

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06722

研究課題名(和文) 神経軸索における動的情報処理

研究課題名(英文) Dynamic information processing in neuronal axons

研究代表者

川口 真也 (Kawaguchi, Shin-ya)

京都大学・産官学連携本部・特定准教授

研究者番号：00378530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の神経細胞の軸索およびその終末は、サイズが小さいために直接的な機能解析が難しく、不明な点が多く残されている。本研究では、微小な軸索終末からの直接パッチクランプ記録技術と、神経伝達物質の局所光活性化技術を組み合わせることで、軸索や軸索終末で情報伝達がいかに動的に調節されるかを明らかにした。特に、運動の調節をになう小脳のプルキンエ細胞や顆粒細胞の軸索終末からの伝達物質放出の動的制御メカニズムを同定した。

研究成果の概要(英文)：Physiology of an axon and its terminals in the central nervous system remains elusive because of the difficulty to analyze the small size of structures. In this project, we clarified the dynamic regulation mechanism of information processing in the axon and terminals by using the direct patch-clamp recording technique together with local activation of transmitter by a spot laser illumination method. Specifically, we analyzed dynamic regulation mechanisms to control transmitter release from terminals of Purkinje cells and granule cells which mediate fine motor control.

研究分野：神経性物

キーワード：軸索終末 放出 シナプス パッチクランプ 小脳 Ca緩衝 GABA-A受容体 短期シナプス可塑性 伝達物質

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は樹状突起・細胞体で他の細胞からシナプス入力を受けて統合し、その結果を活動電位に変換して軸索を介して終末まで伝播させ、そこで別の神経細胞へシナプス出力する。この神経細胞における情報伝達様式のうち、情報を受容する細胞体・樹状突起での入力統合メカニズムについては近年かなり研究が進み、その非線形的な情報処理メカニズムと機能的意義が明らかにされてきた。一方、軸索はその起始部で発生した活動電位を忠実かつ高速に伝達する単純な導線であると一般に考えられているが、実際には技術的限界によりその正誤は定かではない。それは、軸索・終末が、通常1マイクロメートル程度の大きさで、1ミリ秒以下で活動電位を発生・伝播する高速機能・微細構造部位であることに起因する。

軸索終末部は一般に小さいためパッチクランプ法適用は困難だが、例外的に比較的大きなげっ歯類聴覚系のカリックス型シナプス前部や海馬の苔状線維の末端などを用いて、興奮性ニューロンの軸索終末の電気的な興奮性やシナプス小胞放出の制御メカニズムなどが明らかにされてきた。一方、抑制性ニューロンの軸索終末に関しては、直接パッチクランプを適用できる系が無かったため、その性質はほとんど分かっていなかった。そこで、私たちは初代分散培養した小脳プルキンエ細胞の軸索およびその終末から、直接パッチクランプ記録することに挑戦し、そこでの伝達物質放出の制御メカニズムを解析することに成功した (Kawaguchi and Sakaba, 2015)。プルキンエ細胞は小脳皮質における情報処理を集約して小脳核などへ出力する唯一の細胞であり、そのGABAによる抑制性出力は動物の運動を精妙に調節する重要な役割を担う (Ito, 2006)。その終末からの直接記録により、軸索終末部位では電気的興奮性が低いことに起因して、軸索を忠実に伝播する活動電位が終末付近で活動頻度依存的に減弱することが分かった。その結果、軸索終末からの伝達物質放出が弱まり、それが短期シナプス抑圧を引き起こすと考えられる。したがって、軸索から終末へ至る経路は単なる忠実な電気信号の導線ではなく、状況に応じて動的に情報を処理しながら伝達する素子であることが分かりつつある。一本の軸索が複雑に分岐して多数のニューロンへシナプス出力することと考え合わせると、神経回路は従来考えられていたより遥かに高い情報処理能力を有する可能性がある。実際、プル

キンエ細胞はシナプス出力する相手細胞に応じて短期シナプス可塑性が異なっており、それは軸索部位に応じた独自の情報処理に起因する可能性が考えられる。この軸索での情報処理を理解するためには、小ささ、高速、複雑な形態、という軸索・終末の3つの特徴に伴う困難を乗り越え、高い時空間解像度で軸索活動を記録する研究をすすめることが必要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまでの研究から示唆された軸索での動的情報処理の実体を明らかにし、神経回路の情報処理の柔軟性の基盤となる新たな仕組みを明示することを目指す。この目的を達成するには、微細構造である軸索・終末からの直接パッチクランプ記録が強力なツールとなる。また、複雑に分岐する軸索での情報伝達の変化を同時に多点で解析することが可能になれば、その理解は飛躍する。そこで、活動電位を検出する膜電位感受性蛍光タンパク質を開発し、軸索における活動電位の伝播を高い時空間解像度で計測できるようにすることも目指す。そして、軸索からの直接パッチクランプ記録と蛍光イメージングを組み合わせることにより、軸索における動的な情報処理機構を分子・細胞レベルで明らかにすることが最終的な目標である。

### 3. 研究の方法

軸索で活動電位がどのように調節されながら伝導し、その結果シナプス伝達がどのように影響されるかについて、高度な電気生理学的技術を駆使して明らかにする。具体的には、小脳プルキンエ細胞の軸索終末から直接パッチクランプ記録を行い、標的細胞の種類に応じて短期シナプス可塑性の方向性が変化するメカニズムを明らかにする。また、軸索に局在する伝達物質受容体が、軸索における情報伝達やシナプス出力にどのように影響するかについて、紫外光の局所照射により空間を限定して伝達物質を活性化する技術を用いて検討する。さらに、軸索部位からの直接パッチクランプ技術を他の神経細胞にも適用し、中枢神経の一般的な大きさのシナプス前部の機能解析を試みる。一方、神経細胞の膜電位変化の光計測技術の開発について、予備実験で有望な候補と示唆された膜電位感受性蛍光タンパク質をアミノ酸置換により改変することで、高機能化を図る。最終的には軸索での活動電位伝播を高い時空間解像度で可視化できるものを探索する。

#### 4. 研究成果

プルキンエ細胞が他のプルキンエ細胞に形成する抑制性シナプスで起こる短期シナプス促進のメカニズムを明らかにするため、初代分散培養下のプルキンエ細胞に EGFP 蛍光タンパク質を発現させ、軸索終末から直接パッチクランプ記録を行った。活動電位に伴う終末での Ca 電流が、連続刺激時に顕著に大きくなるのが分かり、その Ca 電流の増大と、シナプス伝達の短期促進がほぼ完全に相関することを見出した。そして、Ca 電流の増大を阻害した場合には、シナプス伝達の短期促進が起こらなくなることから、プルキンエ細胞間シナプスで見られる短期促進は、連続刺激による Ca 電流の一過的増大に起因すると結論した。一方、プルキンエ細胞が深部小脳核に形成するシナプスでは、連続刺激時にシナプス伝達が減弱する短期抑圧が起こる。ここでも、プルキンエ細胞同士で形成されるシナプスと同様、個々のシナプス前部で連続刺激により Ca 電流が短期的に増大するメカニズムがはたらく一方、興奮性が低い終末部が高密度に標的細胞を取り囲む形態をとるために、終末へ到達する活動電位自体が連続刺激時に減弱して、シナプス出力が短期抑圧を呈すると考えられた。一連の知見について、英国の *The Journal of Physiology* 誌に発表した (Diaz-Rojas et al., 2015)。

また、培養プルキンエ細胞の軸索終末からのパッチクランプ記録を、微小な紫外光スポット照射による局所的ケージド GABA 活性化と組み合わせることにより、軸索における GABA<sub>A</sub> 受容体の機能局在を培養およびスライス標本で明確に示した。さらに軸索終末で GABA<sub>A</sub> 受容体が膜電位を上昇させる興奮性作用を及ぼしてシナプス伝達および可塑性を調節するという機能的役割を明らかにした。こうした知見は本課題で狙った目標そのものであり、*The Journal of Physiology* 誌に発表した (Zorrilla de San Martin et al., 2017)。

さらに、一般的にみられる 1 ミクロン程の微小な中枢神経系シナプス前部の機能解析に挑戦し、小脳顆粒細胞の軸索終末からの直接パッチクランプ記録に取り組んだ。顆粒細胞軸索を EGFP 標識することにより、極小ではあるものの表面が露出したシナプス前部へ電極を狙い定めることが可能となり、シナプス前 Ca<sup>2+</sup>電流や細胞膜容量変化とシナプス後細胞の応答を同時測定することに成功した。こうした実験から、顆粒細胞軸索のシナプス前部には、Ca<sup>2+</sup>チャネルと緩く機能結合した約 20 個の即時放出可能なシナプス小胞があり、それらはエキソサイトシス後に高速補充されること、また細胞内 Ca<sup>2+</sup>緩衝により情報伝達強度やその可塑性が厳密に調節されることが分かった。こうした特性は、リソースが限られる微小シナプスの、高信頼性かつ柔軟な情報伝達を実現する洗練されたつくりを反映すると考えられる (図)。この

知見は、*Cell Reports* 誌に論文として公刊した (Kawaguchi and Sakaba, 2017)。

細胞膜電位イメージングの技術開発に関しては、当初構想通りに、膜電位蛍光プローブの時間分解能を向上させた改良変異分子を得ることに成功し、神経軸索での高頻度の活動電位発火を捉えることが出来るようになった。この新しい技術を用いて、軸索における動的な情報処理の時空間パターンを解析する研究を、今後展開することを構想している。

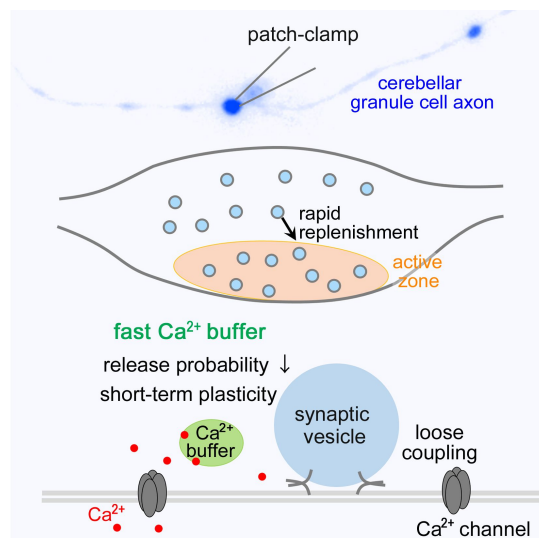


図 小脳顆粒細胞の軸索終末部からの直接記録により明らかになった機能設計

#### 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 4 件)

Yamashita M, Kawaguchi SY, Hori T, Takahashi T. Vesicular GABA Uptake Can Be Rate Limiting for Recovery of IPSCs from Synaptic Depression. *Cell Reports*, 22, 3134-3345, (2018). 査読有  
DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.080

Kawaguchi SY, Sakaba T. Fast Ca<sup>2+</sup> Buffer-Dependent Reliable but Plastic Transmission at Small CNS Synapses Revealed by Direct Bouton Recording. *Cell Reports*, 21, 3338-3345, (2017). 査読有  
DOI: 10.1016/j.celrep.2017.11.072

Zorrilla de San Martin J, Trigo FF, Kawaguchi SY. Axonal GABA<sub>A</sub> receptors depolarize presynaptic terminals and facilitate transmitter release in cerebellar Purkinje cells. *The*

Journal of Physiology, 595, 7477-7493,  
(2017). 査読有  
DOI: 10.1113/JP275369

Francois Diaz-Rojas, Takeshi Sakaba,  
Shin-ya Kawaguchi.  $Ca^{2+}$  current  
facilitation determines short-term  
facilitation at inhibitory synapses  
between cerebellar Purkinje cells.  
The Journal of Physiology, 593,  
4889-4904, (2015). 査読有  
DOI: 10.1113/JP270704

(DIAZ-ROJAS, Francois)  
同志社大学・脳科学研究科・大学院生

〔学会発表〕(計 5 件)

川口真也、Regulatory mechanism of  
transmitter release at a small  
presynaptic terminal. 日本神経科学大  
会 2017.7.21、幕張メッセ(千葉県)

川口真也、Experimental and model  
analysis of transmitter release  
mechanisms at small presynaptic  
terminals in the CNS. 日本生理学大会  
2017.3.30、アクトシティ浜松(静岡県)

Shin-ya Kawaguchi、Biophysics and  
short-term plasticity in cerebellar  
small presynaptic terminals. JSPS &  
OIST Joint Symposium 2016.9.26、OIST  
(沖縄県)

Francois Diaz-Rojas, Takeshi Sakaba,  
Shin-ya Kawaguchi, Short-term  
facilitation is predominantly mediated  
by presynaptic  $Ca^{2+}$  current  
facilitation at Purkinje cell -  
Purkinje cell synapses. 北米神経科学会  
大会 sfn2015 2015.10.17、シカゴ(米国)

川口真也、坂場武史 軸索終末での活動電  
位調節による短期シナプス可塑性, 日本  
神経科学大会、2015.7.29、神戸コンベン  
ションセンター(兵庫県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (3) 連携研究者

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

### (4) 研究協力者

ロハス・ディアス フランソワ・ズ