

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02598

研究課題名(和文) 海馬苔状線維シナプスにおける伝達効率の制御とその機能的意義

研究課題名(英文) Regulation of hippocampal mossy fiber synapses and its functional significance.

研究代表者

坂場 武史 (SAKABA, TAKESHI)

同志社大学・脳科学研究科・教授

研究者番号：80609511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：海馬苔状線維シナプスにおける伝達効率の制御機構の研究として、長期シナプス増強のメカニズムを電気生理学と超解像顕微鏡を組み合わせ解析した。光遺伝学的な方法でシナプス前終末を刺激することで長期増強を誘導し、その後、直接パッチクランプ法でシナプス前機能の変化を計測した。活動電位やCaチャンネル電流といった終末電気特性に変化がなかった。一方でシナプス小胞の開口放出確率が上昇した。超解像顕微鏡でシナプス前終末のactive zoneタンパク質を構成するMunc13-1やRIM1の集積が見られた。よって、active zoneタンパク質のダイナミックな分布変化が長期増強のメカニズムであると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経シナプスはms以内で神経間の伝達を高速で担う一方で、秒から時間の単位で伝達効率ダイナミックに変化し、素子レベルでの学習・記憶を担っている。本研究では、シナプス後性より理解が立ち遅れていたシナプス前性の長期シナプス増強現象の分子細胞メカニズムを、分子細胞レベルで明らかにするという基礎神経科学としての意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have examined the mechanisms of long-term potentiation (LTP) at rodent hippocampal mossy fiber synapses, in order to understand how the synaptic strengths are regulated in an activity-dependent manner. We have opto-genetically stimulated mossy fibers to induce LTP, and applied direct presynaptic patch clamp afterwards to elucidate presynaptic changes after LTP. Electrical properties such as action potential waveform and Ca currents were unchanged. Capacitance measurements showed that the release probability of synaptic vesicles was increased after the induction of LTP. Super-resolution microscopy has shown the accumulation of Munc13-1 and RIM1 at the active zones. Taken together, we have shown that the distribution of active zone scaffold proteins dynamically changed upon LTP, which might underlie the presynaptic plasticity at mossy fiber synapses.

研究分野：神経生理学

キーワード：シナプス 神経機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シナプス伝達においては、活動電位のシナプス前終末への到達に伴う Ca 流入によってシナプス小胞が形質膜融合をする。細胞外に放出された神経伝達物質がシナプス後部に作用することで伝達が起こる。シナプス伝達は、ms 以内の高速で起こる一方、秒、分、時間単位で伝達効率がダイナミックに変化する(短期・長期可塑性)。また、シナプス間でも伝達効率には大きな違いがある(多様性)。このような可塑性、多様性は脳神経回路の情報伝達の鍵となると考えられるが、分子細胞メカニズムがわかっておらず、それゆえに選択的な操作が難しく、機能的な意義を直接的に問うことは現在でも難しい。

げっ歯類海馬苔状線維 - CA3 シナプスは、海馬の歯状回 - CA3 - CA1 という重要な情報伝達経路の一部を構成している。一方で、苔状線維シナプス前終末は直径 5 μm ほどの大きさを持ち、直接パッチクランプが可能であるという特徴を持つこと (Geiger and Jonas, 2000)。短期・長期に顕著なシナプス増強現象を示すことから (Weisskopf et al., 1994; Salin et al., 1996)、直接パッチクランプ記録によって、シナプス可塑性を研究するには優れた標本であると考えられる。これまでの研究で、単離シナプス前終末標本と全反射蛍光顕微鏡を組み合わせることでシナプス小胞のダイナミクスを調べるとともに、スライス標本における電気生理学を組み合わせる研究をおこなった。この結果、短期・長期増強にとって重要なシグナル因子である cAMP 濃度上昇に伴って、シナプス小胞の伝達物質放出確率が上昇することを示した (Midorikawa and Sakaba, 2017)。

シナプス前終末内の cAMP 濃度上昇が上昇したときの伝達物質放出増強のメカニズムを詳細に明らかにするために、forskolin の細胞外投与、あるいはパッチ電極を介したシナプス前終末への cAMP 導入による効果を検討した。単離シナプス前終末標本で、全反射蛍光顕微鏡を用いた解析を行った。この方法では、ガラス面に張り付いた形質膜付近の Ca 濃度やシナプス小胞ダイナミクスを計測することができる。苔状線維シナプス前終末を急性単離して、終末 Ca 濃度を測定したところ、脱分極によって生じる局所 Ca 濃度高領域 (Ca ホットスポット) の濃度がより高く上昇していることがわかった。同時に Ca チャネル電流を測定したところ、電流量そのものは変わらないことがわかった。よって、Ca チャネルが局所的に active zone 付近に集積しているのではないかと仮説を得た。さらに、Ca チャネル集積の可能性を直接検証するため、超解像 STED 顕微鏡による解析をベルリン自由大学 Sigrüst 研究室においておこなったところ、実際に Ca チャネル集積を確認することができた (Fukaya et al., 2021)。

しかし、シナプス前終末内の強制的な cAMP 濃度上昇ではなく、生理的条件、つまり活動電位に伴う Ca 流入によるアデニル酸シクラーゼを介した cAMP 濃度上昇によった場合、どのような分子細胞メカニズムで伝達物質放出量の増大をもたらすかは未解明のままであった。cAMP 依存性の可塑性として長期シナプス増強 (LTP: Long-Term Potentiation) や短期シナプス増強の一種である Post-Tetanic Potentiation (PTP) が知られている。しかし、その分子細胞メカニズムは未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、げっ歯類海馬苔状線維 - CA3 錐体細胞間のシナプスにおいて、生理的な条件での cAMP 濃度上昇に伴って、どのようなメカニズムでシナプス伝達効率が上昇するかを明らかにすべく、特に連発の活動電位刺激で惹起される長期シナプス増強 (LTP) を例として、そのメカニズムを解明することを主要な目的とした。

3. 研究の方法

ラット・マウスの急性海馬スライス標本を作成した。スライス標本では、苔状線維シナプス前終末や CA3 錐体細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電位固定下でシナプス前終末電流やシナプス後電流を測定した。膜電位や活動電位を測定する場合には、パッチクランプ法の電流固定 (カレントクランプ) で測定した。

シナプス前終末の開口放出量を測定する場合、膜電位固定下で膜容量測定法をシナプス前終末に適用し、脱分極パルスの持続時間を変化させたときの膜容量上昇量を計測した。シナプス後電流は、主として、苔状線維電気刺激やシナプス前終末の脱分極で測定した。光遺伝学的方法を用いる場合は、AAV を用いてチャンネルロドプシンの一種である Chronos を歯状回顆粒細胞に発現させ、歯状回や苔状線維の光刺激でシナプス応答を誘発させた。このときのシナプス応答は fEPSP (field Excitatory Post-Synaptic Potential) として計測した。この標本で連発光刺激による LTP 誘導後にシナプス前終末からの直接パッチクランプ記録を行った。

Ca チャネルや伝達物質放出タンパク質のシナプス前終末内の分布や位置関係を調べる場合は、共同研究で超解像 STED 顕微鏡を用いて可視化した。

4. 研究成果

(1) LTP における伝達物質放出増大のメカニズム (Fukaya et al., 2023, *Science Advances*)

cAMP 依存性の可塑性のうち、もっとも顕著な可塑性である LTP についてメカニズムを解明

する研究をおこなった。

ラット海馬歯状回顆粒細胞に AAV でチャンネルロドプシンの一種である Chronos を発現させた。急性スライス標本でまず、苔状線維 - CA3 シナプス間で LTP が光刺激で起こるかどうかが確かめた。苔状線維付近で fEPSP を記録し、単発光刺激を顆粒細胞ないし苔状線維に与えてベースラインを測定した。その後、バースト光刺激を与えたところ、fEPSP が顕著な増大を示した。この増大は数分程度で減衰したが (PTP)、2 倍程度の増大がその後も 30 分 ~ 1 時間程度持続した (LTP)。苔状線維の電気刺激によって誘発される PTP・LTP と同様に、光依存性 PTP・LTP も PKA (Protein Kinase A) 阻害剤でブロックされた。さらに、苔状線維シナプス由来の fEPSP であることを確認するために、苔状線維シナプス応答を抑制する mGluR アゴニスト・DCG を投与したところ、fEPSP が抑制された。以上の実験によって、光刺激によって電気刺激と同様な LTP を誘導できることがわかった。

この系を用いて、シナプス前終末直接記録によって、LTP のシナプス前性メカニズムを詳細に調べた。活動電位の波形の変化は Ca 流入量を大きく変化させ、伝達物質放出を増強する (Geiger and Jonas, 2000)。まず、LTP によって、活動電位の波形が変化したかを明らかにするために、シナプス前終末にパッチクランプを行い、カレントクランプで活動電位の波形をモニターした。LTP 誘導後にパッチクランプをすると、活動電位の振幅、半値幅には変化がなかった。静止膜電位は若干の上昇を示したが、上昇は伝達物質放出量の増大を説明するレベルには達しなかった。膜電位固定下で脱分極パルス時に測定できる Ca チャネル電流量も変化がなかったため、LTP 誘導後に Ca チャネルの発現量が修飾される可能性は否定された。これらの結果から、終末の電気的な特性は LTP によって変化しなかったと考えられた。

開口放出したシナプス小胞の数を計測するために、シナプス前終末に膜容量測定法を適用し (Lindau and Neher, 1988) LTP 前後での比較をおこなった。コントロール条件下では、シナプス前終末の脱分極の持続時間を系統的に増加させると、累積の開口放出小胞数を表す脱分極に伴う膜容量上昇値が持続時間延長に伴って増加した。しかし、開口放出可能な小胞プール (RRP: Readily-Releasable Pool of synaptic vesicles) が枯渇するため、ある持続時間以上 (20 ms 以上) では大きくはならなかった。膜容量上昇値の時間経過は指数関数で近似でき、振幅が RRP の大きさを、時定数が開口放出確率の指標となる。また、持続時間をさらに長くすると、RRP への新たに動員されたシナプス小胞の開口放出を反映した膜容量上昇値の緩やかな直線的な増加が見られた。LTP 誘導後は、RRP の大きさは変わらなかったが、より短い持続時間の脱分極パルスでより大きな膜容量上昇が見られた。時間経過としては時定数が小さくなった。これは LTP 誘導によって、RRP の大きさは変化せず、開口放出確率が上昇したためであると考えられた。シナプス前終末内に Ca 緩衝剤の EGTA を高濃度で導入して、開口放出量の抑制を調べた。EGTA の抑制効果が変化したことは放出可能シナプス小胞 (伝達物質放出部位) と Ca チャネル (クラスター) の機能的なカップリングの変化を示唆する。LTP 誘導後も同様に EGTA が放出への抑制効果に変化がなかったため、カップリングの変化が LTP のメカニズムではないことがわかった。これは、cAMP 濃度の終末内強制上昇の場合とは異なる結果であった (Midorikawa and Sakaba, 2017, *Neuron*; Fukaya et al., 2021, *PNAS*)。

さらに、長い持続時間のパルスで膜容量上昇の値が LTP 誘導後で大きくなる傾向が見られた。ため、シナプス小胞の RRP への動員速度の増加が示唆された。そこで RRP を枯渇する 20 ms の持続時間の脱分極パルスを連発で与えることで、小胞動員速度について限定して調べる実験を行ったところ、LTP 誘導後に小胞動員が促進されていることがわかった。

Ca チャネルや伝達物質放出タンパク質の終末内分布を調べるために、超解像 STED 顕微鏡を用いた可視化を行った。LTP 誘導後、Ca チャネルの量、分布に変化はなかった。一方で、開口放出のための分子的な準備を行う、プライミングタンパク質である Munc13-1、RIM1 のおそらく active zone 付近での集積が LTP 誘導後で起こっていた。Ca チャネルと Munc13-1、RIM1 との位置関係には大きな変化がなかった。このことは、プライミングタンパク質の集積によって、開口放出確率が上昇している可能性があることを示す。つまり、LTP は cAMP 濃度上昇と PKA の活性化を介して、Munc13-1、RIM1 の集積をもたらし、伝達物質放出を増大させる可能性を示唆する (図 1)。

以上の研究から、いくつかの疑問点が残る。Munc13-1/RIM1 の集積は RRP の増加を示すと考えられているが (Sakamoto et al., 2018) 今回の実験結果からは放出確率の上昇が示唆される。これが苔状線維シナプス特有のものなのか、一般性を持つものか、疑問が残る。また、脱分

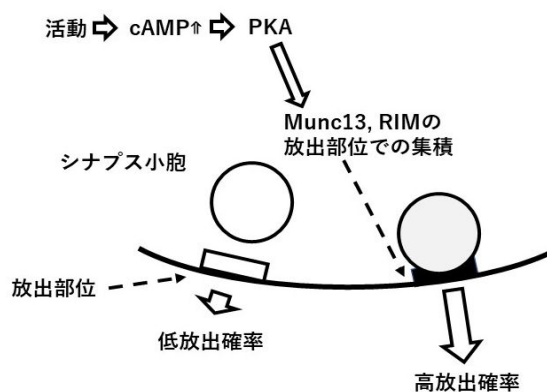


図 1 : 今回の研究でわかった苔状線維シナプスにおけるシナプス前性 LTP のメカニズム

極パルスによって得られる RRP は、活動電位などで得られる RRP とは異なるのではないかと考えられる (Neher and Brose, 2018; Miki et al., 2022)。つまり、形質膜に密着している小胞と、やや離れている小胞の 2 つが RRP に含まれている可能性である。生理的な刺激では前者のみが開口放出する可能性がある。さらに、LTP 誘導によって、高頻度刺激による Ca 流入と cAMP 濃度上昇、PKA 活性化まではわかっているものの、その後、どのように Munc13-1/RIM1 の集積に至るかがわかっていない。この点については今後の研究が必要である。特に、終末内の強制的な cAMP 濃度上昇では Ca チャネル集積をもたらすが (Fukaya et al., 2021, *PNAS*)、LTP では Munc13-1/RIM の集積をもたらす。この違いがどこに起因するのか、生理的な意義は何か、今後のさらなる解明が必要である。以上の研究を論文として公刊し、またこの研究成果をベースに、シナプス可塑性に関する総説を出版した (Fukaya et al., 2023, *Front. Cell Neurosci.*)。

(2) RIM-BP2 によるシナプス前終末 Ca チャネル制御

この他の研究として、シナプス前終末 active zone scaffold を構成する RIM-BP2 の KO マウスを用いて (ベルリン自由大学などからの供与)、苔状線維シナプス前終末における RIM-BP2 の役割を電気生理学と超解像 STED 顕微鏡を組み合わせで調べた。RIM-BP2 はシナプス前終末 active zone において Ca チャネル集積と開口放出プライミング機能の双方を制御する可能性が示唆された (Miyano et al., 2024, *eLife*)。

(3) 苔状線維 - CA3 介在抑制神経細胞シナプスの伝達特性の解析

苔状線維は CA3 錐体細胞に大型のシナプス前終末を形成するが、抑制性の介在神経細胞に対しては小型シナプスを形成することが知られている。このシナプスの基本的な特性を解析するために統計的な解析法を適用したところ、シナプス小胞の放出部位へのドッキング確率と、小胞の開口放出確率の双方が非常に高かった。よって、同じシナプス終末からのシナプスでも、放出確率が低いことで知られる苔状線維 - CA3 錐体細胞シナプスとはまったく異なる性質を持つことが示唆された (Tanaka et al., 2021, *J. Physiol.*)。

(4) その他

その他、乳頭体から海馬歯状回への入力シナプスの可塑性メカニズムに関して研究を行った (Tabuchi et al., 2022, *PNAS*; Hirai et al., 2022, *Cell Reports*)。また、中枢シナプスのシナプス前終末の伝達物質放出機構、シナプス小胞プールに関して総説を出版した (Miki et al., 2022; 三木、坂場, 2023)。

(5) 今後の展望

以上のように、今回の基盤研究(B)の研究期間中にシナプス前性 LTP のメカニズムに関して、電気生理学と超解像光学顕微鏡を用いた解明が進んだ。電気生理学は時間分解能に優れており、神経機能を直接計測できる利点があり、これと分子実体を nm レベルで解明できる超解像光学顕微鏡との組み合わせは有用である。一方で、本研究では、高頻度刺激によって、“人為的”に LTP を誘導している。生理的な条件下、つまり生体で起こっている神経発火パターンでどのような可塑性が起こっているか、また分子細胞メカニズムはどのようなものか、解明は今後の課題である。原理上、特に線形システムでは、時間周波数、持続時間依存性を系統的に調べれば、どのような可塑性でも予測可能ではある。しかし、シナプスは非線形素子であり、シナプス前後部の発火パターンの組み合わせによってさまざまな可塑性が誘発されることが知られている。よって、この問題は別途検証しなければわからない。また、短期可塑性 (PTP など) では、PKA 依存性は確認できたが、それ以上のメカニズムは現在でも不明な点が多い。時間軸が異なる短期可塑性、長期可塑性のメカニズムを統合的に理解することが今後、重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyano Rinako, Sakamoto Hirokazu, Hirose Kenzo, Sakaba Takeshi	4. 巻 12
2. 論文標題 RIM-BP2 regulates Ca ²⁺ channel abundance and neurotransmitter release at hippocampal mossy fiber terminals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP90799
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.90799	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 Fukaya Ryota, Miyano Rinako, Hirai Himawari, Sakaba Takeshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Mechanistic insights into cAMP-mediated presynaptic potentiation at hippocampal mossy fiber synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1237589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2023.1237589	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 Fukaya Ryota, Hirai Himawari, Sakamoto Hirokazu, Hashimotodani Yuki, Hirose Kenzo, Sakaba Takeshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Increased vesicle fusion competence underlies long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadd3616
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.add3616	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 Hirai Himawari, Sakaba Takeshi, Hashimotodani Yuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Subcortical glutamatergic inputs exhibit a Hebbian form of long-term potentiation in the dentate gyrus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111871 ~ 111871
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111871	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 Tabuchi Eri, Sakaba Takeshi, Hashimotodani Yuki	4. 巻 119
2. 論文標題 Excitatory selective LTP of supramammillary glutamatergic/GABAergic cotransmission potentiates dentate granule cell firing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences USA	6. 最初と最後の頁 e2119636119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2119636119	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 Tanaka Mamoru, Sakaba Takeshi, Miki Takafumi	4. 巻 599
2. 論文標題 Quantal analysis estimates docking site occupancy determining short term depression at hippocampal glutamatergic synapses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 5301 ~ 5327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP282235	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 三木 崇史, 坂場 武史	4. 巻 74-1
2. 論文標題 顆粒放出機構 (特集 シナプス) 分担	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学 医学書院	6. 最初と最後の頁 27 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 坂場 武史
2. 発表標題 シナプス伝達の電気生理学 (教育講演)
3. 学会等名 日本神経科学大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 SAKABA, T
2. 発表標題 Synaptic vesicle pools at mammalian central synapses
3. 学会等名 2021 Annual meeting of Korea Society for Brain and Neural Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Takafumi Miki, Yuki Hashimotodani, Takeshi Sakaba	4. 発行年 2022年
2. 出版社 IOP Publishing Ltd	5. 総ページ数 15
3. 書名 Synaptic vesicle dynamics at the calyx of Held and other central synapses. In Exocytosis: From Molecules to Cells (pages13)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社大学大学院脳科学研究科 https://brainscience.doshisha.ac.jp/

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