

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19367

研究課題名（和文）失われていくシナプスにおけるシナプス伝達能喪失過程の解明

研究課題名（英文）Identification of the developmental change of the synaptic transmission mechanism at the to-be-eliminated synapse

研究代表者

緑川 光春（Midorikawa, Mitsuharu）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60632643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：生後発達初期に過剰に形成されたシナプスは、その後の発達過程において40-50%が失われてしまうことが知られている。この際に失われていくシナプスに関して、それらが失われるまでにどのようにシナプス伝達に変化するのかを解明することを目的として研究を行った。電気生理学実験により、将来的に失われるシナプス前終末では神経伝達物質の開口放出に不可欠なカルシウムチャンネルが著しく少ないことを示す結果を得た。また、超解像蛍光顕微鏡を用いた分子形態解析により、将来的に失われるシナプス前終末では、生き残るシナプス前終末で形成される開口放出部位とカルシウムチャンネルとの整然とした位置配列が成立しない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経回路は発達・経験依存的に改編されることが知られており、適切な改編が高次脳機能の発達に重要であるとともに、不適切な改編は精神・運動疾患などの原因となることが示唆されている。したがって、神経回路の接続部であるシナプスが除去されるメカニズムを理解することは、神経回路の不適切な改編による精神・運動疾患の発症機序の理解やその予防・治療へも繋がりうる重要な基礎研究である。申請者の研究成果は将来的に生き残るシナプスと除去されるシナプスの間の相違点についてその一端を明らかにしたものであり、大きな学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that among the redundant synapse formed at the early phase of the development, 40-50% are eliminated before the maturation. Our aim was to examine how the synaptic transmission at the to-be-eliminated presynaptic terminals changed during the development. From the electrophysiological experiments, we found that the amount of calcium channel, which is crucial for the exocytosis of neurotransmitter, was fewer at the to-be-eliminated presynaptic terminals. By applying the super-resolution fluorescent microscopy, it was suggested that the establishment of the organized nanotopography between the synaptic vesicle release sites and the calcium channel was disturbed at the to-be-eliminated presynaptic terminals.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経回路 シナプス 開口放出 電気生理学 イメージング

1. 研究開始当初の背景

応募者はこれまでに神経細胞軸索終末におけるシナプス小胞の開口放出機構の解明を目指して研究を行ってきた。これまで様々な神経細胞における開口放出およびその直前のシナプス小胞の動態を明らかにしてきたが、開口放出機構の精巧さを知るにつれその機構がどのようにして構築され、あるいは分解されるのかについて興味を抱いた。シナプス前機構を構築するための機能分子や構築機序については近年国内外で盛んに研究が進められている反面、神経回路の形成過程を考えた場合にシナプス構築と同等の重要性を持つシナプス除去に関する研究は極めて限られている。この現状に対し、応募者が最近構築した、発達途上の神経回路で将来失われていくシナプス前終末を選択的に標識して機能解析することが可能なマウス視床体性感覚野の実験系 (Midorikawa & Miyata, PNAS, 2021) を活かせば、シナプスが失われていく際にどのような順序でシナプス伝達能が失われていくのかを解明できるのではないかと考えた。特に、最終的にシナプス構造が失われる前にシナプス伝達能がどのような変遷を見せるのかという疑問は、近年目覚ましい発展を遂げている電子顕微鏡検鏡や蛍光イメージング、光遺伝学をもってしてもその実態を測定することは難しく、研究開始当初の時点では高度な電気生理学的手法が最適の手法であると判断し、本研究構想へと至った。

2. 研究の目的

成熟した神経回路の形成は脳機能の発現のために不可欠である。神経回路の形成期には神経細胞はその投射先に軸索を伸長し、標的となる神経細胞に対してシナプスを形成するが、発達初期にはシナプス形成が過剰に行われ、この時期に形成されたシナプスのおよそ 40 - 50% が発達に伴って失われて成熟した神経回路が形成されることが知られている (Bourgeois & Rakic, J Neurosci., 1993)。したがって、生き残るシナプスの発達 (シナプス強化) と失われていくシナプスの消失 (シナプス除去) は成熟した神経回路形成のためには等しく重要な機構である。生き残っていくシナプスがどのような機能分子を持っており、そこでのシナプス伝達がどのように発達していくのかという観点からの研究は盛んに行われており、その概要が明らかになりつつある (Nakamura et al., Neuron, 2015; Luo et al., EMBO J, 2020)。しかし失われていくシナプスに関しては、それらが何故失われてしまうのか、失われるまでにどのようにシナプス伝達に変化して最終的にシナプス構造自体が失われるのか、といった根源的な疑問は驚くべきことに未解決なままであり、未だに芽生え期の段階にある。これは神経回路の形成期に将来生き残るシナプスと失われるシナプスを弁別できないことが大きな要因であったが、応募者は失われるシナプスのシナプス前部を「実際に失われる前から」選択的に標識することに成功した (Midorikawa & Miyata, PNAS, 2021)。そこで本研究ではこの実験系を利用し、失われるシナプスでのシナプス伝達能がどのような原因・順序で失われていくのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウスのヒゲ感覚を中継する視床のシナプスを研究対象とし、脳スライス標本を作成してパッチクランプ法による電気記録によって機能解析を行った。マウス遺伝学とウイルス学を併用することによって、発達途上の神経回路において、将来的に生き残って強化されるシナプス前終末(Krox20Cre-Ai34D マウス)と失われていくシナプス前終末(脳幹三叉神経核に "Cre-Off" AAV (AAV9-Ef1a-D0-ChETA-EYFP)を感染させた Krox20Cre-Ai34D マウス)をそれぞれ選択的に蛍光標識した。さらに、蛍光標識することによって、視床のシナプス前終末からの直接パッチクランプ記録に世界で初めて成功し、失われていくシナプス前終末におけるイオン電流の種類や大きさ、シナプス小胞の開口放出量を計測した。本研究では、発達に伴って失われていくシナプス前終末においてこれらがどう変化してシナプス伝達能(開口放出能)を失うのかを検討した。シナプス前終末からの開口放出能が失われる要因としては、1)開口放出のトリガーとなるカルシウムイオンの流入部位であるカルシウムチャネルが失われる、2)カルシウムチャネルと開口放出されるシナプス小胞とを近接させる機能が失われる、3)シナプス小胞のカルシウムイオンセンサーが失われる、といった要因の組み合わせが考えられる。1)についてはカルシウム電流の発達に伴う変化を測定することで検証する。2)、3)の検証に関しては、シナプス前終末にケイジド Ca^{2+} 試薬を導入し、紫外光のフラッシュを与えて細胞内の Ca^{2+} 濃度を瞬間的に均一に上昇させることによって検証する。2)が主要因であれば開口放出を誘発することができるはずであり、3)が主要因であれば開口放出は生じないことが予想された。

4. 研究成果

発達に伴って失われていくシナプス前終末においては、生き残るシナプスで見られるカルシウムチャネルの発達に伴う発現増加がみられなかった。また、チャネルロドプシンの変種である ChETA を光刺激することによって生じるシナプス後電流を計測することを試みたが、シナプス後細胞からの興奮性シナプス後電流が計測できることは極めてまれであり、将来失われていくシナプス前終末の神経回路内での機能が非常に限定的であることが示唆された。

研究期間内に申請者自身の異動があった関係で、当初予定していたケイジド Ca^{2+} 試薬を用いた実験を遂行することはできなかったが、カルシウムチャネルと開口放出されるシナプス小胞との距離については超解像蛍光イメージングによって取得した画像解析によって検討しており、将来失われるシナプス前終末においては、生き残るシナプス前終末で発達に伴って獲得される整然とした配列が成立しない予備結果が得られており、さらなる解析を進めている段階である。

また、当初の計画にはなかった軸索自体の投射パターンについての形態解析も進めた結果、こちらも将来失われる軸索の発達に伴う投射パターンの変化は生き残る軸索の発達依存的な形態変化とは大きく異なることを示唆する予備的なデータを得ている。

これらの研究成果を統合し、神経回路の発達過程で失われるシナプスおよびそれを含む配線の変化について論文として成果を発表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mitsuharu Midorikawa	4. 巻 181
2. 論文標題 Pathway-specific maturation of presynaptic functions of the somatosensory thalamus.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2022.04.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuharu Midorikawa	4. 巻 eCollection 2022.
2. 論文標題 Developmental and activity-dependent modulation of coupling distance between release site and Ca ²⁺ channel.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2022.1037721.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Walter A, Uesaka N, Midorikawa M.	4. 巻 eCollection 2023.
2. 論文標題 Editorial: Functional and molecular insights of neural circuit adaptation, refinement, and remodeling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2023.1213640.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mitsuharu Midorikawa and Mariko Miyata
2. 発表標題 Functional and morphological changes of the presynapse at the developing somatosensory thalamus.
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mitsuharu Midorikawa, Hirokazu Sakamoto and Mariko Miyata
2. 発表標題 Super-resolution imaging of the presynaptic active zone at the developing somatosensory thalamus.
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mitsuharu Midorikawa
2. 発表標題 Morphological and functional developments of neural circuits at the somatosensory thalamus
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松田憲之、南本敬史、難波隆志 他	4. 発行年 2024年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 216
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2024	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮田 麻理子 (Miyata Mariko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	FMP im ChariteCrossOver			