

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430079

研究課題名(和文) Gi/o共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性の分子的基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the diversity of Gi/o-coupled receptor-mediated presynaptic depression

研究代表者

佐竹 伸一郎 (SATAKE, Shin'Ichiro)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：30360340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン(籠細胞、星状細胞)間のグルタミン酸作動性シナプスにおいて記録される興奮性シナプス後電流(EPSC)は、顆粒細胞軸索(上向性線維)の2回パルス刺激(30-100ミリ秒間隔)に伴い、2回目EPSCの振幅値と減衰時定数()が増大する。ペアパルス増強の発現機構を検討する過程で、Gi/o共役型受容体が仲介するシナプス前抑制には、EPSC減衰時間の減弱の有無により区別される、複数の様式が存在することを発見した。本研究では、シナプス前抑制にこうした多様性が生み出されるメカニズムを追究した。

研究成果の概要(英文)：Paired pulse activation of rat cerebellar granule cell (GC) ascending axons at short intervals (30-100 ms) causes not only increase in the peak amplitude (PPFamp) of the second EPSC (EPSC2) recorded from molecular layer interneurons (MLIs) but also prolongation of the EPSC2 decay time (PPPdecay) relative to those of the first EPSC. PPFamp is resulted from transient increases in release probability (Pr) and multivesicular release (MVR), whereas PPPdecay is elicited by an increase in MVR and the subsequent pooling of MVR-glutamate among adjacent synapses. Recently, we found that PPPdecay plays a major role in Gi/o-coupled receptor-mediated presynaptic depression in the GC-MLI synapse. In this study, we focused on molecular mechanisms underlying the presynaptic depression. Dynamic modulation of presynaptic MVR and postsynaptic current decay will provide additional complexity in neuronal encoding, processing, and plasticity at the single synapse to reflect circumstances of adjacent cells.

研究分野：神経生理学

キーワード：小脳 顆粒細胞 分子層介在ニューロン 興奮性シナプス後電流 スライスパッチクランプ法 グルタミン酸輸送体

1. 研究開始当初の背景

中枢ニューロンの軸索終末において、神経伝達物質の放出部位では、活動電位の伝播に伴い、1個のシナプス小胞が開口放出されると考えられてきた(単一性放出: univesicular release)。その一方、1回の活動電位当たり、複数のシナプス小胞が複数の放出部位から同期的に、もしくは単一の放出部位から連続的に遊離される、多重性放出(multivesicular release)の存在も指摘されている。シナプス小胞の単一性/多重性放出の違いは、神経終末のCa²⁺動態や放出装置の特性に従い生じると推定されてきた。しかし、神経終末のシナプス小胞遊離ダイナミクス(放出確率ならびに放出単一性・多重性、放出同期性)を決定するメカニズムは、ほとんど解明されていない。また、各シナプスにおいて単一性放出と多重性放出が遷移する可能性についても詳しい検討は行われていない。

ラット小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン(籠細胞、星状細胞)軸索起始部間のグルタミン酸(L-glutamate, Glu)作動性シナプスにおいて記録される興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current, EPSC)は、顆粒細胞(上向性線維)の2回パルス刺激(30 - 100ミリ秒間隔)に伴い、2回目EPSCの振幅値と減衰時定数(decay time constant, τ)が一過性に増大する(Satake et al., 2012)。EPSC減衰時間のペアパルス増強(paired pulse prolongation of the decay time, PPP_{decay})は、放出多重性の亢進(即ち、単一小胞放出から多重小胞放出への可逆的遷移)に伴う、伝達物質Gluのシナプス外漏出(spillover)とその蓄積によって引き起こされたと考えている(Satake et al., 2012, 2016)。

顆粒細胞における多重性放出は、複数のCa_v2.1(P/Q-type)チャンネル(電位依存性Ca²⁺チャンネルのサブタイプの1つ)を介して軸索終末に流入したCa²⁺が流入部位から周囲に拡散して蓄積すること、蓄積したCa²⁺がチャンネル近傍に局在するシナプス小胞/Ca²⁺センサー複合体のみならず、遠位の小胞/センサー複合体にも作用して複数のシナプス小胞を開口放出させることによって惹起されたと推定している(『Ca²⁺マイクロドメイン仮説』; Neher and Sakaba, 2008; Eggermann et al, 2012; Satake and Imoto, 2014; Satake et al., 2016)。しかし、EPSCの減衰時間が多重性放出によって決定されるという制御機構はこれまで報告がなく、そのメカニズムや生理的役割は不明であった。

2. 研究の目的

前シナプス性G_{i/o}共役型受容体の活性化に伴い、小脳顆粒細胞 - 介在ニューロン間EPSCの振幅が減弱すること、またこのとき同時にEPSC振幅のペアパルス比(paired

pulse ratio of the amplitude, PPR_{amp})が増大することは広く知られてきた。PPP_{decay}の発現メカニズムを追究する過程で、G_{i/o}共役型受容体が仲介するシナプス前抑制には、PPP_{decay}(即ち、多重性放出)におよぼす影響により区別される、複数の様式が存在することを発見した。

本研究では、電位依存性Ca²⁺チャンネルとシナプス小胞/Ca²⁺センサー複合体の位置関係(Ca²⁺ドメイン)やG_{i/o}共役型受容体とCa²⁺チャンネルの機能的連関に重点を絞り、シナプス前抑制に多様性が生み出される分子の基盤を解き明かすことを目標とした。

3. 研究方法

自然科学研究機構・動物実験センターの指針に従い動物実験を実施した。当機構の動物実験委員会において実験計画の審査を受けた後、許可された方法に従い研究を遂行した。実験動物に苦痛を与えることのないよう、麻酔ならびに安楽死の処置には十分な注意を払った。

実験には、出生後2-3週齢のラット(Wistar種)もしくはマウスを用いた。小脳よりスライス標本(傍矢状断)を作製し、電気生理学的手法(パッチクランプ法)を用いて、シナプス前抑制に多様性が生み出されるメカニズムを追究した。シナプス後電流減衰相のキネティクス解析には、単純指数関数(single-exponential fitting procedure)を適用した。受容体作用薬/阻害薬や細胞内シグナル伝達に関わる各種モジュレータ試薬の影響は、スライス標本に灌流液(人工脳髄液)を介して投与することにより観察した。

4. 研究成果

脳スライス標本に薬理学的手法を適用することにより、多重性放出とシナプス前抑制の関係を検討した。また、神経伝達物質Gluのシナプス外拡散がEPSCのキネティクス(減衰時間)におよぼす影響を観察するため、グルタミン酸輸送体(興奮性アミノ酸輸送体excitatory amino acid transporter, EAAT)の機能を評価する実験系を構築した。発展的課題として、この実験系をジストニア病態モデルマウスAtp1a3^{+/−}(Ikeda et al., 2013)に適用し、EAATの機能を評価した。

(1) G_{i/o}共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性: 網羅的検討

G_{i/o}共役型受容体作用薬がラット小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間EPSCにおよぼす影響を網羅的に観察した(表1)。III型mGlu受容体作用薬L-AP4ならびにGABA_B受容体作用薬baclofen、アデノシンA1受容体作用薬CPAは、EPSC減衰時間のペアパルス比(paired pulse ratio of the

decay time, PPR_{decay})の減少を伴うシナプス前抑制を惹起した。また逆に、 $GABA_B$ 受容体阻害薬 CGP55845 は EPSC の振幅と減衰時間を共に増大させた。 $GABA_B$ 受容体は常に活性化されていること、このシナプスは継続的に前抑制の状態にあることを示唆している。一方、カンナビノイド $CB1$ 受容体の作用薬 WIN55212-2 は、 PPR_{decay} に影響しない様式でシナプス前抑制を引き起こした。II 型 mGlu 受容体作用薬 DCG-IV とアドレナリン α_2 受容体作用薬 clonidine は EPSC 振幅に有意な影響を示さなかった。

これら $G_{i/o}$ 共役型受容体サブタイプに依存した異なるシナプス前抑制は、スライス標本に刺入したガラス電極による神経刺激や記録電極から注入した電流による脱分極刺激により各受容体を活性化させることでも再現された。シナプス前抑制は、近傍のニューロンやグリア細胞の多様な活動を単一シナプスのレベルにおいて、情報のコード化やプロセッシング、短期/長期可塑性に反映させるメカニズムとしても働いていると考えられる。

表 1: $G_{i/o}$ 共役型受容体作用薬が顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間 EPSC におよぼす影響

作用薬 (受容体サブタイプ)	EPSC 振幅	PPR_{amp}	PPR_{decay}
L-AP4 (20 μM) (III 型 mGlu)	減少	増大	減少
DCG-IV (1 μM) (II 型 mGlu)	無効	無効	無効
Baclofen (1 μM) ($GABA_B$)	減少	増大	減少
WIN55,212-2 (2 μM) (Cannabinoid $CB1$)	減少	増大	不変
CPA (1 μM) (Adenosine A_1)	減少	増大	減少
Clonidine (30 μM) (Adrenergic α_2)	無効	無効	無効

ペアパルス刺激は 30 ミリ秒間隔にて付与。

(2) カンナビノイド $CB1$ 受容体が仲介する逆行性脱興奮における Ca_v2 チャネルの役割：サブタイプ間相補的作用の存在

前述の通り、ラット小脳顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間 Glu 作動性シナプスでは、 $G_{i/o}$ 共役型受容体を介したシナプス前抑制には、 PPR_{decay} におよぼす影響により区別される複数の様式が存在する。その他にも、 $Ca_v2.1$ チャネル阻害薬 ω -agatoxin IVA は EPSC と PPR_{decay} を共に抑制することを報告した (Satake and Imoto, 2014)。一方、 $Ca_v2.2$ (N -type) チャネル阻害薬 ω -conotoxin GVIA や $Ca_v2.3$ (R -type) チャネル阻害薬 SNX-482 は、EPSC 抑制作用を示したものの PPR_{decay} には影響しなかった (Satake and Imoto, 2014)。また、介在ニューロンの一過的な脱分極に伴い惹起される、内因性カンナビノイ

ドの逆行性遊離と前シナプス性 $CB1$ 受容体の活性化を介した EPSC 抑制 (脱分極誘導性脱興奮: depolarization-induced suppression of excitation, DSE) においても、 PPR_{decay} は減弱しなかった。

シナプス前抑制にこうした多様性が生じるメカニズムを明らかにするため、DSE をモデルに Ca_v2 チャネルサブタイプがシナプス前性制御において担う役割を検討した。DSE は、 ω -conotoxin GVIA ならびに SNX-482 の同時投与により完全に消失した。一方、各阻害薬の単独投与は DSE に無効であった。また、両阻害薬が顆粒細胞 - 分子層介在ニューロン間 EPSC を減弱させる作用は閉塞的 (occlusive) であった。 $Ca_v2.2$ チャネルと $Ca_v2.3$ チャネルは、顆粒細胞 $CB1$ 受容体の下流において相補的な様式でシナプス前抑制に関わっていることを示唆している。引き続き、 Ca_v2 チャネル各サブタイプ間で観察された機能的分化 (即ち、多重性放出を制御する機能の有無) の分子的背景やその生理的意義を追究している。

(3) 軸索終末 Ca^{2+} マイクロドメインにおいて内在性の Ca^{2+} 結合タンパク質 (Ca^{2+} 緩衝作用) が担う役割の検討

Ca_v2 チャネルサブタイプに開口時間の延長作用を示す化合物 roscovitine (Tomizawa et al., 2002; Yan et al., 2002; DeStefino et al., 2010; Satake and Imoto, 2014) を用いて、神経伝達物質の開口放出と軸索終末 Ca^{2+} マイクロドメインの関係を追究した。ラット小脳プルキンエ細胞より全細胞パッチクランプ記録を行い、roscovitine を灌流投与した。

Roscovitine は、顆粒細胞 (平行線維) - プルキンエ細胞間の Glu 作動性 EPSC と分子層介在ニューロン - プルキンエ細胞間の抑制性 ($GABA$ 作動性) シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current, IPSC) を顕著に増強した。一方、roscovitine は、登上線維 (脳幹下オリブ核ニューロン) - プルキンエ細胞間の Glu 作動性シナプス伝達には無効であった。薬理的解析を行い、roscovitine は $Ca_v2.1$ チャネルの機能増強を介して神経伝達物質の放出確率 (release probability, Pr) を増大させたことを示唆する結果を得た。また roscovitine は、IPSC の減衰時定数 (τ) や Na^+ チャネル阻害薬 tetrodotoxin (TTX) 非感受性微小 IPSC (miniature IPSC) の平均振幅と発生頻度を増大させた。従って roscovitine は、IPSC をシナプス後性機構により増強する作用も併せ持つと考えられる。Roscovitine は、シナプス種特異的かつ複数のメカニズム (シナプス前性/後性機構) により、小脳プルキンエ細胞に入力するシナプス伝達を亢進させることができると結論した。

Roscovitine のシナプス伝達亢進作用は、細胞外灌流液 (人工脳髄液) の Ca^{2+} 濃度を下

げること (2.5 mM → 1.0 mM) により完全に消失した。また、細胞膜透過性 Ca^{2+} キレート剤 (EGTA-AM ならびに BAPTA-AM) が roscovitine のシナプス後電流亢進作用におよぼす影響は、顆粒細胞 - プルキンエ細胞間シナプスと分子層介在ニューロン - プルキンエ細胞間シナプスの間で著しく異なっていた。顆粒細胞と分子層介在ニューロンの各軸索終末に発現する Ca^{2+} 結合タンパク質 (calretinin, parvalbumin) の性質 (Ca^{2+} 緩衝作用) の違いと関連があると推定し、さらに追究を進めている。

Roscovitine (別名 seliciclib) は当初、細胞周期の移行制御に関わるタンパク質リン酸化酵素、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase, Cdk) に対して選択的かつ強力な阻害作用を示す化合物として発見された (De Azevedo et al., 1997; Meijer et al., 1997; Bibb et al., 1999)。こうした特性から現在、経口抗がん剤としての有効性が広く検証されている (Khalil et al., 2015)。将来的な臨床応用に向けて、roscovitine が神経伝達におよぼす影響を精査することの重要性は今後、ますます高まっていくと考えられる。また、Cdk ファミリーのサブタイプの 1 つ Cdk5 は、成熟ニューロンに豊富に発現するという特徴から、細胞周期の制御とは別の役割を担っている可能性が指摘されている (Kim and Ryan, 2010)。Roscovitine のシナプス伝達亢進作用に Cdk5 を介したタンパク質リン酸化カスケードが関与するか否か早急に検討を行いたい。

(4) EAAT 機能評価系の構築：可視光線遊離型 caged-glutamate の適用

PPP_{decay} は、多重性放出に伴いシナプス外に漏出・拡散した Glu が、隣接シナプスに蓄積することにより引き起こされると推定している (Satake et al., 2012, 2016)。EAAT が担う Glu 取り込み機構 (Glu 回収機構) も同様に、Glu のシナプス外拡散・蓄積過程に大きな影響をおよぼす (Satake et al., 2010)。シナプス外 Glu の動態制御機構を検討するため、caged-Glu の光遊離により EAAT の Glu 輸送機能を評価する実験系の構築を試みた。

EAAT は、Na⁺ポンプ (Na,K-ATPase) によって作り出される、形質膜内外の Na⁺/K⁺電気化学勾配を Glu 輸送の駆動力として利用しており、1 分子のグルタミン酸 (Glu⁻) を輸送するために、3 つの Na⁺と 1 つの H⁺を共輸送すると共に 1 つの K⁺を逆輸送する。このため、EAAT は Glu 輸送と共役した起電性を示す (Danbolt, 2001)。こうした特性から、caged-Glu の光遊離に伴い記録される電流から、その細胞の Glu 回収能 (EAAT の機能) を評価することができると考えた。

2 週齢幼若マウスより作製した小脳スライス標本に、Glu/GABA 受容体阻害薬 (NBQX, D-APV, AIDA, bicuculline) ならびに TTX と

共に caged-Glu (RuBi-glutamate) を灌流投与した。可視光線パルス (430 nm, 5 ms) を照射して Glu を遊離させることにより、電位固定したプルキンエ細胞 ($V_H = -60$ mV) から内向き電流を記録することに成功した。この内向き電流は、EAAT 阻害薬 TBOA の投与により著しく減弱したことから、EAAT の Glu 輸送電流が記録できたと結論した。

RuBi-Glu は、低濃度でも十分な電流惹起作用を示すと共に、可視光線の照射によって Glu を遊離させることができるという特徴がある (Fino et al., 2009)。そのため RuBi-Glu は、MNI-Glu を始めとする従来型の紫外線作動性 caged 化合物と比べて、細胞毒性や作用の交雑性が低いと考えられている (Fino et al., 2009)。本評価系の確立により、長時間に渡り、安定的かつ特異的な EAAT 電流 (photo-uncaging evoked transporter current, PTC) を記録することが可能となった。

(5) 発展的課題：ジストニア病態モデルマウス *Atp1a3*^{+/−} の EAAT 機能評価

Na⁺ポンプ $\alpha 3$ サブユニット遺伝子ヘテロ欠損マウス *Atp1a3*^{+/−} は、急性発症性ジストニアパーキンソン症 (rapid-onset dystonia parkinsonism, RDP; 遺伝性ジストニア DYT12) と小児交互性片麻痺 (alternating hemiplegia of childhood, AHC) の病態モデルである (Ikeda et al., 2013)。上記 EAAT 機能評価系を *Atp1a3*^{+/−} に適用し、EAAT と Na⁺ポンプの関係を検討した。

Atp1a3^{+/−} では、プルキンエ細胞において EAAT 電流 (PTC) が野生型よりも顕著に減弱していた。EAAT4 (プルキンエ細胞特異的に発現する輸送体サブタイプ) と Na⁺ポンプ $\alpha 3$ サブユニットの間に強い機能的連関が存在することを示している。一方、*Atp1a3*^{+/−} バグマンガリアの PTC は野生型よりも有意に増大していた。*Atp1a3*^{+/−} では、プルキンエ細胞において減弱した EAAT 機能をグリア細胞 (アストロサイト) の EAAT が補償する『Glu 回収の恒常性維持機構』が働いていることを示唆している。

今後は、この機能評価系を病態モデル動物や遺伝子改変動物に広く適用することにより、脳神経疾患や学習・記憶の形成過程において EAAT が担う役割を追究していきたいと考えている。

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 3 件)

Shin'Ichiro Satake, Tsuyoshi Inoue, Keiji Imoto (2016) Synaptic multivesicular release in the cerebellar cortex: its mechanism and role in

neural encoding and processing. *Cerebellum* 15, 201–207. (査読有)
DOI: 10.1007/s12311-015-0677-5

Toshika Ohkawa, Shin'Ichiro Satake, Norihiko Yokoi, Yu Miyazaki, Tomohiko Ohshita, Gen Sobue, Hiroshi Takashima, Osamu Watanabe, Yuko Fukata, Masaki Fukata (2014) Identification and characterization of GABA_A receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis. *Journal of Neuroscience* 34, 8151–8163. (査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4415-13.2014

Shin'Ichiro Satake, Keiji Imoto (2014) Cav2.1 channels control multivesicular release by relying on their distance from exocytotic Ca²⁺ sensors at rat cerebellar granule cells. *Journal of Neuroscience* 34, 1462–1474. (査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2388-13.2014

〔学会発表〕(計 7 件)

佐竹 伸一郎、井本 敬二 「小脳分子層介在神経の脱分極に伴う逆行性脱興奮を仲介する Cav2 チャンネルサブタイプ」 Neuroscience 2016(第 39 回日本神経科学大会). パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 7 月 20 日–2016 年 7 月 22 日.

佐竹 伸一郎、池田 啓子、川上 潔、井本 敬二 「Atp1a3^{+/−}マウス小脳プルキンエ細胞におけるグルタミン酸輸送体電流の減弱」 Neuroscience 2015 (第 38 回日本神経科学大会). 神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市) 2015 年 7 月 28 日–2015 年 7 月 31 日.

Shin'Ichiro Satake, Keiji Imoto 「Diversity in the presynaptic potentiation of glutamatergic neurotransmission from granule cells to molecular layer interneurons in rat cerebellar cortex」 Niigata University BRI International Symposium 2015 Genome Editing Technology; its Current State-of-Art and Application to Brain Research. Niigata University, Niigata, Niigata (Japan) 2015 年 3 月 5 日–2015 年 3 月 6 日.

Yuko Fukata, Toshika Ohkawa, Shin'Ichiro Satake, Norihiko Yokoi, Osamu Watanabe, Masaki Fukata 「Pathological roles of autoantibodies to synaptic proteins in encephalitis」 Neuroscience 2014 (Society for Neuro-

science 44th Annual Meeting). Washington, DC (USA) 2014 年 11 月 15 日–2014 年 11 月 19 日.

佐竹 伸一郎、井本 敬二 「Cav2 チャンネルサブタイプに依存したラット小脳顆粒細胞軸索 Ca²⁺ ナノ/マイクロドメインシグナリング」 Neuroscience 2014 (第 37 回日本神経科学大会). パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014 年 9 月 11 日–2014 年 9 月 13 日.

Kiyoshi Kawakami, Shin'Ichiro Satake, Hiroki Sugimoto, Keiko Ikeda 「Altered motor memory in behaviour and electrophysiological analyses in Atp1a3 heterozygous knockout mice」 14th International Conference. Na,K-ATPase and Related Transport ATPases: Structure, Mechanism, Cell Biology, Health and Disease. Lunteren (Netherlands) 2014 年 8 月 31 日–2014 年 9 月 5 日.

佐竹 伸一郎 「G_{i/o} 共役型受容体が仲介するシナプス前抑制における多様性」 第 18 回活性アミンに関するワークショップ. サポートホール高松(香川県高松市) 2014 年 8 月 30 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐竹 伸一郎 (SATAKE Shin'Ichiro)
生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教
研究者番号: 30360340

(2) 研究分担者

深澤 有吾 (FUKAZAWA Yugo)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 60343745