

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640001

研究課題名(和文)単一神経終末エレクトロポレーションによるシナプス前ギャップ結合の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of presynaptic gap junction by single terminal electroporation

研究代表者

神谷 温之(Kamiya, Haruyuki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10194979

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):海馬苔状線維シナプスにおいて脳内で初めてみつかったシナプス前部での2つのギャップ結合、すなわち、海馬苔状軸索間の「軸索間」ギャップ結合と、苔状線維神経終末とCA3野細胞間の「シナプス間」ギャップ結合の様式と機能的意義を探求することを目的とした。このうち、「シナプス間」ギャップ結合の機能的意義を調べる目的で苔状線維シナプス伝達に対するギャップ結合ブロッカー(MFA)の効果調べた。苔状線維刺激によりCA3野に生じるシナプス後電位は、MFA投与により可逆的に抑制された。苔状線維シナプスはグルタミン酸を介する化学的伝達と、ギャップ結合を介する電気的伝達を行う混合型シナプスである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):In this study, we aimed at elucidating the roles of two modes of presynaptic gap junction, i.e. axo-axonal gap junction coupling and axo-dendritic gap junction coupling at the hippocampal mossy fiber synapses, which have been suggested to exist on the basis of morphological analysis using connexin 36 immunoreactivity. Application of a gap junction blocker, meclofenamic acid, reversibly suppressed the excitatory postsynaptic potentials at the mossy fiber-CA3 synapse, supporting the possibility that the hippocampal mossy fiber synapse might be a unique mixed synapse composed of both chemical and electrical components of synaptic transmission.

研究分野：神経生理学

キーワード：脳・神経 神経科学 生理学 薬理学 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

ニューロンの同期的活動にはギャップ結合を介した高速な細胞間情報伝達が重要な役割を担うと考えられている。これまでに、アストログリアや抑制ニューロン間の機能的ネットワークにギャップ結合が寄与することが明らかになったが、興奮性ニューロン間のギャップ結合の役割については未だ不明な点が多い。最近の形態学的研究から、海馬 CA3 野苔状線維シナプスにおいて軸索間および神経終末・樹状突起スパイン間にギャップ結合が存在することが明らかになった。しかしながら、脳内で初めて見つかった2種類のシナプス前部でのギャップ結合、すなわち軸索および神経終末のギャップ結合のシナプス伝達調節における機能的意義については不明な点が多い。

ギャップ結合は細胞間の電气的カップリングにより高速な細胞間情報伝達を可能にする。脳内の細胞間情報伝達には神経伝達物質やグリア伝達物質などの化学的伝達が重要な役割を果たすが、ギャップ結合を介した電气的伝達に比べて時間を要するなどの違いがある。脳内におけるギャップ結合として、これまでに(1)アストロサイト間および(2)抑制性ニューロンの樹状突起間に形成されるものが知られている。前者は広汎なカルシウム波の伝播によるグリア・ニューロン連関の調節に、後者は高速なニューロンの同期的活動に寄与することが示されている。さらに近年になって、大脳皮質や海馬において興奮性ニューロン間のギャップ結合が発見され、その機能的意義が注目されている。脳内では(1)アストロサイト間および(2)抑制性ニューロンの樹状突起間のギャップ結合が神経情報処理に重要な役割を果たすことが知られている。これに対し、興奮性ニューロン間のギャップ結合の詳細な局在と機能的意義についてはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究は、最近の免疫組織や免疫電顕による形態学的研究から存在が示唆されている海馬 CA3 野苔状線維シナプスにおける2種類のシナプス前部でのギャップ結合、すなわち(1)軸索(苔状線維)間のギャップ結合と、(2)神経終末(苔状線維終末)・樹状突起スパイン間のギャップ結合の存在を機能的に証明し、その生理的および病態生理的な機能を明らかにすることで、神経情報処理におけるギャップ結合の未知のメカニズムを解明することを目的とした。申請者の開発した単一神経終末エレクトロポレーション(電気穿孔)法と、スライスパッチクランプ法による電気生理学的解析を駆使して、興奮性ニューロンの軸索間ギャップ結合や神経終末ギャップ結合の機能と局在について包括的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

マウス海馬スライス標本において、蛍光標識による形態的解析と、パッチクランプ法による機能的解析を行う。エレクトロポレーション(電気穿孔)法を用いて単一軸索および神経終末にギャップ結合を通過する小分子の蛍光色素を効率よく導入し、近傍の軸索に拡散するか、あるいはシナプス後部(樹状突起スパイン)に拡散するか、を指標として、軸索および神経終末ギャップ結合の分布や細胞間カップリングの頻度(分布密度)を明らかにする。また、電気生理学的な解析では、シナプス伝達や可塑性、律動的同期活動に及ぼすギャップ結合ブロッカーの影響を調べ、これらのシナプス前部でのギャップ結合の機能的意義について直接的に検討する。

海馬 CA3 野苔状線維シナプスは、脳内では例外的に大型の神経終末を有し、近赤外線微分干渉(IR-DIC)顕微鏡で視認し、パッチ電極を直接押しあてることで、エレクトロポレーション(電気穿孔)法により容易に単一苔状線維終末と単一苔状線維軸索を蛍光標識することが可能である(単一神経終末エレクトロポレーション法; 神谷温之, 第34回日本神経科学学会, 2011, 横浜)。ギャップ結合を通過する Lucifer Yellow などの小分子の蛍光色素を用いることで、(1)苔状線維軸索間で色素カップリングがみられるか、(2)CA3 野錐体細胞樹状突起スパインと神経終末との色素カップリングがみられるかを検討し、新たな神経細胞の構成因子としてのこれらのギャップ結合の存在を証明することを試みる。また、これらのギャップ結合による細胞間カップリングの頻度や、海馬内での部位差(海馬内領域や中隔側頭軸における差異)などについても調べる。また、発達に伴うギャップ結合の頻度の変化があるかなどについて検討を行い、新たに見つかった興奮性ニューロン間の軸索および神経終末ギャップ結合の詳細な局在や分布についての体系的な理解を目指した。

マウス海馬スライス標本において、CA3 野苔状線維シナプス伝達の調節におけるギャップ結合の役割を検討する。まず、代表的なギャップ結合ブロッカーである carbenoxolone (CBX) が EPSP (興奮性シナプス後電位) および fiber volley (軸索の集合活動電位) に及ぼす効果を調べる。また CBX は特異性が低いことが指摘されていることから、もう一つのブロッカーである meclofenamic acid (MFA) についても同様の検討を行う。MFA は CBX よりも特異性が高く、また即効性で作用が可逆的なため (Nature, 486:113-118, 2012) ギャップ結合ブロッカーとして優れていることが指摘されている。CBX の効果のうち、MFA でも同様の効果が見られるかについて注意深く比較検討することで、シナプス前ギャップ結合が神経伝達の調節に果たす役割を明らかにする。

4. 研究成果

まず、「シナプス間」ギャップ結合の機能的意義について探求した。苔状線維シナプスはこれまでグルタミン酸を介する情報伝達を行う通常の化学的シナプスと考えられてきたが、免疫組織化学的検索によりギャップ結合構成タンパクであるコネクシン 36 の発現がみられることから、電気的・化学的シナプスの混合型シナプスである可能性が指摘されている。この「シナプス間」ギャップ結合の機能的意義を調べる目的で、苔状線維シナプス伝達に対するギャップ結合ブロッカー (MFA) の効果を調べた。苔状線維刺激により CA3 野に生じるシナプス後電位は、MFA 投与により可逆的に抑制された。また、軸索遠位部の興奮性を反映する逆行性集合活動電位の可逆的増大もみとめられたことから、苔状線維シナプスはグルタミン酸を介する化学的伝達と、ギャップ結合を介する電気的伝達を行う混合型シナプスである可能性が示唆された。

また、軸索間ギャップ結合の存在を証明するために単一神経終末に蛍光色素を導入し、複数の軸索間でギャップ結合が存在する可能性について形態学的に検討を行った。近赤外線微分干渉法により海馬スライス標本の苔状線維線維終末を視認し、エレクトロポレーション (電気穿孔) 法により単一苔状線維に蛍光色素を導入し、軸索間の色素カップリングが見られるか否かについて検討を進めている。この実験を進める中で、視認した苔状線維終末からガラス電極を通じて、極めて分離のよい単一軸索終末の活動電位 (軸索終末ユニット記録) が可能であることが判明した。苔状線維は中枢軸索に典型的な通過型軸索を構成することから、通過型軸索における活動電位伝播の制御機構を検討する有用な実験系となると考えられた。単一軸索終末からユニット活動電位を記録し、通過型軸索における興奮伝播の安全率や興奮伝播の制御機構に関する解析を進めた。単一軸索終末のユニット活動電位は、全か無かの法則に従い、また電位依存性ナトリウムチャンネルブロッカーのテトロドトキシンにより抑制されたことから苔状線維軸索の多くは安全率の高い高信頼性の神経情報伝達を行なっていることが確認された。通過型軸索終末である海馬苔状線維軸索終末は高密度に電位依存性ナトリウムチャンネルを発現し、伝導ブロックのリスクを減らしていると考えられた。軸索間ギャップ結合の存在する可能性を示唆するスパイクレットが軸索終末から記録されるかについても検証を進めていく。

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 1 件)

Obara N, Kamiya H, Fukuda S. Serotonergic modulation of inhibitory synaptic transmission in mouse inferior colliculus. *Biomed Res.* 査読有り. 35 巻 2014, 81-84
DOI: 10.2220/biomedres.35.81

[学会発表](計 6 件)

Kamiya H. Local control of axonal excitability of hippocampal mossy fibers. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術大会、第 92 回日本生理学会合同大会 (招待講演), 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

神谷 温之. 軸索の神経生物学: 膜興奮と伝播. 第 120 回日本解剖学会総会・全国学術大会、第 92 回日本生理学会合同大会 (招待講演), 2015 年 3 月 22 日, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

Kamiya H. Photoinactivation analysis of synaptic AMPA receptors in PSD-95 knockout mice. *Neuroscience* 2014, 2014 年 11 月 19 日, Washington DC Convention Center (Washington DC, USA)

Kamiya H. PSD-95 limits synaptic delivery of native AMPA receptors in situ. *Conferences Jacques Monod*, 2014 年 06 月 14 日, CNRS ロスコフ生物研究所 (Roscoff, France)

Kamiya H. Input-selective synaptic photoinactivation at the hippocampal mossy fiber synapse. *Neuroscience* 2013, 2013 年 11 月 11 日, San Diego Convention Center (San Diego, USA)

Kamiya H. Photoinactivation analysis of synaptic AMPA receptor dynamics. 4th European Synapse Meeting, 2013 年 08 月 29 日, Bordeaux University (Bordeaux, France)

[その他]
ホームページ等

北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野ホームページ
<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20632/index.htm>

脳科学辞典「カイニン酸型グルタミン酸受容体」鈴木江津子・神谷温之、査読有り

<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/カインン酸型グルタミン酸受容体>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

神谷 温之 (KAMIYA, Haruyuki)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10194979