

平成22年2月15日現在

研究種目：基盤研究 (A)  
研究期間：2006-2008  
課題番号：18200023  
研究課題名 (和文) 単一中枢シナプスにおける伝達制御機構の解析  
研究課題名 (英文) Regulation mechanism of information transmission at single central synapses  
研究代表者 平野丈夫 (HIRANO TOMOO)  
京都大学・大学院理学研究科・教授 研究者番号：50181178

## 研究成果の概要：

哺乳類中枢神経系内シナプスの機能と形態の性質およびそれらの相関を単一シナプスレベルで解明することをめざし、海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞上に形成されるグルタミン酸作動性興奮性シナプスを比較研究した。海馬のシナプスにおいては、シナプス応答の強さとシナプス後部スパインの大きさが相関し、小脳シナプスにおいてはシナプス前膨大とシナプス後部スパインの大きさが相関するなど、両シナプスの違いが明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	16,500,000	4,950,000	21,450,000
2007年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
年度			
年度			
総計	29,900,000	8,970,000	38,870,000

## 研究分野：分子細胞神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス、海馬、小脳、錐体細胞、プルキンエ細胞、スパイン、グルタミン酸

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系内のシナプスを介した神経細胞間の情報伝達により、脳の機能は実現される。これらシナプスの多くは、グルタミン酸を伝達物質として興奮性の情報伝達を行うが、シナプス種により、その形態と機能特性に多様性が認められる。そうした多様性が、哺乳類の脳における複雑で高度な情報処理に貢献すると考えられる。しかしながら、各種のシナプスにおける諸性質間の相関についての

情報は限られており、特に単一シナプスレベルでのシナプス前・後部構造と機能の関係の詳細は不明であった。

## 2. 研究の目的

哺乳類中枢神経系の単一シナプスの機能と形態の性質とそれらの相関を、個々のシナプス構造とそのはたらきを定量化することにより、明らかにすることをめざした。また、

それらが、シナプスの使用状況等によりどのように変化するかについての研究も試みた。なお、研究対象は、哺乳類中枢神経系内の代表的シナプスである海馬錐体細胞上および小脳プルキンエ細胞上に形成されるグルタミン酸作動性興奮性シナプスとした。

### 3. 研究の方法

(1) ラットの海馬または小脳から神経細胞を単離して分散培養した。シナプス前神経細胞となる海馬神経細胞または小脳顆粒神経細胞に電気穿孔法を用いて蛍光タンパク質であるEGFPのcDNAを導入し、タンパク質を発現させた。その上で蛍光色素であるAlexa568を含んだ細胞内液を使用して、シナプス後海馬錐体細胞または小脳プルキンエ細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。この手法により、シナプス前・後両神経細胞を異なる色の蛍光色素で染め分け、シナプス前膨大とシナプス後スパイン構造両者を可視化し、共焦点顕微鏡を用いてそれらの形態を記録した。

(2) 単一のシナプス前膨大を選択的に活性化するために、フグ毒のテトロドトキシンを用いて活動電位の発生を抑制した状態で、ガラス電極により一つのシナプス前膨大を電気刺激した。刺激強度はEPSCが誘発される閾値とした。そして、シナプス後神経細胞から興奮性シナプス後電流(EPSC)を記録した。EPSCの大きさのバラツキ等からEPSCの最小単位であるqEPSCを求めた。また、電気刺激が単一シナプス前膨大に限局されていることを確認するために、FM蛍光色素をシナプス前膨大内のシナプス小胞に取り込ませ、その放出が起こるシナプス前膨大と刺激電極間の距離の関係を検討した。

(3) シナプス前膨大およびシナプス後スパインの大きさ・qEPSCの大きさ・qEPSCの時間経過等を計測し、それらの間の相関も求め、海馬と小脳のシナプスで比較検討した。

(4) シナプス伝達効率の変化を引き起こす高頻度刺激を加え、シナプスに変化が起こるか否かを検討した。

### 4. 研究成果

(1) シナプス前・後部の可視化  
海馬および小脳の分散培養系において、シナプス前膨大とシナプス後スパイン構造を異なる蛍光色素で染め分け、その形態を記録し(図1)、両者の大きさを計測した。海馬では錐体神経細胞上に形成される興奮性シナプス、また小脳については顆粒細胞・プルキ

ンエ細胞間興奮性シナプスを対象とした。シナプス前膨大・シナプス後部スパイン共に小脳の方が海馬より大きいことが分かった。

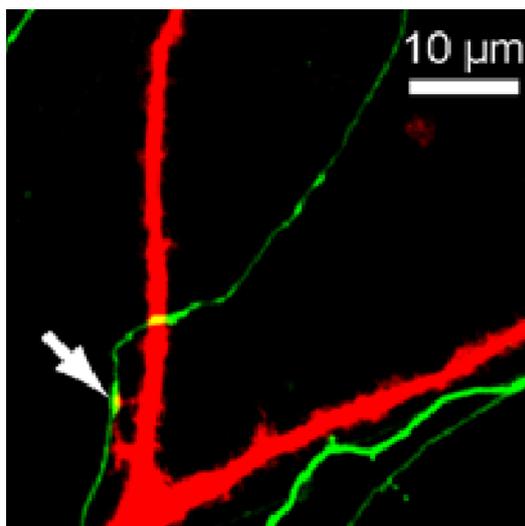


図1 海馬錐体細胞(赤)上のシナプス(矢印)。緑はシナプス前神経細胞の軸索。

(2) 単一シナプスにおけるqEPSC  
単一シナプス前膨大の電気刺激により誘発されるEPSCを記録した。EPSCを多数回記録し(図2)、各EPSCの大きさと時間経過の類似性および大きさの分布状況(図3)から、EPSCの単位となるqEPSCを求め、その大きさ・時間経過を計測した。海馬の方が小脳よりqEPSCの時間経過が速いことが分かった。なお、qEPSCの大きさには有意な差は認められなかった。また、FM色素を用いた実験により、今回用いた電気刺激では、ガラス電極先端の中心から2μm以内にあるシナプス前膨大のみが活性化されることが分かった(図4)。

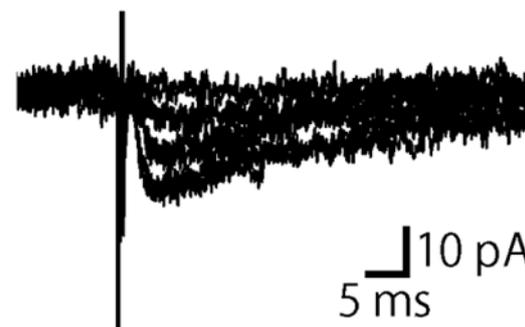


図2 EPSCの例。複数回のトレースを重ねて表示している。

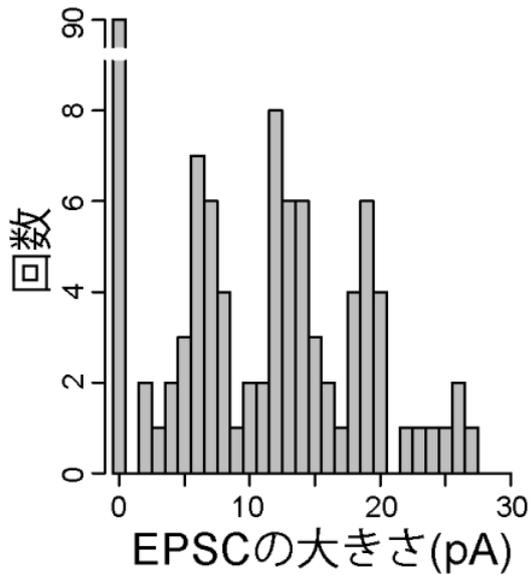


図3 EPSCの大きさのヒストグラム。

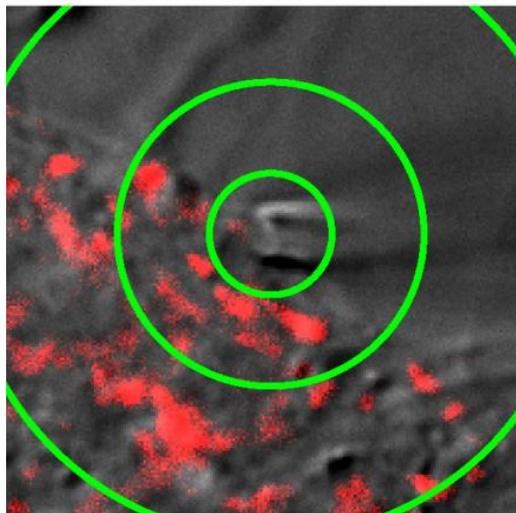
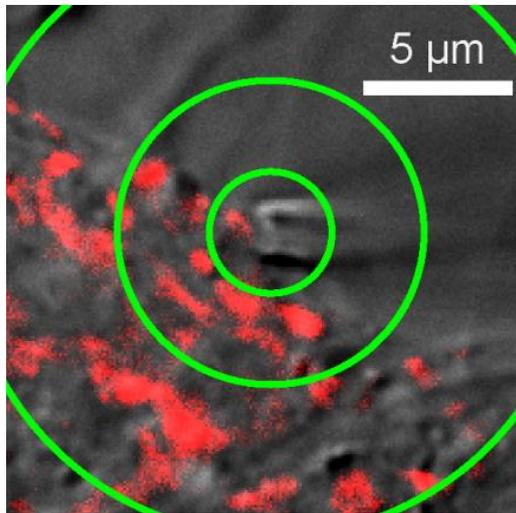


図4 電気刺激の有効範囲の計測。ガラス電極先端を中心に半径2, 5, 10  $\mu\text{m}$ の円を描いた。上が刺激前・下は刺激後。最小円内のFM色素(赤)のみが刺激により褪色し、刺激有効範囲が2 $\mu\text{m}$ 以内であることがわかる。

### (3) シナプス構造と機能の相関

海馬・小脳について、シナプス前膨大・シナプス後スパインの大きさ、qEPSCの大きさ、qEPSCの立ち上がりの速さ、qEPSCの立下りの速さの相関を調べた。海馬では、qEPSCの大きさとシナプス後スパインの大きさに正の相関(図5)が、またqEPSCの立下りの速さとスパイン後スパインの大きさにも相関が認められたが、小脳ではこれらの性質間に有意な相関は認められなかった。一方、小脳ではシナプス前膨大の大きさとシナプス後スパインの大きさに正の相関(図6)が認められたが、海馬ではこの相関は認められなかった。

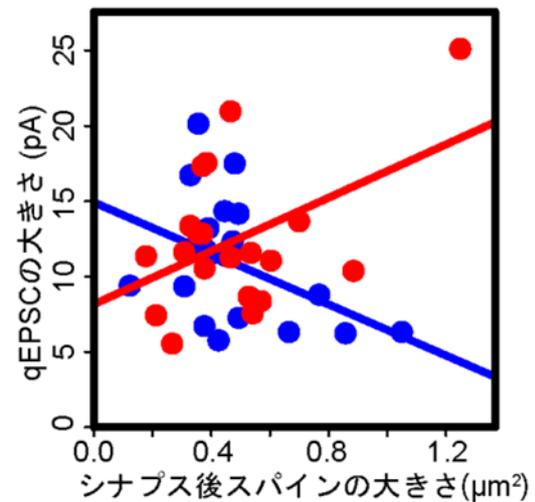


図5 qEPSCの大きさとシナプス後スパインの大きさの相関。海馬(赤)では正の相関が認められる。

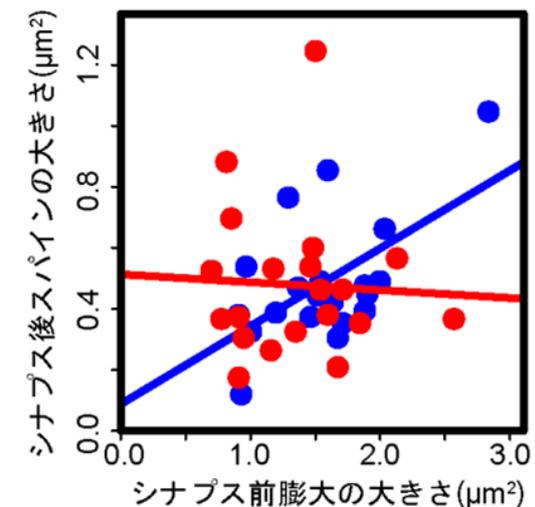


図6 シナプス前膨大の大きさとシナプス後スパインの大きさの相関。小脳(青)で正の相関が認められる。

#### (4) シナプス伝達調節

小脳において、シナプス前膨大を高頻度刺激 (4 Hz, 30 秒) したところ、EPSC が増大する増強現象が起こった (図 7)。この結果から、今回開発した実験系で、シナプス伝達の活動依存的変化を調べることが可能と考えられる。

#### 条件刺激前



#### 条件刺激後

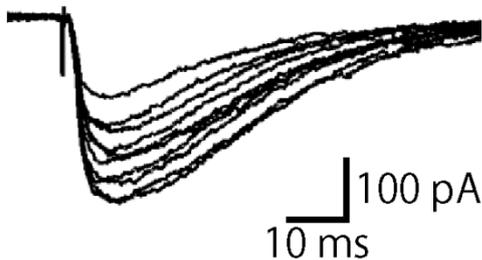


図 7 条件刺激による EPSC の増強

#### (5) 結論と考察

本研究では、単一の哺乳類中枢シナプスにおけるシナプス応答を、シナプス前・後部の形態と共に記録・解析する手法を開発した上で、海馬錐体細胞と小脳プルキンエ細胞上に形成されるグルタミン酸作動性興奮性シナプスを比較研究した。その結果、海馬のシナプスにおいては、シナプス応答の強さとシナプス後部スパインの大きさが相関し、小脳シナプスにおいてはシナプス前膨大とシナプス後部スパインの大きさが相関するなど、両シナプスの違いを明らかにすることができた。海馬におけるシナプス可塑性においては、シナプス応答の変化とシナプス後部スパインの形態変化が同時に起こるが、小脳においてはシナプス応答の変化がシナプス後部スパイン構造の変化を伴わないことが報告されている。具体的には、海馬におけるシナプス応答の長期増強・長期抑圧は各々シナプス後部スパインの増大・縮小を伴うが、小脳の長期抑圧はスパインの縮小を伴わない。今回、シナプスでの単位応答 (qEPSC) の大きさとシナプス後部スパイン構造の相関が海馬シナプスのみで認められたことは、海馬で機能的シナプス可塑性がスパイン構造変化と関連しており、培養下における自発的神経活動によりシナプス可塑性が起こったことを反映していると考えられる。一方、小脳でのみシナプス前膨大とシナプス後部スパイン構造間で大きさの相関が認められたことは、両者間でシナプス形成・維持に関わるシナプス前

後部の分子及び相互作用が異なることを反映しているかもしれない。小脳顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプスでは、グルタミン酸受容体  $\delta 2$  サブユニットが特異的に発現しており、この分子はこのシナプスの形成および維持に関与することが明らかになった。 $\delta 2$  サブユニット等の分子により、小脳顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプス特有の性質が生じた可能性が考えられる。

#### 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 5 件)

- ① Kitagawa, Y., Hirano, T. and Kawaguchi, S. Prediction and validation of a mechanism to control the threshold for inhibitory synaptic plasticity. *Mol. Syst. Biol.* 5, 280, 1-16, 2009. 査読有
- ② Kuroyanagi, T., Yokoyama, M. and Hirano, T. Postsynaptic glutamate receptor  $\delta$  family contributes to presynaptic terminal differentiation and establishment of synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 4912-4916, 2009. 査読有
- ③ Sugiyama, Y., Kawaguchi, S. and Hirano, T. mGluR1-mediated facilitation of long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *Eur. J. Neurosci.* 27, 884-896. 2008. 査読有
- ④ Kawaguchi, S. and Hirano, T. Sustained GABARAP structural change underlies long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. *J. Neurosci.* 27, 6788-6799. 2007. 査読有
- ⑤ Tsuruno, S. and Hirano, T. Persistent activation of protein kinase C  $\alpha$  is not necessary for expression of cerebellar long-term depression. *Mol. Cell Neurosci.* 35, 38-48. 2007. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① Miyawaki, H. and Hirano, T. Correlations between function and morphology of single synapses on hippocampal pyramidal neurons and cerebellar Purkinje neurons are

different. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Chicago. McCormick Place Convention Center. 2009年10月21日

- ② Miyawaki, H and Hirano, T. Correlations between function and morphology of single synapses on hippocampal pyramidal neurons and cerebellar Purkinje neurons are different. 32nd annual meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya. 名古屋国際会議場. 2009年9月17日
- ③ Hirano, T. Roles of glutamate receptor  $\delta$  family in synapse formation. Symposium "Novel aspects of the function of ionotropic & metabotropic glutamate receptors" in the 32nd annual meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya. 名古屋国際会議場. 2009年9月16日
- ④ 宮脇寛行、平野丈夫、小脳プルキンエ細胞における個々のシナプスでの EPSC の特性 第31回日本神経科学大会、東京、東京国際フォーラム。2008年7月11日
- ⑤ Hirano, T. Regulation of synaptic transmission and motor learning. International symposium on hierarchy and holism: Bridging across different hierarchies in natural sciences. Okazaki. 自然科学研究機構. 2008年2月22日
- ⑥ Kawaguchi, S. and Hirano, T. Critical role of GABARAP in long-term potentiation at inhibitory synapses on a Purkinje neuron. 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego. San Diego Convention Center. 2007年11月6日
- ⑦ Kawaguchi, S. and Hirano, T. Regulatory mechanism of inhibitory synaptic transmission in the cerebellum. Symposium "Regulatory mechanism of GABAergic synaptic transmission" in the 29th annual meeting of the Japan Neuroscience Society, Kyoto. 京都国際会館. 2006年7月21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

<http://www.biophys.kyoto-u.ac.jp/hirano.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 丈夫 (HIRANO TOMOO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号： 50181178

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし