

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04261

研究課題名(和文) 軸索とシナプス前終末の生理学的研究

研究課題名(英文) Physiology of axons and axon terminals.

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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、いままで実験的に困難であった、神経細胞の情報出力部分である軸索やシナプス前終末から直接パッチクランプ記録をおこない、生理学的な特性を明らかにすることを目標とした。また必要に応じて、イメージング技術を併用し、内部素過程の動態を明らかにすることも試みた。軸索に関しては、神経細胞によって、活動電位の安定的な伝導には差がある可能性があること、シナプス前終末に関しては伝達物質放出の速度がシナプスによって異なり、これはCaチャンネルとシナプス小胞の距離に依存する可能性が示唆された。またセカンドメッセンジャーによって、距離が可塑的に変化し、神経可塑性を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study program, we have directly patch-clamped from axons and axon terminals at mammalian CNS neurons to elucidate their physiological properties. In addition, we employed imaging techniques such as TIRF (total internal reflection fluorescent microscopy), to reveal the underlying mechanisms. In axons, action potentials are propagated reliably in some neuron types whereas they are attenuated in other types. In presynaptic terminals, transmitter release kinetics differ considerably among synapse types, which may be mediated by different coupling distance between Ca channels and synaptic vesicles. Moreover, second messengers may modulate the coupling distance, which may mediate short- and long-term presynaptic plasticity.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 軸索

1. 研究開始当初の背景

神経細胞において、樹状突起に対して複数のシナプスから入力があり、発生したシナプス電位が細胞体に伝播する。シナプス電位の総和が一定以上の振幅になると、細胞体ないし近傍で活動電位が発生する。活動電位は軸索を安定して伝播し、シナプス前終末に到達すると神経伝達物質を細胞外に放出することで次の細胞に情報出力をすると考えられている。しかし、これらの図式は無脊椎動物や末梢神経のモデル標本からの知見に依拠したものである。形態的、機能的に複雑かつ多様な哺乳類中枢神経細胞において、樹状突起、細胞体、軸索、シナプスといった細胞内コンパートメントがどのように挙動し、細胞の動的特性を規定し、神経回路内でどのような役割を担っているかは未解明な点が多く残されている。特にこれまで実験困難であった、神経細胞の情報出力を担う軸索やシナプス前終末の特性を明らかにすることが、本研究の主要な目的である。

樹状突起に関しては、1990年代より多くのグループで、直接記録、イメージングを用いた精力的研究が行われてきており、樹状突起におけるシナプス入力の統合、細胞体から樹状突起への活動電位の逆伝播など、従来の知見よりも複雑な情報処理が行われる可能性が示唆されつつある。一方で、軸索、シナプス前終末でも樹状突起と同様に複雑な情報処理をおこなっている可能性が指摘されている。しかし、軸索や終末は直径が1ミクロンあるいはそれ以下の大きさで直接記録が困難であるため、実験的知見が限られている。

最近、私たちのグループを含め、いくつかのグループでパッチクランプ法を軸索、シナプス前終末に適用し、直接電気記録する研究が始まっている。本研究課題では、直接記録法を中心にイメージング法などを取り入れて、軸索およびシナプス前終末の特性を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

形態的に複雑かつ多様な哺乳類中枢神経細胞において、樹状突起、細胞体、軸索、シナプス前後部といった細胞内コンパートメントがどのように作動するかに関しては未解明の部分が多く残されている。本研究は、いままですべて実験的に困難であった、神経細胞の情報出力部分である軸索やシナプス前終末から直接パッチクランプ記録をおこない、生理学的な特性を明らかにする。必要に応じて、イメージング技術を併用し、内部素過程の動態を明らかにすることも試みる。さらに、異なる種類の神経細胞を定量的に比較し、軸索、シナプス前終末の機能的多様性を媒介する分子細胞メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

急性スライス標本を P8-30 程度のラット、

マウス脳から作成する。具体的には聴覚系脳幹、小脳、海馬から標本作製する。細胞体、樹状突起、軸索、シナプス前終末といった細胞コンパートメントからパッチクランプ法による直接電気記録を行うことによって、それぞれの特性を明らかにすることを試みた。また、細胞コンパートメント(シナプス前終末など)を急性単離し、それぞれの性質を独立して明らかにすることを試みた。さらに小脳の研究に関しては、一部の実験では、ラット小脳から分散培養細胞標本作製し、パッチクランプおよびイメージング実験を行った。

具体的な標本としては、脳幹 calyx of Held、小脳平行線維、小脳プルキンエ細胞シナプス、海馬苔状線維など、軸索、シナプス前終末にアクセス可能な標本を用いた。

軸索、シナプス前終末の特性を明らかにするために、パッチクランプ法によって直接電気記録をおこなった。また、イメージング(落射蛍光、全反射照明)によって、Ca濃度、シナプス小胞のダイナミクスを測定した。

すべての実験は同志社大学の動物実験、DNA 実験の審査を経て行った。

4. 研究成果

(1) 海馬苔状線維シナプス前終末の伝達特性の解明

海馬苔状線維-CA3 錐体細胞シナプスは、多くの哺乳類中枢シナプスと異なり、連発刺激でシナプス強度の促進現象を起こすこと、シナプス前性の長期シナプス現象をおこすこ

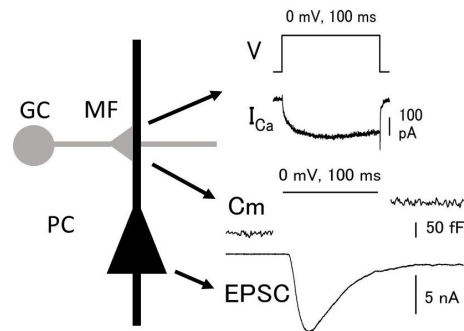


図1 左：苔状線維(MF)と錐体細胞(PC)がシナプスを形成。右：同時記録で前終末Ca電流(I_{Ca})、膜容量(C_m)、シナプス後電流(EPSC)が測定可能。

となどの独自のシナプス伝達特性を持つ。研究期間当初に、技術的な工夫をおこなうことで、苔状線維シナプス前終末(直径5ミクロン程度)からのパッチクランプ直接記録が可能になった(図1)。また、シナプス後部であるCA3錐体細胞からの同時記録が可能になった。シナプス前終末の電流(I_{Ca})、シナプス

後部のシナプス応答 (EPSC) と、シナプス小胞の形質膜融合に伴う膜容量 (Cm) の電気生理学的な計測法を組み合わせることで、伝達物質放出の時間経過を計測した (図 1)。

苔状線維からの神経伝達物質放出の時間経過は、ほかの中枢シナプスより 10 倍程度遅かった。また結合速度が速い Ca 緩衝剤 (バッファー) である BAPTA だけでなく、遅い Ca バッファーである EGTA に対する感受性が比較的高いことから電位依存性 Ca チャンネルと伝達物質放出部位 (放出可能なシナプス小胞) との距離が比較的長い (loose coupling) 可能性が示唆された。

さらに、短期シナプス増強や長期シナプス増強現象に關与する Protein kinase A の活性化によって、EGTA 感受性が消失することから、PKA の活性化によって Ca チャンネルとシナプス小胞の距離が短縮し、より素早く、多量の神経伝達物質放出が可能になることが示唆された (Midorikawa and Sakaba, 2017)。これが長期シナプス増強のメカニズムなのかどうかは今後の解明が必要である。

(2) 小脳平行線維シナプス前終末の伝達特性の解明

小脳平行線維-介在神経細胞シナプスは、苔状線維とは異なり、比較的素早い伝達をおこすシナプスとして知られている。ラット培養シナプス標本を用いることで、平行線維シナプス前終末 (1 ミクロン) からのパッチクランプ直接電気記録が可能になった。また、シナプス後部からの同時記録が可能になった。1 個のシナプスが 20 個の伝達物質放出可能な小胞を持つこと、伝達物質放出は Ca バッファー依存性が高く、内在 Ca バッファーの特性によって伝達物質放出量、短期可塑性の特性が決定されることがわかった (Kawaguchi and Sakaba, 2017)。

(3) 小脳プルキンエ細胞シナプス前終末からの直接記録

小脳プルキンエ細胞どうしは、シナプス結合をしており、連発刺激でシナプス促進現象を示すことが知られているが、促進のメカニズムはわかっていない。このシナプス結合は培養標本でも維持される。培養プルキンエ細胞シナプス前終末からの直接記録と、シナプス後細胞からの同時記録によって、Ca チャンネルの促進が、シナプス促進現象を媒介していることがわかった。(2) の結果と合わせると、シナプス促進現象にはいくつかのメカニズムがあるが、それぞれのシナプスによって、どのメカニズムが主要な要因になるかは異なる可能性がある (Diaz et al., 2015)。

(4) 軸索からの直接記録

ラット小脳バスケット細胞の細胞体にパッチクランプ法を適用し、蛍光色素を導入して軸索を可視化することで、軸索、シナプス前終末からの直接記録を技術的に可能にし

た。バスケット細胞の場合、プルキンエ細胞とは異なり (Kawaguchi and Sakaba, 2015)、比較的安定に活動電位が軸索上を伝導することが示唆された。今後、軸索からの記録が可能なほかの標本 (海馬苔状線維など) でも同様の実験をし、軸索の電気特性がどのようなものか知る必要がある。

(5) シナプス小胞の動態の直接計測

海馬苔状線維シナプス前終末を急性単離し、ガラス面にはり付けることで、全反射蛍光顕微鏡の適用を可能にし、シナプス小胞を単一レベルで可視化することができるようになった。蛍光色素 FM1-43 をシナプス小胞に対してエンドサイトーシスを介して取り込ませることで、小胞可視化を可能にした。この方法を用いて、シナプス小胞のダイナミクスを測定できるようになった。脱分極パルスに対するシナプス小胞の膜融合速度はほかの中枢シナプス前終末、たとえば calyx of Held (Midorikawa and Sakaba, 2015) に比較すると遅かった。小胞の形質膜への接着は比較的遅く、伝達物質放出部位への接着の時間数は数秒のオーダーであった。また接着のみがシナプス小胞の伝達物質放出に十分ではなく、形質膜で伝達物質放出可能な状態へ分子的な準備が必要である可能性が示唆された。

長期シナプス増強に關係する Protein kinase A の活性化によって、膜融合速度は上昇したが、放出部位への小胞接着速度は変化しなかった。この結果は (1) に記述した電気生理学からの実験結果と一致した (Midorikawa and Sakaba, 2017)。

(6) 伝達物質放出メカニズムの総説

これまでのシナプス前終末からの伝達物質放出メカニズムに関する研究をまとめた総説を学士院の英語版紀要に出版した (Sakaba, 2018)。これまで研究をしてきた calyx of Held シナプス、海馬苔状線維シナプス、小脳抑制性神経細胞シナプスの結果を比較し、伝達物質放出を説明するモデルを提唱し、それぞれのシナプスがどのように機能分化し、機能的な多様性を獲得するのかを説明した。

(7) その他

共同研究により、シナプス小胞エンドサイトーシスの分子細胞メカニズム (細胞骨格アクチン依存性) に関して、新たな知見を得た (Soykan et al., 2017)。また、calyx of Held シナプスのエンドサイトーシスに関して、形質膜 (膜容量測定法) とシナプス小胞タンパク質 synaptotagmin (syt) 2 動態の同時計測を行った (Okamoto et al., 2016)。エンドサイトーシスが 2 種類あり刺激条件によってどちらが優位化が決まること、syt2 の取り込みには calmodulin / Munc13 シグナル経路が重要な役割を担う可能性が示唆された。

(8) 今後の研究

3年間の研究で、軸索、シナプス前終末の機能特性に関して、新たな知見を得た。今後は電気生理学のみならず、イメージングなど直接内部構造を可視化できる方法論を用いて、分子細胞メカニズムの解明へと研究を進めていく必要がある。

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 7 件)

Sakaba T. Kinetics of transmitter release at the calyx of Held synapse. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 2018年 94(3):139-152. doi: 10.2183/pjab.94.010. 査読あり

Kawaguchi SY, Sakaba T. Fast Ca²⁺ buffer-dependent reliable but plastic transmission at small CNS synapses revealed by direct bouton recording. **Cell Rep.** 2017年 21(12):3338-3345. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.072. 査読あり

Midorikawa M, Sakaba T. Kinetics of releasable synaptic vesicles and their plastic changes at hippocampal mossy fiber synapses. **Neuron.** 2017年 96(5): 1033-1040.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.016. 査読あり

Soykan T, Kaempfer N, Sakaba T, Vollweider D, Goerdeler F, Puchkov D, Kononenko NL, Haucke V. Synaptic vesicle endocytosis occurs on multiple timescales and is mediated by formin-dependent actin assembly. **Neuron.** 2017年 93(4):854-866.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.011. 査読あり

Okamoto Y, Lipstein N, Hua Y, Lin KH, Brose N, Sakaba T, Midorikawa M. Distinct modes of endocytotic presynaptic membrane and protein uptake at the calyx of Held terminal of rats and mice. **Elife.** 2016年 5. pii: e14643. doi: 10.7554/eLife.14643. 査読あり

Midorikawa M, Sakaba T. Imaging exocytosis of single synaptic vesicles at a fast CNS presynaptic terminal. **Neuron.** 2015年 88(3):492-8. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.047. 査読あり

Díaz-Rojas F, Sakaba T, Kawaguchi SY. Ca(2+) current facilitation determines short-term facilitation at inhibitory

synapses between cerebellar Purkinje cells. **J Physiol.** 2015年 593(22):4889-904. doi: 10.1113/JP270704. 査読あり

[学会発表](計 6 件)

坂場 武史 パッチクランプ法をはじめとする電気生理学的計測法について。日本神経科学学会 幕張(幕張メッセ) 2017年 7月 20日

坂場 武史 哺乳類シナプス前終末の生理学的研究 日本生理学会、浜松(浜松アクトシテイ)、2017年 3月 28日

Sakaba T Mechanisms of transmitter release at the calyx of Held synapse. Goettingen Neuroscience meeting, Goettingen, Germany, 2017年 3月 20日

坂場 武史 中枢神経系におけるシナプス伝達の生理学(塚原伸晃賞受賞記念講演) 日本神経科学学会、横浜(パシフィコ横浜) 2016年 7月 20日

Sakaba T Physiology of axon and axon terminals. The 6th Faons congress and the 11th Biennial conference of CNS, Wuzhen, Zhejiang Province, China, 2015年 9月 21日

坂場 武史 シナプス前終末の生理学、日本糖質学会、東京(東京大学)、2015年 8月 2日

[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
同志社大学大学院脳科学研究科
<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・大学院脳科学研究科・教授
研究者番号: 80609511

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

川口 真也 (KAWAGUCHI, Shinya)
京都大学・産官学連携本部・特定准教授
研究者番号: 00378530

緑川 光春 (MIDORIKAWA, Mitsuharu)
東京女子医科大学・医学部・准講師
研究者番号:60632643

(4)研究協力者
なし