

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成 21 年度採択研究代表者

平成 21 年度
実績報告

高橋 智幸

同志社大学生命医科学部・教授

シナプス前性神経回路制御メカニズムの生後発達

§ 1. 研究実施の概要

ポストシナプス機構の研究と比較して、プレシナプス機構の研究は技術的制約のため立ち遅れている。温血動物脳幹巨大シナプス、ヘルドのカリックスは前末端から電気信号が記録できる希少なシナプスである。代表者のグループは、十数年来、この標本にパッチクランプ法を適用して、プレシナプス制御機構の問題に直接的な解答を与えて来た。今後、更に新たな研究方法を導入して研究を展開する。平成 21 年度は (I) カリックスシナプス前末端イメージング、(II) シナプス前末端ケージド化合物の光分解、(III) 活動依存性可塑的变化、(IV) シナプス前末端 Ca チャネル・タンパク質相互作用(Watanabe et al *J Neurosci* 2010)、(V) シナプス小胞回収機構の生後発達に関して研究を行った。現在は、培養カリックス前末端イメージング、グリア・シナプス同時記録、前末端ケージド化合物光分解、免疫電顕などの方法を駆使して、プレシナプス機構の解明をめざし、研究を行っている。

§ 2. 研究実施体制

(1) 高橋グループ

①研究分担グループ長: 高橋 智幸(同志社大学、教授)

②研究項目

- I) カリックスシナプス前末端イメージング
- II) シナプス前末端ケージド化合物の光分解
- III) シナプス前末端 Ca チャネル・タンパク質相互作用
- IV) シナプス小胞回収機構の生後発達

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(I) カリックスシナプス前末端イメージング

I-1 単一活動電位によって誘発される マイクロドメインCa transientを脳幹スライスカリックス前末端の共焦点スポットから記録して次の結果を得た(Nakamura Y et al, 投稿中)。

- (1) Ca transient の時空間的分布の生後発達変化：ラットが聴覚を獲得する前の生後(P)7-9 日と獲得後の P14-15 を比較したところ、Ca transient のキネテックスは変化しなかったが、振幅、検出頻度が発達に伴って減少することが明らかになった。
 - (2) 生後発達に伴う Ca チャネルの密度の減少：カリックス前末端を電位固定して、脱分極パルスによって Ca 流入を誘発し、Ca transient を記録したところ、P7-9 日と P14-15 日間で、Ca 電流の振幅は同様であったが、Ca transient の振幅が発達に伴って約 50%に減少した。
 - (3) Ca チャネル密度減少による Ca-放出カップリングの増強：カリックス前末端に 10 mM EGTA を注入すると P7-9 日においては、EPSC が顕著に減少したが、P14-15 では、ほとんど影響を受けなかった。この結果は、生後発達と共に Ca-放出カップリングが増強することを示唆する。次に、P7-9 日において低濃度(50-100 nM)の ω -Agatoxin によって P/Q 型 Ca チャネルを部分的にブロックしたところ、EGTA 注入による EPSC の減少が起こらなくなった。この結果は、Ca チャネルの機能的密度の減少が Ca-放出カップリングの増強をもたらしていることを示唆する。
 - (4) Ca-放出カップリング強度の Ca チャネル型依存性：P7-9 日において、 ω -conotoxin および SNX-482 によって N/R 型チャネルをブロックした後にカリックス前末端に 10 mM EGTA を注入すると、EPSC の減少が起こらなくなった。未成熟カリックスにおいて、N 型 R 型チャネルは P/Q 型に比べて放出部位から遠位に分布すると報告されているが、今回の結果は、型特異的な分布の相違を支持しない。実際、カリックス内 10 mM EGTA 存在下に ω -conotoxin と SNX-482 を投与すると EPSC の振幅が約 50%に減少した。この結果は、N 型 R 型チャネルは、放出部位の遠位だけでなく近位部にも分布していることを示唆している。
 - (5) 生後発達による活動電位幅の短縮の Ca transient の振幅と分布に対する影響：P7-9 カリックス電位固定下に、P7 および P14 の活動電位波形を与えて Ca 電流を誘発し、Ca transient を記録、比較したところ、後者は前者の約 1/2 の振幅であった。更に P14-15 カリックスにおいて 1mM TEA によって活動電位幅を約 2 倍に拡張すると、Ca transient の振幅が約 2 倍になった。以上の結果は生後発達に伴う Ca transient 振幅の減少の一部は活動電位幅の減少によると推論された。
- (1) ~ (5) の結果、およびカリックスにおける放出機構の Ca 感受性は生後発達に伴

って増強しないとの報告(Wang et al, 2008)から、生後発達に伴う Ca チャネル密度の減少と、活動電位幅の減少によって、Ca-放出カップリングの増強がもたらされると結論した。生後発達に伴い、Ca-放出カップリングが増強すると共に、放出確率が低下することによって高頻度伝達効率が上昇することは、カリックスに限らず多くのシナプスで報告されているが、これらの生後発達変化は、いずれも Ca チャネル密度の減少と、活動電位幅の減少によって良く説明することができる。

I-2 培養カリックスイメージングの立ち上げ：PC-12 cellにおけるQuantum dotによる小胞可視化の予備実験が順調に進み、年度末に顕微鏡が納品されて、培養カリックスイメージングを開始する準備が整いつつある。

(II) シナプス前末端ケージド化合物の光分解

小胞グルタミン酸再充填機構の検討：ホールセルピペット内液によって前末端内のグルタミン酸を洗い流して小胞内グルタミン酸を枯渇させた後、MNI glutamate photolysis によって前末端内のグルタミン酸濃度を急速に上昇させ、EPSC 振幅の増大と mEPSC の頻度上昇から小胞内へのグルタミン酸充填速度を測定した。現在、グルタミン酸濃度と充填速度の関係を定量的に解析している。

(III) 活動依存性可塑的变化 (Ohshima-Takago et al, 投稿準備中)

抑制性シナプス伝達の入力遮断効果：幼若マウスにおいて両側内耳破壊を行い、MNTB細胞から記録されるグリシン作動性miniature IPSCの生後発達に伴う時間経過短縮に対する効果をテストした。次いでポストシナプス領域の組織から定量的PCR測定を行って、グリシン受容体のサブユニットの生後発達変化と内耳破壊効果を明らかにした。

(IV)シナプス前末端Caチャネル・タンパク質相互作用 (Watanabe et al *J Neurosci* 2010)

シナプス小胞回収における前末端 Ca チャネルの役割:電位依存性 Ca チャネルの synprint site に AP-2 が直接結合することを見出した。この結合は、既に知られる synprint-synaptotagmin 結合と競合し、synprint site は高濃度 Ca 下では synaptotagmin と、低濃度 Ca 下では AP-2 と結合することが明らかになった。Synprint の部分ペプチドをカリックスに注入して、3者間の結合をブロックしたところ、膜容量変化から測定される endocytosis が顕著に抑制されたが、exocytosis の変化は Ca 電流増強を介する僅かな増大に留まった。Ca チャネルの synprint site はシナプス小胞の exocytosis には直接関与せず endocytosis を促進する役割を担うものと結論した。

(V) シナプス小胞回収機構の生後発達 (Yamashita et al, under revision)

生後日齢の異なるラットのカリックス前末端と後細胞からホールセル記録を行い、単一刺激およびテタヌス刺激によって誘発した exocytosis と、それに続く endocytosis を膜容量測定記録した。単一刺激誘発性 endocytosis は生後発達と共に EGTA 抵抗性となり、P14 では、10 mM BAPTA によって、はじめてブロックされたことから、endocytosis は exocytosis 同様、Ca ナノドメインにおいて prime されると結論された。一方、テタヌス刺激誘発性 endocytosis は P7 では Ca/calmodulin/calcineurin 依存性を示したが、生後発達と共に calmodulin/calcineurin 依存性を失った。Ca 依存性是不変であることから、生後発達途上、endocytosis の Ca センサーが calmodulin/calcineurin から新たな分子にスイッチする可能性が示唆された。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- 1) Watanabe H, Yamashita T, Saitoh N, Iwamatsu A, Campbell KP, Mori Y, Takahashi T: Involvement of Ca^{2+} channel synprint site in synaptic vesicle endocytosis. J Neurosci 30: 655-660, 2010.
DOI:10.1523/JNEUROSCI.3214-09.2010