

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 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：25870896

研究課題名(和文)可視化による神経伝達物質放出機構の動態の解明

研究課題名(英文)Visualizing the mechanism of neurotransmitter release

研究代表者

緑川 光春 (Midorikawa, Mitsuharu)

同志社大学・高等研究教育機構・助教

研究者番号：60632643

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)：刺激によって細胞が興奮すると、軸索終末部に存在するCa²⁺チャネルからCa²⁺が流入することによってシナプス小胞が細胞膜と融合し、神経伝達物質が細胞外へと放出され(開口放出)、これによって神経細胞間の情報伝達が行われる。開口放出やその後のエンドサイトーシスに重要な役割を持つCa²⁺チャネルのサブタイプを同定したり、開口放出前後の関連タンパク質の動態を明らかにすることによって、シナプス前部におけるシナプス小胞サイクルについて新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：When the neuron is activated, Ca²⁺ flows into the presynaptic terminal through Ca²⁺ channels, and neurotransmitter is released by the fusion of synaptic vesicles with the plasma membrane (exocytosis), and the information is transmitted from cell to cell. We identified the subtypes of Ca²⁺ channels mediating exocytosis and the following endocytosis. The kinetics of the vesicular proteins that mediate exocytosis was also examined. These studies provides new insights to the synaptic vesicle cycle at the presynaptic terminal.

研究分野：神経科学

キーワード：開口放出 エンドサイトーシス シナプス

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室は、主に電気生理学的手法を用い、ラットやマウスの脳幹聴覚伝導路に存在する脳幹聴覚系カリックス型シナプスを標本として伝達物質放出機構の解明を進めてきた(Sakaba and Neher, 2001; Sakaba et al., 2005; Wadel et al., 2007; Hosoi et al., 2009)。シナプス前終末である軸索終末部において、シナプス小胞は伝達物質放出部位への動員、伝達物質放出への分子的準備(プライミング)、形質膜への融合と伝達物質の細胞外への放出、エンドサイトーシスによる小胞の再回収、伝達物質再充填と小胞再利用への準備、といった一連のサイクルを経て再利用されると考えられる(図1)。

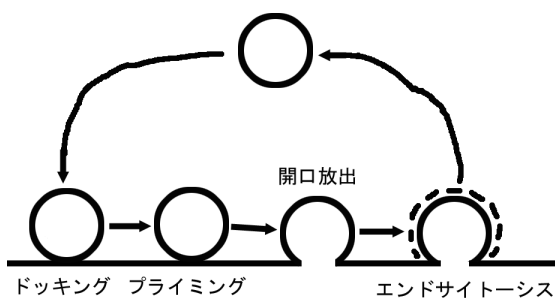


図1 シナプス小胞サイクルの模式図

この一連のサイクルにおける関連タンパク質の動態は、神経シナプスにおいては電気生理学的な手法によって間接的に証明されている段階であり、申請者の研究室もそれに寄与している(Sakaba et al., 2005)が、その時空間的分布、動態を直接可視化する研究は、まだ行われていない。

一方で、神経伝達物質放出部位は Ca^{2+} チャンネルが集積しており、そこへのシナプス小胞の接着が素早い神経伝達を行うカギを握る可能性がある(Midorikawa et al., 2007)。幼若期(生後 10 日以前)の脳幹聴覚系カリックス型シナプスには複数のタイプの Ca^{2+} チャンネルが存在しており、それぞれの Ca^{2+} チャンネルの開口放出に対する寄与は証明されている(Wu et al., 1999)が、開口放出後のエンドサイトーシスに対する寄与は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は 開口放出関連タンパク質の神経シナプス前終末における動態、複数の異なるタイプの Ca^{2+} チャンネルの開口放出サイクルに対する役割、を検証することを目的とすした。ラットやマウスの脳幹聴覚系カリックス型シナプスを主たる標本とし、神経伝達物質放出メカニズムに関して、関与する Ca^{2+} チャンネルのサブタイプの同定と、開口放出タンパク質の可視化によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

標本としてラット、マウスの脳幹聴覚系カリックス型シナプスのシナプス前終末のスライス標本を使用する。カリックス型シナプス前終末に存在するシナプス小胞タンパク質であるシナプスタグミンを pH 感受性蛍光物質の cypHer によって蛍光標識する。シナプス小胞内は細胞外に比べて酸性状態であるので、シナプスタグミンの動態をシナプス小胞内外の pH の差を利用することによって測定し、開口放出関連タンパク質が開口放出後にどのように再取り込みされるのかを明らかにする。

また、カリックス型シナプスには複数の異なるタイプの Ca^{2+} チャンネルが存在するが、それぞれの Ca^{2+} チャンネルが個々の Ca^{2+} チャンネルを阻害した際にシナプス小胞サイクルのどの段階に変化が生じるのかを調べる。カリックス型シナプスのシナプス前終末は膜容量測定法によって開口放出に伴う細胞形質膜の面積変化を測定することが可能な標本である(Sun & Wu, 2001; Sakaba, 2005)。カリックス型シナプスのシナプス前終末にホールセルパッチクランプ法を適用し、異なる種類の Ca^{2+} チャンネルを阻害した状態で脱分極刺激を与え、開口放出にともなう膜容量の増加、エンドサイトーシスに伴う膜容量の減少の時間経過に対してどのような作用があるのかを調べる。

4. 研究成果

ラットカリックス型シナプスにおける異なるサブタイプのカルシウムチャンネルがエンドサイトーシスに果たす役割について、膜容量測定法を用いて調べた。実験の結果、幼若期においては3種類のカルシウムチャンネル(P/Q型、N型、R型)のうち主にR型がエンドサイトーシスを制御しており、非常に強い刺激を与えた場合にのみP/Q型によって制御されるエンドサイトーシスが顕著に表れることが明らかになった。また、成熟期になるとエンドサイトーシスの制御機構が変化し、P/Q型カルシウムチャンネルによって制御されるエンドサイトーシスが支配的になった。この成果は論文として発表した(Midorikawa et al., 2014、図2)。

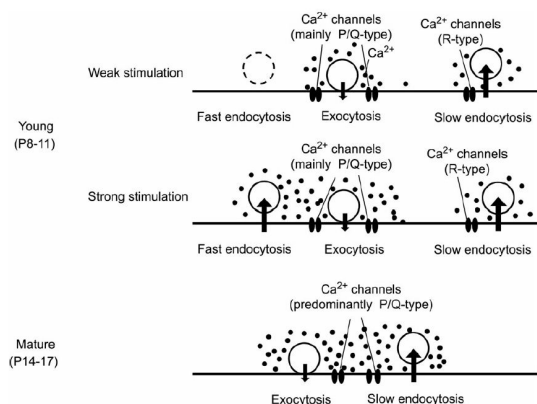


図2 Ca²⁺チャネルと開口放出部位、エンドサイトーシス部位との位置関係の模式図。Midorikawa et al., 2014 より。

また、シナプス小胞タンパク質の一種であるシナプトタグミンを蛍光標識した抗体 (syt2-cypHer) で蛍光標識 (図3) し、膜容量測定法と光学的測定法を組み合わせることによって、開口放出後にシナプス小胞膜とシナプス小胞タンパク質がそれぞれどのように細胞内へと取り込まれるのかを測定することを試みた。実験の結果、刺激強度が弱い場合にはシナプス小胞膜と syt2-cypHer の細胞内への取り込みの時間経過はよく一致するが、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの働きを阻害すると、syt2-cypHer の取り込みの時間経過のみが遅くなることが分かった。一方、刺激強度が強い場合には syt2-cypHer が取り込まれた細胞内構造体の酸性化が遅いことが示唆された。刺激の強度に応じてエンドサイトーシスされて取り込まれる膜構造の大きさやその分子構成が異なる可能性が考えられ、これらの実態について今後さらに詳細な実験を行うことで小胞膜、および小胞膜タンパクのサイクルの実態について、新たな知見が得られることが期待できる。

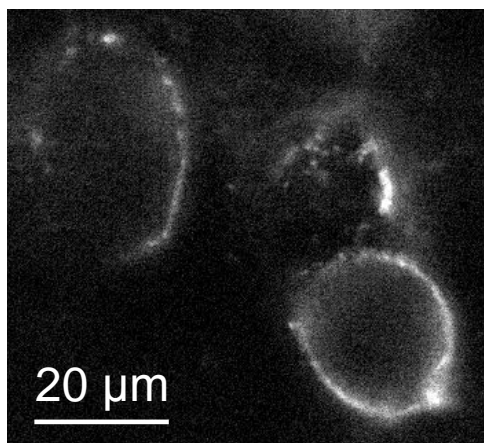


図3 syt2-cypHer によって蛍光標識したスライス標本内におけるカリックス型シナプス前終末

光学的測定法に関しては、細胞膜直下のみを観察できる全反射蛍光顕微鏡 (図4) をカリックス型シナプス前終末の単離標本に適用し、単一シナプス小胞の開口放出、および開口放出前のシナプス小胞動態の可視化に成功した (図5)。単一シナプス小胞の開口放出部位、および開口放出前のシナプス小胞の動態を可視化することによって、これまで明らかになっていないドッキングやプライミングといった開口放出の前段階の動態を調べることが可能になると期待できる。

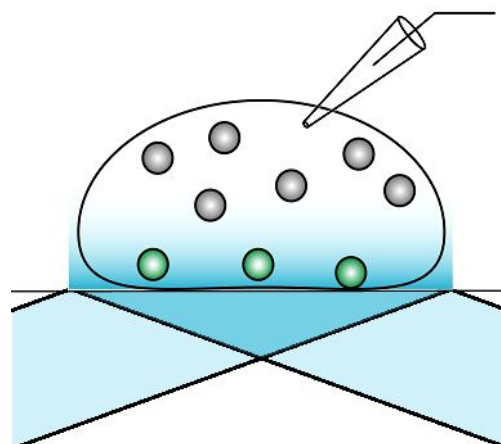


図4 全反射蛍光顕微鏡細胞膜直下 (約 100nm 以内) のシナプス小胞 (緑) のみに励起光を照射することができる。

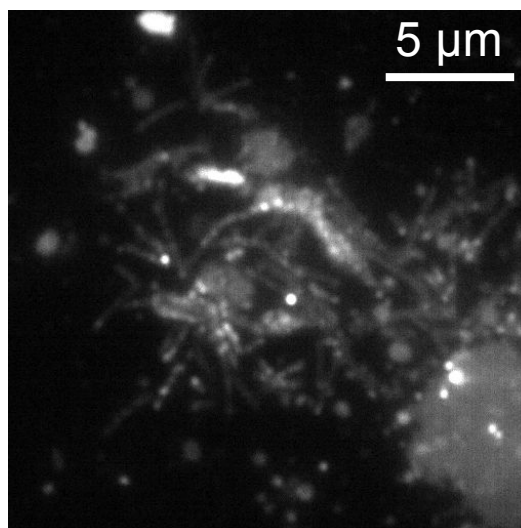


図5 シナプス小胞を FM1-43 で蛍光標識したカリックス型シナプス前終末の全反射蛍光顕微鏡像

これらの研究によって、シナプス小胞の開口放出、その後のエンドサイトーシスによる細胞内への再取り込み、その後の再利用に至るまでの実態を明らかにすることに貢献できると考える。

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 1 件)

Midorikawa M, Okamoto Y, Sakaba T. Developmental changes in Ca²⁺ channel subtypes regulating endocytosis at the calyx of Held. *J Physiol.* **592**, 3495-510 (2014). (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

Yuji Okamoto, Takeshi Sakaba and Mitsuharu Midorikawa, Optical and electrophysiological measurements of synaptic exo-endocytosis at the rat calyx of Held synapse. 第 91 回日本生理学会大会 (鹿児島). 2014 年 3 月 16 日 ~ 18 日.

Mitsuharu Midorikawa, Yuji Okamoto and Takeshi Sakaba, Measurements of synaptic exo-endocytosis by electrophysiological and optical technique at the rat calyx of Held synapse. 第 37 回日本神経科学大会 (横浜). 2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日.

Mitsuharu Midorikawa and Takeshi Sakaba, Visualizing exocytosis of single synaptic vesicles at the calyx-type presynaptic terminal. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会 (神戸). 2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緑川 光春 (MIDORIKAWA, Mitsuharu)
同志社大学・高等研究教育機構・助教
研究者番号 : 60632643

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :