

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 22 年度は、主として (I) Ca 依存性小胞エンドサイトーシス機構の生後発達 (Yamashita *et al Nature Neuroscience* 2010)、(II) 逆行性エンドサイトーシス調節機構と生後発達、(III) シナプス前末端小胞への伝達物質充填速度の測定、(IV) シナプス前末端 Ca ドメインの可視化、の4項目に関して研究を行った。また、これ以外にも、①培養カリックスにおけるシナプス小胞実時間イメージング、②グリア・シナプス連関、③カリックス-海馬シナプス間の比較、などに関する研究を進めている。

§ 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(同志社大学生命医科学部、教授)

②研究項目

- I. Ca 依存性小胞エンドサイトーシス機構の生後発達
- II. 逆行性エンドサイトーシス調節機構と生後発達
- III. シナプス前末端小胞への伝達物質充填速度の測定
- IV. シナプス前末端 Ca ドメインの可視化
- V. 活動依存的可塑的变化: (i)興奮性シナプス伝達の入力遮断効果、(ii)抑制性シナプス伝達の入力遮断効果

(2) 重本グループ

①研究分担グループ長: 重本 隆一(生理学研究所、教授)

②研究項目

- I. シナプス前末端 Ca チャネルの局在

§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) Ca 依存性小胞エンドサイトーシス機構の生後発達¹⁾

神経回路を制御するシナプス伝達の維持にとって必須な、神経終末端シナプス小胞の endocytosis に関して新たな知見を得た。

(1)カリックス前末端から膜用量測定を行い、Ca 結合速度の異なる EGTA と BAPTA を前末端内に投与することによって、小胞エンドサイトーシスにおける Ca の役割を明らかにした。前末端の活動電位が惹起する Ca 流入によって形成される高濃度の Ca nanodomain において exocytosis が誘発されることは周知であるが、この Ca nanodomain が、小胞の endocytosis にも必須であることを明らかにした。この結果は、低親和性の Ca 結合タンパク質である synaptotagmin が exocytosis と endocytosis の両方を媒介するという仮説、および Ca チャネルの細胞内ループドメインが endocytosis に関与するという我々の仮説 (Watanabe *et al*, 2010 *J Neurosci*) を支持する。

(2) 連続刺激により nanodomain の外に拡散した(bulk) Ca は、過度の exocytosis を補償する endocytosis を媒介する。このメカニズムは、未成熟シナプスでは、calmodulin と calcineurin の働きによって作動するが、個体の成熟に伴って両者の関与が失われることが明らかになった。生後発達に伴って endocytosis の Ca 感受性、回収効率、kinetics は、いずれも変化しないので、新たな Ca 結合タンパク質が calmodulin/calcineurin に代わって endocytosis を媒介すると考えられる。このタンパク質の同定は今後の課題である。

(3) 未成熟のシナプスでは、刺激強度を上げると GTP 非依存性の endocytosis が誘発されるが、このメカニズムは生後発達と共に消失して、endocytosis は専ら GTP の分解に依存するようになることが明らかとなった。

II) G カイネース依存性逆行性エンドサイトーシス調節機構の生後発達 (Eguchi *et al*, *In preparation*)

シナプス前末端から放出される伝達物質グルタミン酸が、活動依存的にシナプス小胞の回収を促進すること、および、この逆行性調節メカニズムは生後発達途上に獲得されることを見出した。膜容量測定によってモニターされるシナプス小胞の endocytosis は、PKG 阻害薬によって抑制された。この抑制作用は exocytosis の大きさに比例して顕著となり、NO scavenger または APV によって mimic/occlude された。また、PKG 阻害薬の endocytosis 抑制作用は PIP2 の calyx 内投与によって救済され、PIP2 阻害薬によって mimic/occlude された。PIP2 は calyx of Held 内に cluster を形成することが免疫組織化学によって示された。この、PIP2 免疫反応性は PKG 阻害薬、または NO scavenger によって消失した。聴覚獲得前の calyx では、PKG 阻害薬は endocytosis を抑制しなかった。

(III) シナプス前末端小胞への伝達物質充填速度 (Hori *et al*, *In preparation*)

Calyx 前末端内のグルタミン酸を洗い流すと、小胞内のグルタミン酸が枯渇して EPSC が消失し、末端内にグルタミン酸を投与すると、小胞に再充填されて EPSC の振幅が増大す

る (Ishikawa *et al Neuron* 2002)。この実験系に MNI caged glutamate を適用して、グルタミン酸濃度を短時間に上昇させて、EPSC の振幅、または mEPSC の総電荷の増大から小胞再充填速度を算定した結果、10 数秒の時定数が得られた。この結果は、グルタミン酸の小胞取り込みが、シナプス小胞回収再利用過程の rate-limiting step であることを示唆している。

(IV) 海馬 autapse と calyx of Held の比較 (Akahane *et al, unpublished*)

シナプス小胞内の酸性化に関わる H⁺ATPase を阻害して、グルタミン酸の取り込みを阻害する薬物として知られる bafilomycin を細胞外投与すると、グルタミン酸含有小胞が枯渇することを利用して recycling pool size (RPS) を算定することができる (Ikeda & Bekkers, 2009)。この方法を calyx of Held に適用して、RPS を算定したところ、その値が刺激頻度に比例して増大することが明らかになった。海馬培養 autapse では、同プロトコールで RPS が刺激頻度に依存しないことが報告されている。Calyx における結果は、高速シナプス特有の伝達維持機構として reserve pool から recycling pool への補給機構が存在することを示唆する。

(V) 活動依存的可塑的变化：

(i) 興奮性シナプス伝達の入力遮断効果 (Johnson *et al, unpublished*)

Drosophila で報告されているグルタミン酸作動性シナプスの homeostatic plasticity が mammalian CNS で再現するかをテストした。生後 13-15 日齢のラット脳幹急性スライスを CNQX(0.5 μM) を含む aCSF 中に保存し、20 分おきに MNTB ニューロンから EPSC を記録したところ 150-240 分にかけて EPSC の振幅が約 2 倍 (P<0.05) に増大した。また、これと平行してプレシナプスの Ca 電流の増大が認められた。しかし、この作用は、AMPA 受容体の特異的アンタゴニスト GYKI52466 (8 μM) によって再現しなかったことから kainate receptor の関与が示唆された。

(ii) 抑制性シナプス伝達の入力遮断効果 (Ohshima-Takago *et al, unpublished*)

生後 5-7 日のマウスの内耳を両側破壊し、生後 21 日のマウスの MNTB 細胞から記録される IPSC の時間経過への影響をテストした。内耳破壊マウスでは、生後発達に伴う IPSC の短縮が阻害されており、また MNTB 領域の glycine receptor α1 subunit mRNA の増大が阻害されていた。これらの結果から聴覚入力活動依存性発達可塑性の存在が示唆された。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1) Yamashita T., Eguchi K., Saitoh N., von Gersdorff H. & Takahashi T. Developmental shift to a mechanism of synaptic vesicle endocytosis requiring nanodomain Ca²⁺. *Nature Neurosci.* 13: 838-844, 2010. doi:10.1038/nn.2576