

「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

H24 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
- ・シナプス小胞回収制御機構の生後発達
- ・シナプス前末端Caチャンネル生後発達スイッチ機構
- ・伝達物質小胞充填機構

(2) 重本グループ

① 主たる共同研究者: 重本 隆一 (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*)

シナプス小胞のリサイクル過程において、小胞の枯渇を防ぐためには、エクソサイトーシスした小胞の数をエンドサイトーシスの制御機構に伝えて、両者のバランスを保つことが必要である。本研究では PKG に依存する逆行性調節機構がその役割を担うことが明らかになった。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した。最初に PKG の阻害剤がエンドサイトーシスを遅くすることを見出した。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結論された。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。これらの結果から 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た。

(II) PKG 活性を PIP2 産生にリンクさせるメカニズム (Taoufiq *et al*, 投稿中)

神経末端の Rho kinase が PKG 活性を PIP2 産生にリンクさせることが明らかになった。Rho kinase 阻害剤は、脳幹 synaptosome の PIP2 量を低下させ、calyx 末端に注入するとエンドサイトーシスを遅延させた。このエンドサイトーシス抑制作用は、PIP2 の直接注入によって救済され、PKG 阻害薬の作用と occlude した。これと対比的に、synaptosome に Rho activator を投与すると PIP2 量が上昇し、calyx に注入すると、PKG 阻害薬の作用を打ち消した。これらの結果から、PKG の下流に Rho kinase が働き、神経末端の PIP2 レベルを調節することによって、エンドサイ

トーシスの速度を維持すると結論された。

(III) シナプス前末端小胞への伝達物質充填速度 (Hori & Takahashi, Neuron)

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。

(IV) 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、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。シナプスの成熟後においても、未成熟シナプスと同様に active zone 内に広く分布する複数の Ca チャネルが高速の伝達物質放出に関わることが明らかになった。

(V) 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の大型シナプスを形成し、培養下で構造的、機能的成熟の過程を追跡した。この大型シナプスは NT3 の投与により、形成頻度が増大し、NT3 抗体によって、その効果が著しく減弱することから TrkC の関与が示唆された。

(V) シナプス小胞動態、実時間イメージング (Guillaud *et al*, 投稿準備中)

培養カリックス末端に quantum dot を高濃度 KCl 下に取り込ませ、静止時の神経末端における単一シナプス小胞のダイナミクスを観測した。小胞の最大速度と軌跡長の間には正の相関が見いだされた。更に、高速長軌跡の小胞動態は、microtubules の重合阻害剤 nocodazol 処理によって、低速短軌跡となった。神経末端における小胞の輸送に microtubules が関わっていることが示唆される。

(VI)シナプス前末端 Ca チャネルサブタイプの生後発達スイッチ機構(Miki et al, 投稿準備中)
P/Q 型 Ca チャネルの異常は小脳失調の一因として知られており、P/Q 型チャネルのノックアウトマウスは N-P/Q のスイッチが起こる生後発達期に小脳失調症状を示すことが知られている。
小脳スライス培養系を立ち上げ、プルキンエ細胞(PC)から深部核細胞(DCN)に投射する IPSC を記録して、シナプス伝達を媒介する Ca チャネルサブタイプのスイッチを培養系において再現した。
神経活動を TTX で阻害し、あるいは神経栄養因子の受容体を k252a で阻害することによって、N 型から P/Q 型へのスイッチがブロックされることを見出した。

(VII)神経末端における微小管動態固定化の効果(Hori et al 未発表データ)

Calyx 前末端内に微小管安定化タンパク質である tau を注入すると、短期シナプス抑制からの回復が遅くなり、シナプス応答が抑制された。更に、これと同様の作用が低濃度の微小管安定化剤 taxol 注入によって再現された。これらの結果は微小管の重合脱重合がシナプスの正常な機能にとって重要なことを示唆している。

§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 (2012) Maturation of a PKG-dependent retrograde mechanism for exo-endocytic coupling of synaptic vesicles. *Neuron* 74, 517-529. Doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.028,
2. Hori T, Takahashi T (2012) Kinetics of synaptic vesicle refilling with neurotransmitter glutamate. *Neuron* 76, 511-517. Doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.013.