

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0082

研究課題名(和文) 学習する培養神経回路の構成とそのシステム解析

研究課題名(英文) Construction and system analysis of cultured neuronal circuit with learning ability

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) 9,900,000円

研究成果の概要(和文)：動物の学習や記憶を生み出す神経回路の柔軟性の実体を理解するには、同時に多数の神経細胞の活動やシナプスの機能変化を大規模に捉えることが重要である。本研究では、神経細胞活動を蛍光変化として検出するための膜電位イメージングプローブを開発することにより、神経回路の動態および可塑的機能変化の時空間パターンを観測できるようになった。

また、蛍光イメージングや細胞微小コンパートメントからの直接パッチクランプ記録により、小脳神経回路を構成する様々なシナプスでの可塑性メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶や学習がいかなる神経回路の情報処理変化によりもたらされるかを理解することは、認知症など高次脳機能障害の原因・対処法に繋がる基盤となる。本研究で得られた神経細胞の活動を大規模に観測することを可能にする革新的光技術と、神経回路の柔軟性を生み出す細胞・分子レベルでのメカニズムについての知見は、神経系の作動原理の理解を深化させ、さらに将来の発展につながる基礎となるものと言える。

研究成果の概要(英文)：To fully understand the plasticity of neuronal circuit underlying the learning and memory in animals, we need a technique that enables large scale recordings of multiple neuronal activity and/or functional changes of synapses at the same time. For this aim, here I have developed a fluorescent imaging probe for membrane potential that reports neuronal activities in real-time. Voltage imaging enabled to observe spatio-temporal pattern of neuronal circuit and its plastic changes.

In addition, combined application of fluorescent imaging technique and sub-cellular patch-clamp method have clarified mechanisms of plasticity at various synapses in the cerebellar circuit.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経細胞 シナプス イメージング 膜電位 可塑性 軸索 パッチクランプ 培養神経回路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物を生物たらしめる環境適応能は、外界からの入力と個体の行動出力を媒介する神経系の情報処理が柔軟に変化することで生まれると考えられるが、その実体は定かではない。神経細胞同士がシナプス形成して神経回路ができる過程は神経細胞の活動により調節されるため、神経回路は外界からの入力を反映したものになると想定される。また、神経回路の完成後も、シナプス伝達効率が活動履歴に依存して変化する可塑性が起こるため、経験に応じた回路の機能変化が絶えず起こり続けると考えられている。このように、外界からの入力に応じて神経ネットワークが自己組織的に形成され、また最適化されることにより、動物の環境適応能が実現すると推測される。しかし、多数の神経細胞が形成する複雑なネットワークで多要素の変化を捕捉して、その本質を理解することは極めて困難である。また、動物個体において環境からの入力とそれに応じた行動出力を定量的に評価すること自体も容易ではない。こうした要因により、動物個体の環境適応能を生み出す神経系のしくみについて、知見が増えてはいるものの、格段の深化に至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

膨大な数の神経細胞が複雑に神経回路を構成する中で実現される記憶・学習能力について、その最小単位を構成的研究アプローチによって十分条件として明らかにすることが、本研究の最終的な目標である。具体的には、動物における環境入力と行動出力に相当する経路を徹底的な制御下で実験的に置き換えることで明確化し、生きた神経細胞集団にネットワークを自己組織化させ、そこで適応的情報処理が創発する原理を明らかにする系を確立することを目指す。その実現のため、本研究では非侵襲的に神経細胞の活動を捕捉するため、細胞膜電位変化に応じて蛍光強度が変化する蛍光プローブを改良し、複数の神経細胞から同時に、長時間にわたり膜電位変化を記録できるようにする。また、神経回路のどの部分で可塑的な機能変化が起こっているかを、「見る」ことにより同定できるようにするため、シナプス可塑性の発現を高い時空間解像度で検出する蛍光プローブ分子も確立する。さらに、神経回路で柔軟な情報処理を生み出す基盤となるメカニズムについて、精緻な理解を積み上げる。これら革新技術の確立と神経回路を構成する素子の深い理解に基づいて、培養皿上に構築される神経回路の発揮する可塑性の性質と、その結果もたらされる情報処理の変化を大規模に解析できるようにする。最終的には、構成する神経回路の相同体をコンピューターにモデルとして構築し、システム解析することで生物の適応的情報処理の実体を培り出す方向へ研究を進展させる構想である。

3. 研究の方法

A. 神経回路の活動読み取り：膜電位変化の蛍光イメージングプローブ開発

神経細胞の活動電位やシナプス電位をイメージングにより様々な場所から非侵襲的に同時記録ができれば、神経ネットワークから簡便に出力を得ることができる。また、個々の神経細胞内で樹状突起から細胞体、軸索を経て終末に至るまでになされる、シナプス入力の集約・活動電位への変換・シナプス出力という一連の情報伝達過程も詳細に明らかにできる。そこで、細胞膜電位の蛍光イメージングプローブを確立する。具体的には、膜電位依存性脱リン酸化酵素の膜電位感受性部位と蛍光タンパク質を融合させたタンパク質(St-Pierre et al., Nat. Neurosci., 2014)を、独自に改良する。そのプローブ分子の細胞内局在の改善、膜電位変化の追従の時間正確性と大きさをさらに向上させることが出来れば、弱い励起光照射により長時間安定に神経細胞活動を捉えることも可能になる。特に本研究においては、複数の神経細胞から同時に細胞膜電位を経時的に記録し続けることが必須の技術レベルで、開口数の低い低倍対物レンズで蛍光変化を十分に捉えられるプローブのS/N比が求められる。その実現のため、さらなるアミノ酸置換などを探索的に行い、改変プローブをHEK細胞に発現させてパッチクランプ記録と蛍光イメージングを同時に行うことにより基礎データを取得し、定量的に解析する。

細胞膜電位に加え、シナプス可塑性のイメージングには、PKCを改変して開発した小脳プルキンエ細胞でおこる長期抑圧を検出するプローブを用いる。これは、MAPKやPKCが構成するシグナル経路の正のポジティブフィードバックの駆動に反応するように設計したもので、長期抑圧を起こす刺激を与えた樹状突起部位で選択的かつ持続的に細胞膜周辺へプローブ分子が集積する。これまでの予備実験により示唆されていた、膜近傍へのプローブ分子の集積が、真に長期抑圧の発現を反映するか否かについて、薬理的検討や電気生理学の実験により確かめることで、可塑性を真に検出できるプローブとして確証する。

B. 培養神経回路の動態解析

上述した蛍光イメージングプローブを培養神経回路に適用して、機能的なネットワークを構成させてその動態を非侵襲的に継続観察する。まずは、操作性の高い分散培養プルキンエ細胞に膜電位イメージングプローブを発現させ、多数のプルキンエ細胞の活動電位発火を記録する。アデノ随伴ウイルスを用いれば、膜電位感受性プローブを選択的にプルキンエ細胞に発現させることができる。この際、簡便なプラチナ電極を用いたフィールド刺激や、ケージ

ドグルタミン酸の任意の時空間パターンでの紫外光照射による活性化、チャンネルロドプシンの顆粒細胞への選択的発現に基づく光刺激などにより、必要に応じて神経細胞を刺激し、それに応じた活動変化およびシナプス可塑性の誘導・観察を行う。そのようにして、プルキンエ細胞でシナプス可塑性が発現することにより、細胞全体として活動の動態がどのように変化するかを解析する。そこでは、細胞膜電位変化の時空間パターンが得られることを活かし、シナプス可塑性が発現する樹状突起での空間パターンについても注目して解析する。また、可塑性誘導に伴い、樹状突起での情報処理変化が、どのような変化として細胞体・軸索・終末へ波及するかについても検討する。ここでは、高度な細胞内微小部位からのパッチクランプ記録を適宜利用して、蛍光イメージングによる膜電位変化計測の妥当性を担保する。

こうしたイメージングおよび電気生理学的な解析を小脳培養神経細胞に適用することにより、シナプス・細胞レベルでの可塑的变化について精緻な理解を確立し、またそうした可塑性が寄り集まることで細胞集団レベルでいかなる情報処理変化を生みだすことが出来るのかを考察する。

4. 研究成果

(1) 細胞膜電位イメージングの技術開発に関しては、当初のねらい通りに、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た(図1)。また、60アミノ酸からなるペプチド鎖を付加することにより、プローブ分子の細胞内局在が均一になり、樹状突起でのシナプス電位はもとより、微小な神経細胞の軸索終末からですら、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(図2)。この膜電位プローブを、高効率に多くのプルキンエ細胞へ選択的に導入させるアデノ随伴ウイルスを作成することにも成功した。これを用いる事により、図3に示すように、蛍光膜電位プローブを発現する複

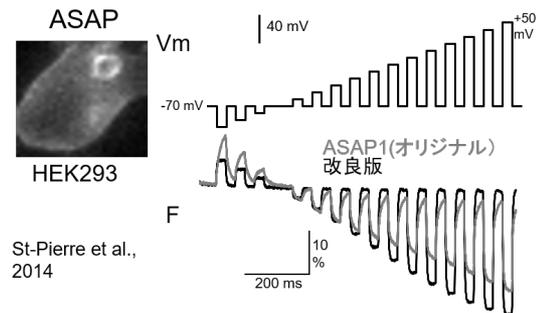


図1 HEK細胞に発現させた改良型膜電位感受性タンパク質
膜電位(Vm)変化に応じて蛍光(F)が変化する

数の培養プルキンエ細胞から、非侵襲的に活動電位発火を長時間にわたり安定に同時観測できるようになった。こうして確立した実験系に、光刺激などによりシナプス可塑性を誘導し、以下の研究進展が得られた。

まず第一に、細胞膜電位感受性蛍光タンパク質プローブとグルタミン酸の局所活性化を組み合わせることで、シナプス後部の局所的グルタミン酸応答を蛍光変化として検出することが可能となった。また、繰り返し光照射による強いグルタミン酸刺激を行うことで長期抑圧を誘導し、その結果起こるシナプス後部応答の減弱についても蛍光変化の低下として長時間にわたり記録することができた。したがって、シナプス応答の局所記録、可塑性の誘導およびその発現すべてを光技術で行える実験系を確立した。

第二に、小脳プルキンエ細胞における長期抑圧の発現部位に集積する蛍光タンパク質プローブを局所的なグルタミン酸光活性化と組み合わせることで適用し、樹状突起における長期抑圧発現の最小空間ユニットを調べた。その結果、プローブのシナプス後膜への集積は、グルタミン酸刺激された2ミクロン程の領域よりも広い領域に波及することが分かり、樹状突起の微小な一枝でまとまって長期抑圧が起こる傾向が認められた。これは、シナプス

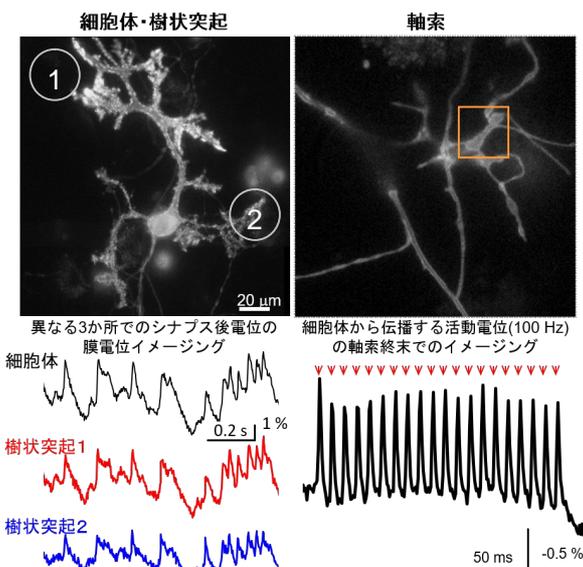


図2 改良型膜電位蛍光プローブによるシナプス電位・活動電位の検出

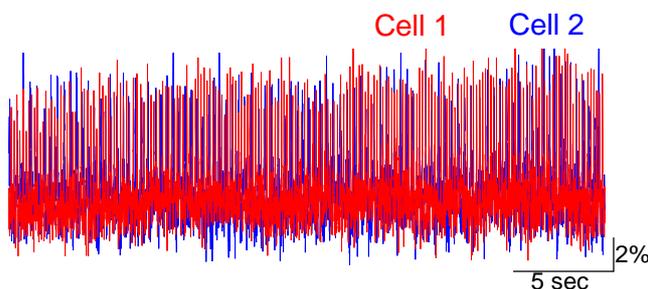


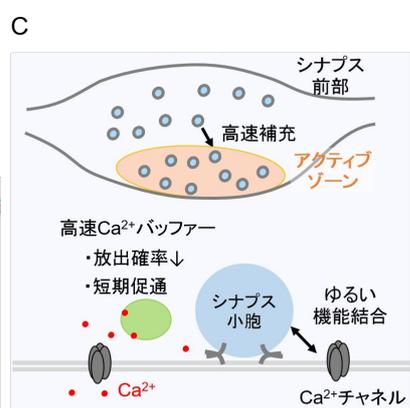
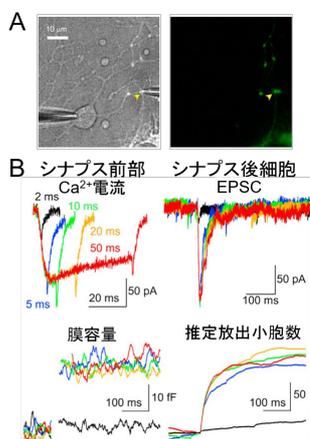
図3 複数プルキンエ細胞の活動電位発火の長時間にわたる安定な蛍光イメージング

可塑性発現におけるシナプス特異性についての従来の考えとは異なり、可塑性発現が数十個のシナプスでまとまって起こる可能性を示唆するユニークな結果である。プルキンエ細胞における可塑性発現の最小空間ユニットが、海馬や大脳皮質の錐体細胞などで見られる単一シナプスでの特異的な可塑性発現と異なるメカニズムは不明であるが、その可塑性が主に膜電位依存性Ca²⁺チャネルにより惹起されるか、NMDA型グルタミン酸受容体により引き起こされるか、の違いに依拠する可能性があるかと推測している。

第三に、可塑性がプルキンエ細胞の樹状突起で起こった後、どのような影響が軸索終末部に生じるかを解析した。具体的には、グルタミン酸を含む高濃度K⁺溶液でプルキンエ細胞を処理して長期抑圧を誘導し、その後、軸索終末の膜興奮性、局所的な伝達物質受容体の変化などが起こるか否かを、細胞膜電位イメージングと局所的パッチクランプ法を融合適用して検討した。その結果、長期抑圧の誘導後48時間以上にわたり、軸索終末部位の電気的な活動が亢進し、興奮性シナプス後電位様の脱分極が頻発するようになった。これは、軸索終末部位に局在するGABA_A受容体の活動が亢進するためであると考えられた。また、薬理的検討から、軸索終末部位の興奮性活動長期亢進は、樹状突起での長期抑圧に関わるシグナル経路や新規mRNA合成に依存して起こることも分かった。さらに、膜電位イメージングによる空間的活動解析から、長期抑圧の誘導後には、軸索終末ごとに部位選択的な発火が起こるようになることも示唆された。これらの結果から、運動学習を実現するシナプス可塑性がプルキンエ細胞の樹状突起部位で起こると、軸索終末部位にまで波及して長時間の機能変化が起こり、局所的GABA放出状況に応じて独自出力を作り出すようになる可能性が示唆された。本研究結果について、現在論文公刊へ向けてデータを取りまとめている。

(2) 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)。

(3) 中枢神経系シナプスの多くは、1ミクロン程の微小構造で高速情報伝達を行うため、直接機能解析することが難しく、不明な点が多く残っている。特に小脳の平行線維シナプスは、長期抑圧などシナプス前部・後部それぞれで様々な可塑性が起こり、それが運動学習の基礎となる。そこで、平行線維シナプスの基本的な機能設計と、その可塑的変化の基盤となるメカニズムを明らかにするため、分散培養した小脳顆粒細胞軸索のシナプス前部から直接パッチクランプ記録することに挑戦した。顆粒細胞軸索をEGFP標識することにより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Ca²⁺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、Ca²⁺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Ca²⁺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(図4)。こうした特性は、リソースに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。この研究成果については、Cell Reports誌(Kawaguchi and Sakaba, 2017)に発表した。

図4 顆粒細胞シナプスの直接パッチクランプ記録による解析

A, 培養顆粒細胞軸索のシナプス前部(黄矢頭、EGFP標識)とシナプス後細胞からの同時記録。B, シナプス前Ca²⁺電流と細胞膜容量増加、およびシナプス後電流と算出した膜融合した小胞数の時間経過。C, 顆粒細胞シナプス前部の機能設計の概要。

- (4) プルキンエ細胞の軸索・終末は、小脳皮質から小脳核への長距離情報伝達を担っており、それは小脳皮質で生成された運動記憶を小脳核に伝える場といえる。そこで、このプルキンエ細胞の軸索終末部が、伝達してきた情報をもとにシナプス出力するのみの単純な機能構造か、あるいは周囲の状況に応じて機能修飾されるかを直接パッチクランプ記録と局所的紫外光スポット照射による伝達物質活性化を駆使して解析した。その結果、プルキンエ細胞の軸索終末には、GABA_A 受容体が局在しており、局所的な細胞内 Cl⁻濃度が高いため、膜電位を上昇させる興奮性作用を及ぼすことが分かった。そして、終末部での GABA_A 受容体による膜電位上昇は、活動電位時の電位依存性 Ca²⁺チャンネルの活性化を促進して、より多くの伝達物質放出を引き起こすことで、シナプス出力を強めることが明らかとなった。したがって、小脳皮質の情報を小脳核に伝えるプルキンエ細胞の軸索終末には、小脳核の局所状況に応じて、皮質からの情報の伝わり方を調節する仕組みが備わっていることが示唆された。本研究成果については、The Journal of Physiology 誌に発表した(Zollila San Martin et al., 2017)。
- (5) 中枢神経系の抑制性情報伝達を主に担う GABA 性シナプスにおいて、高頻度活動時に軸索終末部のシナプス小胞がどれだけ早く生産できるか、という点は脳の抑制レベルを保つために重要な要素となる。そこで小脳抑制性介在ニューロンシナプスで、エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた後のシナプス小胞への GABA 充填速度を計測する OIST 高橋智幸教授らによる共同研究に参画した。この研究から、GABA は約 40 秒の時定数でシナプス小胞に取り込まれることが分かった。さらに、高頻度刺激時にみられるシナプス小胞枯渇を原因とするシナプス伝達の短期抑圧からの回復は、遅い GABA 充填速度により規定されることが示唆され、抑制性シナプス伝達の可塑性の基盤となる新しい分子メカニズムが示された。この共同研究結果は、Cell Reports 誌(Yamashita et al., 2018)に論文公開された。
- (6) 記憶・学習の基盤となる神経細胞の長期安定な可塑的变化は、神経活動による新規遺伝子発現に依存する。その発現の一部は、樹状突起などシナプス部で局所的に mRNA からタンパク質翻訳が起こることで実現する。そうしたシナプス部での局所的な遺伝子発現調節に、mRNA のメチル化などエピジェネティックな分子修飾がどのような役割を担うかに関して、京都大学の玉丹准教授らによる共同研究に参画した。そして、シナプスに局在化する mRNA のうち約 3000 個が N⁶-メチルアデノシン化されていること、その修飾阻害によりシナプス後部の AMPA 型グルタミン酸受容体が減少して興奮性シナプス伝達が減弱することが分かった。したがって、シナプス部での局所的な遺伝子発現制御に mRNA 分子のメチル化修飾が重要な役割を果たすことが明らかになった。この共同研究の結果は、Nature Neuroscience 誌(Meukurjev et al., 2018)に論文公開された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Kawaguchi SY. Dynamic Factors for Transmitter Release at Small Presynaptic Boutons Revealed by Direct Patch-Clamp Recordings. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, in press. 査読有

Merkurjev D, Hong WT, Iida K, Oomoto I, Goldie BJ, Yamaguti H, Ohara T, Kawaguchi SY, Hirano T, Martin KC, Pellegrini M, Wang DO. Synaptic N⁶-methyladenosine (m⁶A) epitranscriptome reveals functional partitioning of localized transcripts. *Nat Neurosci*. 21, 1004-1014, (2018). 査読有
DOI: 10.1038/s41593-018-0173-6.

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 Ca²⁺ 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_A 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

Diaz-Rojas F, Sakaba T, Kawaguchi SY. Ca²⁺ 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

[学会発表](計8件)

Shin-ya Kawaguchi, Control of synaptic outputs by dynamic axonal excitability. 9th FAOPS Congress 2019. 3. 30、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

川口真也, Dynamic information processing in an axon and presynaptic boutons in the cerebellar circuit. 日本神経科学大会 2018. 7. 26、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

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)

川口真也, 坂場武史 小脳平行線維シナプス前部の直接記録による機能解析 日本神経科学大会、2016.7.21、パシフィコ横浜(神奈川県)

Francois Diaz-Rojas, Takeshi Sakaba, Shin-ya Kawaguchi, Short-term facilitation is predominantly mediated by presynaptic Ca²⁺ current facilitation at Purkinje cell - Purkinje cell synapses. 北米神経科学学会大会 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)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：坂場 武史

ローマ字氏名：SAKABA, Takeshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。