

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19360

研究課題名（和文）軸索終末の入力受容能の獲得による新規長期可塑性の分子機構

研究課題名（英文）Molecular Mechanism of sustained plasticity at axon terminals through acquisition of input recognition

研究代表者

川口 真也（Kawaguchi, Shin-ya）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：00378530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：全か無の法則で説明される高信頼性の神経軸索における活動電位伝導による情報の伝わり方が、活動に依存して変化すること、およびその結果として終末部からのシナプス出力が動的に変化することを明示し、さらにはそのメカニズムを明らかにすることを目指して研究を進めてきた。本研究により、小脳抑制性介在神経細胞やプルキンエ細胞において、活動依存のあるいは細胞内シグナルの変化により活動電位伝導や終末部のCaチャンネルの状態が変化し、シナプス出力が動的に調節されることを明らかにした。また想定外の研究展開として、膜電位蛍光イメージング技術を向上させ、海馬錐体細胞の樹状突起でユニークな膜電位変化の非線形増幅を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の神経細胞における情報処理は、脳神経系での情報処理の最も根幹をなす重要な要素であるが、技術的境界のためにあいまいな理解のままであった。本研究では、その困難を乗り越える技術的な発展を蛍光イメージングと精細な電気生理学実験を駆使して実現し、神経細胞のユニークな情報演算および修飾メカニズムを複数同定することに成功した。こうした学術的成果は、現代社会が抱える様々な神経系のはたらきの不調の理解やその対処法を模索するための基礎的な知見を整備する意義があり、また得られた技術的な進展が今後の脳神経系の基礎および応用面で広範な波及効果を発揮する可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：This project has aimed to shed light on the dynamic behaviors and mechanisms of synaptic outputs from axon terminals through activity-dependent modification of all-or-none type of high fidelity information transfer in neuronal axons based on action potential conduction. Our studies on inhibitory interneurons and Purkinje cells in the cerebellum have shown that synaptic outputs dynamically change in size through altered action potential conduction pattern and/or transient modification of Ca²⁺ channel states in a manner dependent on neuronal activity and/or intra-cellular signaling pathway. In addition, unexpectedly, development of fluorescent imaging technique for membrane potential has enabled us to identify a novel supra-linear amplification of dendritic voltage fluctuation at distal dendrite in hippocampal pyramidal neurons.

研究分野：神経生物学

キーワード：シナプス 膜電位イメージング 軸索 樹状突起 パッチクランプ Ca²⁺チャンネル シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

スペインの解剖学者ラモン・イ・カハールは、120年以上も前に精巧な解剖スケッチから神経系の基本単位「ニューロン」の概念を生み出し、樹状突起 細胞体 軸索 終末へと一方向性に情報が流れることを提示した。この神経細胞における情報の流れは、高校教科書でも説明される基礎的概念である。樹状突起・細胞体で多くのシナプス入力を統合し、全か無の活動電位を忠実に軸索終末まで届け、多くの細胞へ等しく出力を伝達することが、単一神経細胞の基本的なはたらきである。その正当性は膨大な研究により支持され、現代神経科学はこの基本概念の上に立脚している。しかし、軸索が通常1ミクロン程の微小構造で1ミリ秒に満たない活動電位を伝える高速機能部位であるため、そのはたらきを直接捉えることは技術的に難しく、軸索での情報伝播の忠実性については精密に実証できないまま、例外的に巨大な標本で得られた知見を一般化して信じられてきたのが実際である。一方で、研究代表者らは、げっ歯類の小脳プルキンエ細胞や顆粒細胞の1~2ミクロンの軸索・終末から直接パッチクランプ記録を行うことに成功し、軸索での情報伝播が必ずしも高信頼性ではなく、状況に応じて情報の伝わり方が変わり、終末からのシナプス出力が動的に変化することを示してきた。また、イオンチャンネル型伝達物質受容体が軸索にも局在し、その活性により終末からの伝達が調節されることも分かってきた。したがって、全か無の法則として教科書で説明されるより、ずっと軸索・終末での情報伝達は動的に変動する余地があり、それが単一神経細胞全体およびネットワークの情報処理にも影響する可能性がある。さらに代表者らは、細胞膜電位の蛍光イメージング技術の開発・改良に取り組んでおり、その質の向上に伴い、軸索や樹状突起など神経細胞の微小な構造体での膜電位変化を定量的に捕捉することもできるようになっており、それを駆使すればこれまで知りようもなかった神経細胞の微小部位ごとの動的な膜電位変化の実態に迫ることが可能になりつつあった。

2. 研究の目的

神経細胞において唯一の軸索が分岐してできる多くの終末は、全か無の法則により同じ情報を出力すると考えられている。情報の出力に特化した軸索終末が神経活動依存的に機能変化することにより、細胞内での情報処理が動的に調節される可能性について、微小な部位からの電気生理学記録と最先端光技術を駆使した実験により検証し、軸索での可塑性がいかにか細胞の情報処理を変化させるかの全容と分子メカニズムを解明することを目指した。また、その神経細胞における1方向性の情報処理が、神経活動依存的に長時間にわたり多方向化する、という斬新な長期可塑性を同定してそのメカニズムを解明し、神経回路の作動原理の基礎的理解を革新することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

動物の記憶・学習に寄与するシナプス可塑性が起こる神経細胞として盛んに研究されてきた小脳プルキンエ細胞および海馬錐体神経細胞の初代分散系を主に標本として用いて、細胞体から遠く離れた軸索や樹状突起での電氣的活動を膜電位蛍光イメージングや直接パッチクランプ法適用により記録する。膜電位イメージングについては、代表者自らがプローブの独自改良に取り組み、神経細胞の細胞体・樹状突起、さらには2μm程の微細な軸索やその終末からシナプス伝達や活動電位を非侵襲に蛍光検出できるようにした最先端技術を適用する。また神経細胞に局所的な刺激を与えるために、ケージドグルタミン酸やケージドGABAなど紫外光(405nm)により活性化する分子を用いて、レーザースポット照射(径1-2μm)による局所での伝達物質の生成を行う。そこで生じる膜電位変化に応じた蛍光タンパク質の輝度変化を、高感度sCMOSカメラにより経時観察し、神経細胞の多点での電氣的応答の変化を定量的に記録する。

上述の実験により得られる膜電位変化の空間伝播パターンや、それに応じたシナプス出力の変化に関する分子メカニズムなど、数理的なモデルを構築してシミュレーション解析し、実験データの背景にある仕組みの本質を抽出する。

4. 研究成果

(1) 小脳抑制性介在神経細胞の軸索でのアナログ的情報伝達修飾メカニズム

小脳の抑制性介在神経細胞における活動電位の伝導について、初代分散培養および急性スライス標本を用いて直接パッチクランプ記録を軸索に適用し、活動電位自体が極めて安定に伝導し、変化する余地は極めて少ないことを明らかにした。一方で、抑制性介在神経細胞は比較的軸索が短いため、樹状突起や細胞体の膜電位変化が直接軸索の内部まで減衰しながらも届き、軸索で活動電位が発生する直前や直後に静止膜電位を数ミリボルト程度変動させることも、直接的な電気記録により明らかになった。そうした僅かな膜電位の変動が終末に伝わった場合、終末部の電位依存性Ca²⁺チャ

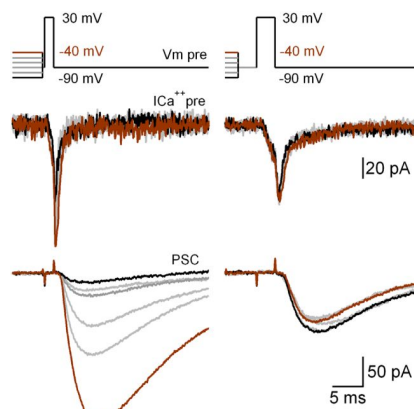


図1 軸索終末の微小な膜電位変化に応じたシナプス機能の修飾 (文献1より)

ネルの電位センサーに部分的な状態変化を引き起こし、その効果が数ミリ秒間にわたり履歴として残存し続けるため、活動電位そのものが同じ大きさ・かたちで軸索終末に到達した場合であっても Ca^{2+} チャネルの活性化確率は変化し、終末からの伝達物質放出が影響されることを示した(図1)。これら一連の実験結果は、活動電位自体が変化しない安定性の高い情報の伝送を行う軸索であったとしても、高頻度の活動電位到達は Ca^{2+} チャネルの状態変化の形でごく短時間にわたりその活動状況履歴を残存させることで、随時 Ca^{2+} 流入を変化させてシナプス出力を動的に変化させるという新しい短期シナプス可塑性メカニズムを示すもので、その研究成果については、eLife 誌に発表した。(文献)。

(2) 小脳プルキンエ細胞の軸索における cAMP による興奮伝導および出力の動的調節

中枢神経系の多くの神経シナプスにおいて、細胞内セカンドメッセンジャーの cAMP 生成はシナプスでの情報伝達をシナプス前性に増強し、さらに最近では軸索での活動電位の伝導速度を変化させることも報告が集まりつつある。そこで、プルキンエ細胞において cAMP 濃度上昇が軸索およびその終末でどのように情報処理に影響するかについて、直接パッチクランプ記録を駆使して検討した。その結果、プルキンエ細胞においては cAMP 上昇は、軸索での Na^+ チャネル電流を低減させることにより活動電位の大きさを減弱させ、その結果、活動電位の伝導が遅くなり、またシナプス前部での Ca^{2+} 流入を弱めることでシナプス伝達を負に調節する、という意外性の高い知見を得た。一方で多くのシナプスでも見られるように、cAMP は直接的にシナプス前部での小胞エキソサイトーシスを増強する作用も引き起こすため、プルキンエ細胞からの出力は、細胞体からそのシナプス前部までの軸索の長さに依存して増大するか、減弱するか、という動的調節が実現すると結論された。本研究成果については、プレプリントを bioRxiv にて公開済みである (文献②)。

(3) 小脳プルキンエ細胞の軸索終末におけるカナビノイドによる新規の伝達調節メカニズム

軸索終末からの伝達物質放出は、多くの神経細胞において大麻成分に含まれるカナビノイドの受容体 (CB1, CB2 など) の活性化により負に調節される。一方で、近年 GPR55 と名付けられた第三のカナビノイド受容体が同定されたものの、そのシナプス伝達調節への関与はあまり理解が進んでいなかった。この GPR55 がプルキンエ細胞に発現している可能性があるため、その軸索終末での伝達物質放出を変化させるか否かを直接パッチクランプ記録や、蛍光イメージングによる膜融合量の動学的解析を行った。その結果、CB1 や CB2 の良く知られたはたらきと同様に、GPR55 はプルキンエ細胞において伝達物質放出を負に調節すること、ただしそのメカニズムは他の受容体で言われる Ca^{2+} チャネルの負の調節ではなく、放出可能なシナプス前小胞の動的変化によることが分かってきた。これは、軸索部の受容体活性化に応じたシナプス伝達の調節に関して、これまで例がない画期的で強力なメカニズムの同定に相当し、その更なる解析を続けている。なお本研究内容は、同研究室の井下拓真助教との共同研究である。

(4) 海馬錐体細胞の樹状突起における興奮伝播の非対称性

膜電位蛍光イメージングプローブの性能向上を達成した技術的成果を、プルキンエ細胞から海馬錐体細胞へも展開し、興奮性入力応答が樹状突起でどのように処理されるかを検討した。ケージドグルタミン酸の局所光活性化による興奮性シナプス後電位を樹状突起に惹起し、その脱分極が細胞内でどのように空間的に広がるかをイメージング解析した。通常、閾値に達しない脱分極性の膜電位変化は、その部位から周囲へ次第に減弱しながら伝播すると考えられているが、驚くべきことに刺激部から細胞体とは反対方向へ脱分極応答が増大しながら伝わることを示唆された。この興味深い現象について、分子メカニズムを徹底的に追究し、樹状突起の遠位部では静止膜電位が細胞体付近より深くなっており、それが細胞膜の Cl^- 透過性により実現すること、それらが興奮性シナプス後電位により減弱するために、結果として脱分極が突起遠位で増大しやすくなることなどを明らかにした。これら一連の新規性の高い細胞局所での信号増幅メカニズムについては、数多くの学会発表をおこない、bioRxiv でプレプリントとして公開し(文献)、最終的には Science Advances 誌に受理された(文献)。

<引用文献>

Trigo Federico, Kawaguchi Shin-ya. Analogue signaling of somatodendritic synaptic activity to axon enhances GABA release in young cerebellar molecular layer interneurons. eLife, 10.7554/eLife.85971. (2023).

Furukawa Kei, Inoshita Takuma, Kawaguchi Shin-ya. Timing Control of Purkinje Cell Outputs by Dual cAMP Actions on Axonal Action Potential and Transmitter Release. bioRxiv. 10.1101/2023.09.14.557678. (2023)

Morita Masato, Higashi Reo, Kawaguchi Shin-ya. Cl⁻-dependent amplification of excitatory synaptic potentials at distal dendrites revealed by voltage imaging. bioRxiv. 10.1101/2023.05.29.542696 (2023).

Higashi Reo, Morita Masato, Kawaguchi Shin-ya. Cl⁻-dependent amplification of excitatory synaptic potentials at distal dendrites revealed by voltage imaging. Science Advances, in press. (2024).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Higashi Reo, Morita Masato, Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 in press
2. 論文標題 Cl-dependent amplification of excitatory synaptic potentials at distal dendrites revealed by voltage imaging	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	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） なし	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 Trigo Federico, Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 12
2. 論文標題 Analogue signaling of somatodendritic synaptic activity to axon enhances GABA release in young cerebellar molecular layer interneurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.85971	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 Furukawa Kei, Inoshita Takuma, Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 -
2. 論文標題 Timing Control of Purkinje Cell Outputs by Dual cAMP Actions on Axonal Action Potential and Transmitter Release	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.09.14.557678	査読の有無 無
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 Morita Masato, Higashi Reo, Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 -
2. 論文標題 Cl-dependent amplification of excitatory synaptic potentials at distal dendrites revealed by voltage imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2023.05.29.542696	査読の有無 無
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 Trigo Federico F., Kawaguchi Shin-ya	4. 巻 -
2. 論文標題 Analogue signaling of somato-dendritic synaptic activity to axon enhances GABA release in young cerebellar molecular layer interneurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.10.18.512768	査読の有無 無
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

〔学会発表〕 計27件(うち招待講演 3件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 東 玲於、川口 真也
2. 発表標題 蛍光膜電位イメージングが見せた小脳プルキンエ細胞におけるシナプス入力の時空間演算
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川 慧、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞においてcAMPが活動電位およびシナプス出力を制御する生物物理機構
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 異なるカナビノイド受容体によるプルキンエ細胞シナプスでの対照的な伝達物質放出調節
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大川 理久、川口 真也
2. 発表標題 蛍光プローブによる小脳LTDの発現空間パターン可視化
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬 綾汰、川口 真也
2. 発表標題 瞬目反射条件付けは対刺激の比率を下げても成立する
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本 優友、川口 真也
2. 発表標題 海馬シナプス長期増強を反映する蛍光プローブの空間集積
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 雅登、川口 真也
2. 発表標題 樹状突起におけるシナプス入力の非対称性修飾を介した時空間統合の動的特性
3. 学会等名 第46回神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大川理久、川口真也
2. 発表標題 樹状突起における高頻度グルタミン酸入力後の局所持続的カルシウム上昇
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉本優友、川口真也
2. 発表標題 海馬における LTP シナプスの長期可視化
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 岩瀬綾汰、川口真也
2. 発表標題 対刺激比率が低い場合の瞬目反射条件付けの成立
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川口 真也
2. 発表標題 Asymmetric spread of membrane potential changes in neuronal dendrites
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 真也
2. 発表標題 Spatial pattern of LTD establishment in a cerebellar Purkinje cell Spatial pattern of LTD establishment in a cerebellar Purkinje cell
3. 学会等名 Hamburg Univ. - Kyoto Univ. Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川口 真也
2. 発表標題 神経細胞での情報演算機構の実計測による革新
3. 学会等名 定量生物の会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 雅登、川口 真也
2. 発表標題 海馬神経細胞の樹状突起における低Cl ⁻ 濃度依存的な興奮性入力の非対称調節
3. 学会等名 生理学研究所 研究会「次世代シナプス生理学による脳神経機能の理解」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 シナプス小胞膜融合のカンナビノイドによる調節の軸索終末パッチクランプ記録による生物物理学的解析
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古川 慧、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞軸索における活動電位伝播と伝達物質放出のcAMPによる修飾
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 雅登、川口 真也
2. 発表標題 海馬神経細胞における樹状突起内での興奮性及び抑制性シナプス入力の独自修飾
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Furukawa, Shin-ya Kawaguchi
2. 発表標題 Impact of cAMP on action potential propagation and synaptic outputs in cerebellar Purkinje cell axons
3. 学会等名 JSPS core to core program symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masato Morita, Shin-ya Kawaguchi
2. 発表標題 Cl-dependent asymmetric propagation of excitatory synaptic inputs in hippocampal neuronal dendrites
3. 学会等名 JSPS core to core program symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井下 拓真、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞終末におけるCB2によるCa ²⁺ 流入減弱を介したシナプス伝達抑制の量的制御
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川 慧、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞における活動電位伝導を支配する膜興奮性のcAMPによる調節
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森田 雅登、川口 真也
2. 発表標題 海馬神経細胞での細胞内Cl ⁻ 濃度に依存した興奮性シナプス入力修飾
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩瀬 綾汰、川口 真也
2. 発表標題 瞬目反射条件付けにおける対刺激比率の変化と学習成立
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大川 理久、川口 真也
2. 発表標題 蛍光プローブによる小脳長期抑圧発現の可視化
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東 玲於、川口 真也
2. 発表標題 小脳プルキンエ細胞における興奮性シナプス後電位の広域伝播
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本 優友、川口 真也
2. 発表標題 海馬神経細胞におけるシナプス長期増強を起こすシグナル経路の長期可視化
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kei Furukawa, Shin-ya Kawaguchi
2. 発表標題 Dual actions of cAMP on action potential and transmitter release in an axon of a cerebellar Purkinje cell.
3. 学会等名 北米神経科学学会 SFN2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 川口 真也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 3
3. 書名 Clinical Neuroscience vol 40, no.8 伝達物質の量子放出の発見	

1. 著者名 川口 真也	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 4
3. 書名 生体の科学 74(1) 抑制性シナプスの機能設計	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	井下 拓真 (Inoshita Takuma)		

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		
ウルグアイ	Biol Res Ins Clemente Estable		