能シナプス小胞が存在することが分かった。また、ケージト Ca の紫外光による活性化実験によってもこの結論が支持された。一方で、活動電位に対しては、個々のシナプス前部から数個程度のシナプス小胞がエキソサイトーシスされることが分かった。したがって、プルキンエ細胞の軸索終末は、膨大な放出可能小胞プールを有しており、個々の小胞の放出確率は 1% 以下であると推定された。

一方、プルキンエ細胞からの出力は、高頻

度刺激時にはシナプス伝達が強力的に減弱される。その仕組みとして、高頻度刺激時には活動電位の伝播が弱まること、軸索終末からの直接記録により分かった。これは、軸索終末には電位依存性 K チャネルに比べて電位依存性 Na チャネルがあまり存在しないことによると示唆された。以上から、プルキンエ細胞の軸索終末部では、膜興奮性が低いことにより高頻度活動時の活動電位が負に調節され、その結果放出可能シナプス小胞を枯渇させることなく、シナプス伝達を減弱するユニークな仕組みを明らかにすることが出来た。以上の研究成果については、Neuron 誌に発表した (Kawaguchi and Sakaba, 2015)。

##### **シナプス可塑性発現の可視化**

プルキンエ細胞に形成される抑制性シナプスでの長期増強は、運動学習に寄与することが明らかになった (Tanaka et al., J. Neurosci., 2013)。この長期増強は、リン酸化酵素 CaMKII により誘導される。この CaMKII 活性を検出する FRET イメージングプローブを作成し、培養プルキンエ細胞に遺伝子導入して、蛍光イメージングを行った。その結果、 $\alpha$  型 CaMKII が多い場合には CaMKII 活性は脆弱で、 $\beta$  型 CaMKII が多い場合には、全体的な CaMKII 活性が高くなることが分かった。そして、 $\beta$  型 CaMKII が比較的多い状態では、シナプス長期増強が発現する際に、CaMKII の活性が持続的に高まることが分かった。一方、 $\alpha$  型が多い場合には、CaMKII 活性が相対的に弱まってしまいう結果、抑制性シナプス長期増強の誘導も障害される結果を得た。したがって、運動学習に寄与するシナプス可塑性の発現と密接に関連した細胞内シグナル過程を可視化することが出来たと考えている。本研究成果については、J Physiol 誌に発表した (Nagasaki et al., 2014)。

一方、プルキンエ細胞の興奮性シナプスでの長期抑圧の可視化に関しては、一過的な可塑性誘導刺激に応じて、刺激した部位に集積する有望なプローブ分子を得ることが出来た。また、長期抑圧に関与する様々なシグナル分子の阻害剤などにより、プローブ分子の集積が影響される結果も得ており、研究開始当初目的である長期抑圧の可視化が実現しつつあると考えている。今後、さらにその妥当性を確認し、可塑性が起こったシナプスの選択的可視化の精度を高め、生体内での学習痕跡の可視化に繋げてゆきたいと考えている。

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 5 件)

Kawaguchi SY, Sakaba T. (2015). Control of inhibitory synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording. *Neuron*. 85, 1273-88. 査読有  
doi:10.1016/j.neuron.2015.02.013.

Nagasaki N, Hirano T, Kawaguchi SY. (2014). Opposite regulation of inhibitory synaptic plasticity by  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Physiol*. 592, 4891-909. 査読有  
doi: 10.1113/jphysiol.2014.280230.

Hirano T, Kawaguchi SY. (2014). Regulation and functional roles of rebound potentiation at cerebellar stellate cell-Purkinje cell synapses. *Front Cell Neurosci*. 8, 42. 査読有  
doi: 10.3389/fncel.2014.00042.

Tanaka S, Kawaguchi SY, Shioi G, Hirano T. (2013). Long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission onto cerebellar Purkinje neurons contributes to adaptation of vestibulo-ocular reflex. *J Neurosci*. 33, 17209-17220. 査読有  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0793-13.

Yamashita M, Kawaguchi SY, Hirano T. (2013). Contribution of postsynaptic GluD2 to presynaptic R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel function, glutamate release and long-term potentiation at parallel fiber to Purkinje cell synapses. *Cerebellum*. 12, 657-66. 査読有  
doi: 10.1007/s12311-013-0474-y.

[学会発表](計 3 件)

Françoise Díaz-Rojas, Takeshi Sakaba, Shin-ya Kawaguchi.  $\text{Ca}^{2+}$  current facilitation underlies short-term facilitation

at inhibitory synapses between Purkinje cells. 2015年3月 第92回 日本生理学会大会(神戸)

川口真也. 小脳シナプス可塑性の分子機構のモデル予測と実験検証 第91回日本生理学会大会 2014年3月(鹿児島)

S Tanaka, S Kawaguchi, T Hirano. Cerebellar inhibitory synaptic plasticity, rebound potentiation, contributes to adaptation of vestibulo-ocular reflex. *Neuroscience* 2013, San Diego (USA)

[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/introduction/mol/msf.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川口 真也 (KAWAGUCHI SHIN-YA)  
同志社大学・高等研究教育機構・准教授  
研究者番号: 00378530