

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12301
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2023
課題番号：20K06906
研究課題名（和文）発達における短期シナプス可塑性の切り替えメカニズム

研究課題名（英文）A developmental switch in short-term synaptic plasticity

研究代表者
細井 延武（Hosoi, Nobutake）
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90543570
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：脳・神経系は、発達に伴い、形や大きさだけでなく機能的にもダイナミックな変化を伴い成熟していく。その中でも、抑制性のシナプス伝達に関して、幼若期では短期シナプス抑圧の性質を示すが、成熟期では短期シナプス増強の性質に変化することを予備実験で見出した。つまり、幼若期では一過性にしか抑制できなかったものが、成熟すると持続的かつ効率的に相手先の神経細胞を抑制できるように切り換わることを意味するが、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究では、この切り替えのメカニズムに迫る実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
神経系における抑制性シナプス伝達の機能的発達は、いまだわかっていないことも多く、また、抑制性シナプス伝達の機能不全は、自閉症や統合失調症、てんかんなどの精神疾患にも大きく関与することが知られている。したがって、本研究での成果は、今後、抑制性シナプス伝達を原因とする多くの精神疾患などの原因解明にもつながりうるし、治療方法の開発にも寄与しうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：During development, the central nervous system changes dynamically and matures in terms of size, morphology and function. Properties of inhibitory synaptic transmission also changes dynamically and my preliminary study suggests that short-term depression switches to short-term facilitation at cerebellar inhibitory synapses during development. This implies that efficiency of synaptic inhibition improves greatly during maturation. The mechanism of this developmental switch of short-term plasticity, however, remains to be elucidated. In this study, I tried to examine the mechanism experimentally.

研究分野：神経科学

キーワード：short-term plasticity inhibitory synapse cerebellum

1. 研究開始当初の背景

脳・神経系は、生後から成体になるまでの過程において、形態だけでなくシナプス伝達の機能面においてもダイナミックに変化しながら成熟していく。しかしながら、その機能的な成熟過程の性質やメカニズムについては不明な点が多い。申請者は、予備実験において、野生型マウスの高頻度刺激に対する抑制性シナプス応答を調べたところ、幼若期では最初は抑制性シナプス応答が大きいものの、その後大幅に減少していく短期シナプス抑圧の応答を示していたが、成熟期になると、高頻度刺激に対して、抑制性シナプス応答が一過性に増強し、その後応答が比較的維持される短期シナプス増強の応答を示すようになることを発見した。つまり、幼若期では、抑制性シナプスの性質が、一過性に抑制する性質だったものが、成熟期になると、相手先の神経細胞をより持続的かつ効率的に抑制できる性質に変化していく、抑制の仕方の「切り換え」が生じることを予備実験によって見出した(図1)。

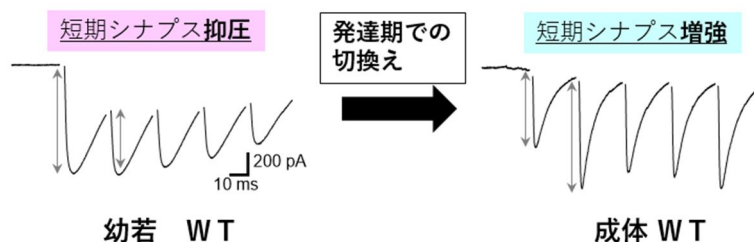


図1 小脳神経細胞から記録した、連発電気刺激(40 Hz, 5回)によって誘発した抑制性シナプス応答。両端矢印の長さは1番目と2番目のシナプス応答の大きさを示す。

2. 研究の目的

予備実験で見出した、抑制性のシナプス伝達における発達期での短期シナプス可塑性(Short-term plasticity: STP)が、幼若型から成熟型に切り換わる現象について、電気生理学的、解剖学的、分子生物学的な解析を行うことにより、その切り換えメカニズムに迫ることを目的として、研究をおこなった。

3. 研究の方法

幼若期(生後10 - 13日)の野生型マウスは幼若型シナプス抑圧を示し、成体期(5週齢以上)の野生型マウスは成熟型シナプス増強の性質を持つことを利用し、この2グループ比較することで、抑制性シナプスの特性の何が変化するのかを解剖学的に検討した。また、この2グループの小脳組織を用いて RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、分子メカニズムを検討した。

また、予備実験において、遺伝子改変マウス X では、成体期になっても小脳抑制性シナプスの STP が幼若型のままであることを見出した。5週齢以上の成体マウスの野生型マウスと遺伝子改変マウス X の小脳組織においても RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

まず、予備実験で示唆された幼若期と成体期において STP が切り換わる現象が安定して生じる robust な現象かどうかを電気生理学的に確認する実験を行った。小脳スライス標本を用いて、プルキンエ細胞からパッチクランプ記録を行い、細胞外電気刺激によって抑制性の神経線維を活性化して、抑制性シナプス応答を記録した。高頻度のシナプス刺激を行うと、幼若期では1回目の抑制性のシナプス応答以降、応答の大きさが急激に減少する短期シナプス抑圧の現象が明確に観察された。その一方、成体期のシナプス応答では、2 - 3回目の応答の時点で、1回目の応答より大きさが増強する短期シナプス増強の現象が明確に観察され、それ以降の応答も多少減弱するものの、かなり応答の大きさが維持される現象が安定して観察された(図2)。Two-way ANOVA による統計学的検定においても、有意差が確認され、幼若期と成体期で STP の性質が大きく異なることが明らかとなった(幼若期と成体期の要因 $p < 0.001$, N 番目の要因 $p < 0.001$, 交互作用 $p < 0.001$)。

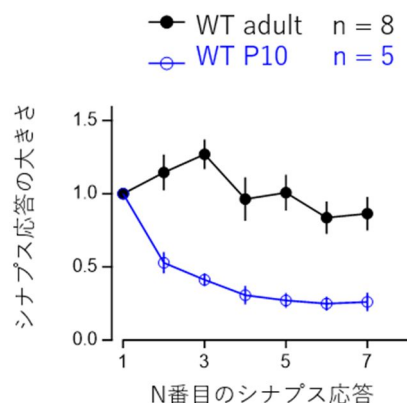


図2 小脳の抑制性シナプス伝達における短期シナプス可塑性(40 Hz, 7回刺激で誘発された応答、最初の応答を1として標準化)

次に、上記の実験で確認された幼若期と成体期において、小脳皮質での抑制性シナプスの形態に違いがあるかどうかを免疫染色によって検討した。シナプス後細胞であるプルキンエ細胞をカルビンディン抗体で可視化し、抑制性シナプスのシナプス前細胞側のマーカーで、シナプス小胞に GABA を充填する機能をもつ VGAT(vesicular GABA transporter)を緑のシグナルで可視化し

た(図3)。幼若期では、プルキンエ細胞の細胞体付近に観察されるVGATのシグナルのサイズが大きい傾向が見られ、成体期でのプルキンエ細胞体付近のVGATシグナルのサイズは幼若期よりも小さい傾向が見られた。VGATのシグナルのサイズが大きいということは、シナプス前細胞側の構造が大きい可能性を示唆するが、この現象は細胞体付近でのみ観察される現象で、分子層でのVGATのシグナルについては大きな違いは見られなかった。幼若期でも成体期でも抑制性シナプスは、分子層にも細胞体付近にも形成されており、STPのdynamicsの違いについては、細胞体でのVGATのシグナルの大きさの違いのみでは説明することは難しいと考えられる。したがって、免疫染色の結果からでは、STPに関係しそうな幼若期と成体期での顕著な違いについて、残念ながら見つけることはできなかった。

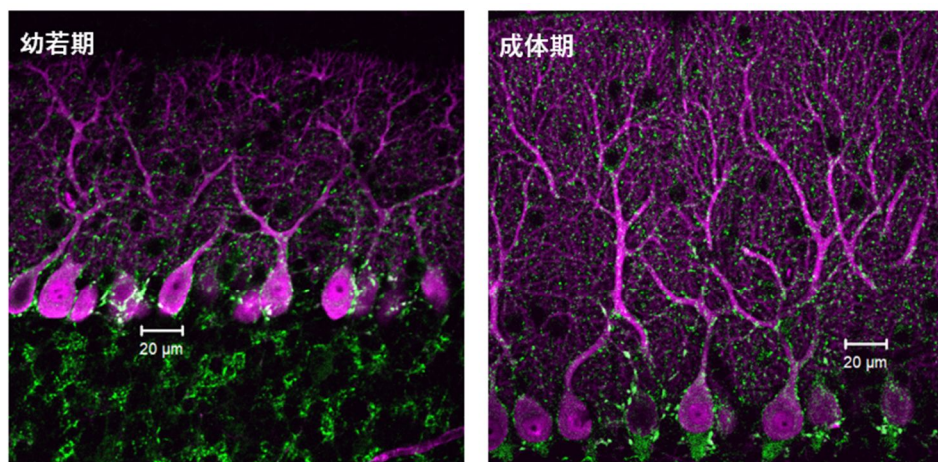


図3 幼若期と成体期の小脳免疫染色像。マゼンタは、プルキンエ細胞のマーカであるカルビンデインのシグナルを示し、緑は抑制性のシナプス前細胞のマーカであるVGATのシグナルを示す。

次に、野生型の成体期(WT)、野生型の幼若期(WT_{pup})、遺伝子改変マウスXの成体期(X)の3条件で、RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った(図4)。STPの切換えに関わる分子は、WTにしか見られず、WT_{pup}やXの条件では見られない遺伝子発現パターンを探索すればよいと考えられるが、候補遺伝子は数百種類以上にのぼるため、いまだ絞り込めていない。WTとWT_{pup}の間の比較だけでは、STPの性質の切換え以外の発達・成長に関係する多くの遺伝子群の発現変化が含まれてしまっていると考えられる。数多くの遺伝子候補からの絞り込みはかなり難しいと考えられるが、まずは成体期で、発達・年齢変化などの差が少ないと考えられるWTとXの遺伝子発現パターンの違いから、候補を絞り込もうと考えている。WTとXの間でGO cellular componentに関するエンリッチメント解析をおこなったところ、X条件では、WTに比べて、Synaptic membraneやPresynapseに関する遺伝子の発現低下が指摘されている(図5)。この遺伝子群をとっかかりとして、さらに条件を絞れるような解析を行い、STPの切換えに関与する分子メカニズムにせまりたいと考えている。

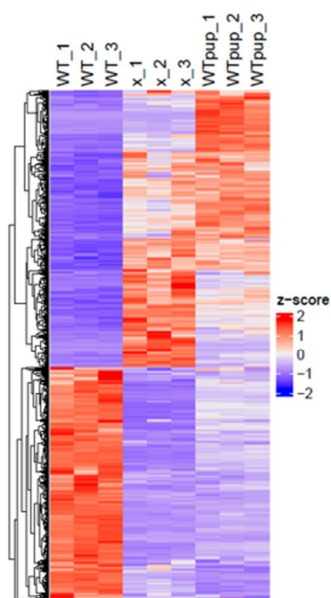


図4 3条件でのRNA-seqによる遺伝子発現パターンのheatmap

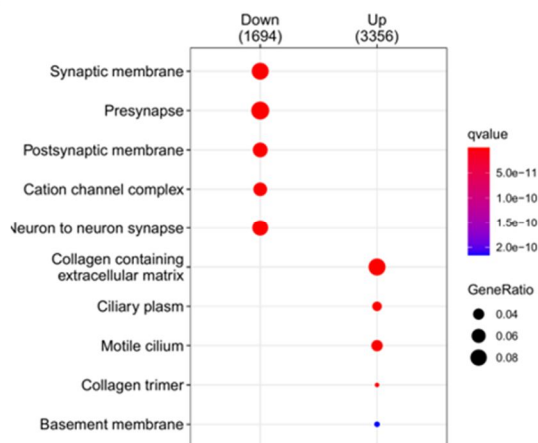


図5 WTとXの条件間でのエンリッチメント解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ninomiya Ayane, Amano Izuki, Kokubo Michifumi, Takatsuru Yusuke, Ishii Sumiyasu, Hirai Hirokazu, Hosoi Nobutake, Koibuchi Noriyuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Long-term depression?inductive stimulation causes long-term potentiation in mouse Purkinje cells with a mutant thyroid hormone receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2210645119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2210645119	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 Okada Yukihiro, Hosoi Nobutake, Matsuzaki Yasunori, Fukai Yuuki, Hiraga Akito, Nakai Junichi, Nitta Keisuke, Shinohara Yoichiro, Konno Ayumu, Hirai Hirokazu	4. 巻 5
2. 論文標題 Development of microglia-targeting adeno-associated viral vectors as tools to study microglial behavior in vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04200-3	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 Hirai H, Fukai Y, Konno A, Hosoi N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Electrophysiological and Imaging Analysis of GFP-Tagged Protein Kinase C Translocation in Cerebellar Purkinje Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cerebellum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12311-022-01384-6	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 Watanabe M, Takahashi N, Hosoi N, Konno A, Yamamoto H, Yasui H, Kawachi M, Horii T, Matsuzaki Y, Hatada I, Hirai H.	4. 巻 119(7)
2. 論文標題 Protein kinase C in cerebellar Purkinje cells regulates Ca ²⁺ -activated large-conductance K ⁺ channels and motor coordination.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2113336119.	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 Ninomiya A, Mshaty A, Haijima A, Yajima H, Kokubo M, Khairinisa MA, Ariyani W, Fujiwara Y, Ishii S, Hosoi N, Hirai H, Amano I, Koibuchi N.	4. 巻 159:112751
2. 論文標題 The neurotoxic effect of lactational PFOS exposure on cerebellar functional development in male mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Food Chem Toxicol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fct.2021.112751.	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 Hoshino Chiaki, Konno Ayumu, Hosoi Nobutake, Kaneko Ryosuke, Mukai Ryo, Nakai Junichi, Hirai Hirokazu	4. 巻 14
2. 論文標題 GABAergic neuron-specific whole-brain transduction by AAV-PHP.B incorporated with a new GAD65 promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00746-1	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5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 細井延武、岡田如弘、深井悠貴、平賀証人、松崎泰教、中井淳一、今野歩、平井宏和
2. 発表標題 microRNAターゲット配列を用いたAAVによる新規なマイクログリア特異的遺伝子発現法の応用例とこの手法の神経細胞への影響について
3. 学会等名 日本生理学会大会第100回記念大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 細井延武、二ノ宮彩音、小久保倫史、天野出月、平井宏和、鯉淵典之
2. 発表標題 甲状腺ホルモンシグナルによる小脳シナプス可塑性の調節メカニズム
3. 学会等名 第99回日本生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Nobutake Hosoi, Koji Shibasaki, Teiichi Furuichi, Hirokazu Hirai, Tetsushi Sadakata
2. 発表標題 Deletion of class II ARFs causes tremor by disruption of Nav1.6 localization to the axon initial segment of cerebellar Purkinje cells in mice
3. 学会等名 FENS 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井延武、柴崎貢志、古市貞一、平井宏和、定方哲史
2. 発表標題 Insufficiency of class II ARFs causes tremor by impairment of Nav1.6 localization to the axon initial segment of cerebellar Purkinje cells in mice
3. 学会等名 生理研研究会 2020 シナプス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井延武、柴崎貢志、古市貞一、平井宏和、定方哲史
2. 発表標題 クラスIIARFはNav1.6を小脳プルキンエ細胞の軸索初節部に局在させる新規な役割を持つ
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会 Web開催 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>甲状腺ホルモンが小脳機能の発達に不可欠であることを発見 https://www.med.gunma-u.ac.jp/news/10403</p>

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------