

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300144

研究課題名(和文) 神経伝達物質放出における律速段階の解明

研究課題名(英文) Rate-limiting steps in transmitter release

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) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：主な成果は次のようなものである。(1) 聴覚系カリックス型シナプスにおいて伝達物質放出の律速段階として、伝達物質放出部位再利用過程(Sakaba et al., 2013, PNAS)とシナプス小胞の分子プライミング(Lipstein et al., 2013, Neuron)の双方が重要であることが示唆された。(2) 抑制性プルキンエ細胞出力シナプスで、シナプス前終末での活動電位振幅の減衰がシナプス伝達を短期的に抑圧するというメカニズムを明らかにした(Kawaguchi and Sakaba, 2015)。興奮性シナプスのように伝達物質放出機構が短期抑圧を規定していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have obtained the following new findings during the support period. (1) At the calyx of Held synapse in the auditory brainstem, we found that Intersectin, an endocytotic protein, is involved in synaptic vesicle replenishment (Sakaba et al., 2013, PNAS), suggesting tight coupling between exo- and endocytosis. In addition, using KI mice, we found that Munc13-1 is the downstream target of calmodulin and regulates synaptic vesicle replenishment and recovery from short-term synaptic depression (Lipstein et al., 2013, Neuron). (2) At the Purkinje cell output synapse, we have performed direct presynaptic recordings and found that action potential attenuation specifically at the presynaptic terminal, but not at the axon, determines short-term synaptic depression (Kawaguchi and Sakaba, 2015, Neuron). Unlike glutamatergic synapses, synaptic vesicle dynamics may not be a limiting factor at inhibitory synapses. This issue needs future investigation.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経科学

1. 研究開始当初の背景

脳における神経回路情報処理において化学シナプスは重要な素子である。シナプス前終末への信号入力に伴い、細胞外から Ca^{2+} が流入し、伝達物質を貯蔵するシナプス小胞が形質膜に融合する。細胞外に放出された伝達物質がシナプス後部の受容体に作用することでシナプス伝達がおこる。シナプス後部の受容体の性質、分子機構については解明が進んでいる一方、シナプス前終末は通常形態的に小さく電気生理学的な解析が難しいため、前終末機能の分子と機能を架橋する研究は進んでいない。申請者は例外的に大きな終末をもつラットやマウスの脳幹聴覚伝導路にある calyx of Held シナプスを用いて、伝達物質放出機構の解明を進めてきた(発表文献 Sakaba and Neher, 2001, Neuron; 2003, Nature; Sakaba et al., 2005, Science; Wadel et al., 2007, Neuron; Hosoi et al., 2009, Neuron)。シナプス前終末内において、シナプス小胞は伝達物質放出部位への動員、伝達物質放出への分子的準備(プライミング)、形質膜への融合と伝達物質の細胞外への放出、エンドサイトーシスによる小胞の再回収、伝達物質再充填と小胞再利用への準備、といった一連のサイクルを経ると考えられる。しかし、サイクルのどのステップを遮断しても最終出力である神経伝達は阻害されてしまう。これでは、どの分子がどこに関与するか、また小胞サイクルのどのステップが伝達物質放出速度を決定するボトルネック(律速段階)になるかを同定することが難しい(総説 Neher and Sakaba, 2008, Neuron)。

この問題を克服するため、私たちはシナプス前後部の膜電位固定法、伝達物質放出速度の定量的機能解析(Sakaba and Neher, 2001, J Neurosci)、 Ca^{2+} アンケイジング法、生化学、マウスモデルの解析、数理モデル構築による伝達物質放出機構の推定を多面的に組み合わせ、伝達物質放出過程において小胞サイクルのどの過程が律速段階になるかを調べてきた。従来の仮説では、即時形質膜融合可能なように開口放出関連タンパク質が分子的な準備をする過程(分子プライミング)が律速段階であるとの仮説が有力であった(Sudhof and Rothman, 2009)。私たちはこれに対して、分子プライミングは律速段階ではないことを示した(Wadel et al., 2007, Neuron)。続いて、伝達物質放出部位がシナプス小胞を受容可能な状態か(release site availability)どうかで律速段階になるとの仮説を得た(Hosoi et al., 2009, Neuron)。すなわち、伝達物質放出において、シナプス小胞タンパク質と放出部位タンパク質が会合し形質膜融合をするが、その後、会合したタンパクを解離し、小胞タンパク質を放出部位からエンドサイトーシスによって除去し

て放出部位を再利用する必要がある。放出部位再利用速度が神経伝達速度全体を決定する最大要因であり、その活動依存性の増大や減少が、前終末の連発刺激によって生じるシナプス応答の促進や抑圧といった短期可塑性をもたらすという仮説である。この仮説は新規のものであり、学界でより広く受け入れられるためには更に研究を進め、実証を繰り返すことが重要である。本研究の第一の目的は、この放出部位再利用仮説を軸に、伝達物質放出機構を明らかにしていくことである。特に、(1) 放出部位再利用の分子メカニズムを生化学、遺伝学を組み合わせで検討し、関与する分子複合体を明らかにしていくこと、また、(2) 放出部位再利用やシナプス小胞サイクリングは、電気生理学的に推定された仮説的のものなので、可視化して実証すること、が重要である。伝達物質放出部位は1ミクロン以下の微小なものであり、従来の光学顕微鏡では解像が難しいが、STED 顕微鏡などの新技術は、それを可能にしつつある。

本申請の第二の目的は、シナプス間の機能的な差異がどのようなメカニズムによるのかを、なるべく簡単に説明することである。シナプスは脳部位、シナプス前細胞、後細胞の種類の違いなどによって、シナプス強度、伝達物質放出確率、短期シナプス可塑性などの機能特性が著しく異なることが知られている。このような多様性を媒介するメカニズムに関してはよくわかっていない。律速段階が全体の反応速度を決定するとの作業仮説に立脚すると、各種シナプスにおける機能的な違いを決定するのは、律速段階の特性の差異であると考えられる。例えば、小脳抑制性シナプスとカリックス型シナプスは、連発刺激下でみられるシナプス応答の短期可塑性の時間経過に違いがみられる。申請者は、この違いがシナプス小胞の伝達物質放出部位動員、あるいは、伝達放出部位再利用の Ca^{2+} 依存性の違いである可能性を指摘した(Sakaba, 2008, Neuron)。また、大脳皮質にある小型シナプスにおいて放出部位再利用が短期シナプス可塑性(抑圧、促進現象)にどのような役割を担うかを調べるために予備実験を行っている(Huang et al., 2010, J Neurosci)。これらの研究をさらに発展させ、カリックス型シナプスで明らかにした分子機構と共通のメカニズムで他のシナプスの機能をどこまで説明できるのか、またどこが違うかに重点をおいた研究をおこなう。目的を達成するためには、電気生理学的手法の適用の難しい小型シナプスにカリックス型シナプスと同じレベルで定量的に解析する方法を開発することが必要である。これに関しては、(1) シナプス応答の挙動から内部構造を推定するシナプス応答統計解析法の利用、(2) Ca^{2+} アンケイジング法を用いて単一シナプスを局所刺激するスポットアンケイジング法の利用が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ラットやマウスの脳幹聴覚系カリックス型シナプスを標本とし、伝達物質放出部位再利用過程の実体、およびその分子メカニズムに関して、電気生理学を主軸として明らかにする。具体的な目標として以下の3点を設定する。(1) エンドサイトーシス関連タンパク質を改変したノックアウト/ノックインマウス、生化学的なタンパク質阻害法を併用し、放出部位再利用に關与するタンパク質、あるいはタンパク質複合体を同定していくことを目指す。(2) エンドサイトーシス関連タンパク質を直接可視化することを試みる。放出部位再利用に關わるならば、伝達物質放出部位に局在している可能性がある。このため、共焦点顕微鏡、STED 顕微鏡(共同研究) 全反射蛍光顕微鏡といった高解像度の光学顕微鏡を用いた方法を適用することで解像していくことを目指す。(3) シナプス間の機能的差異、特に短期シナプス可塑性の違いがどのようなメカニズムによっているのか、特にカリックス型シナプスで律速段階だと考えられる放出部位再利用過程がどのような役割を果たすかをカリックス型シナプスと皮質の小型シナプスを比較することによって検討していく。これによって、シナプス可塑性の一般モデル構築へと拡張することを目指す。

3. 研究の方法

ラットおよびマウスの急性スライス標本あるいは培養標本を使用した。脳幹聴覚伝導路にある大型のカリックス型シナプス(calyx of Held)において伝達物質放出部位再利用過程の分子メカニズムの実体を、電気生理学を中心に、マウス遺伝学、生化学、非線形光学顕微鏡、数理モデルを併用して明らかにすることを試みた。電気生理学的手法としては、主にシナプス前終末からの直接パッチクランプ法を用いる。また、シナプスの短期可塑性が伝達物質放出部位再利用の速度に依存するかどうかを、エンドサイトーシス分子の欠失を行うことで検証した。

カリックス型シナプスで得られた知見がシナプス機能一般に適用できるのか、あるいは伝達物質放出メカニズムが異なっている場合、それがシナプス機能の多様性をもたらすものなのか、といった問題を明らかにするために、小型シナプスで併行して実験をおこなった。具体的には小脳皮質のプルキンエ細胞-深部小脳核神経細胞のシナプスにおいて、シナプス前終末から直接記録することを試みた。

4. 研究成果

3年間の研究によって、カリックス型シナプスにおいて伝達物質放出の律速段階として、伝達物質放出部位再利用過程とシナプス

小胞の分子プライミングの双方が重要であることを示唆する実験結果を得た。また、抑制性であるプルキンエ細胞出力シナプスで、シナプス前終末での活動電位振幅の減衰が短期シナプス抑圧現象をもたらすという短期シナプス可塑性メカニズムを明らかにした。以下、具体的に述べる。

(1)カリックス型シナプスにおけるエンドサイトーシスタンパク質の短期可塑性の役割(Sakaba et al., 2013, PNAS)

本研究では、エンドサイトーシス関連タンパク質 Intersectin を欠如したマウスを用いてそのシナプス伝達における影響を calyx of Held シナプスで検討した。ノックアウトマウスでは即時伝達物質放出可能なシナプス小胞プール枯渇後の回復過程が顕著に遅れた。また、膜容量測定法をシナプス前終末に適用したところ、刺激後のエンドサイトーシスは正常であった。よって、Intersectin はシナプス小胞動員過程にエンドサイトーシスとは関係なく作用することがわかった。エンドサイトーシス関連タンパク質であるにも関わらず、Intersectin はエンドサイトーシス部位ではなく伝達物質放出部位に存在していることが STED 顕微鏡を用いた観察から明らかになった。以上の研究から、Intersectin がエクソサイトーシスとエンドサイトーシスの間で作用することが示唆され、伝達物質放出部位の放出関連タンパク質の除去による再利用の過程に作用する可能性が考えられた。

(2) Munc13-1 のシナプス小胞プライミングにおける役割(Lipstein et al., 2013, Neuron)

即時伝達物質放出可能なシナプス小胞プール枯渇後の回復過程が Ca^{2+} 、カルモジュリン依存性であることを 2001 年に示したが(Sakaba and Neher, 2001, Neuron)、カルモジュリンの分子標的が何であるかはわかっていなかった。シナプス小胞は伝達物質放出可能になるためには形質膜に接着し、分子的に放出可能な状態にならなければならない(プライミング)。Munc13-1 はプライミングに關与する分子であることが知られているが、カルモジュリン結合部位を有する。この部位を変異させた Munc13-1 をノックインしたマウスを用いて、即時伝達物質放出可能なシナプス小胞プール枯渇後の回復過程を calyx of Held シナプスで調べた。この結果、Munc13-1 がカルモジュリンの分子標的であることが明らかになった。プライミングと、伝達物質放出部位の再利用過程のどちらが重要であるかは今後の研究を待つ必要がある。

(3)カリックス型シナプスにおけるエンドサイトーシスの Ca^{2+} チャネルサブタイプ依存

性に関する研究(Midorikawa et al., 2014, *J Physiol*)

本研究では、カリックス型シナプスにおいてシナプス小胞エンドサイトーシスが Ca^{2+} 依存性であることを再確認するとともに、どの Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入がエンドサイトーシスを制御しているかを調べた。シナプス前終末にパッチクランプ法を適用し、膜容量測定をすることで、シナプス小胞開口放出後のエンドサイトーシスの時間経過を測定した。幼弱ラット (P8-11) のエンドサイトーシスは R 型 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入によって制御されることがわかった。伝達物質放出が P/Q 型チャネルによって制御されるので、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスの部位が異なることが示唆された。より成熟したラット (P14-17) の場合、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスの両方が P/Q 型チャネルを介した Ca^{2+} 流入によって制御されており、エキソサイトーシスとエンドサイトーシスの部位が近接するのではないかと示唆された。近接することによって、より効率の良い、シナプス小胞サイクリング、シナプス伝達を保障するのではないかと考えられた。

(4) 小脳 深部小脳核神経細胞間の短期シナプス抑圧の分子細胞メカニズム

興奮性カリックス型シナプスの場合、短期シナプス抑圧は即時伝達物質放出可能なシナプス小胞の枯渇によって説明できると考えられる。一方で、抑制性シナプスの場合、それで説明できるかよくわかっておらず、学界でもいろいろな議論がある。これを調べる目的で主に分散培養下で、プルキンエ細胞と深部小脳核神経細胞で形成されたシナプスを用いた実験をおこなった。シナプス前終末から直接記録をすると、伝達物質放出可能な小胞が多数にあり、活動電位単発でのシナプス小胞の形質膜融合確率 (伝達物質放出確率) 相対的に低く、小胞枯渇モデルでは短期抑圧現象を説明できないことがわかった。軸索やシナプス前終末から直接記録をおこない、活動電位の細胞体からの伝播を調べたところ、軸索を安定して伝播するが、シナプス前終末で活動電位振幅の減衰が起こり、この結果 Ca^{2+} 流入量が減少して伝達物質放出量が減ることがわかった。同様の結果は急性スライス標本でも確認することができた。以上の実験結果から、短期シナプス可塑性の要因として活動電位減衰というメカニズムを提唱した。

このようなメカニズムが抑制性シナプス一般にいえることなのかどうかについては今後調べなければいけないと考えている。

(5) 今後の研究への展望

カリックス型シナプスの研究では、イメージングの利用により、伝達物質放出に關与するシナプス小胞および分子素過程の可視化をさらに推進することが重要である。シナプス間の多様性に関する研究では、短期抑圧から、短期促通、長期可塑性へと研究を拡張する必要がある。また、小脳抑制性シナプスの研究からは軸索およびシナプス前終末の電気特性が神経伝達のカギを握っている可能性が示唆された。

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 6 件)

Kawaguchi SY, Sakaba T “Control of inhibitory synaptic outputs by low excitability of axon terminals revealed by direct recording.” *Neuron*, 査読有, 85:1273-1288, 2015 年 DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.013

Mortensen LS, Schmidt H, Farsi Z, Barrantes-Freer A, Rubio ME, Ufartes R, Eilers J, Sakaba T, Stühmer W, Pardo LA. “KV_{10.1} opposes activity-dependent increase in Ca^{2+} influx into the presynaptic terminal of the parallel fibre-Purkinje cell synapse.”, *J Physiol*. 査読有, 593: 181-196, 2014 年, DOI: 10.1113/jphysiol.2014.281600.

Midorikawa M, Okamoto Y, Sakaba T, “Developmental changes in Ca^{2+} channel subtypes regulating endocytosis at the calyx of Held.”, *J. Physiol*. 査読有, 592:3495-3510, 2014 年 DOI: 10.1113/jphysiol.2014.273243

+Lipstein N, +Sakaba T, Cooper BH, Lin KH, Strenzke N, Ashery U, Rhee JS, Taschenberger H, Neher E, Brose N, “Dynamic control of synaptic vesicle replenishment and short-term plasticity by Ca^{2+} -calmodulin-Munc13-1 signaling.”, *Neuron*, 査読有, 79:82-96, 2013 年 (+: co-first author), DOI: 10.1016/j.neuron.2013.05.011

Sakaba T, Kononenko N, Bacetic J, Pechstein A, Schmoranzler J, Yao L, Barth H, Shupliakov O, Kobler O, Aktories K, Haucke V, “Fast neurotransmitter release regulated by the endocytic scaffold intersectin.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有, 110:8266-8271, 2013 年, DOI: 10.1073/pnas.1219234110

Trigo FF, Sakaba T, Ogden D, Marty A, "The readily releasable pool of synaptic vesicles measured at single synaptic contacts.", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有,109:18138-43, 2012 年, DOI: 10.1073/pnas.1209798109.

〔学会発表〕(計 3 件)

坂場武史 定量的なシナプス生理学、生物物理学、日本解剖学会、日本生理学会合同大会、委員会企画シンポジウム 8、2015.3.23

Sakaba T, "Presynaptic Recordings from an Inhibitory Terminal"、Gordon research conference "Cell Biology of the Neuron", Waterville Valley, NH, USA 2014.6.24 (Invited speaker)

Sakaba T "Exo-endocytotic coupling at the calx of Held synapse." International society for neurochemistry, Cancun, Mexico, 2013.4.23 (Invited speaker)

〔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://brainscience.doshisha.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし