

「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

H23 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. 研究実施体制

(1) 高橋グループ

① 研究代表者: 高橋智幸 (同志社大学生命医科学部、教授)

② 研究項目

- ・シナプス前末端イメージング
- ・シナプス前末端Caチャンネル生後発達スイッチ機構
- ・シナプス前末端ケージド化合物の光分解
- ・シナプス小胞回収制御機構
- ・前シナプス cAMP 動態解析
- ・グリア・シナプス連関

(2) 重本グループ

① 主たる共同研究者: 重本隆一 (自然科学研究機構生理学研究所、教授)

② 研究項目

- ・シナプス前末端 Ca チャンネルの免疫電顕的解析

§ 2. 研究実施内容

(I) 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*, *Neuron* in press) シナプス小胞がシナプス前末端膜に融合し、エクソサイトーシスによって伝達物質を放出した後、シナプス前末端膜からエンドサイトーシスにより小胞膜が回収される。小胞が枯渇することなく、シナプス前末端膜がその構造を保つためにはエクソサイトーシスとエンドサイトーシスのバランスが保たれることが必要で、具体的には、エクソサイトーシスした小胞の数を、何らかの方法でエンドサイトーシスの制御機構に伝えて、エンドサイトーシスの速度を調節することが行われていると考えられている。本研究では脳幹のグルタミン酸作動性興奮性シナプス前末端 calyx of Held において、膜容量測定を行い、種々の薬物やシグナル分子をシナプス前末端内に直接注入して、エンドサイトーシスの速度に対する作用を検討する手法を用いた。最初に見出したことは、protein kinase G (PKG) の阻害剤によってエンドサイトーシスが遅くなることであった。この作用は、NO scavenger の PTIO または NMDA 受容体のブロッカー APV によって再現し、PKG 阻害薬との同時投与によって作用が打ち消されたことから、小胞エクソサイトーシスによって放出された伝達物質グルタミン酸が、シナプス後細胞 (MNTB) の NMDA 受容体を介して Ca 流入を惹起し、その結果 NO が産生されて、シナプス前末端に逆行性に到達し、PKG を活性化させることによってエンドサイトーシスを加速させると推論した。この推論を更に支持する結果として、cGMP をシナプス前末端内投与したところ、エンドサイトーシスが加速し、PTIO の効果が遮断された。次いで PKG の活性化によるエンドサイトーシスの加速を媒介する分子を検討した結果、PIP2 がこの役割を果たすことが免疫染色および ELISA アッセイによって明らかになった。実際、PIP2 の阻害薬はエンドサイトーシスを減速させ、PKG 阻害薬、または PTIO は calyx Held および脳幹における PIP2 の発現レベルを著しく低下させた。一方、PIP2 の calyx 内投与によって PKG 阻害薬によるエンドサイトーシスの減速効果が遮断された。また、ここで明らかになった逆行性エンドサイトーシス調節メカニズムは生後発達に伴って機能するようになることが見いだされた。すなわち、生後 7-8 日齢のラットでは、エンドサイトーシスが遅く、PKG 阻害薬は無効であった。これらの事実を裏付ける結果として、calyx of Held および脳幹における PKG の発現は生後 7-8 日においては低く、生後 14-15 日にかけて著しく増大した。最後に、この PKG 依存性逆行性調節機構の生理的意義を検討した。阻害薬は高頻度持続性シナプス伝達の忠実性を低下させた。連続高頻度 (100 Hz) シナプス伝達によって生じる活動電位をシナプス後細胞から記録し、シナプス前末端内に PKG 阻害薬を投与したところ、刺激を開始して 20-30 秒にシナプス伝達の欠損が顕著に増加した。したがって PKG 依存性逆行性調節機構は、エクソサイトーシスの程度に応じてエンドサイトーシスを加速することにより、高頻度シナプス伝達の信頼性を維持するものと結論される。

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

単離/再構成シナプス小胞標本において計測されたグルタミン酸の小胞充填速度は、数分から数十分におよび、小胞枯渇後のシナプス伝達の回復時間を説明できない。Calyx シナプス前末端では、細胞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、UV パルスによってグルタミン酸濃度を瞬時に上昇させて、EPSC の振幅の回復時間を測定し、ここから小胞再充填速度を算定した。その結果、グルタミン酸の小胞再充填速度の時定数として 15 秒の値が得られた。この時定数は、温度依存的に短縮し(Q₁₀; 2.4)、P7-8 から P13-15 にかけて約 43%に短縮した。この時定数は、また、シナプス前末端内の Cl 濃度に依存し、Cl 濃度を mM 以下に低下させると著しく遅くなった。ここで求められた時定数は、クラスリン被覆小胞の回収時定数を下回るが、“kiss-and-run”に代表される高速小胞回収再利用時間を上回っており、高速回収経路の小胞のグルタミン酸再充填が不完全なためにシナプス伝達効率の維持に役立っていない可能性を示唆する。したがって、今回の結果は、伝達物質の小胞再充填ステップが、シナプス小胞回収再利用の律速段階になることを示している。

(III) シナプス前末端 Ca ドメインの分布と、Ca チャネルの局在 (Nakamura *et al*, 投稿準備中) 生後 7 日、14 日、21 日のラットの calyx of Held において活動電位、および Ca 電流パルスによる Ca 流入の時空間的な分布を共焦点顕微鏡によって測定した。Ca チャネル α 1A サブユニット抗体を用いた immuno-gold Freeze Fracture 電顕を行って、Ca チャネルの空間分布を測定したところ、生後発達に伴う Ca チャネルクラスターの分離が明らかになった。

(IV) 培養細胞におけるカリックス様シナプス形成 (Dimitrov *et al*, 投稿準備中) 延髄の分離培養によって、カリックス様大型のシナプスが形成されるが、この大型シナプス形成に関わる因子が明らかになってきた。候補物質 X の投与により、カリックス形成の頻度は 30 倍以上となり、X の抗体によって、その効果は消滅した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Eguchi K, Nakanishi S, Takagi H, Taoufiq Z, Takahashi T. Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exo-endocytic coupling of synaptic vesicles. *Neuron*, in press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件、海外 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件、海外 1 件)