

30. 行動に関連した記憶痕跡シグナル素子の同定

同志社大学大学院脳科学研究科 教授 坂場 武史

概要

シナプス可塑性は学習記憶の素子レベルの基盤となっていると考えられている。シナプス後部の伝達物質受容体の動態を軸としたシナプス後性可塑性メカニズムに比べ、シナプス前終末由来のメカニズムに関しては解析法が限られているため、未解明の点が多かった。げっ歯類海馬顆粒細胞の苔状線維シナプス前終末は比較的大きく、直接パッチクランプなどによる分子細胞メカニズムの解析が可能であるメリットがある。苔状線維と CA3 錐体細胞の間のシナプスをモデルとして、実験的に誘導した様々なシナプス可塑性のメカニズムを系統的に解析し、分子細胞メカニズムの異同について考察した。特にシナプス前性の可塑性について、シナプス小胞開口放出・膜容量測定やシナプス応答をもとにメカニズムの解析を行い、異なる可塑性の間の共通性、特殊性を探った。また、行動に関連した可塑的な変化する可能性を明らかにするため、活動依存性プロモーターを利用して、行動に関連して活性化したシナプス前終末を可視化し、パッチクランプ法などを駆使してメカニズムの解析を行った。

背景および目的

シナプスは神経間の接合部であり、シナプス伝達によって神経間の情報伝達がおこなわれる。シナプス伝達強度は一定ではなく、神経活動や神経修飾物質によって、可塑的な変化を示すことが知られている。シナプス可塑性は学習記憶の素子レベルの基盤となっていると考えられている。シナプス後部の伝達物質受容体の動態を中心としたシナプス後性可塑性はメカニズムについては研究が進んでおり、また行動との関連についても理解が進みつつある。一方でシナプス前終末由来のシナプス前性可塑性メカニズムに関しては、解析法が限られているため、未解明の点が多い。げっ歯類海馬顆粒細胞の苔状線維シナプス前終末は比較的大きく、直接パッチクランプなどによる分子細胞メカニズムの解析が可能であるメリットがある。苔状線維と CA3 錐体細胞の間のシナプスをモデルとして、実験的に誘導した様々なシナプス可塑性のメカニズムを系統的に解析し、分子細胞メカニズムの異同について考察した。

研究代表者はこれまで、苔状線維からの直接パッチクランプ記録を確立し、シナプス前後部からの同時記録による解析を行った (Midorikawa and Sakaba, 2017)。また、シナプス前性可塑性のカギを握るセカンドメッセンジャーである cAMP のシナプス前終末における作用機序に関する解析を行った (Fukaya et al., 2021)。さらにシナプス可塑性の代表的なものである長期シナプス増強 (LTP) のシナプス前終末におけるメカニズムに関して解析を行った (Fukaya et al., 2023)。

本研究は、これらの研究をベースに、LTP 以外のさまざまなシナプス可塑性のメカニズムについて共通の方法論で解析を行い、メカニズムについて明らかにした。また、行動に関連した可塑的な変化する可能性を明らかにするため、活動依存性プロモーターを利用して、行動に関連して活性化したシナプス前終末を可視化し、パッチクランプ法などを駆使してメカニズムの解析を行った。

方法

げっ歯類脳から急性海馬スライス標本を作成した。スライス標本に対して、パッチクランプ法を適用し、シナプス前終末ないしシナプス後細胞（CA3 錐体細胞）からの電気記録を行った。シナプス前終末からはイオンチャネル電流の記録および膜容量測定、シナプス後細胞からシナプス応答（EPSC）の記録を行った。長期間記録をおこなう場合はシナプス場電位（field potential）の記録を行った。チャネルロドプシン（Chronos）は AAV を *in vivo* で歯状回に導入することで発現させた。また、活動依存性プロモーターとして RAM を用い、AAV を用いて海馬歯状回顆粒細胞に活動依存性に GFP やチャネルロドプシンなどを発現させた。マウスを新規環境に暴露した 24 時間後にスライス標本を作成し、その後パッチクランプ法による解析を上記と同様に行った。

実験は大学の規程に従い、実験に関する当該委員会の承認を経て行った。

結果

（1）長期シナプス抑圧（LTD）のメカニズム

苔状線維シナプスにおいて LTP は高頻度刺激後に起こることが知られている。一方で、LTD は低頻度の比較的長時間の刺激に対して起こることが知られている。LTD のメカニズムを明らかにするため、光依存性チャネル Chronos を苔状線維に発現させ、光刺激で LTD を誘導した。フィールド記録で LTD の誘導を確認したあと、シナプス前終末からパッチクランプ記録を行い、シナプス前性メカニズムについての解析を行った。Ca チャネル電流に関しては変化がなく、放出機構の変化が明らかになった。現在、詳細なメカニズムについて解析を続けている。

（2）セロトニンによるシナプス前性修飾のメカニズム

LTP や LTD はシナプス自身の活動に起こる可塑性（homosynaptic plasticity, activity-dependent plasticity）と呼ばれるものである。一方で、外来の修飾物質や伝達物質がシナプスに作用して起こる可塑性（heterosynaptic plasticity）と呼ばれるものがある。ドーパミンやセロトニン、BDNF などが代表的なものだと考えられる。このうち、本研究ではセロトニンのシナプス前性作用について、セロトニンの細胞外からの投与によって、シナプス伝達への効果を検討した。セロトニンはシナプス応答（EPSC）の振幅を増大させた。ここからさらに、分子細胞メカニズムを明らかにした。これまでのアメフラシ神経シナプスなどを用いた研究では、シナプス前終末の活動電位の波形が変わることで、シナプス前細胞への Ca 流入が増大することが重要なメカニズムだと考えられていたが、苔状線維では活動電位の振幅には大きな変化はなかった。一方で、セロトニンはシナプス前終末 Ca 電流の大きさを増大させた。また、伝達物質放出量が増大していることが、膜容量測定による開口放出量の測定から明らかになった。さらに、Ca 電流量増大のみで伝達物質放出量増大を説明できるかどうかを明らかにするため、シナプス前後部からの直接同時記録を行った。セロトニン投与後、Ca 電流とシナプス応答の増大を確認したあと、Ca 流入量を投与前と同様に調整すると、シナプス応答の増大の程度は減弱したものの、増大そのものは起こった。よって、セロトニンはシナプス前終末 Ca チャネルと伝達物質放出機構の両方に作用しており、LTP や LTD とは部分的に異なるメカニズムであることがわかった（Miyano et al., *in press*）。

（3）行動に関連した可塑性メカニズム

行動に関連してシナプスが可塑的な変化をする可能性を明らかにするため、活動依存性プロモーターを利用して、行動に関連して活性化したシナプス前終末を可視化し、パッチクランプ法などを駆使してメカニズムの解析を行った。活動依存性プロモーターとして RAM を用い、新規環境に暴露した後に急性スライス標本を作成し、GFP や Chronos を発現させ、シナプス前終末からの直接記録や線維を光刺激して誘発したときの EPSC の記録を行った。新規環境下で活動したシナプスでは、Ca 電流量が変化せず、伝達物質放出量が減少している可能性が示唆された。現在、論文投稿準備中である。

考察

本研究では、異なる可塑性のメカニズムの共通性、違いについて明らかにしてきた。苔状線維シナプスの可塑性は、伝達物質放出機構の修飾という共通性を持ちながらも、放出機構のどこを修飾するかに違いがある。ま

た、可塑性によっては放出機構の修飾以外に、Ca チャネルの修飾など異なるメカニズムによって起こっており、単一苔状線維シナプス内で複雑な可塑性制御メカニズムを持つことが明らかになってきた。これらを時空間を軸として統一的に理解していくことが、今後の課題である。

(完)

発表論文

- 1) Miki T, Okamoto Y, Ueno-Umegai M, Toyofuku R, Hattori S, Sakaba T. Single-vesicle imaging reveals actin-dependent spatial restriction of vesicles at the active zone, essential for sustained transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2024 Oct 22;121(43):e2402152121. doi: 10.1073/pnas.2402152121. Epub 2024 Oct 15.
- 2) Hirai H, Konno K, Yamasaki M, Watanabe M, Sakaba T, Hashimotodani Y. Distinct release properties of glutamate/GABA co-transmission serve as a frequency-dependent filtering of supramammillary inputs. *Elife*. 2024 Dec 16;13:RP99711. doi: 10.7554/eLife.99711.
- 3) Miyano R, Onishi T, Tabuchi E, Hirose K, Sakaba T. Serotonin potentiates presynaptic calcium currents and transmitter release at cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. in press

引用文献

- 1) Midorikawa M, Sakaba T. Kinetics of Releasable Synaptic Vesicles and Their Plastic Changes at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Neuron*. 2017 Dec 6;96(5):1033-1040.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.016. Epub 2017 Nov 2. *ci Adv*. 2023 Feb 22;9(8):eadd3616. doi: 10.1126/sciadv.add3616. Epub 2023 Feb 22.
- 2) Fukaya R, Maglione M, Sigrist SJ, Sakaba T. Rapid Ca²⁺ channel accumulation contributes to cAMP-mediated increase in transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 2;118(9):e2016754118. doi: 10.1073/pnas.2016754118.
- 3) Fukaya R, Hirai H, Sakamoto H, Hashimotodani Y, Hirose K, Sakaba T. Increased vesicle fusion competence underlies long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *Sci Adv*. 2023 Feb 22;9(8):eadd3616. doi: 10.1126/sciadv.add3616. Epub 2023 Feb 22.