

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300146

研究課題名（和文） 海馬シナプス前カルシウムストアの細胞分子基盤に関する研究

研究課題名（英文） Cellular and molecular basis of hippocampal presynaptic calcium store

研究代表者

神谷 温之（KAMIYA HARUYUKI）

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10194979

研究成果の概要（和文）：海馬苔状線維シナプス前部におけるカルシウムストアの細胞内局在とカルシウム放出機構の詳細について詳細な解析を行った。カルシウム放出の生じる部位とカルシウム流入部位の位置関係を調べるために、共焦点顕微鏡を用いた単一神経終末レベルでのカルシウムイメージングを試みた。微分干渉顕微鏡下に同定した苔状線維終末に電気穿孔法により蛍光カルシウム指示薬を導入し、効率よく単一神経終末・軸索レベルでの標識を可能にした。

研究成果の概要（英文）：Subcellular localization of calcium releasing sites from presynaptic calcium store in hippocampal mossy fiber synapse was examined. Using high speed confocal microscope system, calcium imaging within mossy fiber terminals and axons was performed. Calcium indicator was efficiently introduced to single mossy fiber terminals and axons by electroporation through microelectrode placed on visually identified mossy fiber terminals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：シナプス伝達、カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

シナプス前終末におけるカルシウムイオンの動態は、シナプス伝達とその可塑性を制御する最重要因子である。近年、その制御因子として、細胞内カルシウムストアの役割が注目されている。従来から、シナプス前終末部に豊富に存在するミトコンドリアが低親和性ならびに大容量性カルシウム緩衝系として機能することが知られていたが、近年、

これに加えて、一部の脳のシナプスではリアノジン感受性ストアがシナプス前部でのカルシウム動態を調節することが明らかになりつつある。我々はこれまでに、顕著なシナプス前性長期増強を示す海馬CA3野苔状線維シナプスにおいて、シナプス前部に機能的なリアノジン受容体が存在し、神経活動依存的にシナプス前部のカルシウム動態を増幅していることを見出した。これらの研究では免

疫組織化学的手法を用いて2型リアノジン受容体 (RyR2) が苔状線維の軸索部に多く発言していることがわかったが、これらのリアノジン受容体がどの細胞内構造 (オルガネラ) に局在するのか、またカルシウム放出部位が神経終末部なのか軸索部なのか、など、その詳細については不明な点が多かった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、これまでの研究成果についてさらに解析を進め、単一神経終末、単一軸索レベルでのカルシウムイメージングを行うことで、海馬苔状線維シナプス前カルシウムストアの細胞内局在とオルガネラの同定、カルシウム放出機構の詳細について解析し、シナプス前カルシウムストアの細胞分子基盤とその機能的意義に関して全貌を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス海馬スライス標本を用いて、電気生理学的な解析を行うとともに、ニボウ円盤式の高速共焦点顕微鏡を導入し、苔状線維シナプス前部でのカルシウムイメージングにより苔状線維シナプス前部における細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出部位の解明を目指した。近赤外線微分干渉 (IR-DIC) 顕微鏡観察により同定した苔状線維終末に直視下に電気穿孔法で蛍光カルシウム指示薬を負荷する手法 (単一神経終末エレクトロポレーション法: 後述) を開発した。

4. 研究成果

海馬苔状線維シナプスにおけるシナプス前カルシウムストアの細胞分子基盤について理解を深めるために、カルシウムストアの局在と機能に関して、以下の三点について解析を行った。

(1) カフェインによる苔状線維での活動電位波形の変化

リアノジン受容体からのカルシウム放出を促すカフェインを投与すると苔状線維シナプス伝達の著明な亢進が生じる。本研究では、カフェインによるシナプス伝達亢進の一因として、カフェイン投与が苔状線維軸索における活動電位波形の変化を引き起こす可能性について検討した。マウス海馬スライスにおいて細胞外記録法により軸索の集合活動電位を記録した。カフェイン投与により軸索集合活動電位の振幅と潜時の軽度の増大を認めた。この効果は無カルシウム液中でも観察され、また、4-アミノピリジン投与により電位依存性Kチャンネルを選択的に抑制するとカフェインと同様の効果 (潜時の軽度の増加) がみられたことから、カフェインによるリアノジン受容体を介する細胞内カルシウ

ム放出が軸索内のカルシウムレベルの上昇を引き起こし、これが活動電位下降相を規定する電位依存性Kチャンネルを抑制することで活動電位波形を遷延化させたと考えられた。特異抗体を用いた免疫組織化学的解析では2型 (心筋型) リアノジン受容体が苔状線維の神経終末部ではなく軸索に密に存在することから、これらの軸索内リアノジン受容体がカフェイン投与によりカルシウム放出を引き起こし、シナプス前部での活動電位波形を延長することで伝達物質放出を促進する可能性が示唆された。

(2) 苔状線維シナプスでのカフェインのシナプス前性作用におけるリアノジン受容体の活性化とアデノシン受容体の抑制の関与

カフェインの脳・神経系に対する作用として、神経調節物質の受容体であるアデノシン受容体を抑制する作用と、細胞内の小胞体膜に存在するリアノジン受容体を刺激して細胞内ストアからのカルシウム放出を促す作用の二種類の作用が知られている。このうち覚醒作用はアデノシン受容体の活性化によると考えられてきた。これに対し、リアノジン受容体は骨格筋や心筋の収縮に関与することが知られているが、脳における作用の詳細については未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、リアノジン受容体が海馬苔状線維シナプス前部に存在することを見出した。海馬苔状線維シナプスでは顕著なシナプス前性の可塑性を示すことから、苔状線維終末でのリアノジン受容体がシナプス前部でのカルシウム動態を増幅することで、シナプス可塑性に寄与する可能性が想定される。しかしながら海馬苔状線維シナプス前部にはアデノシン A1 受容体も存在し、これらは細胞外液中に存在するアデノシンにより定常的に活性化され、シナプス前カルシウムチャンネルに抑制的に作用することで、苔状線維終末における伝達物質 (グルタミン酸) の放出を持続的に抑制していることが知られている (tonic inhibition)。カフェインがアデノシン A1 受容体を抑制することで、A1 受容体を介する持続的抑制が解除され、伝達物質放出を促進すると考えられるが、カフェインによる苔状線維シナプス伝達の亢進において、アデノシン受容体の抑制とリアノジン受容体の活性化がそれぞれどの程度生じているかについては明らかでない。そこでアデノシン A1 受容体特異的な阻害薬である DPCPX の効果とカフェインの効果を定量的に比較し、両者の効果の相対的な寄与の程度について調べた。まず、マウス海馬スライス標本においてカフェイン投与が海馬の CA3 野シナプス伝達に及ぼす作用を検討した。高濃度のカフェイン (10 mM) を投与すると、苔状線維 EPSP は顕著に増大し、投与前の約 600% に増大した。その後、カフェインを除去すると苔状線

維 EPSP は速やかに減衰し、カフェイン投与前より軽度で減弱したレベル（投与前の 70% ほど）で安定化した。カフェインは海馬 CA3 野シナプス伝達を促進するとともに、シナプス伝達の長期抑圧現象を引き起こすことが示された。カフェイン投与時のシナプス伝達の亢進に際して二発刺激促進は減少し、カフェイン除去後の長期抑圧現象に際しては二発刺激促進は増大した。カフェインによるシナプス伝達の亢進と、カフェイン除去後の長期抑圧現象は、何れもシナプス前性の変化、すなわち神経終末からの伝達物質量の変化であることが示唆された。さらに、上記のカフェインの作用が、アデノシン受容体とリアノジン受容体の何れの受容体を介するかについて検討した。アデノシン受容体の選択的な阻害薬である DPCPX (1 μ M) を投与すると、苔状線維 EPSP は約 200% に増強した。2 μ M の DPCPX を追加投与しても CA3 野シナプス応答はさらに増強しなかったため、1 μ M の DPCPX はアデノシン受容体をほぼ完全にブロックしたと考えられた。DPCPX (1 μ M) 投与後にカフェイン (10 mM) を追加投与すると苔状線維 EPSP はさらに増強し、カフェイン単独投与とほぼ同レベルの増強を示した。以上の結果から、カフェインはアデノシン A1 受容体を抑制することで苔状線維シナプス伝達を軽度で亢進するが、それ以外にも、おそらくリアノジン受容体を介するカルシウム放出を介してシナプス伝達を亢進することが考えられた。この点を確認するために、シナプス前部でのカルシウムレベルの測定を試みた。マウス海馬スライス標本において苔状線維軸索の走行する CA3 野透明層に膜透過型蛍光カルシウム指示薬である Oregon Green BAPTA1-AM を負荷し、軸索内に取り込まれた後に軸索輸送の機構を介して輸送されることを利用して、シナプス前部（終末部および軸索部）に蛍光カルシウム指示薬を負荷することができる（軸索標識法）。このような標本において、蛍光強度を指標にシナプス前部のカルシウムレベルを評価した。アデノシン A1 受容体阻害薬 DPCPX の投与ではシナプス前部の定常的なカルシウムレベルは変化しなかったが、カフェイン投与では顕著なカルシウムレベルの上昇（蛍光強度の増加）を観察した。カフェインがリアノジン受容体の活性化によりシナプス前カルシウムストアからのカルシウム放出を促したと考えられた。カフェインはアデノシン受容体とリアノジン受容体の両者に作用してシナプス伝達を調節することが示唆された。

(3) 単一神経終末エレクトロポレーション法による単一苔状線維終末と軸索の観察

海馬苔状線維シナプス前部における細胞内カルシウムストアの役割について解析す

るために、単一終末レベルないし単一軸索レベルでの苔状線維ナプス前部でのカルシウムイメージングを新たに試みた。新たに導入したニポウ円盤型共焦点顕微鏡を用いた高速イメージングシステムを用いて、シナプス前部でのカルシウム動態の測定を行った。マウス海馬スライス標本において、苔状線維の起始細胞である歯状回顆粒細胞に効率的に単一細胞レベルで蛍光カルシウム指示薬を負荷するために、単一細胞エレクトロポレーションの条件検討を行い、小型の細胞である歯状回顆粒細胞の細胞体に直視下に簡便に蛍光色素を導入することが可能になった。しかしながら、顆粒細胞の軸索である苔状線維軸索は極めて微細で、また、スライス内を立体的に走行し、共焦点顕微鏡を用いても苔状線維の神経終末部まで連続して蛍光をモニターすることが困難な場合がしばしばであった。そこで、苔状線維神経終末に直接蛍光カルシウム指示薬を負荷することを試みた。海馬苔状線維シナプス前部における細胞内カルシウムストアの役割について解析するために、単一終末レベルないし単一軸索レベルでの苔状線維シナプス前部でのカルシウムイメージング法の開発を目指した。近赤外線微分干渉 (IR-DIC) 顕微鏡を用いてマウス海馬スライス標本の苔状線維軸索の走行する CA3 野透明層を観察すると、3 ないし 5 ミクロンほどの球型の構造が観察される。これらの構造に直視下に、膜不透過型蛍光カルシウム指示薬である Oregon Green BAPTA1 を含むガラス微小電極を接触させ、1 ミリ秒ほどの電気パルスで短時間に繰り返し与えることによって、速やかに苔状線維終末（シナプス前終末）及び連続する苔状線維（軸索）様の構造が簡便に蛍光標識可能であった（単一神経終末エレクトロポレーション法）。ただし、IR-DIC で視認できるのはスライス表面に近い苔状線維終末に限られるため、起始細胞である歯状回までを連続して標識することは多くの場合困難であった。また、単一神経終末内の細胞内カルシウム放出の局在を同定するために、現有する共焦点顕微鏡に中間変倍レンズを取り入れることで、蛍光画像の空間分解能をあげることができた。そこで、苔状線維入力に高頻度刺激を与えた際の蛍光シグナルと、阻害濃度のリアノジン投与により細胞内カルシウム放出を阻害させた際の蛍光シグナルの差分を取ることで、細胞内カルシウム放出の局在性に関する解析を進めている。特に免疫組織学的に同定した軸索内リアノジン受容体がカルシウム放出に寄与するかに注目して解析を進めている。

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3件)

- ① Uchida T., Fukuda S., Kamiya H.
Heterosynaptic enhancement of the excitability of hippocampal mossy fibers by long-range spill-over of glutamate. *Hippocampus* 22(2): 222-229, 2012 査読有
doi: 10.1002/hipo.20885
- ② Sato I., Kamiya H. Assessing the roles of presynaptic ryanodine receptors and adenosine receptors in caffeine-induced enhancement of hippocampal mossy fiber transmission. *Neuroscience Research* 71(3): 183-187, 2011 査読有
doi:10.1016/j.neures.2011.07.001
- ③ Akashi K., Kakizaki T., Kamiya H., Fukaya M., Yamasaki M., Abe M., Natsume R., Watanabe M., Sakimura K. NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *Journal of Neuroscience*, 29(35): 10869-10882, 2009 査読有
doi: 10.1523/JNEUROSCI.5531-08.2009

[学会発表] (計7件)

- ① 神谷温之、光反応性ブロッカーを用いたグルタミン酸受容体動態のシナプス「その場」解析、第89回日本生理学会大会(シンポジウム)、2012/3/31、信州大学(長野)
- ② Kamiya H. Photoinactivation analysis of postsynaptic AMPA receptor dynamics during hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 2011. 2011/11/16, Washington DC (USA)
- ③ 神谷温之、単一神経終末エレクトロポレーション法による海馬苔状線維軸索と神経終末の蛍光観察、第34回日本神経科学学会大会、2011/9/17、パシフィコ横浜(神奈川)
- ④ 神谷温之、光不活化法による海馬CA1野シナプスAMPA受容体動態の長期計測、第88回日本生理学会大会、2011/3/28、パシフィコ横浜(神奈川)(誌上開催)

⑤ Kamiya H. Photochemical inactivation of postsynaptic AMPA receptors in hippocampal slices. *Neuroscience* 2010. 2010/11/15, San Diego (USA)

⑥ 神谷温之、海馬スライスでのAMPA受容体の不可逆的な光不活化、第87回日本生理学会大会、2010/5/20、盛岡市民文化ホール(岩手)

⑦ Kamiya H. Bumetanide-sensitive and -insensitive actions of GABA_A receptors on the excitability of the hippocampal mossy fibers. 36th International Congress of Physiological Sciences. 2009/7/29, 京都国際会館(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 温之 (KAMIYA HARUYUKI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10194979

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: