

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430016

研究課題名(和文)抑制性神経伝達物質のシナプス小胞充填機構

研究課題名(英文)Kinetics of synaptic vesicle filling with neurotransmitter GABA

研究代表者

堀 哲也 (Hori, Tetsuya)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：70396703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物小脳の籠細胞(Basket cell)はブルキンエ細胞に巨大GABA作動性シナプスを投射するが、このシナプス前終末は巨大なので、ホールセル直接記録下で前末端内の抑制性神経伝達物質GABAの濃度を操作することが可能である。本研究では、このシナプス前末端に、光分解性GABAを適用して急速に濃度を変えることで、中枢神経における抑制性神経伝達の回復時間を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：After releasing neurotransmitter, synaptic vesicles are retrieved by endocytosis and recycled via fast and slow pathways to be reused for synaptic transmission. To maintain the synaptic efficacy, vesicles must be refilled with neurotransmitter during recycling. We examined the vesicle refilling rate directly at central GABAergic synapses, using caged GABA photolysis. The refilling of vesicles with GABA was about 1 min.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス小胞 前シナプス GABA 抑制性シナプス 小脳 マウス

1. 研究開始当初の背景

GABA は軸索末端内に数 mM、シナプス小胞内には、約 10 倍の数(10 mM-100 mM)の高濃度で充填されている。開口放出によって空になったシナプス小胞はエンドサイトーシスで末端内に回収された後、vacuolar ATPase を使って小胞内の pH を下げ、GABA の取り込みを準備する。小胞へのグルタミン酸取り込みは VGAT を介して行われ、前末端細胞内から小胞内に約 10 倍の濃縮を行う。神経終末でこの過程を直接観察記録することは従来困難であったため、生化学的な方法で脳ホモジェネートからシナプス小胞分画を単離し、放射ラベルした GABA の取り込みが測定されており (例、Kish, Fischer-Bovenkerk, and Ueda, 1989)、充填時間は数分ないし 10 分と推定されている。一方、興奮性シナプスにおいて、申請者の研究報告により、シナプス前終末中でのケイジドグルタミン酸光分解による遊離グルタミン酸の小胞取り込み時定数は 15 - 20 秒であることが確認されている (Hori, Takahashi Neuron, 2012, in Press)。また、シナプス小胞分画を用いた研究では GABA の取り込みが Cl⁻濃度依存的に行われ、小胞外 Cl⁻濃度は 5-10 mM の時に最大の取り込みが行われ、これ以上もしくは、これ以下では取り込みが減少することが良く知られている。

このように、これらの実験根拠はいずれも間接的であり、前末端において直接小胞充填時間を測定することが必要である。申請者は、げっ歯類脳幹部台形体内側核の聴覚中継シナプス calyx of Held において、前末端と後細胞から同時パッチクランプ記録を行い、前述のとおり、シナプス前終末でのケイジドグルタミン酸光分解を用いて前末端内グルタミン酸濃度を制御し、シナプス小胞への伝達物質充填速度の直接記録に成功した。本研究では、これらの方法に新たな測定方法を組み合わせ、抑制性シナプスにおいても、シナプス前末端内の GABA 濃度を操作し、それによって生じるシナプス小胞への充填時間と、充填修飾機構を明らかにすることをめざして研究計画を立案した。

2. 研究の目的

中枢神経系の抑制性シナプスにおいては、シナプス小胞は抑制性伝達物質 GABA を開口放出した後、エンドサイトーシスによって回収され、開口部位へとリサイクリングされるが、その過程で、シナプス末端内の GABA を取り込んで、新たな開口放出に備える。小胞充填に必要な時間は小胞の再利用に必要な時間を規定し、小胞充填機構の修飾は、シナプス伝達効率を変化させる。

本研究は、中枢神経系において主要な抑制性シナプス伝達を担う GABA のシナプス小胞への再充填時間の測定を第一の研究目的とし、充填修飾機構の解明を第二の研究目的

とする。以下に具体的な方法を述べる

(1) シナプス前終末内 GABA 濃度制御技術を確立する。籠細胞の前末端とプルキンエ細胞から同時ホールセル記録を行い、前末端内液を、GABA を含まないホールセルピペット内液で置換することによって小胞内の GABA を枯渇させる。次いで、前終末内 GABA 濃度を人工的に上昇させることによってシナプス小胞に GABA を再充填させる。充填の程度は後細胞から記録される IPSC 振幅によって測定する。UV 光パルスにより DPNI-Caged GABA (TOCRIS 社) から GABA を遊離させて前終末内 GABA 濃度を急激に上昇させる。また、ピペット灌流によって定濃度の GABA を前末端内に投与する。

申請者は、興奮性シナプスにおいて NMI-caged glutamate を細胞質中で光分解すると、シナプス小胞開口放出に著しい毒性を示すこと、およびこの毒性は細胞内液にグルタチオンを付加する事で回避できることを発見した。細胞質内 caged GABA 遊離も同様の困難が予想されるため、適切な酸化防止分子の選定が必須である。また、caged GABA 光分解は濃度上昇を瞬時に行える利点がある一方、放出された GABA 濃度を知ることが難しい。一方、ピペット灌流法は、GABA 濃度の上昇に時間がかかる (1-2 分) 欠点があるものの、最終的に前末端内 GABA を定濃度にすることができる事、また、細胞毒性の心配が無い、という利点がある。両者の実験方法を併用して、定量的かつ正確な経時変化の情報を得る。

(2) GABA の小胞内から前末端細胞質への定量的リークの有無を明らかにする。

(3) 伝達物質の充填速度は、生理的温度では室温よりも速いことが予測されるため、室温での実験に加えて 36 °C で実験を行って Q10 を求める。

(4) 生後発達に伴って VGAT の発現が増加することが予測され、充填時間が加速される可能性がある。生後発達の各時期の脳スライス標本作製して実験を行い、この点について明らかにする。

(5) パッチ電極内紫外線照射による、定量的 GABA アンケーシング技術の開発を試みる。申請者は興奮性シナプスにおけるグルタミン酸アンケーシングにおいて、ホールセル記録下で蛍光源から顕微鏡光路を介したアンケーシングを行うと、遊離したグルタミン酸がパッチ電極へと拡散し、細胞質濃度が急速に減少する問題に直面した。この問題は、アンケーシング直前のパッチ電極引き上げで回避できるが、前終末からの電気記録と、パッチ内液による人工的なイオン環境の維持が中断される、という欠点を持つ。この問

題を解決するため、パッチ電極内に光ファイバーを装填し、細胞質および全パッチ内液の同時アンケーシング技術の開発を試みる。申請者は、パッチ電極内に微小ガラス管を導入したピペット灌流技術を開発した経緯を持つ(最新パッチクランプ実験技術法(吉岡書店)第8章4.シナプス前末端灌流)。この技術を応用し、ピペット灌流装置の微小ガラス管を光ファイバーに置換し、光ファイバー断端に紫外線照射することで実現可能であると想定される。

(6) 小胞内 GABA 取り込みの Cl⁻濃度依存性について、様々な Cl⁻濃度のピペット内液を用いて前末端からホールセル記録を行い、GABA 濃度上昇による IPSC 振幅の増加率が Cl⁻濃度に依存するか否かを判定する。

3. 研究の方法

生後 7-21 日のマウスから麻酔下に小脳を摘出後、スライサー(教室備品)を用いて、厚さ 150-200 μm の横断スライスを作成する。スライス表面のプルキンエ(シナプス後)細胞と籠細胞(シナプス前)を正立微分干涉顕微鏡水浸対物レンズ(X63, 教室備品)によって直視下同定する。シナプス後細胞と前末端、あるいは籠細胞細胞体からパッチクランプ増幅器による(教室備品)同時ホールセル記録を行う。前末端パッチ電極内には、予め細胞内灌流用のガラス細管を装填して(Hori et al. 1999)、注入用の溶液で充填しておく。前末端に活動電位を誘発し、後細胞から抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録する。記録電極内ガラス細管にパルス加圧し、シナプス前末端細胞内に新たな内液を注入する。

4. 研究成果

中枢神経系の抑制性シナプスに置いては、シナプス小胞は抑制性伝達物質 GABA を開口放出した後、エンドサイトーシスによって回収され、開口部位へとリサイクリングされるが、その過程で、シナプス末端内の GABA を取り込んで、新たな開口放出に備える。小胞充填に必要な時間は小胞の再利用に必要な時間を規定し、小胞充填機構の修飾は、シナプス伝達効率を変化させる。本研究は、中枢神経系において主要な抑制性シナプス伝達を担う GABA のシナプス小胞への再充填時間の測定を第一の研究目的とし、充填修飾機構の解明を第二の研究目的とした。

(1) 平成 25 年度は、シナプス前終末内 GABA 濃度制御技術の確立を実施した。具体的には、げっ歯類(マウス)小脳籠細胞の細胞体と、プルキンエ細胞から同時ホールセル記録を行うことで、前末端内液を GABA を含まないホールセルピペット内液で置換することにより小胞内の GABA を枯渇させ、次いで、前終末内 GABA 濃度を人工的に上昇させることによってシナプス小胞に GABA を再充填させることに成功した。

次に、籠細胞細胞体に光分解 GABA である DPNI-Caged GABA(TOCRIS 社)を導入し、抑制性シナプスにおけるシナプス小胞への GABA 充填速度の測定を実施した。具体的には、DPNI-GABA を細胞質中にて光分解し、GABA を遊離させて前終末内 GABA 濃度を急激に上昇させた後の抑制性シナプス応答の回復時定数を測定した。げっ歯類小脳シナプスにおける小胞 GABA 充填時定数は約 90 秒であった。興奮性シナプスにおける小胞へのグルタミン酸充填(約 15 秒)と比較し、遅いことが明らかとなった。

(2) 平成 26 年度は、抑制性シナプス伝達におけるシナプス前終末細胞質 GABA 濃度依存性の測定を行った。具体的には、平成 25 年度に確立したシナプス前終末内 GABA 濃度制御技術を適用し、細胞内灌流技術を用いて小脳籠細胞 プルキンエ細胞間 GABA 性シナプス伝達強度の細胞質 GABA 濃度依存性を計測した。

次に、光分解 GABA である DPNI-GABA を籠細胞に導入し、抑制性シナプスにおけるシナプス小胞への GABA 充填速度の細胞質 GABA 濃度依存性を測定した。具体的には、DPNI-GABA 光分解に伴う抑制性シナプス応答の回復量から細胞内 GABA 濃度を推定し、シナプス小胞への GABA 充填における細胞質 GABA 濃度依存性を観測した。興奮性神経伝達物質グルタミン酸における報告(Hori et al. 2012)と異なり、細胞質 GABA 濃度を増減しても小胞 GABA 充填速度は変化せず、小胞 GABA 充填速度は細胞質濃度依存性が弱いことがあきらかとなった。

(3) 平成 27 年度においては、抑制性シナプスにおける GABA 充填速度がシナプス伝達に及ぼす影響について研究を行った。具体的には、平成 25 年度、および平成 26 年度に確立したシナプス前終末 GABA 濃度操作技術を適用し、小脳籠細胞 プルキンエ細胞間シナプス伝達における高頻度活動時のシナプス伝達に対する GABA 充填速度の影響を、高頻度発火中のシナプス応答の減衰、および高頻度発火後の回復過程の時定数を計測した。興奮性神経伝達物質グルタミン酸における報告と異なり、小胞への GABA 充填速度は遅いが、籠細胞 プルキンエ細胞間シナプスの低い放出確率とシナプス小胞プールからの十分なシナプス小胞の補充により、GABA 充填はシナプス伝達の律速過程とはならないことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

{学会発表}(計1件)

山下愛美 堀哲也 高橋智幸、抑制性神経伝達物質補充速度の測定、92回日本

生理学会大会、2015年3月21日
神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 哲也 (Hori Tetsuya)

同志社大学・生命医科学部・准教授

研究者番号：70396703