

平成 21 年 4 月 7 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 年～2008 年

課題番号：19790174

研究課題名（和文） シナプス小胞動態の多様性を基盤とした記憶メカニズムの解明

研究課題名（英文） The fluctuation of the vesicular release probability in developing hippocampal autaptic synapses

研究代表者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50435145

研究成果の概要：脳の興奮性伝達物質であるグルタミン酸の開口放出量と開口放出状態にあるシナプス小胞数は培養期間に応じて増大した。そして、1回の活動電位発火で伝達されるグルタミン酸の放出効率は培養初期では高かったが中期になると低下し、以後は一定値を示した。また、単位シナプス小胞当たりのグルタミン酸含量もしくは受け手側の AMPA 受容体の感受性は培養初期から中期には変化を認めず、培養後期に増大した。加えて、シナプス数は培養初期から中期にかけて急増し、中期から後期は微増する傾向が掴めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：システム生理学、シナプス、発達、伝達確率、シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経ネットワークにおけるシナプス伝達の動作原理を解明することは記憶のメカニズムを知るための基盤研究として位置づけられる。つまり、「なぜ記憶できるか？」という単純な疑問をシナプスレベルで解明

できれば、脳システムとしての記憶メカニズムの解明のみならず、「何が異常か？」も判断でき、精神疾患治療への発展性も期待できる。

記憶メカニズムの基本単位としては LTP (Long-term potentiation) や LTD (Long-term

depression)などのシナプス長期可塑性があり、その作用機序としてシナプス後膜のAMPA受容体の発現やNMDA受容体を介したCa²⁺流入量の変化が重要である。近年はシナプス前神経終末部の関与も明らかになり始めており(Kamiya et al, J Neurosci, 2002; Zhang et al, J. Neurosci, 2006)、伝達物質を開口放出するシナプス小胞の動作原理の解明が急務となっている。

2. 研究の目的

従来、シナプス小胞は規則正しく伝達物質を放出すると考えられていたが、ドイツMax-Planck研究所のSakaba & Neherは「伝達物質の放出確率はシナプス小胞レベルで差異を示す」ことを提唱した(Neuron, 2001)。彼らの理論は、伝達物質を放出しやすい場所(Optimal position)へシナプス小胞が活動依存的に移動することを示している。これはシナプス小胞動態が様々な環境に応じて効率よく変化することを意味する。つまり、本理論はシナプス伝達における長期可塑性の形成メカニズムの一つと考えられる。すなわち、シナプス小胞動態の基本動作原理を熟知した上で長期可塑性の発現メカニズムを追求することは、シナプスの長期可塑性の生理学的発生機序のみならず、記憶メカニズム解明への有力なアプローチとなる。

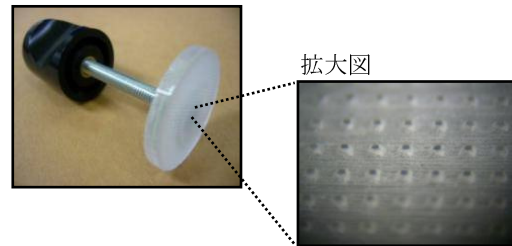
そこで、如何にしてシナプス小胞がOptimal positionへ移動するのか生物物理学のおよび生理学的に解析し、生命システムを制御するシナプス伝達の動作原理を解明する。具体的には、培養期間に応じたシナプス小胞動態を電気生理学的に解析し、シナプス小胞動態の発達および活動依存性を明らかにする。

3. 研究の方法

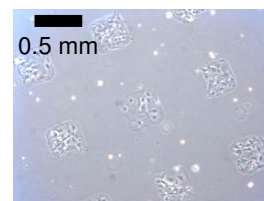
(1) 島状アストロサイト (Micro Island) 培養標本の作製

① 自己にシナプスを形成するオータプス培養標本のシナプス数は島状アストロサイトの広さによって変わる。そこで均一サイズの島状アストロサイト層をカバーガラス上で大量培養するための「コーティング液用スタンプ」を作製した(下図)。

コーティングスタンプ



これにより、コーティング液はドット状にスタンプされ、島状アストロサイト層の大きさのバラツキを最小限にして均等に培養できることから(下図)、ニューロンの発達程度も統一できる。



② 生後0-1日齢マウス大脳皮質をトリプシンで酵素処理し、10%ウシ胎児血清を含むD-MEMメディウムを用いて37度で2週間培養した。培養後、高密度のアストロサイトを得るために培養ボトルを振とうし、ミクログリアや細粒細胞を浮遊させてメディウムを除去した。続いて培養ボトル底面に接着しているアストロサイト層をトリプシンで剥離し、予め準備しておいた島状アストロサイト培養用6-ウェルプレートに撒いた。5-6日後にアストロサイトが島状に培養されていることを確認し、過度の増殖を止めるために5-フルオロ-2'-デオキシウリジン

とウリジンの混合液を各ウェルに添加した。

(2) オータプスニューロン培養標本の作製

パピインを用いて生後0-1日齢マウス海馬からニューロンを酵素処理単離し、予め作製した島状アストロサイトを培養した6-ウェルプレートに細胞を撒き、37度で7日~27日間培養した。培養液は2% B27を含むNeurobasal-Aメディウムを用い、培養期間中は液性因子を保持するためにメディウム交換は行わなかった。培養はDay *in vitro* (DIV) 7 - 9 (培養初期), DIV 13 - 15 (培養中期), DIV 21 - 27 (培養後期) の3期間に分類した。

(3) 電気生理学的解析

シナプス解析はパッチクランプ法を用い、膜電位を-70mVに固定して興奮性シナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current, EPSC) を記録した。開口放出可能な全体のシナプス小胞のサイズ (Readily releasable pool, RRP) は、一過性高浸透圧刺激 (0.5 M sucrose) で惹起される内向き電流の総面積を計算した。また、自発性グルタミン酸放出はNa⁺チャンネルブロッカーの0.5 μMテトロドトキシンを細胞外液中に投与して記録した。

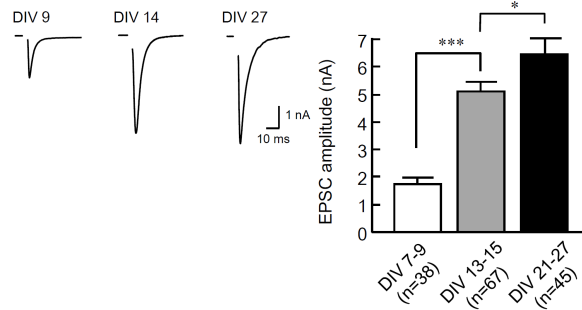
伝達物質放出確率の高いシナプス小胞群 (High P_{vr} pool) と低いシナプス小胞群 (Low P_{vr} pool) の割合の同定は、高頻度刺激 (20Hz) による興奮性シナプス後電流の減衰を解析した。

4. 研究成果

(1) シナプス小胞の開口放出の活動依存性

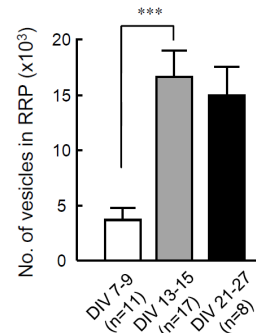
発達に伴うシナプス小胞動態の可塑的变化を7-9 day *in vitro* (DIV) (培養初期)、13-15 DIV (培養中期)、21-27 DIV (培養後期) に分類し、パッチクランプ法にて伝達物質の

放出様式を解析した。結果、活動電位発生に同期してシナプス小胞から開口放出されたグルタミン酸 (Synchronous release) によるEPSCは培養期間に応じて増加した (下図)。

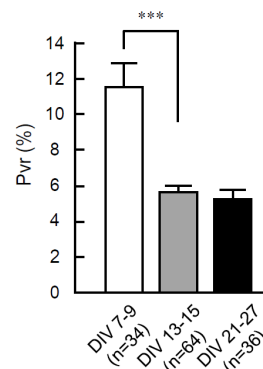


また、自発的グルタミン酸放出によって惹起されるminiature EPSCは培養初期から培養中期にかけては有意な変化を認めず、培養後期に増大した (data not shown)。

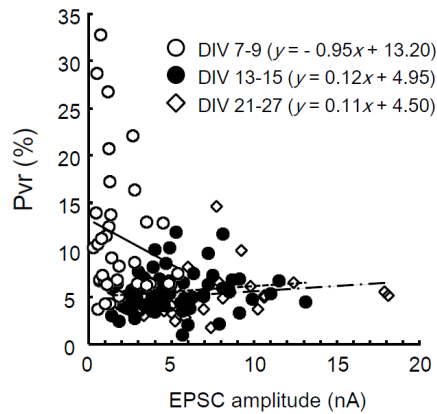
一方、開口放出段階にあるシナプス小胞群 (Readily releasable pool, RRP) のサイズも培養期間に比例して増大することが明らかとなった (下図)。



これらの結果を踏まえ、EPSCの面積をRRPの面積で割ることで求められる比率 (Vesicular release probability, P_{vr}) は培養初期では非常に高く、培養中期以降は低下して一定値を示すことが明らかとなった (下図)。



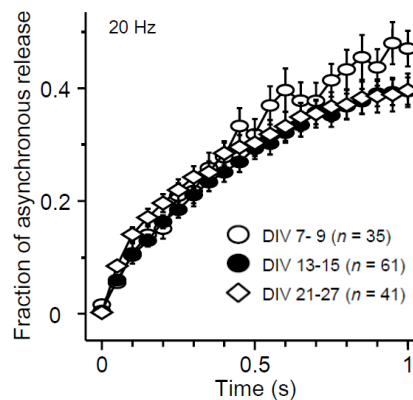
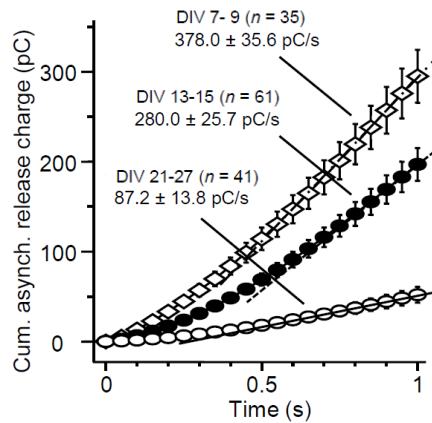
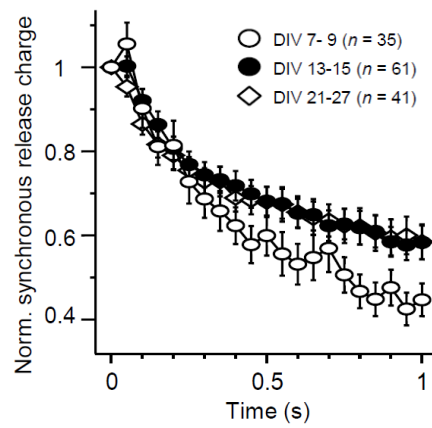
最近、シナプスの発達はEPSCの大きさで定義できることが報告された (Gekel & Neher, 2008)。これを基に、本研究で得られたEPSC amplitude (nA) とPvr (%)の相関関係をプロットした。興味深いことに、培養初期と培養後期では正の相関がみられたが、培養初期では負の相関が得られた (下図)。



このことから、培養初期は従来の相関関係が得られないことが判明した。この原因については更なる実験が必要である。

(2) シナプスの発達とPvr多様性分布の相関関係の解明

6-7 DIV、13-14 DIV、21-23 DIVにおいて、活動電位の高頻度刺激 (20Hz) に同期するSynchronous releaseと同期しないAsynchronous releaseの比率を解析した。前者は放出確率の高いシナプス小胞 (High Pvr pool) であり、後者は低いシナプス小胞 (Low Pvr pool) と定義されている。もし発達に伴うPvrの低下が両者の比率の変化によるものであるならば、発達とともにLow Pvr poolの比率は増加するはずである。しかしながら、各刺激時における両者の比率は、シナプスの発達とともにHigh Pvr poolとLow Pvr poolのサイズは増大したものの、両者の割合に有意な発達変化は認められなかった (右図)。



以上の結果より、シナプスの発達によるPvrの低下のメカニズムにシナプス小胞動態の多様性分布の変化はないことが判明した。

(3) シナプスの発達と細胞外 Ca^{2+} 感受性

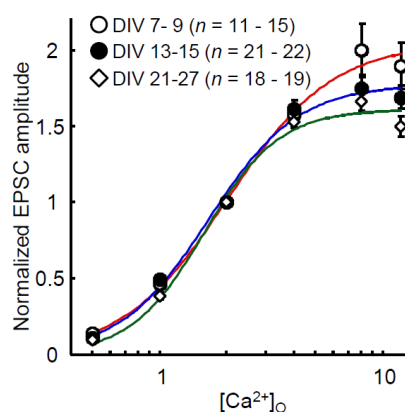
シナプス開口放出は細胞外 Ca^{2+} 感受性があり、Pvr も細胞外 Ca^{2+} によって変化する。シナプスの発達による Pvr の低下には Pvr 多様性分布は関係しなかったことから（前頁）、発達により細胞外 Ca^{2+} 感受性が変化する可能性を考えた。実験は、細胞外 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) を 0.5、1、2、4、8、10 mM に設定し、各濃度における EPSC amplitude (nA) を計測した。驚いたことに、発達とともに細胞外 Ca^{2+} 親和性 (Cooperativity) は低下し、Hill 係数は増加した（下テーブル）。

DIV 7-9	mean	se
Kd (mM)	2.01	0.16
Hill係数	1.85	0.22

DIV 13-15	mean	se
Kd (mM)	1.65	0.11
Hill係数	2.17	0.27

DIV 21-27	mean	se
Kd (mM)	1.59	0.11
Hill係数	2.61	0.40

以上の結果から、シナプスの発達とともに、細胞外 Ca^{2+} 感受性も増加することが分かった（下図）。



(4) 本研究の結論と今後の展望

本研究によりシナプスの発達により Pvr が低下することが明らかとなった。しかしな

がら、その原因となるメカニズムを明らかにすることはできなかった。

ひとつの可能性として、シナプス外受容体 (Extrasynaptic receptor) は発達で急増することが報告されているので (Zhang & Benson, 2001)、0.5 M Sucrose 投与によって惹起されたグルタミン酸放出が Extrasynaptic receptor にも作用したことが考えられる。その結果、RRP サイズが過度に見積もられて大きい数値となるため、計算上 Pvr が低い結果となったかもしれない。この疑念を解く直接的な実験法はまだないが、間接的な手段として、頻回刺激中に Synaptic NMDA 受容体を Open channel blocker である MK-801 でブロックし、その後の Sucrose 反応を観察することで解決できるかもしれない。しかし、MK-801 は Pr の低いシナプスには効果が弱いことから (Rosenmund & Stevens, 1996)、この手段もさほど有用ではない可能性もある。何れにせよ、Sucrose を用いた RRP サイズの解析と Extrasynaptic receptor の関与を明確にしなければ、Sucrose の利用に制限があることになる。今後は別手段を考えて、更なる研究の発展に努めたい。

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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Shutaro Katsurabayashi, The fluctuation of the vesicular release probability in developing hippocampal autaptic synapses, International Congress of Physiological Science 2009, 2009年7月、京都 (学会受理済)
- ② 桂林秀太郎、Presynaptic phenotype の

基礎検討、生理研研究会『新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える』、2008年9月19日、愛知

- ③ 桂林秀太郎、シナプス伝達は発達でどう変わるか?、第10回ブレインサイエンス研究会、2008年6月1日、福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50435145

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し