

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14321

研究課題名(和文)1シナプス小胞解析のための蛍光プローブの適用

研究課題名(英文)Application of fluorescent probes to single vesicle analysis

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類中枢シナプスでは、30から50 nm程度の大きさしかないシナプス小胞1個の動態、たとえば開口放出、エンドサイトーシスを実測した試みが少ない。このため、神経伝達物質放出メカニズムに関しては多くの謎が残されている。シナプス前終末を単離し、全反射蛍光顕微鏡を適用することで、シナプス小胞1個の動態を観察することを試みた。本研究課題期間中に、脳幹聴覚伝導路calyx of Heldシナプス、海馬苔状線維シナプスのシナプス前終末において、シナプス小胞動態を観察することに成功した。シナプス小胞は形質膜付近に係留されただけでは伝達物質放出可能になるのではなく、分子的な準備段階を経ることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In mammalian CNS synapses, transmitter is released by fusion of synaptic vesicles to the plasma membrane. Because diameter of synaptic vesicles is small, it is difficult to look at dynamics of single synaptic vesicles. In this program, we have applied total internal reflection fluorescent microscopy to acutely-dissociated presynaptic terminals. By sparsely staining synaptic vesicles with FM1-43, we could monitor dynamics of synaptic vesicles such as fusion and tethering to the release sites at the calyx of Held synapse in the auditory brainstem as well as hippocampal mossy fiber synapse. Moreover, we found that tethering of synaptic vesicles to the release sites was not sufficient for vesicle fusion. In addition to tethering, molecular priming of synaptic vesicles was required for fusion events.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 神経

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達においては、細胞体からシナプス前終末に活動電位が伝播すると、シナプス小胞が形質膜に融合し、小胞内の神経伝達物質が細胞外に放出される。伝達物質がシナプス後部の受容体に作用することで伝達がおこる。学習、記憶の分子細胞基盤であると想定されているシナプス伝達の可塑性は、シナプス後部のみならず、シナプス前終末でもおこると考えられており、伝達物質放出機構の解明は重要である。これまでの中枢シナプスの研究では、シナプス後部で測定できるシナプス応答から Katz らが考案した統計学的手法などを用いて伝達物質放出機構を間接的に推定してきた。対して、本研究課題では、当初、伝達物質放出のプロセスを直接測定するため、中枢シナプスにおいて、シナプス小胞の動態を単一レベルで信頼性高く観察するための方法の開発を提案した。

分泌細胞の分泌顆粒や、キンギョ網膜のリボンシナプスの神経終末の1シナプス小胞では、単一小胞レベルの解析が全反射蛍光顕微鏡を用いて行われていたが、哺乳類中枢シナプスではおこなわれてこなかった。いままですら生理学、生化学によって推定されてきた哺乳類中枢シナプスにおける伝達物質放出の素過程を直接見ることができるようになれば、可塑性、発達の際にシナプス小胞の動態がどのように変化するか、あるいは病態時にどのような障害をうけるかといった方向に将来的には研究を発展させることができる。

2. 研究の目的

哺乳類中枢シナプスでは、30 から 50 nm 程度の大きさしかないシナプス小胞1個の動態、開口放出、あるいはエンドサイトーシスを実測した試みが少ない。このため、神経伝達物質放出メカニズムに関しては多くの謎が残されている。脳幹聴覚伝導路のカリック型シナプス前終末を単離し、全反射蛍光顕微鏡を適用することで、シナプス小胞1個の動態を観察できるようになってきた。本申請課題では、シナプス小胞の動態を信頼性高く測定できるようにすることを目指す。これによって、神経伝達物質放出の過程を実測し、その基礎的な分子細胞メカニズムを明らかにすることを主要な目的とする。将来的には疾患に関連する分子や薬物の作用機序を調べること目標とする。

3. 研究の方法

P8-11 ラットから聴覚脳幹スライスを作製した。スライス標本を高濃度 K 溶液に FM1-43 を加えた溶液中で1分前後処理し、脱分極に伴う開口放出、エンドサイトーシスに伴って FM1-43 をシナプス小胞膜に取り込ませた。その後、システインを付加したパバイン溶液でスライスを10分-30分程度処理し、標本のガラスピペットへの出し入りによって、calyx of Held シナプス前終末を機械的に単

離した。

単離標本を concanavalin A をコートしたガラスディッシュの上にばらまき、ガラス面に張り付けた。倒立顕微鏡で可視化した中で、パッチクランプ法を適用し、シナプス前終末からのパッチクランプをおこなった。パッチクランプで膜電位固定を行い、Ca 流入を制御するとともに、膜容量測定法を適用することで、シナプス小胞の形質膜融合を測定した。また、電気生理学記録と平行して、全反射蛍光照明をおこなった。レーザー光をガラス面下部から全反射照明をおこない、形質膜近傍(100 nm 程度)にエバネッセント場を形成させ、膜直下の蛍光色素を励起させた。FM1-43 による小胞動態の測定をおこなうとともに、必要に応じて Ca 感受性色素をパッチ電極から導入し、終末内の Ca 濃度を測定した。

海馬苔状線維シナプス前終末は、calyx of Held シナプス前終末と同様の方法を用いて実験した。3 週齢程度のラットから海馬スライスを作製した。スライス標本を高濃度 K 溶液に FM1-43 を加えた溶液中で1分前後処理し、FM1-43 をシナプス小胞膜に取り込ませた。その後、システインを付加したパバイン溶液でスライスを10分-30分程度処理し、ガラスピペットへの出し入りによって、シナプス前終末を単離した。

4. 研究成果

(1) calyx of Held シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の可視化 (Midorikawa and Sakaba, 2015)

これまでの研究で、大型の分泌顆粒やキンギョ網膜リボン型シナプス前終末におけるシナプス小胞の可視化は Almers グループなどによって可能になっていたが (Zenisek et al., 2000 など) 哺乳類中枢シナプスにおいてはなされていなかった。そこで、10 ミクロン以上の大きさを持ち、実験的な操作が容易である、聴覚伝導路にある calyx of Held シナプスを急性単離し、シナプス小胞の可視化を試みた。

まず、単離細胞が機能的にスライス標本などと同じようなものであるかを確認した。パッチクランプ下で測定する Ca 電流、膜容量測定によって測定できる開口放出量はスライス標本下よりも若干少な目であったが、開口放出の時間経過は似たようなものであった。急性単離によって、一部の伝達物質放出部位が損なわれた可能性はあったが、大枠として、急性単離標本は機能的に問題ないと考えられた。また、落射蛍光下で終末を高 K で刺激すると、取り込まれた FM1-43 の蛍光強度が下がった。このことから、小胞の形質膜融合(開口放出)がおこったことが確認できた。

取り込ませる時間を調節して、全体の1%程度のシナプス小胞のみを染色した条件では、全反射蛍光照明下で個々のシナプス小胞を可視化できた。この時、刺激に伴って

おこる開口放出現象だけでなく、小胞の形質膜への動員（いわゆる tethering）も観察された。動員現象は刺激後に起こることから、伝達物質放出部位が小胞の開口放出後に空になった後に、新たな小胞が放出部位近傍に動員されてくる可能性があることが示唆された。

脱分極パルスを与えて、伝達物質放出可能な小胞を使い切った後、数秒以内に再度脱分極パルスを与えると、新たに動員された小胞は膜融合できなかつた。むしろすでに形質膜付近に係留されていて、1 発目に膜融合しなかつた小胞が膜融合した。よって、動員された小胞はすぐに膜融合可能にはならず、数秒程度の時定数で分子的に膜融合可能な状態になることが示唆された（Hallermann, 2015 参照）。キンギョ網膜神経細胞では新たに動員されたシナプス小胞が比較的短時間に膜融合可能になることが知られており、シナプスによって、分子的な準備に必要な時間が異なる可能性が示唆された。

膜融合、動員以外にも形質膜に接近した後に直ちに遠ざかる bounce と呼ばれる現象も観察された。この現象は伝達物質放出とは直接関係ないと考えられたことから、これ以上の解析はおこなわなかつた。

(2) 海馬苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の可視化 (Midorikawa and Sakaba, 2017)

Calyx of Held シナプス前終末と同様に、海馬苔状線維シナプス前終末を急性単離し、全反射蛍光顕微鏡を用いてシナプス小胞動態の可視化を試みた。技術的により困難であったものの、機能が維持された形で苔状線維シナプス前終末を単離できることが可能になった。

脱分極パルス (Ca 流入) に伴って観察される膜融合の累積時間経過は calyx of Held よりもかなり遅かつた。これは Ca 流入がおこる形質膜 Ca チャネルとシナプス小胞との距離が比較的長いことによるものではないかと考えられる。一方で、小胞の形質膜への動員の速度は calyx of Held と大差なかつたことから、シナプス小胞動員機構はほぼ同様のものであることが推定された。また、calyx of Held と同様に、動員された小胞はすぐに膜融合可能にはならず、数秒程度の時定数で分子的に膜融合可能な状態になることが示唆された。

長期シナプス増強に係する Protein kinase A の活性化によって、脱分極に対する平均膜融合速度が上昇したこと、また外来性 Ca バッファ (EGTA) に対する伝達物質放出の感受性の減少から、苔状線維シナプス前終末では Ca チャネルと小胞の距離を調節する形で、開口放出速度がセカンドメッセンジャーの標的となる可能性が示唆された。これが、実際の長期シナプス増強のメカニズムになっているかどうかは、今後のさらなる実験が

必要である。

(3) 今後の研究への展望、課題

以上のように、哺乳類中枢シナプスで、全反射蛍光顕微鏡を用いたシナプス小胞動態観察が可能になった。よって、本課題での当初目標は十分達成したものと結論できる。これによって、今後、伝達物質放出の分子細胞メカニズムの解明が可能になってくると思われる。このためには小胞可視化だけでなく、分子機構の可視化が重要である。

全反射蛍光顕微鏡は実時間イメージングが可能で z 軸の解像度に優れているが、x, Y 軸の解像度は通常の光学顕微鏡と変わらない。この点に関しては SIM, STORM など新たな技術を組み合わせることで、今後より解像度の高いイメージングが可能になってくると思われる。

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, Kaempf N, Sakaba T, Vollweiter 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