

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07064

研究課題名(和文) シナプスの短期可塑性を制御する即時放出可能シナプス小胞の空間分布の解明

研究課題名(英文) Spatial distribution of readily releasable vesicles underlying short-term plasticity at synapses

研究代表者

中村 行宏 (Nakamura, Yukihiro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40460696

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)：シナプス前終末内における電位依存性カルシウム(Ca)チャネルとシナプス小胞の配置は、神経伝達物質放出の確率やタイミングを制御するが、小胞の分布についての詳細は不明であった。Caキレート剤EGTAのシナプス前終末注入実験ならび、Caの反応拡散・伝達物質放出シミュレーションによって、成熟した脳幹Held型シナプスでは、即時放出可能シナプス小胞の7割がCaチャネルから50 nm以内に分布し、通常の活動電位は20 nm付近の小胞を開口放出させることが明らかになった。また、繰り返し刺激によって小胞の分布に変化はみとめられなかったことから、シナプス短期可塑性の主因は小胞の補充機構に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

電位依存性Caチャネルと即時放出可能シナプス小胞の局所配置は神経伝達物質放出の確率やタイミングを制御する。中枢神経シナプス前終末では数十個のCaチャネルがクラスター状に存在することが知られていたが、本研究が明らかにした即時放出可能小胞の分布は、これを相補する分子の局所配置に関する重要な知見である。短期可塑性で小胞の分布に変化が生じないことは、小胞の補充こそが短期可塑性を担う本質的な機構であることを示唆するものであり、今後の可塑性研究の展開が待たれる。またEGTAによるナノドメインCaの抑制を示したシミュレーションは、通説に一石を投じ過去の実験の解釈の見直しを迫るものである。

研究成果の概要(英文)：The coupling between presynaptic voltage-gated Ca channels (VGCCs) and synaptic vesicles (SVs) critically determine the probability and timing of neurotransmitter release.

However, the distribution of SVs within active zones is poorly understood. Using patch-clamp experiments assessing the inhibitory effect of Ca chelator EGTA on vesicular release and reaction diffusion simulations of Ca<sup>2+</sup> followed by SV release, we demonstrated at the calyx of Held synapse in the auditory brainstem that ~70% of readily-releasable pool SV is docked within 50 nm from a cluster of VGCCs and that SVs around 20 nm are exocytosed in response to action potentials. The distribution of SVs was maintained during repetitive stimulation, suggesting that the SV replenishment is primarily responsible for short-term plasticity of the synapse. Furthermore, this simulation points out that EGTA can inhibit SV release in the nanodomain of single VGCCs, pressing for a revision of the interpretation of past experiments.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス伝達 シナプス前終末 カルシウムチャネル シナプス小胞 短期可塑性 カルシウムキレート剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シナプスは脳神経系における情報処理の要であり、シナプス伝達の分子機構やその調節メカニズムの解明は脳神経科学の主要な課題である。シナプス前細胞からの神経伝達物質の開口放出は、シナプス前末端へのカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の流入によって誘発される。拡散速度の違い  $\text{Ca}^{2+}$  は細胞内において局所シグナルとしてはたらくため、カルシウムチャンネルの近傍には一過性の急峻な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度勾配が形成される。従って、シナプス小胞開口放出の確率やそのタイミングは、電位依存性カルシウムチャンネルとシナプス小胞の距離に依存する。

カルシウムチャンネルに対するシナプス小胞の配置の究極的な解明には、透過型電子顕微鏡による電子線トモグラフィーとカルシウムチャンネルの免疫染色の併用による形態学的な観察が期待される。しかし、カルシウムチャンネル標識抗体の組織浸透性や染色効率に改良の余地があり、この方法は今なお実現していない。カルシウムチャンネル単独では SDS 処理凍結割断レプリカ免疫標識法によってその分布が観察され、多くの中枢神経系シナプス前末端ではアクティブゾーン内部でクラスター状に分布することが明らかになされた (Holderith et al, 2012; Indriati et al, 2013)。一方シナプス小胞については、シナプス前末端に注入したカルシウムキレート剤グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) のシナプス伝達抑制作用を電気生理学実験で測定することで、カルシウムチャンネルからの機能的距離が推定されてきた (Neher, 1998)。EGTA の結合速度定数は比較的遅いため、カルシウムチャンネルとシナプス小胞が数十 nm の距離で近接している場合、 $\text{Ca}^{2+}$  は EGTA によるキレートを受ける前に小胞上のカルシウムセンサーへ到達し開口放出を誘導する。逆にカルシウムチャンネルとシナプス小胞が数百 nm 離れている場合は、EGTA は  $\text{Ca}^{2+}$  が小胞のカルシウムセンサーに到達する以前に  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートし開口放出を抑制する。EGTA の伝達抑制作用はさまざまなシナプスで検証され、EGTA がシナプス伝達を抑制しない場合は  $\text{Ca}^{2+}$  ナノドメイン (<100 nm) による開口放出、抑制する場合は  $\text{Ca}^{2+}$  マイクロドメイン (>100 nm) による開口放出であると解釈されてきた (Eggermann et al, 2012)。

脳幹の巨大シナプス calyx of Held では、シナプス前末端への EGTA 注入はシナプス伝達を約 50%抑制するため、 $\text{Ca}^{2+}$  マイクロドメインが開口放出を誘導すると長らく解釈されてきた (Borst & Sakmann, 1995)。しかし我々の研究で、SDS 処理凍結割断レプリカ免疫標識法で観察したカルシウムチャンネルの分布に基づいて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の拡散をシミュレーションし、さらに開口放出シミュレーションを行って EGTA によるシナプス伝達抑制作用を予測したところ、小胞開口放出は Ca チャンネルクラスターの外縁から 20 nm の距離でおこるという結論に達した (Nakamura et al, 2015)。さらにこのカルシウムチャンネルクラスター外縁放出モデルは、EGTA によるシナプス伝達抑制率のみならず、シナプス小胞の放出確率や放出のタイミングも合理的に説明した一方で、以下のような新たな疑問が生じることとなった。

- (1) 従来の解釈 (linearized buffer approximation 法; Neher, 1998) ではカルシウムチャンネルから 20 nm に位置するシナプス小胞に対して EGTA は作用しないとされるが、カルシウムチャンネルクラスター外縁放出モデルでは 50%の抑制率を示す。この差は何が原因か?
- (2) 1 発の活動電位によって開口放出される即時放出可能シナプス小胞プールのごく一部である。アクティブゾーンにおいて即時放出可能シナプス小胞の全体はどのように分布しているか?
- (3) 複数の活動電位が連続して到来するとき、シナプスは、1 発目の開口放出に比べて 2 発目が増減する短期可塑性を示すが 2 発目以降の開口放出は 1 発目と同じ距離でおきるのか、異なった距離で起きるのか? 連続する複数の活動電位に対して生じるシナプス前末端からの、開口放出が起きる距離やシナプス小胞の分布はシナプスの短期可塑性に影響を与えるか?

## 2. 研究の目的

アクティブゾーンにおけるカルシウムチャンネルクラスターと即時放出可能シナプス小胞全体の空間的配置の解明は、シナプス伝達の分子メカニズムやその制御機構を理解する上できわめて重要かつ基礎的な情報である。上記の疑問を踏まえ、以下3項目を本研究の具体的目標として設定した。

(1) カルシウムチャンネルクラスター周辺における EGTA によるシナプス伝達抑制率の詳細な時空間分布を、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入のさまざまな振幅や持続時間ごとに数理計算によって求め、linearized buffer approximation 法とカルシウムチャンネルクラスター外縁放出モデルもとなる  $\text{Ca}^{2+}$ 反応拡散シミュレーションの差異を明らかにする。

(2) アクティブゾーンにおけるカルシウムチャンネルクラスターの周囲に存在する即時放出可能シナプス小胞全体の分布を明らかにする。

(3) 短い間隔で連続して誘発される開口放出の場所を明らかにし、カルシウムチャンネルクラスターからの距離や即時放出可能シナプス小胞の空間的分布の変化がシナプス伝達の短期可塑性を制御する可能性について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) $\text{Ca}^{2+}$ 反応拡散とシナプス小胞開口放出シミュレーション

開口したカルシウムチャンネル(クラスター)近傍における  $\text{Ca}^{2+}$ の局所濃度変化を調べるために、JAVA-base のシミュレーターD3D (Nakamura et al, 2015) を用いて  $\text{Ca}^{2+}$ 反応拡散シミュレーションを行った。数百個のアクティブゾーンが約  $0.7 \mu\text{m}$  の間隔で分布している calyx of Held シナプス前末端の 1 個のアクティブゾーンを模して、シミュレーションの標準的な容積は  $0.5(x) \times 0.5(y) \times 1(z) \mu\text{m}^3$  とした。その  $xy$  平面の中央にカルシウムチャンネル(クラスター)を配置した。クラスターを構成するカルシウムチャンネルは SDS 処理凍結割断レプリカ免疫標識法によって測定された分布を用いた。シミュレーションの計算単位は一辺  $10 \text{ nm}$  の voxel とした。カルシウムバッファの性質や濃度は calyx of Held で実験的に測定された値を使用し、該シナプスにおける測定値が存在しない場合は他の中枢神経系シナプスで得られた報告値を用いた。チャンネルを介して流入するカルシウム電流の振幅と持続時間をさまざまに変えて、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の時空間変化を求めた。さらに、計算で得られた膜近傍の  $\text{Ca}$  濃度変化に 5-site model (Wang et al, 2008) を適用してシナプス小胞開口放出シミュレーションを行った。開口放出の計算には IgorPro を用いた。以上のシミュレーションを EGTA 存在下・非存在下で実行し、カルシウムチャンネル(クラスター)近傍における EGTA によるシナプス伝達抑制率を計算した。

### (2) 電気生理実験

動物実験は、東京慈恵会医科大学動物実験規程および同志社大学動物実験等の実施に関する規程に基づいて、各大学の動物実験委員会の承認を得て実施した。生後 2 週齢マウスから脳幹の急性スライス標本を作製し、顕微鏡観察下で calyx of Held シナプスを同定した。シナプス前末端と台形体核シナプス後細胞から同時パッチクランプ記録を行い、脱分極によって  $\text{Ca}$  電流をシナプス前末端によって誘発したときに後細胞に生じるシナプス後電流を測定した。シナプス後電流は deconvolution 解析 (Neher & Sakaba, 2001) を適用し、シナプス小胞開口放出の量および放出のタイミングを求めた。また測定中にピペット内灌流によって EGTA をシナプス前末端へ注入し、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入の振幅や持続時間、回数など複数の  $\text{Ca}$  流入条件ごとに EGTA によるシナプス伝達抑制率を測定した。

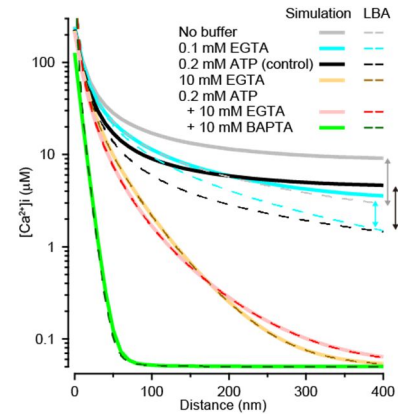
### (3) 解析

電気生理実験で測定したシナプス小胞開口放出の量および放出のタイミングを、シミュレーションで予測したカルシウムチャンネル（クラスター）からの距離ごとの開口放出の確率、タイミング、EGTA による抑制率を比較対照し、シナプス開口放出がきているカルシウムチャンネルからの距離を推定した。

## 4. 研究成果

### (1) EGTA によるナノドメイン $\text{Ca}^{2+}$ の抑制

開口したカルシウムチャンネル（クラスター）の近傍に生じる  $\text{Ca}^{2+}$  濃度勾配を linearized buffer approximation と反応拡散シミュレーション 2 通りの方法で計算し結果を比較した。高濃度の高親和性モバイル  $\text{Ca}^{2+}$  バッファ（EGTA 換算で 5 mM 相当以上）存在下では両者はよく一致し、計算が簡便な linearized buffer approximation の有用性が確認できた。しかし、低  $\text{Ca}^{2+}$  バッファ条件下では、反応拡散シミュレーション（右図実線）は linearized buffer approximation（点線）よりも高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を導出した。さらに反応拡散シミュレーションではチャンネルが開口してから濃度勾配の定常状態出現までに遅延が観察され、遅延は不動  $\text{Ca}^{2+}$  バッファを追加によってさらに延長した。遅延は低親和性バッファの濃度に依存し、シナプス前末端内の典型的なバッファを再現した状態では 1-5 ミリ秒であった。一方、linearized buffer approximation は原理上定常状態の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を計算するものであり、定常状態到達以前の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の推定はできない。活動電位によって誘発されるカルシウムチャンネル開口は通常ミリ秒以下であり、シナプス前末端で活動電位によって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の推定には反応拡散シミュレーションが必須であると結論づけられた。



EGTA によるシナプス伝達抑制作用は多くの中枢神経系シナプスで検討され、シナプス伝達が EGTA で抑制された場合、開口放出はカルシウムチャンネルから遠位のカルシウムマイクロドメインで起きていると linearized buffer approximation に基づいて解釈されてきた。しかし本研究では、反応拡散シミュレーションによって EGTA によるシナプス伝達抑制はカルシウムチャンネルの開口時間にも影響され、 $\text{Ca}^{2+}$  流入時間が 1 ミリ秒以下と短い時は EGTA はナノドメイン (<100 nm) においても  $\text{Ca}^{2+}$  濃度と開口放出を抑制することを示した。従来の解釈に見直しを迫るこの結果は、Journal of Neuroscience 誌に発表、また特に単一チャンネルによる Ca 濃度勾配と開口放出のケースを摘出し Frontiers in Synaptic Neuroscience 誌に報告した。

### (2) アクティブゾーンにおける即時放出可能シナプス小胞分布の解明

シナプス前末端の 1, 2, 10 ミリ秒間脱分極によって生じるシナプス後電流を記録し、deconvolution 解析によって開口放出の量やタイミングを計測した。またピペット内灌流によって前末端に EGTA を注入し、EGTA による開口放出の抑制率を脱分極の持続時間ごとに測定した。実験結果をシミュレーションによって得た知見と照合したところ、脱分極の開始後 1 ミリ秒では、チャンネルから 20 nm 付近の近位のシナプス小胞が主に放出されるのに対し、脱分極が長くなるにつれてチャンネルから遠い小胞も放出に参画するようになり、10 ミリ秒の脱分極では 100 nm 付近の小胞も放出されることが明らかになった。Calyx of Held シナプスでは 10 ミリ秒の脱分極によって即時放出可能シナプス小胞のほぼすべてを枯渇できることが知られているた

め、小胞のプール全体はカルシウムチャンネルクラスター外縁より 100 nm 以内に存在し、そのうち約 7 割がチャンネルから 50 ナノメートルまでの距離に、残り 3 割がそれよりも遠い距離にドックしていると推定された。また EGTA によるシナプス電流の抑制作用は、即時放出可能シナプス小胞数 ( $N$ ) の減少と各距離における放出確率 ( $P$ ) の減少の両方の作用によることが確認された。

### (3) シナプス短期可塑性への小胞分布の関与

連続して開口放出が起きるときカルシウムチャンネルクラスターと小胞の配置に生ずる変化を検討するために、前末端と後細胞の同時パッチクランプ実験を行い、数十ミリ秒の間隔で前末端を脱分極した。シナプス後電流は、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が 2 mM とき 2 回目の開口放出量が減少する短期抑圧、1 mM のとき増加する短期増強を示したが、どちらの場合もカルシウムチャンネルの開口から開口放出までの遅延時間や開口放出の速度には 1 回目と 2 回目に差はみられなかった。また EGTA による抑制率も 1 回目と 2 回目の開口放出で差が見られなかったことから、1 回目と 2 回目の開口放出はカルシウムチャンネルクラスターから同じ距離で起きているものと考えられた。(2)(3)の結果を 1 つに取りまとめた論文を投稿準備中である。

本研究に関連して行った同志社大学・パリ第 5 大学との共同研究におけるシミュレーションでは、小脳平行線維シナプスの短期可塑性は、開口放出部位の違いよりもシナプス小胞の補充メカニズムによって説明された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miki Takafumi, Nakamura Yukihiro, Malagon Gerardo, Neher Erwin, Marty Alain	4. 巻 9
2. 論文標題 Two-component latency distributions indicate two-step vesicular release at simple glutamatergic synapses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-018-06336-5	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 Fekete Adam, Nakamura Yukihiro, Yang Yi-Mei, Herlitze Stefan, Mark Melanie D., DiGregorio David A., Wang Lu-Yang	4. 巻 10
2. 論文標題 Underpinning heterogeneity in synaptic transmission by presynaptic ensembles of distinct morphological modules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08452-2	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 Nakamura Yukihiro, Reva Maria, DiGregorio David A.	4. 巻 38
2. 論文標題 Variations in Ca <sup>2+</sup> Influx Can Alter Chelator-Based Estimates of Ca <sup>2+</sup> Channel?Synaptic Vesicle Coupling Distance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3971 ~ 3987
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2061-17.2018	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Yukihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 EGTA Can Inhibit Vesicular Release in the Nanodomain of Single Ca <sup>2+</sup> Channels	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Synaptic Neuroscience	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnsyn.2019.00026	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 -

1. 著者名 Hashiguchi Shunta, Doi Hiroshi, Kunii Misako, Nakamura Yukihiro, et al	4. 巻 130
2. 論文標題 Ataxic phenotype with altered CaV3.1 channel property in a mouse model for spinocerebellar ataxia 42	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 104516 ~ 104516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2019.104516	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中村 行宏, David DiGregorio
2. 発表標題 Linearized buffer approximationとreaction-diffusion simulationによるCa濃度勾配の推定の比較
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村行宏, 堀哲也
2. 発表標題 EGTAによるナノドメインCaの抑制
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村行宏, 堀哲也
2. 発表標題 中枢神経シナプス前末端における即時放出可能小胞の包括的分布の推定
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村行宏, David A. DiGregorio
2. 発表標題 Linearized buffer approximationとreaction-diffusion simulationによるCa濃度勾配の推定の比較
3. 学会等名 第42回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田春美, 中村行宏, 別府薫, 松井広, 渡辺雅彦, 坂本寛和, 並木繁行, 廣瀬謙造, 重本隆一
2. 発表標題 Cav2.1 changes its number and distribution pattern after stimulation in cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 HARADA H. NAKAMURA Y, BEPPU K, MATSUI K, WATANABE M, SAKAMOTO H, NAMIKI S, HIROSE K, SHIGEMOTO R.
2. 発表標題 Cav2.1 changes its number and distribution pattern after stimulation in cerebellar parallel fibre-Purkinje cell synapses
3. 学会等名 Neuro2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakamura Y
2. 発表標題 EGTA can inhibit vesicular release in the 'nanodomain' distance from Ca channels
3. 学会等名 IBRO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 中村行宏
2. 発表標題 シナプス前終末開口放出部位におけるCaチャンネルクラスター外縁放出モデル
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学薬理学講座 <http://www.jikei-pharm.com/>  
 パスツール研究所神経科学部門神経ダイナミックイメージング研究ユニット <https://research.pasteur.fr/en/team/dynamic-neuronal-imaging/>  
 IST Austria <https://ist.ac.at/>  
 トロント大学 <https://www.physiology.utoronto.ca/content/lu-yang-wang>

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
研究協力者	堀 哲也  (Hori Tetsuya)  (70396703)	同志社大学・生命医科学部・准教授    (34310)	