

生理研研究会

『新たなコンセプトで シナプス伝達機構を考える』

2008 年9月19日(金)～9月20日(土)

自然科学研究機構 生理学研究所(明大寺地区) 1 階会議室

代表者: 浜松医科大学生理学第一講座 福田敦夫

所内対応者: 生理学研究所生体恒常機能発達機構 鍋倉淳一

抄録集



生理学研究所研究会

新たなコンセプトでシナプス伝達機構を考える

日時: 2008年 9月19日(金)～ 9月 20日(土)

場所: 自然科学研究機構生理学研究所(愛知県岡崎市)

代表者: 浜松医科大学 生理学第一講座 福田敦夫

世話人: 生理学研究所 生体恒常機能発達機構研究部門 鍋倉淳一(所内)

1日目(9月19日金曜日)

13:05

開会の挨拶

システム (座長: 加藤総夫 東京慈恵会医科大学)

13:10

The lateral connections in the superficial layer of the mouse superior colliculus

Phongphanphanee Penphimon (総合研究大学院大学大学院生命科学研究科生理科学専攻認知行動発達機構研究部門)

13:40

経頭蓋蛍光イメージングによるマウス高次視覚機能の解析

澁木克栄(新潟大学脳研究所システム脳生理学分野)

14:10

マウス新生児脊髄反回抑制回路におけるシナプス結合様式

西丸広史(筑波大学大学院 人間総合科学研究科基礎医学系生理)

Coffee Brake(10分)

シナプス前機構 (座長: 澁木克栄 新潟大学)

14:50

2型リアノジン受容体による海馬苔状シナプス前カルシウム動態の増幅

神谷温之(北海道大学大学院 医学研究科神経生物学分野)

15:20

Presynaptic phenotypeの基礎検討

桂林秀太郎(福岡大学薬学部臨床疾患薬理学教室)

15:50

グルタミン酸のシナプス小胞への取込機構

高森茂雄(東京医科歯科大学脳統合機能研究センター)

16:20

シナプス小胞エンドサイトーシス活動依存性加速メカニズムの生後発達

山下貴之(沖縄科学技術研究基盤整備機構 大学院大学先行研究プロジェクト 細胞分子シナプス機能ユニット)

Coffee Brake(10分)

シミュレーション・モデル (座長:平野丈夫 京都大学)

17:00

運動神経終末のCa誘起性Ca遊離の特性とそのシミュレーション
久場健司(名古屋学芸大学 管理栄養学部 管理栄養学科)

17:30

プルキンエ細胞におけるAMPA受容体双方向性トラフィックとモデルによる考察
山口和彦(理化学研究所脳科学総合研究センター記憶学習機構研究チーム)

18:00

コンピュータシミュレーションと生理学実験による小脳抑制性シナプス可塑性の誘導閾値制御メカニズムの解析
北川雄一(京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻 生物物理学教室平野研究室)

18:45

懇親会 (サングリア)

2日目(9月20日土曜日)

発達・可塑性のメカニズム (座長:八尾 寛 東北大学)

9:00

海馬スライス培養系における神経細胞生後新生の系譜解析
横瀬 淳(東北大学大学院 生命科学研究科 生命機能科学専攻)

9:30

頭部外傷後のシナプス可塑性障害に対するエダラボンの効果
蓮尾 博(久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門)

10:00

慢性痛による扁桃体中心核シナプス伝達の増強機構
加藤総夫(東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター神経生理学研究室)

Coffee Brake(10分)

シナプス伝達の新展開 (座長:関野祐子 東京大学)

10:40

神経細胞体におけるCa²⁺誘起性Ca²⁺遊離の不活性化機構
秋田天平(自然科学研究機構 生理学研究所 細胞器官研究系 機能協同研究部門)

11:10

網膜双極細胞間に存在する電気シナプスの性質と働き
荒井 格(東京大学大学院人文社会系研究科心理学研究室)

11:40

海馬CA1アストロサイトにおけるGABAカレントと細胞内Cl⁻濃度変化
江川 潔(浜松医科大学医学部第一生理学講座)

12:10

閉会の挨拶

The lateral connections in the superficial layer of the mouse superior colliculus

Penphimon Phongphanphanee^{1,2}, Robert Marino³, Katsuyuki Kaneda^{1,2}, Yuchio Yanakawa⁴, Douglas P. Munoz³, Tadashi Isa^{1,2,5}

¹Department of Developmental Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji, Okazaki, Japan

²Department of Physiological Sciences, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Hayama, Japan

³Department of Physiology, Centre for Neuroscience Studies, Canadian Institute of Health Research Group in Sensory-Motor Systems, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada

⁴Department of Genetic and Behavioral Neuroscience, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi, Japan

⁵The Core Research for Evolutionary Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), Kawaguchi, Japan

The superior colliculus (SC), a layered midbrain structure, functions as a crucial integrative center for orienting behaviors such as saccadic eye movements. Lateral connections within this map have been proposed to mediate temporal and spatial competition among multiple visual stimuli that can simultaneously appear within different locations of the visual field. Many models of these interactions in the SC commonly assume that the strength of the local neuronal connections depends on the distance between neurons. Furthermore, they propose that short-range excitation and a long-range inhibition shapes the distribution of neural activity in the SC map in a winner-take-all fashion.

To test these models, we prepared horizontal slices which preserved the local architecture of the topographical map and recorded postsynaptic responses from non-GABAergic cells using the whole-cell current-clamp recording technique. Horizontal slices, composed of stratum griseum superficiale (SGS) and stratum opticum (SO), were obtained from 16-20 postnatal-day GAD67-GFP knock-in mice. We stimulated various locations in the SO with an 8x8 electrodes array grid (150 μ m interelectrode space) in order to mimic the visual input to the SGS layer.

We have found short-range excitation surrounded by long-range inhibition in the local circuits of the SGS layer. When excitatory and inhibitory interactions were separated and compared with voltage-clamp recordings at different holding potentials, inhibition exhibited a delayed onset and longer duration than the excitation. The differences in the temporal characteristics of the excitatory and inhibitory responses contributed to a center-surround receptive field map in the superficial layer. We conclude that local lateral interactions in the SGS layer play a key role in the competition of visual input in the SC local circuit proposed by the models for target selection process of saccadic eye movements.

経頭蓋蛍光イメージングによるマウス高次視覚機能の解析

澁木克栄
新潟大脳研生理

遺伝子改変操作は高次脳機能の分子メカニズムを研究する上で重要な手段である。しかし遺伝子改変操作が容易に出来るマウスの高次脳機能の解析は限定的であり、高次脳機能が詳しく解析されている霊長類の遺伝子改変操作は困難である。このジレンマを解決するため、我々は活動依存的な緑色フラビン蛋白蛍光シグナルを利用した経頭蓋蛍光イメージングによってマウスの皮質活動を可視化し、高次脳機能の解析に取り組んでいる。この研究会では、霊長類において詳細に解析が進んでいる高次視覚機能が、マウスでどこまで解析できるのか、我々のデータを紹介したい。

ウレタン麻酔したマウスに移動する縞模様を提示すると、視覚野に局限した蛍光応答が観察された。縞模様の移動スピードを変えると蛍光応答のパターンが微妙に異なった。これはV1が遅い縞模様によく応じ、高次視覚野の一部が速い縞模様によく応ずるという刺激選択性の差によると思われる。この移動スピードに対する選択性を利用し、V1と高次視覚野を分離する差分イメージング法を開発した。即ちマウスに連続して移動する縞模様を提示し、移動スピードをステップ状に速くすると高次視覚野のみに蛍光増加が見られ、ステップ状に遅くするとV1と高次視覚野の残存部にのみ蛍光増加が見られた。視覚刺激の提示位置を変化させると、それぞれの領野の応答は独立したマップを示した。V1を選択的に破壊しても高次視覚野の応答が残存したことから、V1と高次視覚野は独立した視覚入力を受けると思われる。V1の眼優位性可塑性として良く研究されているものに単眼遮蔽による眼優位性可塑性があるが、高次視覚野は別の経験依存的可塑性によって支配されていると予想される。例えば動きを感知できないストロボ光下でマウスを飼育すると、高次視覚野の応答性がV1と一致したことから、高次視覚野への視覚入力は経験依存的なコントロール下にあると結論される。

眼優位性変化を起こすもう一つの操作として、斜視が知られている。そこでマウスの片目に約30度光を屈曲させるプリズムを装着させ、実質的な外斜視状態を作り出し、視覚野応答への影響を解析した。4週齢のマウスに5-7日間片眼プリズムを装着させると、斜視眼を介する視覚野の応答が、健常眼を介する視覚野応答と比較して有意に抑圧された。視覚野の応答が抑圧されるには、生後4週齢程度が効率が良く、6週齢のマウスでは観察されなかったため、この可塑性には臨界期が存在すると思われる。さらに単眼遮蔽による抑圧と異なり、視覚野の両眼視領域だけでなく単眼視領域でも抑圧が見られた。何故片眼プリズム装着によってこのような抑圧が起きたのか？一つの可能性は、光路を屈曲させることにより、視覚入力とヒゲ入力が空間認知においてミスマッチを生じたためであるということである。この仮説を検証するため、予めマウスのヒゲを切ってからプリズムを装着させると、視覚野応答の抑圧は全く生じなかった。当然ながら単眼遮蔽による視覚野可塑性はヒゲの有無によって影響を受けなかった。つまり、マウスは身近な空間を「見る」のに主にヒゲに頼るので、ヒゲからの情報と視覚情報が食い違うときに、視覚野応答の抑圧が生じたと思われる。ヒゲ入力と視覚入力という全く異なる情報をマウスはどのように比較し、空間認知におけるミスマッチを検出できたのだろうか？霊長類では異なる感覚入力を統合して空間認知を行う脳部位は頭頂連合野である。マウスでも頭頂連合野に相当する脳部位が存在するので、この部位を破壊する実験を行ったところ、プリズム装着による視覚野応答の抑圧が阻害された。即ち単眼遮蔽による眼優位性可塑性は両眼からの入力の競合という比較的シンプルなメカニズムで生ずるが、斜視による視覚野抑圧は頭頂連合野に相当する高次領野の働きによって生ずるという新たなメカニズムによることが判った。

マウスで実験する意義の一つは、冒頭で述べたように遺伝子改変技術が使用できることである。そこで遺伝子改変マウスを用いた我々の最新の知見についても紹介したい。

マウス新生児脊髄反回抑制回路におけるシナプス結合様式

西丸 広史

筑波大学大学院 人間総合科学研究科基礎医学系生理

哺乳類の脊髄において Renshaw 細胞が運動ニューロンの軸索側枝から興奮性シナプス入力を受け、運動ニューロンを反回性に抑制することはかなり以前より知られている。しかし、この反回抑制回路を構成する二つのニューロン群の結合様式にはまだ不明な点が多く、この回路の機能的役割についてはいくつかの説が提唱されているが、どれもまだ仮説の段階である。本研究では、腰髄における反回抑制回路の結合様式を明らかにする目的で、新生児（生後 0-4 日）の GAD67-GFP ノックインマウスからの脊髄摘出標本を用い、脊髄内の神経結合をほぼ正常に保ったままで Renshaw 細胞をホールセルパッチクランプ記録し、複数の腰髄髄節の前根をガラス吸引電極により電気刺激することで、異なる運動ニューロン群からのシナプス入力様式を調べた。Renshaw 細胞の細胞体が局在する髄節の腰髄前根の電気刺激に対しては、記録したすべての Renshaw 細胞（ $n = 18$ ）で短潜時（2-4 ms）の EPSP が観察された。刺激強度を上げると、その EPSP の振幅と持続時間が増大し、活動電位を発生した。その一方、吻側あるいは尾側の髄節前根の刺激に対しては、約半数の Renshaw 細胞（ $n = 9$ ）が応答せず、残りのものでは細胞体の位置に近い方の前根の電気刺激に対して EPSP が観察された。三つ以上の異なる髄節の前根刺激に対して応答する細胞はなかった。記録した Renshaw 細胞を神経トレーサー色素（neurobiotin）で標識し、その軸索投射範囲を観察したところ、細胞体が局在する髄節だけでなく吻尾方向二髄節を越える範囲に渡って軸索の伸展がみられ、その分枝は運動ニューロン核に投射していた。一方、運動ニューロンのホールセルパッチクランプ記録で前根を刺激すると中潜時（6-8 ms）の IPSP が観察されるが、細胞体が局在する髄節の前根だけではなくその前後の髄節の前根の電気刺激によってもほぼ同じ振幅の IPSP が観察された。以上の結果から、Renshaw 細胞は興奮性入力を受ける運動ニューロン群とは異なる運動ニューロン群をも抑制していることが示唆された。この運動ニューロンと Renshaw 細胞の結合の非対称性はこの回路の機能的意義を探る上で非常に重要な知見と考えられた。

2型リアノジン受容体による 海馬苔状線維シナプス前カルシウム動態の増幅

神谷温之

北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野

海馬苔状線維シナプスにおける長期増強 (long-term potentiation: LTP) は、NMDA 受容体活性化を必要とせず、テタヌス刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇が可塑的な変化を誘発し、持続的な伝達物質放出の増大を引き起こすと考えられている。これまでの薬理学的検討から、細胞内カルシウム放出チャンネルであるリアノジン受容体が苔状線維シナプスでの LTP 誘発に寄与することが示唆されているが、その詳細な作用機序や、関与するサブタイプなどの分子の実態に関しては不明であった。本研究では、軸索標識法によるシナプス前カルシウム動態測定と免疫組織学的解析を併用して、苔状線維シナプス前部のリアノジン受容体の活性化機構と分子局在について調べた。リアノジン感受性細胞内ストアからのカルシウム放出を抑制する TMB-8 やリアノジンは、単発刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇にはほとんど影響を与えなかったが、LTP を誘発する 100 Hz 1 秒のテタヌス刺激によるカルシウム上昇を抑制した。このとき、テタヌス刺激の初期相にはほとんど変化がなく、後期相で抑制が顕著であった。苔状線維シナプス前部でのリアノジン受容体が神経活動依存的に活性化され、細胞内ストアからのカルシウム放出によりカルシウム上昇を増幅することで、シナプス前性の長期増強の誘発に寄与するものと考えられた。さらに、このシナプス前リアノジン受容体の分子の実体と細胞内局在を調べる目的で、リアノジン受容体のサブタイプ特異的抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。2 型 (心筋型) リアノジン受容体 (RyR2) は海馬に高密度に発現し、中でも苔状線維の走行する CA3 野透明層および歯状回分子層に強い発現を認めた。各種マーカー分子との二重免疫染色により、CA3 野透明層における RyR2 の細胞内局在を解析したところ、RyR2 の標識は苔状線維終末のマーカーである小胞型グルタミン酸トランスポーター-VGLUT1 や樹状突起マーカーの微小管関連タンパク MAP2 とは共存せず、軸索マーカーであるニューロフィラメント NF160 と強い共局在を示した。苔状線維軸索に発現する RyR2 がカルシウム誘発カルシウム放出 (CICR) の機構を介してシナプス前カルシウム動態を増幅する可能性が考えられた。

Presynaptic phenotype の基礎検討

桂林 秀太郎

福岡大学 薬学部 臨床疾患薬理学教室

シナプスに関連する遺伝子改変動物の Synaptic phenotype を解析する際、標的遺伝子の Dysfunctional phenotype だけなのか、シナプスの発達異常 (Abnormal Synaptogenesis) を含む phenotype なのか判断することはシナプスの機能を理解する上で重要な課題である。例えば、一般的な野生型マウスにおけるシナプス形成過程において、幼若期のニューロンは無造作にシナプスを形成・投射して神経発火を惹起する。一方、成熟期のニューロンはシナプス除去とシナプス強化を経て同期的神経活動パターンを構築する。この一連の過程において、神経伝達物質の放出確率 (Vesicular release probability, Pvr) は発達により低下すると言われている。本研究では Genetic phenotype と Synaptogenesis を区別するために野生型ニューロンにおけるシナプス伝達の発達変化を定性した。実験は遺伝子改変動物のシナプス伝達の解析に有用な “オータプス初代培養細胞” を野生型新生仔マウスから作製し、Day *in vitro* (DIV) 7–9 (培養初期), DIV 13–15 (培養中期), DIV 21–27 (培養後期) の3群に分類してパッチクランプ法を用いて伝達物質の放出機構を中心に解析した。結果、グルタミン酸作動性 EPSC (Excitatory postsynaptic current) と RRP (Readily releasable vesicle pool) は培養期間に応じて増大した。また、1回の活動電位発火で開口放出されるシナプス小胞数は培養初期から中期に増加したが Pvr は低下し、以後は一定値を示した。また、Quantum size もしくは AMPA 受容体の感受性は培養初期から中期には変化を認めず、培養後期に増大した。加えて、活動電位発火に同期的な Synchronous release 成分と非同期的な Asynchronous release 成分も発達とともに増加したが、両者の比率に発達変化は認められなかった。また、シナプス数は培養初期から中期にかけて急増し、中期から後期は微増する傾向が予測できた。以上の結果から、単一ニューロンの各種パラメーターの発達変化にはタイミングのズレがあることが分かった。これらの結果は遺伝子改変動物の Synaptogenesis と Synaptic phenotype の区別に有用であると考えられる。

グルタミン酸のシナプス小胞への取込機構

高森茂雄

東京医科歯科大学 脳統合機能研究センター

酸性アミノ酸であるグルタミン酸は、哺乳類中枢神経系で最も主要な興奮性神経伝達物質として働く。ニューロンがグルタミン酸を神経伝達物質として用いるためには、グルタミン酸を分泌小胞であるシナプス小胞へと濃縮する必要がある。この過程を担うのが、小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)である。他の神経伝達物質と同様に、グルタミン酸のシナプス小胞への輸送は、液胞型プロトン ATPase (V-ATPase)によって形成されるプロトン電気化学勾配によって駆動されるが、そのエネルギー要求性や塩素イオンによる二層性の依存など、VGLUT の分子同定後も依然として多くの疑問を残したままである。本口演では、シナプス小胞のグルタミン酸輸送機構に関する現在までの歴史的な知見を総括するとともに、シナプス小胞膜の塩素イオン透過性の解明を契機として、最近我々が提唱するに至った「VGLUT の新しい輸送制御機構」に関して議論したい。

シナプス小胞エンドサイトーシス活動依存性加速メカニズムの 生後発達

山下 貴之¹、 江口 工学¹、 高橋 智幸^{1, 2}

¹ (独) 沖縄科学技術研究基盤整備機構・細胞分子シナプス機能ユニット

² 同志社大学・生命医科学部・神経生理学

シナプス小胞エンドサイトーシスにおける神経終末端細胞内 Ca^{2+} の役割については、不明な点が多く残されている。今回我々は、聴覚中継シナプスである calyx of Held シナプスを用いてこの問題を検討した。聴覚獲得前の生後 7 - 9 日のラット calyx of Held シナプス前末端からホールセル記録を行い、脱分極パルス (20 ms) を連続的に与えて (1 Hz x 20) Ca^{2+} 電流を誘発すると、膜容量測定法によって記録されるエンドサイトーシスの初速度が加速する (Wu *et al.* 2005)。この加速は、細胞外 Ca^{2+} の Sr^{2+} による置換もしくはカルモジュリン (CaM) 阻害ペプチド (MLCK ペプチド) の神経終末内注入によって、著しく抑制された。 Ca^{2+} の Sr^{2+} 置換および MLCK ペプチドは、単一脱分極パルスで誘発されるエンドサイトーシスには作用を示さなかった。これらの結果は、連続刺激に伴うシナプス前末端内 Ca^{2+} の集積によって CaM が活性化されエンドサイトーシスを加速するメカニズムの存在を示唆する。エンドサイトーシスの活動依存性加速現象は、聴覚獲得後の生後 13 - 14 日のラット calyx of Held においても同程度認められた。ところが、この日齢の動物では、 Ca^{2+} の Sr^{2+} 置換および MLCK ペプチドの前末端内注入は、連続刺激に伴うエンドサイトーシスの加速に全く阻害効果を示さなかった。生後発達に伴って、シナプス前末端内に Ca^{2+} が集積し難くなることが、この生後発達変化の主因であると推論される。

運動神経終末の Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離の特性とシミュレーション

久場健司（名古屋学芸大学、管理栄養学部） 蘇我（榊原）聡子（豊橋市民病院） 久保田正和（京都大学医学部保健学科、老年科） 鈴木慎一（元名古屋大学医学部助手） 秋田天平（生理学研究所、細胞器官系、機能協同研究部門） 成田和彦（川崎医科大学、生理）

カエル運動神経終末でのアセチルコリン(Ach)の放出は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外からの Ca^{2+} によると信じられていたが、10 年程前より Ach 放出が Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離(CICR)により大きく促進されることが解ってきた。すなわち、CICR は、運動神経の低頻度の活動下では Ach 放出に寄与しないが、高頻度活動下では流入する Ca^{2+} により神経終末のリアノジン受容体(RyR)が活性化しうる状態に変化（プライミング）し、直ちに活性化され、更なる Ca^{2+} 流入により不活性化されることが明らかになった。従って、リアノジン受容体では、プライミング、活性化、不活性化の三つの状態への変化が Ca^{2+} により制御されることになる。一方、細胞内での Ca^{2+} 流入による Ca^{2+} 濃度の上昇は動的に変化し、 Ca^{2+} チャンネルの開口部位近傍には、 Ca^{2+} マイクロドメインといわれる定常な非常に高い濃度領域が出現し、ここでは Ca^{2+} 結合タンパクによる速い緩衝作用と周囲への拡散が起こる。この Ca^{2+} マイクロドメインは、 Ca^{2+} チャンネル閉鎖後は直ちに消失し、大部分の細胞質（bulk 相）での Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} 貯蔵部位への取り込みと細胞膜での汲み出しにより静止レベルに戻る。

そこで、「これらの三つの Ca^{2+} による制御部位が、 Ca^{2+} マイクロドメインまたは bulk 相の何れにあるか」が問題となる。これは、細胞外の Ca^{2+} 濃度を変えることによる Ca^{2+} チャンネルを通る Ca^{2+} 流入量の変化、 Ca^{2+} チャンネル阻害剤によるチャンネル密度の変化、結合速度の異なる Ca^{2+} キレート剤の効果から調べられる。反復するテタヌス刺激(50 Hz, 15 秒と 5 秒間の休止期間の反復)による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇の CICR の成分の大きさは、 Ca^{2+} チャンネル密度に比例するのに対し、外液の Ca^{2+} 濃度に対しては上に凸の依存性を示す。一方、プライミングと不活性化の速度は、細胞外 Ca^{2+} 濃度と Ca^{2+} チャンネル密度の減少により小さくなり、その依存性はほぼ同様である。又、EGTA と BAPTA は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の Ca^{2+} 流入による成分と CICR の成分を共に減少するが、CICR の成分の減少は BAPTA で大きかった。この結果は、RyR の活性化部位は Ca^{2+} マイクロドメインにあり、プライミングと不活性化の制御部位は bulk 相にあることが示唆される。この可能性を、シミュレーションにより検証した。

RyR に、休止、プライミング、不活性化の 3 状態を仮定し、プライミング状態は活性化状態へ直ちに移動（常時平衡）と仮定する。休止状態→プライミング状態、プライミング状態→不活性化状態、プライミング状態→活性化状態の遷移は Ca^{2+} 依存性とし、神経終末細胞質の bulk 相、細胞膜での Ca^{2+} フラックス、 Ca^{2+} 貯蔵オーガネラの相、オーガネラ膜と細胞膜の Ca^{2+} ポンプを仮定した。これらの RyR の反応が Ca^{2+} マイクロドメインまたは bulk 相の何れの Ca^{2+} を感じているかを、前者は反応式の中で Ca^{2+} フラックスを直接作用させ、後者は bulk 相の Ca^{2+} 濃度を作用させ、それぞれの Ca^{2+} 濃度や RyR の変化の時間経過を計算した。又、細胞外 Ca^{2+} 濃度依存性と Ca^{2+} チャンネル密度依存性を調べ、実験データと比較した。シミュレーションは、実験による結論「RyR の活性化部位は Ca^{2+} マイクロドメイン内にあり、プライミングと不活性化の制御部位は bulk 相にあること」を証明した。

ブルキンエ細胞における AMPA 受容体双方向性トラフィックとモデルによる考察

山口 和彦
理研・脳センター・記憶学習

記憶や学習の基礎メカニズムにシナプス可塑性があり、海馬や小脳の興奮性シナプスでは、AMPA 受容体の双方向性トラフィックにより、シナプス伝達が制御されている。海馬 CA1 錐体細胞では長い C 末を持つサブユニット GluR1/4 を含む AMPA 受容体が活動依存的にシナプス膜に挿入されることにより、長期増強 (LTP) が生じる。一方、活動依存性の長期抑圧 (LTD) においては、短い C 末を持つ GluR2/3 がシナプス膜から内在化によって除去される。神経活動に依存しない構成性トラフィックでは GluR2/3 がリサイクリングされている。LTP 誘導刺激によりシナプス膜に挿入された GluR1/4 は構成性に GluR2/3 に置換されるが詳細は不明であり、海馬錐体細胞シナプスにおける AMPA 受容体の双方向性トラフィックは複雑である。

一方、成熟哺乳動物の小脳ブルキンエ細胞では短い C 末を持つ GluR2/3 のみが発現しており、LTP, LTD、さらに構成性トラフィックにおいて、同じサブタイプからなる AMPA 受容体がトラフィックによる制御を受けている。我々は以前より (1) 破傷風毒素やボツリヌス毒素の細胞内投与により、構成性に EPSC 振幅が減少する。(2) ダイナミン 1 の阻害ペプチドの細胞内投与により構成性に EPSC 振幅が増加する。(3) LTD と構成性 EPSC 抑圧は閉塞しない。(4) LTP と構成性増強は閉塞する、ということを示してきた。今回、LTP, LTD および構成性トラフィックを統一的に説明するモデルを構築し、速度論的な解析を試みた。

今回のモデルは AMPA 受容体 (GluR2/3) を、細胞内可動プール (IMP)、シナプス膜可動プール (SMP)、シナプス膜安定化プール (SSP) の 3 つのグループに分かれて存在していると仮定し、実験結果をフィットした。典型的には通常、IMP:SMP:SSP は約 2:1:1 であり、エクソサイトーシスを介した IMP から SMP への速度定数は 0.15/min、エンドサイトーシスを介した SMP から IMP への速度定数は 0.3/min であった。SMP と SSP 間の移動の速度定数は 0.0005/min と大変小さい。構成性および活動依存性増強では最大増強を約 180% に制限する“枠”の存在が推定された。LTD においては安定化プールからの脱安定化とエンドサイトーシス側への平衡のシフトが生じていることが想定された。小脳ブルキンエ細胞における AMPA 受容体発現の双方向性可塑性ならびに構成性トラフィックは統一的なモデルを用いて理解することが可能となり、どの酵素がどのサブステップの調節に関与しているのかを今後、解明していく。

コンピュータシミュレーションと生理学実験による 小脳抑制性シナプス可塑性の誘導閾値制御メカニズムの解析

北川雄一、平野丈夫、川口真也
京都大学大学院理学研究科生物物理学教室

小脳プルキンエ細胞に形成される抑制性シナプスでは、プルキンエ細胞が脱分極すると GABA_A 受容体を介する応答が長時間にわたり増強される。この現象は Rebound Potentiation (RP) と呼ばれる (Kano et al, 1992)。RP 誘導には細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇と CaMKII 活性化が必要である。私たちは以前、プルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前抑制性介在ニューロンが活性化すると、シナプス後 GABA_B 受容体を介して RP が抑制されることを見出した。RP 誘導は、CaMKII の他、cAMP 依存性リン酸化酵素の PKA や脱リン酸化酵素の PP-1、カルシニューリンを含む多くの分子が複雑に相互作用することで制御される。その RP 制御を担う分子ネットワークの挙動を系統的に理解するために、細胞内シグナル伝達経路の動的シミュレーションモデルを構築した。そのモデルで計算機シミュレーションを行うと、一過的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇により CaMKII は長期的に活性化したが、 GABA_B 受容体を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と同時に活性化させると CaMKII の長期活性化は抑えられた。この結果から、異なる組み合わせ刺激により分子ネットワークが双安定的に振る舞い、RP 誘導の成否が調節されるという以前の細胞生理学実験の結果をシミュレーションで再現できた。シミュレーション解析により、CaMKII 長期活性化をもたらすのに必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は、主に cAMP を分解する酵素である PDE 1 により制御されることが示唆された。この理論予測をホールセルパッチクランプ法により検証し、RP 誘導に必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は Ca^{2+} 依存性脱リン酸化酵素のカルシニューリンや Ca^{2+} 非依存性の PDE4 ではなく PDE1 により調節されることが確認できた。以上から、コンピュータシミュレーションと電気生理学実験を組み合わせることで、RP 誘導に必要な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の閾値は PDE1 により決定されることが明らかになった。

海馬スライス培養系における神経細胞生後新生の系譜解析

横瀬 淳¹, 八尾 寛¹, 石塚 徹¹

東北大学大学院・生命科学研究科・脳機能解析¹

【背景・目的】 海馬歯状回顆粒細胞層下部で生後に起こるニューロン新生は、学習・記憶を始めとした海馬依存的な機能に寄与していることが示唆されてきている。最近の研究では、海馬において残存し続ける神経幹細胞がいつ、どのような入力を受け成熟したニューロンとなり、海馬ネットワークに統合されていくのかといった新生過程が明らかになりつつある⁽¹⁾。しかし、単一レベルで神経幹細胞の系譜に着目し、海馬ネットワーク内でどのような過程を経て成熟ニューロンまたは、グリア細胞などへと至るのかといった研究がほとんどない。そこで本研究では、海馬スライス培養とレトロウイルスによる新生細胞標識法を組み合わせることにより、単一の前駆細胞がニューロンやグリア細胞へと分化する系譜を解析した。

【方法】 海馬スライス培養には生後 7 日齢の Wister 系ラットを用いた。培養 14 日目のスライスに EGFP を組み込んだレトロウイルスを歯状回顆粒細胞層上脚部に感染させた。その後、EGFP 標識された子孫細胞を 4 週間追跡した。ウイルス感染 28 日目の追跡細胞に対し表現型を Hu(神経細胞マーカー)抗体, GFAP(アストロサイトマーカー)抗体など各細胞種マーカーにより免疫組織化学的に同定した。これらの結果から表現型ごとに細胞系譜図を作製した。なお、本研究における動物実験および遺伝子組換え実験は、これらを定める法規に基づく東北大学の指針に準拠した。

【結果】 海馬スライス培養における前駆細胞の系譜では、一方がニューロンで、その片方がグリア細胞に分化するといった非対称分裂は認められなかった。また、一方がニューロンで、もう一方が表現型の同定できなかった細胞といった系譜もほとんど認められなかった。Hu 陽性細胞と GFAP 陽性細胞の細胞系譜において、細胞分裂直後に消失するものが認められる点において他の系譜と異なり、子孫細胞の生存率で有意な差が認められた。Hu 陽性細胞系譜に属するものには、細胞分裂直後に消失するものが顕著に認められた。すなわち、細胞の消失時期、または消失細胞の残存期間からその新生過程において Critical period が新生後 1~2 週間目に存在することが示唆された。

【考察】 海馬スライス培養で新生細胞に関する Critical period は、新生後 1~2 週間目で細胞消失が高まり、その後残存した細胞は成熟ニューロンへと発達していく傾向が示唆される。神経細胞の新生系譜に関しては数的に制御が働いており、その過程で他の細胞種より細胞死の影響が強く現れている可能性がある。生体内の研究では、新生細胞の生存に関する Critical period はシナプス発達期である新生後 2~3 週間目に認められる^(2,3)ので、海馬スライス培養においても入出力シナプスの形成が生存の要因になっている可能性がある。

【参考】

1. Zhao C, Deng W, Gage FH (2008). *Cell* **132**:645-60.
2. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL & Gage FH (2006). *J Neurosci* **26**:3-11.
3. Shaoyu Ge, Kurt A Sailor, Guo-li Ming and Hongjun Song (2008). *J Physiol* **586**: 3759-3765.

頭部外傷後のシナプス可塑性障害に対するエダラボンの効果

蓮尾 博¹、山下 伸²、重森 稔²、赤須 崇¹

久留米大学医学部生理学講座（統合自律機能部門）¹、脳神経外科²

頭部外傷後の外傷性脳損傷（traumatic brain injury: TBI）による後遺症として長期にわたる記憶・認知障害、外傷性てんかんなどがあるが、その発症機序や治療法についてはまだ不明な点が多い。TBI モデル動物 / 標本を用いた *in vitro* の研究でフリーラジカルが主な障害因子の一つであることが報告されている。本研究で、我々は TBI モデルラットから得られた脳スライス標本におけるシナプス可塑性障害に対する、フリーラジカル消去剤であるエダラボンの効果を検討した。中等度の液体打撃（FPI、約 4.2 気圧）により TBI モデルラットを作製し、外傷 7 日後に歯状回を含む脳スライス標本を作製し、電気生理学的記録を行った。Sham 群、FPI 群、FPI + エダラボン投与群にわけて比較した。内側貫通線維を電気刺激して、歯状回顆粒細胞層から細胞外電極法により電位記録を行った。長期増強の実験は GABA_A 受容体阻害剤存在下で高頻度刺激（100Hz、n=10、10 秒毎に 6 回）により行った。その結果、Sham 群では数時間以上続く興奮性シナプス後電位（EPSP）のスロープの増大（LTP）が見られたのに対して FPI 群では高頻度刺激後 40-60 分でコントロールレベルに戻った。一方、FPI 後 15 分に腹腔内にエダラボン（8mg/Kg）を投与した群では、高頻度刺激後 60 分でも sham 群と同程度の LTP が観察された。次にエダラボンのシナプス可塑性に対する直接作用についてエダラボンを灌流投与して検討した。エダラボン（500 μ M）存在下でテスト刺激に対する応答は変化させなかったが、高頻度刺激による LTP 誘発を抑制した。一酸化窒素（NO）のドナーであるスperlミン NONOate（100 μ M）を 30 分間灌流投与すると、灌流中から徐々に EPSP スロープが増大しはじめて、正常液に戻したのちもその増大が持続した。NONOate 灌流投与により EPSP が増大した後に、高頻度刺激を与えても LTP は観察されなかった。一方、エダラボン（100 μ M）存在下で NONOate 灌流投与した標本では EPSP の増大は見られなかったが、エダラボンを 60 分以上洗い流した後で高頻度刺激を加えたときは LTP が観察された。これらの結果から、海馬歯状回顆粒細胞における長期増強は NO に依存性であり、フリーラジカル消去剤であるエダラボンにより抑制されることが示唆された。TBI 後に投与したエダラボンがシナプス可塑性障害を減弱するのに有効であることが示唆された。

慢性痛による扁桃体中心核シナプス伝達の増強機構

加藤総夫、高橋由香里、岩瀬彩乃

東京慈恵会医科大学・総合医科研・神経生理学

「痛み」の本質的な生物学的意義は警告信号としての働きにある。この「警告信号」としての機能は、痛み受容器由来の求心信号が中枢神経系で処理されて付与されると想定されるが、生体が「何か悪いことが起こっている」ことを認知する際に主要な役割を担う脳内表現は情動、特に、負情動であると考えられている。一方、負情動は、痛みのみならず、天敵の匂いなどによって生じる嗅覚や、腐敗物や毒物などによって生じる味覚あるいは内臓感覚によっても誘発される。また、条件恐怖反応における文脈依存的情動反応や聴覚誘発情動反応などのように、視床・皮質系による感覚処理や海馬などによる場所認識の結果が痛み刺激などと連合されても負情動は誘発される。

前者の痛み・嗅覚・味覚・内臓感覚による負情動と後者の視床・皮質系による感覚情報処理を経た後の負情動との重要な違いの一つは、前者がいずれも視床・皮質系を介さずに、直接、もしくは腕傍核 (nucleus parabrachialis, PB) のシナプスを介して扁桃体および拡張扁桃体に投射する経路を持っていることである。この事実は、これらの感覚に関与するメカニズムが、単なる内・外環境の分析ではなく、直接負情動生成を誘発して、生体に緊急事態を警告するという機能的役割を担って進化してきた可能性を示唆する。

我々は、脊髄後角膠様質および三叉神経脊髄路核膠様質から扁桃体中心核外側外包部 (laterocapsular part of the central nucleus of amygdala, CeLC) への直接的投射路の最終シナプスである PB→CeLC シナプスでのシナプス伝達が、慢性神経因性疼痛動物において痛み応答依存的に増強している事実を見出した (Ikeda et al., 2007)。CeLC は *in vivo* において選択的に侵害刺激に応答するため「疼痛受容性扁桃体」とも呼ばれており (Gauriau & Bernard, 2002; Neugebauer et al., 2005)、このシナプス伝達増強が、慢性痛動物における痛み誘発情動応答増強の主要な基礎過程であるとの想定のもと、そのシナプス伝達増強機構を解析した。Wistar rat において L5 脊髄神経結紮による神経因性疼痛モデルを作成し、von Frey filament を用いて機械的異痛症応答を評価した。モデル作成の 7 日後、スライスを作成し、PB 由来経路刺激による誘発興奮性シナプス後電流を測定した。

EPSC 振幅および paired-pulse ratio とその $[Ca^{2+}]_i$ 依存性、NMDA 受容体成分比の測定、 Sr^{2+} 投与による非同期的シナプス後電流振幅の測定、および、 θ ピペットを用いた minimal 刺激とそれにおよぼすアデノシン A_1 受容体活性化の影響などの解析結果は、本モデルにおける PB→CeLC シナプス伝達の増強が、主として単 1 求心神経終末における 1 活動電位誘発の同期的放出小胞数の増大によって生じているという解釈を支持した。この増大は放出確率の増大を伴わず、シナプス前終末における放出部位数の増加などのシナプス構造の変化を伴う可能性が想定された。急性痛と異なり、慢性痛においては侵害受容と負情動を結ぶ神経連絡における可塑的变化の固定化が生じている可能性が示唆される。

神経細胞体における Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離の不活性化機構

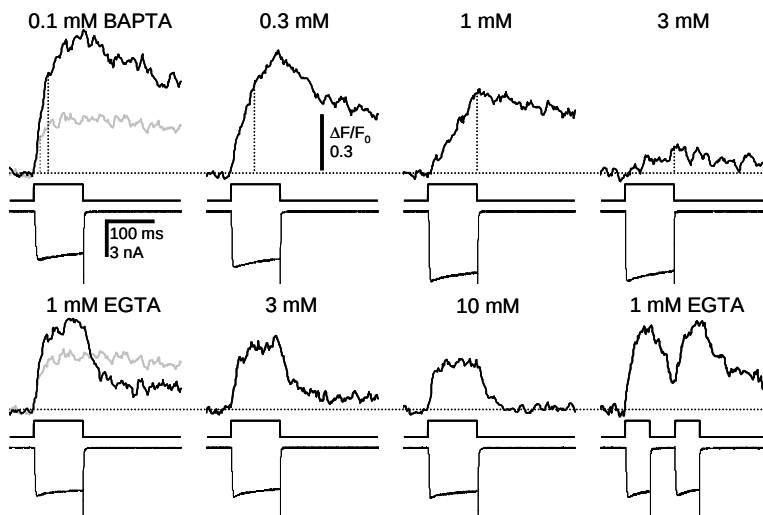
秋田 天平^{1,2}、久場 健司¹

¹名古屋学芸大学 管理栄養学部 管理栄養学科

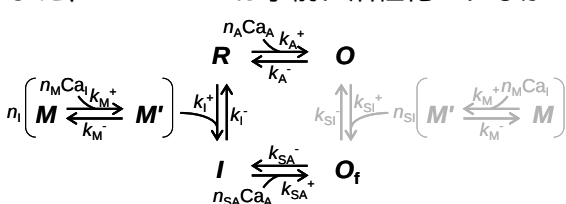
²自然科学研究機構 生理学研究所 細胞器官研究系 機能協同研究部門

あらゆる種類のシナプス後ニューロンにおいて、シナプス入力後に発生する細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が種々の機能発現に重要であることは周知の事実である。しかし、その Ca^{2+} が主にどこに源を発するかについては様々な議論がある。最近我々は、多くのニューロンで普遍的に認められる細胞内小器官構造を持つウシガエル交感神経節ニューロン細胞体において、細胞膜脱分極により引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の実はほぼ全てが、小胞体膜上のライアノジン受容体 (RyR) を介する Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) に由来することを明らかにし、またその CICR が Ca^{2+} 依存性の不活性化 (inactivation) 機構を通じて制御されることにより、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が極めて厳密且つ巧妙に調節されていることを確定したので報告する。膜電位固定下で Ca^{2+} 流入に伴う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を共焦点レーザー顕微鏡で観測すると、RyR が密集する細胞膜近傍 2 - 3 μm 以内の細胞質中では、継続する Ca^{2+} 流入にもかかわらず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は 10-20 ms 以内にほぼ停止した。最初の

Ca^{2+} 流入終了後 50 ms 以内に Ca^{2+} 流入を引き続き発生させても有意な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は起こらなかった。これらは FCCP によるミトコンドリア機能停止にも全く影響を受けず、また $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は ryanodine (10 μM) 存在下で caffeine (10 mM) の頻回投与によりほぼ完全に消失した。 Ca^{2+} 流入終了後 50 ms 以降の CICR inactivation からの回復過程は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルの減衰程度で決定されたが、50 ms 以内の回復の程度は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ レベルから推測されるよりも明らかに小さかった。 Ca^{2+} 流入中の inactivation は細胞内 BAPTA 投与により完全に抑制され ($\text{IC}_{50} \approx 400 \mu\text{M}$)、EGTA は全く影響しなかった。これらは、RyR 分子から凡そ 60 nm 離れた距離に存在する何らかの高 Ca^{2+} 感受性分子が、RyR 開口部近傍に形成される高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 領域 (Ca^{2+} microdomain) にまず晒されることにより Ca^{2+} 流入中の inactivation が誘導されていることを示唆する。また、inactivation は事前に活性化されなかった RyR にも誘導されえた。さらに、 Ca^{2+} 流入継続時間が



長いほど Ca^{2+} 流入終了後の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 減衰速度が遅くなる現象も発見されたが、この現象が起こる前提として、実は CICR inactivation の達成が必要不可欠であることが、BAPTA によるその現象と inactivation の同時抑制により判明した。これら全ての $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化は RyR の 4 状態モデルにより完全に再現された。以上のことから、



ニューロン内 CICR inactivation は Ca^{2+} 流入中の過剰な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を防止するのみならず、 Ca^{2+} 流入終了後もその低値に抑えられた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の継続時間を事前の Ca^{2+} 流入継続時間に応じて延長させる役目も持っており、またそれらの調節は分子間の極めて至近距離内 (数十 nm オーダー) でなされていることが判明した。

網膜双極細胞間に存在する電気シナプスの性質と働き

荒井 格、 間嶋 沙知、 田中 雅史、 立花 政夫
 東京大学大学院人文社会系研究科心理学研究室

網膜双極細胞は光受容器である視細胞と網膜の出力細胞である双極細胞を繋ぐ介在神経細胞であり、網膜における情報処理に重要な役割を担っている。キンギョ網膜のスライス標本を作製し、オン型の Mb1 型双極細胞 (Mb1-BC) と神経節細胞からホールセルクランプ法による同時記録を行い前者に短い脱分極パルスを与えたところ、後者から時間経過の非常に長い誘発性シナプス後電流が観察された。このような長い誘発性シナプス後電流は、抑制性シナプス伝達の阻害剤を投与しても影響を受けず、ギャップ結合の阻害剤である mefloquine を投与することによって消失したことから、網膜内の電気シナプスによって生成されていることが示唆された。そこで、Mb1-BC から 2 細胞同時記録を行い、電気シナプスについて検討を行った。その結果、以下の知見を得た。

1. Mb1-BC は樹状突起間でギャップ結合を形成していることがわかった。ギャップ結合には整流性や電位依存性は見られなかった。電流固定下での正弦波状電流注入実験から 0.5 ~ 5 Hz の信号を伝達するバンドパスフィルタの特性があることが分かった。
2. Mb1-BC 同士は、閾下の膜電位が同期して変動することが分かった。
3. Mb1-BC は暗順応条件において光刺激に対して Ca^{2+} スパイクを発生させることが知られている。Mb1-BC 間のギャップ結合の抵抗 (R_{gj}) と Mb1-BC の入力抵抗 (R_{input}) は明順応に比べて暗順応の方が大きいこと、また、明順応よりも暗順応の方が Ca^{2+} スパイクを発生しやすいことが分かった。
4. 暗順応下で、隣接する 2 つの Mb1-BC に脱分極性の電流を注入すると、一方にのみ注入した場合よりも Ca^{2+} スパイクの発生が促進されることが分かった。時間加重の時間窓は 10 ms 程度あることが分かった。
5. 脱分極性の電流を Mb1-BC に注入して Ca^{2+} スパイクを発生させると、ギャップ結合を形成している隣接した Mb1-BC でも 10 ms 程度の時間遅れで Ca^{2+} スパイクが発生することが分かった。このような Ca^{2+} スパイクによる Ca^{2+} スパイクのトリガー作用は、隣接していない離れた Mb1-BC でも観察された。

これらの結果から、Mb1-BC は明順応よりも暗順応下において Ca^{2+} スパイクによってより広い範囲で情報伝達を可能にしていることが示唆された。また、双極細胞が Ca^{2+} スパイクを、時間遅れをもって次々と発生させることによって、非常に長い誘発性シナプス後電流を神経節細胞に発生させるということが示唆された。

海馬 CA1 アストロサイトにおける GABA カレントと細胞内 Cl^- 濃度変化

江川潔¹, 山田順子², 古川智範¹, 福田敦夫¹

1. 浜松医科大学医学部第一生理学講座, 2. 弘前大学医学部脳神経生理学講座

アストロサイトはシナプスをタイトに包み込み、イオンあるいは伝達物質の自身への流入出を介して細胞外環境を変化させシナプス伝達を調整する。GABA 作動性シナプス伝達におけるアストロサイトの関与を検討するため、アストロサイトの GABA 応答 current と $[\text{Cl}^-]_i$ 変化を評価した。

アストロサイト親和性色素 sulforhodamine 101 (SR 101, 100 nM) でインキュベートした GAD67-EGFP knock-in マウス (日齢 18-30) の海馬スライスにおいて、隣接する GABA 細胞およびアストロサイトを蛍光標識にて同定し、ダブルパッチクランプを行った。GABA 細胞を current injection にて連続発火させると、生理的条件下 ($V_h = -80\text{mV}$, 電極内 Cl^- 濃度 40mM , $E_{\text{Cl}^-} = -33\text{mV}$) で voltage clamp したアストロサイトから 10pA 前後の picrotoxin ($200\mu\text{M}$) sensitive な inward current が記録された。

GABA (1mM) pressure application による検討では、picrotoxin 存在下でより電位依存性の低い inward current が残存した。この picrotoxin insensitive current は GABA transporter (GAT)3 inhibitor (SNAP5114 $20\mu\text{M}$) 投与により著明に減弱し、GAT current であることが示唆された。パッチ電極から Cl^- indicator (MEQ) を load し、GABA 応答 current と $[\text{Cl}^-]_i$ 変化の同時記録を行うと、ACSF 還流下では inward current に伴い $[\text{Cl}^-]_i$ の減少が、picrotoxin 還流下では逆に $[\text{Cl}^-]_i$ の上昇が認められた。

生理的に $[\text{Cl}^-]_i$ の高いアストロサイトにおいて、GABA は GABA_A receptor を介して Cl^- の流出を、 2Na^+ , 1Cl^- , 1GABA を共輸送する GAT を介して Cl^- の流入を来たすことが示された。これら両方向性の Cl^- flow は GABA 作動性シナプスにおける $[\text{Cl}^-]_o$ の変化を介してシナプス伝達を調整している可能性が考えられる。