

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K18374

研究課題名(和文) 感覚系リボンシナプスにおける興奮性神経伝達物質放出の可視化

研究課題名(英文) Real-time visualization of excitatory neurotransmitter release at sensory ribbon-type synapses

研究代表者

大島 知子(Oshima-Takago, Tomoko)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任研究員

研究者番号：50731783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：蝸牛や網膜には、音や光という継続的な刺激に対し持続的に応答できるように周囲に多数のシナプス小胞を繫留したシナプスリボンという特徴的な構造物を有する細胞が存在する。本研究では、蝸牛有毛細胞および網膜双極細胞における神経伝達物質(グルタミン酸)の開口放出をグルタミン酸イメージングにより解析し、感覚情報処理機構の解明を目指した。その結果、金魚網膜双極細胞の軸索終末部において、シナプスリボン個々に存在するアクティブゾーン間で脱分極刺激に対して一過性に放出されるグルタミン酸の量にばらつきがあることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感覚器リボンシナプスの機能解析に、従来のパッチクランプ法やカルシウムイメージングに加えて新規のグルタミン酸イメージングを使用可能とし、リボンシナプスにおける神経伝達機構を多角的に評価するための基盤を提示した。これを用い、単一網膜双極細胞内に存在する複数のリボン型アクティブゾーンを比較した際に、神経伝達物質放出量ならびに開口放出動態に多様性を持つことが示唆された。現時点で金魚網膜双極細胞のみ適用可能だが、今後ゼブラフィッシュやマウスの網膜、内耳に適用範囲を広げ、感覚器リボンシナプスの神経伝達機構の新たな知見を得て、更に視覚・聴覚障害に対する創薬等のスクリーニングツールとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sensory cells in the cochlea and retina have a distinctive structure called synaptic ribbon, which tethers plenty of synaptic vesicles to continuously process sensory information. This research project aims to clarify underlying mechanisms of synaptic transmission by imaging the dynamics of the release of excitatory neurotransmitter glutamate from cochlear hair cells and retinal bipolar cells using the hybrid-type glutamate optical sensors (EOS/eEOS). Glutamate imaging showed that the fluorescent intensity changes of glutamate signals for fast component of release are varied in amplitude at individual ribbon-type active zones of the goldfish Mb1-type bipolar cell terminal. The novel imaging method using EOS/eEOS may enable to analyze the fast and slow components of glutamate release at multiple ribbon-type synapses in the retinal bipolar cell terminal.

研究分野：神経生理学

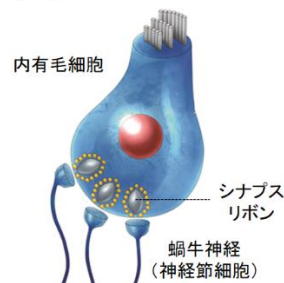
キーワード：網膜 蝸牛 感覚器 シナプス リボンシナプス シナプス伝達 開口放出 グルタミン酸イメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蝸牛や網膜といった感覚受容器は音や光という継続的な刺激に対し持続的に応答できるように特殊な神経伝達機構を発達させてきた。シナプス構造も脳神経系のそれとは異なり、有毛細胞や視細胞などの感覚受容器や網膜第2次ニューロンである双極細胞は、スパイクではなく緩電位応答によって情報を伝達し、それに可能とするシナプスリボンと呼ばれる特殊な構造を持つ。このシナプスリボンは数百ナノメートル長であり、その周囲に多数のシナプス小胞が繫留され迅速かつ持続的な応答が可能になっている(図1)。

A. 蝸牛



B. 網膜

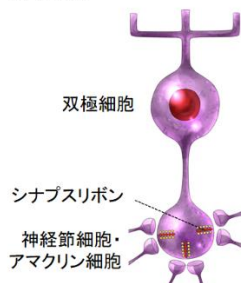


図1. 蝸牛・内有毛細胞 (A) と網膜・双極細胞 (B) のリボンシナプス構造

両者 (A.内有毛細胞、B.双極細胞) とともにシナプス前終末に多数のアクティブゾーンがあり、一つのアクティブゾーンから放出されたグルタミン酸をシナプス後プロセス (蝸牛神経: 1本、神経節細胞やアマクリン細胞: 2本) が受容する。この特徴的構造が応答の多様性に寄与すると考えられている。

シナプスリボンは、その特徴的な構造が故に常に感覚器研究者の関心を集めてきた。アクティブゾーンタンパク質の一つである Bassoon をノックアウトすると、蝸牛および網膜の求心性シナプスにおいてシナプスリボンがアクティブゾーンから消失ないし遊離した (蝸牛: Khimich et al., 2005; 網膜: Dick et al., 2003)。そして、Bassoon ノックアウトマウスの蝸牛・内有毛細胞を用いた研究によって、シナプスリボンがカルシウムチャンネルをアクティブゾーンに集積させてカルシウム流入量を増加させ、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の一過性 (速い) 放出および持続性 (遅い) 放出を制御することが明らかにされた (Frank et al., 2010)。また、キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞は直径 10 μm 程度の巨大な神経終末を有しているため、リボンシナプスの機能解明を目的とした研究の対象として長く用いられてきた。Mb1 型双極細胞では、シナプスリボンの存在するアクティブゾーンと存在しないアクティブゾーンが 1:1 で存在し、前者が速い放出、後者が遅い放出を主として担うことが示唆されている (Midorikawa et al., 2007)。

シナプス機能の解析には、単一の細胞から受容体やイオンチャンネル由来の電流や電圧を数十マイクロ秒単位の高時間分解能で測定するパッチクランプ法が強力な研究手法として活用されてきた。神経伝達物質が放出されるシナプス前終末は一般的にサイズが小さいが、蝸牛・内有毛細胞や網膜・双極細胞のリボン構造を持つシナプス前終末 (図1) は例外的に巨大であるためパッチクランプ法が適用可能であり、シナプス伝達に関する研究が進められた (内有毛細胞: Moser & Beutner, 2000 など; 網膜: Tachibana & Okada, 1991; Midorikawa et al., 2007 など)。パッチクランプ法は時間分解能に優れる利点がある。しかしこの手法では、内有毛細胞あたり 10-20 個あるリボンシナプスにおける応答の総和 (開口放出に伴う膜容量変化など) しか記録できず、各シナプスにおける応答の動態は解析できない。一方、後シナプスの蝸牛神経 1 本から単一シナプスレベルで応答を記録することは可能だが、複数のシナプスからの同時測定は極めて困難である。また、双極細胞の前シナプス終末にはシナプスリボンが 40-50 個程度あり、各シナプスにシナプス後細胞から複数のプロセスがあるため同様の問題が生じる。このため刺激入力に対し個々のシナプスがどう反応するか、単一シナプスレベルの空間分解能を有し且つ複数のシナプス部位から同時記録可能な新しい実験手法の開発が待ち望まれてきた。

2. 研究の目的

本研究では廣瀬らが開発したグルタミン酸イメー징ングを用いる (図2)。グルタミン酸イメー징ングとは、興奮性シナプスの神経伝達物質であるグルタミン酸に結合する蛍光プローブ (glutamate (E) optical sensor, EOS) を用いて、シナプス前終末から放出されるグルタミン酸を光学的に検出する手法である (Namiki et al., 2007; Okubo et al., 2010; Takikawa et al., 2014; Sakamoto et al., 2018)。本研究において、ハイブリッド型蛍光グルタミン酸イメー징ングである EOS とストレプトアビジンの複合体をビオチンを介して細胞膜と結合させるタイプと、より広いダイナミックレンジを持つ enhanced EOS (eEOS) とストレプトアビジンの複合体を C 型ボツリヌス毒素の重鎖 C 末端を介して細胞膜のガングリオシドと結合させるタイプを用いた。

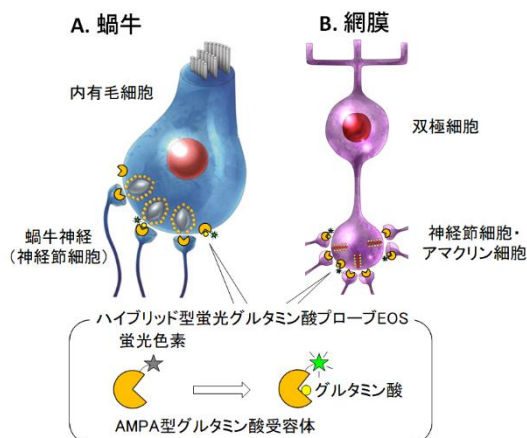


図2. グルタミン酸イメー징ング

興奮性シナプスの神経伝達物質であるグルタミン酸が蛍光プローブに結合すると、蛍光強度が増加する。

本研究ではマウス内耳急性標本、マウス網膜急性標本、キンギョ網膜急性標本に EOS もしくは eEOS を適用し、内有毛細胞リボンシナプスおよび双極細胞リボンシナプスにおけるグルタミン酸放出をグルタミン酸イメージングにより可視化し、個々のシナプスにおける神経伝達物質放出機構を評価および解析することを目指す。グルタミン酸イメージングはパッチクランプ法と違い、空間分解能に優れ、複数のシナプス部位でのグルタミン酸放出を同時に測定することができる。このグルタミン酸イメージングの利点を最大限に活かし、そして、蝸牛や網膜の神経節細胞の応答多様性（蝸牛：Lieberman, 1982; 網膜：Wässle, 2004; Werblin, 2011）という感覚生理学の長年の謎に挑み、シナプスリボンがどのように感覚器シナプスのグルタミン酸放出を制御し、感覚器神経細胞の応答多様性に寄与しているかを解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

マウス蝸牛急性標本、マウスもしくはキンギョ網膜急性標本を用いて、以下の方法により研究を進める。

- (1) マウス蝸牛・内有毛細胞からの神経伝達物質放出をグルタミン酸イメージングにより測定し、同一細胞内にある個々のシナプス間での神経伝達物質放出の多様性を解析する。
- (2) マウス/キンギョ網膜・双極細胞からの神経伝達物質放出をグルタミン酸イメージングにより測定し、同一細胞内にある個々のシナプス間での神経伝達物質放出の多様性を解析する。
- (3) シナプスリボンの近位に存在するアクティブゾーンと遠位に存在するアクティブゾーンで、神経伝達物質放出様式に違いがあるか検証する。
- (4) 以上の方法によりリボンシナプスの神経伝達機構を解明し、研究成果を専門誌に発表する。

4. 研究成果

(1) 蝸牛・内有毛細胞リボンシナプス

野生型マウス（C57BL/6, 生後 2 週齢前後）の蝸牛よりコルチ器スライス標本を摘出し、標本を浸した細胞外液（人工外リンパ液、塩化カリウム濃度：5 mM）に EOS を混合したところ、内有毛細胞、蝸牛神経などの細胞膜表面に結合し、それらの細胞が蛍光標識された（図 3）。

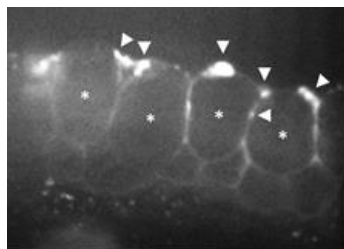


図 3. マウス蝸牛・コルチ器への
蛍光グルタミン酸プローブの適用
C57BL/6J マウスの内有毛細胞（*）と
蝸牛神経（矢頭）のシナプス部位に
蛍光シグナルを認めた。

この標本に対して高濃度（40 mM）の塩化カリウムを含む人工外リンパ液を灌流し、内有毛細胞を脱分極刺激したところ、内有毛細胞および蝸牛神経のグルタミン酸シグナルの蛍光強度が上昇した。この結果は、グルタミン酸イメージングにより内有毛細胞からのグルタミン酸放出を捉えることに成功したことを示唆する。しかしながら、蛍光シグナルの S/N 比が低いと秒単位での解析に留まり、聴覚の神経伝達の解析に必須となるミリ秒単位での解析を行い得なかった。

(2) 網膜・双極細胞リボンシナプス

野生型マウス（C57BL/6, 生後 2 週齢前後）の網膜から単離した双極細胞に eEOS を適用したところ、静止状態（脱分極刺激を行わない状態）で蛍光シグナルを認めた（図 4）。

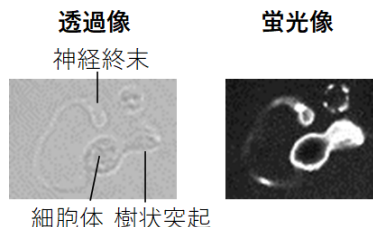


図 4. マウス網膜・双極細胞への
蛍光グルタミン酸プローブの適用
C57BL/6J マウス網膜から単離した双極細胞
に eEOS による蛍光シグナルを認めた。

しかしながら、高濃度塩化カリウムによる脱分極刺激に対してグルタミン酸シグナルの蛍光強度の上昇が明らかではなかった。このため、実験標本ならびに eEOS の細胞膜への結合方法などを見直すこととし、マウスと比較して巨大な神経終末を有するキンギョ網膜の Mb1 型双極細胞を用いて双極細胞膜表面に特異的に存在する糖タンパク質の発現を解析・決定した上で、その糖タンパク質に特異的に結合するよう eEOS を再設計した（bipolar cell-specific eEOS, BC-eEOS）。

BC-eEOS を細胞膜表面に結合させたキンギョ網膜の単離 Mb1 型双極細胞にパッチクランプ法を適用し、細胞内にガラス電極を介して蛍光色素 5-TMR1A を結合させた CtBP 結合ペプチドを導入して、数十個あるシナプスリボンを蛍光標識した。膜電位固定下で脱分極刺激を与えて L 型カルシウムチャネルを活性化しカルシウムイオンを細胞内に流入させると、放出されたグルタミン酸によって BC-eEOS の蛍光強度が変化した（フレームレート：50 Hz）。短時間（100 ミリ

秒)の脱分極刺激を与えると、グルタミン酸放出の速い成分のみが生じることが知られているが (Sakaba et al., 1998)、本研究では速い成分のグルタミン酸放出による個々のリボン型アクティブゾーンでの蛍光強度変化率には多様性があることが示され、これはリボンシナプス特有の性質であることが推測された (図5)。

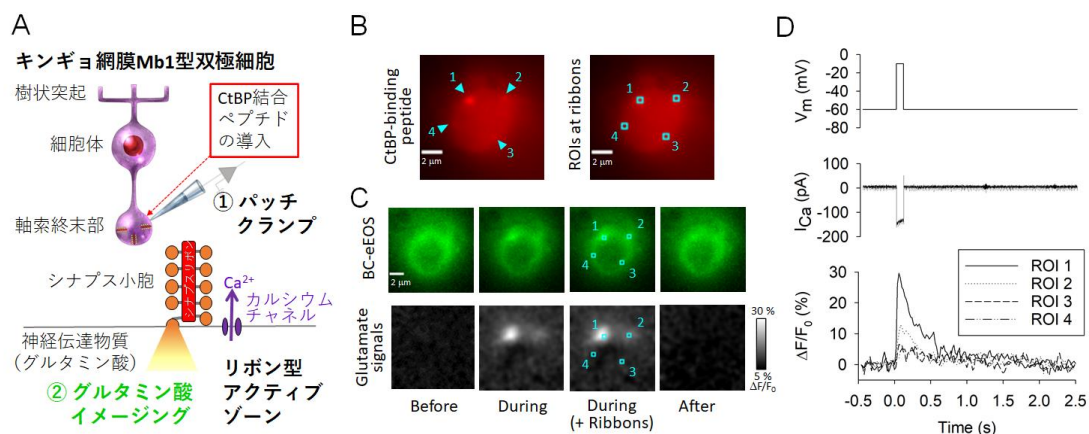


図5. キンギョ網膜 Mb1 型双極細胞におけるグルタミン酸放出の可視化

- (A) 実験のシェーマ。網膜 Mb1 型双極細胞 (パネル上部) とリボン型のアクティブゾーン (パネル下部) を示す。単離した双極細胞にパッチクランプ法 (①) を適用してホールセルモードで膜電位固定 (-60 mV) し、電極から CtBP 結合ペプチド (CtBP-binding peptide) を導入してシナプスリボン (synaptic ribbons) を蛍光標識する。また、細胞膜表面には BC-eEOS を結合させ、脱分極刺激により生じたカルシウム流入により引き起こされるシナプス小胞からのグルタミン酸放出を BC-eEOS の蛍光強度変化として検出する (②)。
- (B) 蛍光色素 5-TMR1A を結合させた CtBP 結合ペプチドを細胞内に導入し、シナプスリボン (水色の矢頭) を可視化した図。右図で ROI (水色の四角, 480 x 480 nm) を 4 か所示す。励起フィルター/吸収フィルター: 520-550/580IF nm
- (C) BC-eEOS を用いてのグルタミン酸イメージング。100 ミリ秒の脱分極刺激の前 (Before)、最中 (During)、後 (After) における蛍光画像 (BC-eEOS, 上段) と蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) で示したグルタミン酸シグナル (Glutamate signals, 下段)。フレームレート: 50 Hz、励起フィルター/吸収フィルター: 460-480/495-540 nm
- (D) 100 ミリ秒間の脱分極刺激時 (-60 mV \rightarrow -10 mV) の膜電位 (V_m)、カルシウム電流 (I_{Ca})、グルタミン酸シグナル ($\Delta F/F_0$) の経時変化。 $\Delta F/F_0$ 振幅に多様性があり、ROI 1 で最大、ROI 2 がこれに続き、ROI 3、ROI 4 ではほとんど変化していない。

また、細胞内液のカルシウムキレート剤 (EGTA) の濃度を 5 mM に設定して 1 秒間の脱分極刺激を行うと、先行研究 (Sakaba et al., 1998) と同様に、グルタミン酸シグナルは速い成分と遅い成分に分かれて観察された (図6)。

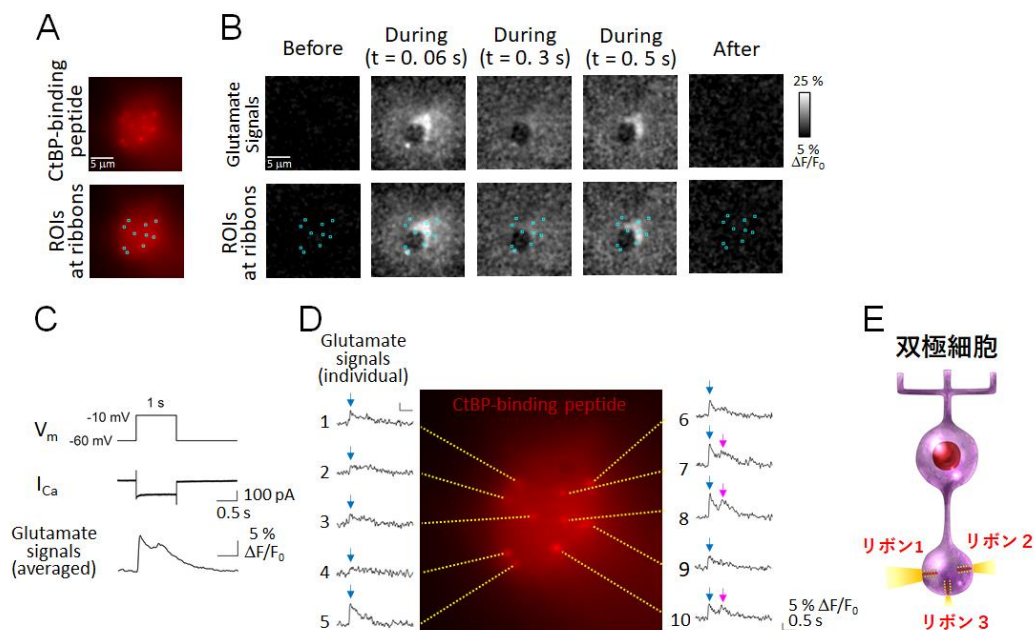


図6. 個々のリボン型アクティブゾーンにおけるグルタミン酸放出の多様性

- (A) CtBP 結合ペプチドにより標識されたシナプスリボンとリボンに設定した ROI (480 x 480 nm, 水色)。励起フィルター/吸収フィルター: 520-550/580IF nm
- (B) BC-eEOS を用いてのグルタミン酸イメージング。1 秒間の脱分極刺激の前 (Before)、最中 (During)、後 (After) におけるグルタミン酸シグナル ($\Delta F/F_0$)。脱分極刺激中に、まず速い成分が出現し (60 ミリ秒後)、消失 (300 ミリ秒後)、その後で遅い成分が出現している (500 ミリ秒後)。フレームレート: 50 Hz、励起フィルター/吸収フィルター: 460-480/495-540 nm
- (C) 1 秒間の脱分極刺激時 (-60 mV \rightarrow -10 mV) の膜電位 (V_m)、カルシウム電流 (I_{Ca})、グルタミン酸シグナル ($\Delta F/F_0$ 、10 箇所の ROI の平均値) の経時変化。
- (D) 個々のリボンにおけるグルタミン酸シグナル ($\Delta F/F_0$) の経時変化。脱分極刺激直後の速い成分 (青色) の振幅にばらつきを認める。また、いくつかのリボン (ROI 7、8、10) では遅い成分 (ピンク色) が認められる。
- (E) キンギョ網膜の Mb1 型双極細胞の軸索終末部からのグルタミン酸放出に多様性があることを示すシェーマ。

グルタミン酸の速い放出と遅い放出に関して、前者は主にシナプスリボンに近接するアクティブゾーンで生じ、後者はシナプスリボン近位に加え、シナプスリボンから遠位にあるアクティブゾーンでも生じている傾向が認められたが、現在さらなるデータの収集と詳細な解析を行っている。

本研究により、感覚器リボンシナプスの機能解析に、従来のパッチクランプ法やカルシウムイメージング法に加えて新規のグルタミン酸イメージングを使用可能とし、リボンシナプスにおける神経伝達機構を多角的に評価するための基盤を提示した。これを用い、単一網膜双極細胞の前シナプス終末内に存在する複数のリボン型アクティブゾーンを比較した際に、神経伝達物質グルタミン酸の放出量および開口放出動態に多様性を持つことが明らかになった。現時点ではグルタミン酸イメージングの適用可能な標本がキンギョ網膜の双極細胞のみであるが、今後、ゼブラフィッシュやマウスの網膜、マウスの内耳に適用範囲を広げることによって、感覚器リボンシナプスにおける神経伝達機構の新たな知見が得られ、更に視覚障害や聴覚障害に対する創薬スクリーニングに利用可能なツールになっていくことが期待される。

【参考文献】

1. Khimich D, Nouvian R, Pujol R, Tom Dieck S, Egner A, Gundelfinger ED, Moser T. (2005) *Nature*. 434:889-894.
2. Dick O, tom Dieck S, Altmann WD, Ammermüller J, Weiler R, Garner CC, Gundelfinger ED, Brandstätter JH. (2003) *Neuron*. 37:775-786.
3. Frank T, Khimich D, Neef A, Moser T. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:4483-4488.
4. Midorikawa M, Tsukamoto Y, Berglund K, Ishii M, Tachibana M. (2007) *Nat Neurosci*. 10:1268-1276.
5. Moser T, Beutner D. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:883-888.
6. Tachibana M, Okada T. (1991) *J Neurosci*. 11:2199-2208.
7. Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Iino M, Hirose K. (2007) *Eur J Neurosci*. 25:2249-2259.
8. Okubo Y, Sekiya H, Namiki S, Sakamoto H, Iinuma S, Yamasaki M, Watanabe M, Hirose K, Iino M. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:6526-6531.
9. Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Hirose K. (2014) *Angew Chem Int Ed Engl*. 53:13439-12343.
10. Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. (2018) *Nat Neurosci*. 21:41-49.
11. Liberman MC. (1982) *Science*. 216:1239-1241.
12. Wässle H. (2004) *Nat Rev Neurosci*. 5:747-757.
13. Werblin FS. (2011) *J Physiol*. 589:3691-3702.
14. Sakaba T, Tachibana M, Matsui K, Minami N. (1998) *Neurosci Res*. 27:357-370.

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 Hideki Takago, Tomoko Oshima-Takago, Tobias Moser	4. 巻 11
2. 論文標題 Disruption of otoferlin alters the mode of exocytosis at the mouse inner hair cell ribbon synapse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 492
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2018.00492	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

1. 著者名 Takago H, Oshima-Takago T.	4. 巻 362
2. 論文標題 Pre- and postsynaptic ionotropic glutamate receptors in the auditory system of mammals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hearing Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heares.2018.02.007	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 Oshima-Takago T, Takago H.	4. 巻 7
2. 論文標題 NMDA receptor-dependent presynaptic inhibition at the calyx of Held synapse of rat pups	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 170032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsob.170032	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 大島知子, 坂本寛和, 並木繁行, 廣瀬謙造, 立花政夫, 鷹合秀輝
2. 発表標題 網膜双極細胞リボンシナプスにおけるグルタミン酸放出の可視化
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oshima-Takago, T., Sakamoto, H., Namiki, S., Hirose, K., Tachibana, M., Takago, H.
2. 発表標題 Optical measurement of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cell
3. 学会等名 Understanding Synapses-From Molecules to Function (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshima-Takago, T., Sakamoto, H., Namiki, S., Hirose, K., Tachibana, M., Takago, H.
2. 発表標題 Optical measurement of glutamate release from multiple ribbon-type synapses at the terminal of goldfish retinal bipolar cell
3. 学会等名 Ribbon Synapses Symposium 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshima-Takago, T., Takago, H.
2. 発表標題 N-methyl-D-aspartate receptor inhibits Ca ²⁺ currents at a rat central glutamatergic synapse
3. 学会等名 6th Mediterranean Neuroscience Society Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鷹合秀輝, 大島知子
2. 発表標題 聴覚中枢におけるNMDA受容体によるシナプス前抑制
3. 学会等名 第62回日本聴覚医学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鷹合秀輝, 大島知子
2. 発表標題 中枢神経系のグルタミン酸作動性シナプスにおいてシナプス前NMDA受容体は電位依存性カルシウムチャンネルを抑制する
3. 学会等名 第90回日本薬理学会年会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大島知子, 鷹合秀輝
2. 発表標題 若齢ラットcalyx of HeldシナプスにおけるNMDA受容体依存性シナプス前抑制
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大島知子, 鷹合秀輝
2. 発表標題 幼若ラットcalyx of HeldシナプスにおけるNMDA受容体依存性シナプス前抑制
3. 学会等名 生理学研究所シナプス研究会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔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