

# 博士学位論文審査要旨

2022年1月28日

論文題目： Mechanisms of short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses using direct patch clamp and variance-mean analysis.  
(海馬苔状線維シナプスの短期可塑性メカニズムの直接パッチクランプと量子解析による解明)

学位申請者： 田中 護

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

要 旨：

脳神経回路機能は、神経細胞間を繋ぐシナプスの伝達強度が短期的あるいは長期的に可塑的な変化をすることで支えられている。記憶や学習の成立に関わっていると考えられている海馬苔状線維は CA3 の錐体細胞と CA3 の介在細胞にシナプスを形成しており、それぞれの短期可塑性が異なることが海馬内のネットワーク制御機構に重要な働きをしていると考えられる。これらの短期可塑性はシナプス前性の機構であることが知られているが、その詳細な細胞メカニズムは未解明である。そこで、田中氏は多様なシナプス可塑性の理解を深める目的で以下の二つの研究を遂行した。シナプス伝達強度の解析においては、小胞放出部位の数  $N$ 、小胞放出確率  $P$ 、単一小胞の放出に対するシナプス応答の大きさ  $Q$  の積がシナプス応答を規定するとする Katz らのシナプス量子解析に従って行った。

(1) 海馬苔状線維—CA3 錐体細胞間シナプス可塑性における代謝型グルタミン酸受容体の役割：代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)の活性化は、苔状線維シナプス前終末に作用して、シナプス伝達を抑制する。このメカニズムを理解するために、ラット海馬急性スライス上の海馬苔状線維—CA3 錐体細胞間シナプスのシナプス前終末に直接パッチクランプ法を適用し、グループ III mGluR の作動薬である L-AP4 暴露のシナプス小胞開口放出、カルシウム電流に対する影響を調べた。シナプス小胞の開口放出量は膜容量測定によって定量した。L-AP4 存在下で 10, 30, 50 ミリ秒の脱分極刺激を与えると、全ての刺激強度でカルシウム電流が抑制されたが、膜容量は 10 ミリ秒の刺激時に減少するものの、30, 50 ミリ秒では抑制効果が見られなかった。このことから、mGluR の活性化によるシナプス伝達の抑制は、 $N$  の変化を伴わず  $Ca$  流入量の減少に起因する  $P$  の減少によることが示唆された。

(2) 海馬苔状線維—CA3 介在細胞間シナプスの量子解析による短期抑制のメカニズムの解明：海馬苔状線維—CA3 介在細胞間シナプスは高頻度刺激時に短期シナプス抑圧を呈するが、その抑圧現象が  $N$ ,  $P$ ,  $Q$  のどのパラメータの変化に起因するかは未解明である。また、本シナプスが単一シナプスである特性を利用し、最近 Marty らによって開発された累積小胞数を用いた分散解析と数理モデルを組み合わせることにより、 $P$  を「小胞が放出サイトにドッキングしている確率  $\delta$ 」と「ドッキングした小胞が開口放出する確率  $p$ 」の二つのパラメータに細分化し、短期シナプス抑圧時の各パラメータを定量することを試みた。海馬急性スライス上の苔状線維を刺激し、後細胞である介在細胞にパッチクランプ法を適用し、20 Hz, 10 回刺激を 15 秒ごとに 10 回

繰り返し刺激し、シナプス後電流を記録した。刺激後半部分の応答を一つの小胞の開口放出による応答と仮定し、その反応の平均トレースをテンプレートとして Deconvolution を行い、刺激に同期した電流変化を小胞の個数に変換した。シナプス抑圧時の電流の減少と放出された個数の減少の割合に違いがないことから、 $Q$  は変化していないことが示唆された。次に分散-平均解析と二項分布へのフィッティングの二つの方法の推定により連続刺激中に  $N$  が変化していないことが示唆されたことから、シナプス抑圧は  $P$  の低下によることが強く示唆された。最後に累積小胞放出数を用いた分散解析と小胞放出・動員の数理モデルを組み合わせた解析を行い、 $\delta$  と  $p$  を推定したところ、本実験条件で見られる連続刺激時のシナプス抑圧は、 $\delta$  の減少であることが考えられた。

上記二つの研究から、同じ海馬苔状線維由来のシナプス終末でも、投射先によって異なるメカニズムによるシナプス抑制が起こることを明らかにした。本研究は、高度な技術であるシナプス前終末へのパッチクランプ法の適用や、近年開発された新しいシナプス量子解析法と数理モデルを組み合わせた方法の応用など、シナプス生理学の先端的な研究成果である。よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するのにふさわしいものであると認められる。

## 総合試験結果の要旨

2022年1月28日

論文題目： Mechanisms of short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses using direct patch clamp and variance-mean analysis.  
(海馬苔状線維シナプスの短期可塑性メカニズムの直接パッチクランプと量子解析による解明)

学位申請者： 田中 護

審査委員：

主査： 脳科学研究科 教授 高森 茂雄

副査： 脳科学研究科 教授 貫名 信行

副査： 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

要 旨：

博士論文提出者は、2017年4月に本学大学院脳科学研究科発達加齢脳専攻一貫制博士課程に入学し、現在、在籍中である。分子細胞脳科学分野・シナプス分子機能部門に属し、記憶の形成に関与している海馬苔状線維シナプスの短期可塑性を実現するメカニズムに関する研究を行った。本研究を通じて、シナプス電流の測定法、膜容量測定法など、高度な電気生理学的手法を体得すると共に、数理モデルとの比較によりシナプス短期可塑性のメカニズムを定量的に評価する方法を習得した。本博士論文の骨子となる研究内容は、2021年12月に国際的な生理学雑誌である *Journal of Physiology* 誌に筆頭著者として刊行された。

2022年1月26日午前10時より約1時間30分、提出論文に関する公聴会を Zoom にて行い、提出者による英語でのプレゼンテーションと質疑応答を行った。プレゼンテーションでは、研究の背景、目的、方法、結果、結論、考察が過不足なく適切に説明され、国際的に活躍するための語学力（英語）を有していることが認められた。プレゼンテーション後の質疑応答においても的確に回答がなされたと評価できる。

更に、2022年1月27日午後1時から約1時間、主査1名副査2名により論文内容並びに関連する脳科学分野の諸問題について非公開の口頭試問を実施した結果、本論文提出者は当該分野の研究者として十分な知識と、ディベート能力を有していることが認められた。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

# 博士學位論文要旨

論文題目: Mechanisms of short-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses using direct patch clamp and variance-mean analysis.  
(海馬苔状線維シナプスの短期可塑性メカニズムの直接パッチクランプと量子解析による解明)

氏名: 田中 護

要旨:

脳神経回路機能は神経細胞間をつなぐシナプスの伝達強度が、短期的または長期的に可塑性な変化をすることで支えられている。記憶や学習などの機能に関わっていると考えられている海馬の苔状線維シナプスでは投射先の細胞によって短期シナプス可塑性が異なっており、複雑な可塑性が海馬内のネットワーク機能制御に重要な働きをしていると考えられる。しかし、苔状線維シナプス可塑性の細胞メカニズムはまだ分かっていないことが多い。そこで、本研究では二つの側面から海馬苔状線維の可塑性を調べた。

(1)海馬苔状線維—CA3 錐体細胞間の代謝型グルタミン酸受容体の効果

海馬苔状線維は投射先の細胞によって異なる代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)を発現しており、活性化によって、それぞれのシナプスで異なる可塑性をもたらす。mGluR の活性化は苔状線維シナプス前終末に対して主に抑制的な効果を及ぼすことが知られている(Schoepp & Conn, 1993; Nakanishi, 1994)。最近の研究では mGluR が海馬内の興奮性・抑制性両方のネットワークに関与していることから、てんかん治療に重要である可能性が示唆されている(Schoepp, 2001; Tang, 2005)。mGluR のグループ III 活性化は海馬苔状線維と CA3 錐体細胞間シナプスに対して可逆的な伝達抑制効果があることが知られているが(Pelkey et al., 2005)、シナプス前終末における細胞メカニズムを直接記録で解明した例はない。苔状線維—CA3 錐体細胞間のシナプス前終末は比較的大きな構造でシナプス前終末を直接記録できる可能性があるが、技術的な面から実際にシナプス前終末へ直接パッチクランプ法を適用している例は少ない。

本研究では海馬苔状線維—CA3 錐体細胞間シナプスのシナプス前終末へ直接ホールセルパッチクランプ法を適用し、グループ III mGluR 活性化の効果を調べた。

標本として生後 23~25 日の Wistar ラットの急性スライスを用い、細胞外溶液にナトリウムチャンネル阻害剤であるテトロドトキシンを 1 $\mu$ M 添加し、細胞内溶液にはカリウムチャンネルを阻害する働きをもつセシウム溶液を用いてカルシウム電流のみが記録できるようにした。サイン波と矩形波を組み合わせた電圧変化を細胞に加えることで、矩形波によってシナプス前終末内へ流入したカルシウム電流を記録し、サイン波によってカルシウム流入によるシナプス小胞開口放出に伴うシナプス前終末の膜容量の変化を記録することで放出量を計測した。矩形波の刺激時間をそれぞれ 10、30、50 ms に変えることで刺激時間による変化も記録した。グループ III mGluR の作動薬である L-AP4 を添加した場合としてない場合を比較した。

L-AP4 を添加するとカルシウム電流の振幅は減少したが、刺激時間によってカルシウム電流の抑制効果は変化しなかった。刺激時間が 10ms の時は L-AP4 添加時の膜容量変化が抑制されたが、30ms と 50ms の時には変化が見られなかった。

これらの結果から、グループ III mGluR はシナプス前終末へのカルシウムイオンの流入を抑えることでシナプス小胞の開口放出を抑制していることが分かった。グループ III mGluR にはサブタイプの 4、7、8 が含まれており、このうちサブタイプ 7 は苔状線維—CA3 錐体細胞間シ

ナプスにはほとんど発現していない(Shigemoto et al., 1997)。よって、グループ III mGluR 活性化の効果は mGluR4 か 8 の活性化の効果であることが考えられる。この二つのサブタイプが発現している他のシナプスでは高頻度活性化時にシナプス後細胞の発火開始を遅らせる効果が報告されている(Cosgrove et al., 2011)。この働きが苔状線維—CA3 錐体細胞でも同様に起こっているならば、グループ III mGluR 活性化は高頻度活性化時にてんかん様の発火を抑制する可能性がある。

## (2)海馬苔状線維—CA3 介在細胞間シナプスの量子解析

シナプス可塑性はシナプスの伝達強度の変化である。伝達強度は古典的には Katz の提唱する量子仮説に従って、小胞を放出する部位の数(N)、小胞放出確率(P)、単一小胞の開口放出に対するシナプス応答の大きさ(Q)の三つのパラメータによって表される(Katz 1969)。最近の研究では、小胞放出確率(P)は小胞が放出サイトにドッキングしている確率( $\delta$ )と小胞が開口放出される確率(p)の二つの積であることが示唆された(Malagon et al., 2020; Pulido & Marty, 2017; Vere-Jones, 1966; Zucker, 1973)。Marty らの研究グループは従来の分散解析法を発展させ、新たな累積分散解析と数値シミュレーションを組み合わせることで小脳シナプスで全パラメータを定量的に推定することを可能とした(Malagon et al., 2016)。 $\delta$  は数値シミュレーションによると、短期シナプス可塑性を決定する重要なパラメータであることが示唆されている(Pulido & Marty, 2018)。しかし、累積分散解析はシナプス前終末の活性化部位とシナプス後細胞のシナプス厚肥部が一つずつしか持たない単一シナプスのみにしか適用することができない。そのため  $\delta$  を調べたシナプスは少なく、可塑性への影響の一般性はわかっていない。

そこで本研究では海馬苔状線維と CA3 抑制性介在細胞間のシナプスにおいて、高頻度刺激を与えて短期シナプス抑圧を誘導し、 $\delta$  を含む全パラメータを定量的に求めた。さらに、数値シミュレーションを用いて各パラメータの可塑性への影響を調べた。

標本には生後 22~30 日の Wistar ラットの急性スライスを用いて、細胞外液には picrotoxin 100 $\mu$ M と D-AP5 50 $\mu$ M を添加することでそれぞれ GABA A 受容体と NMDA 受容体を阻害し、AMPA 受容体によるシナプス電流のみを記録した。

苔状線維—CA3 抑制性介在細胞間シナプスは単一シナプスであるものがほとんどであるので(Acsády et al., 1998)、刺激の強度と位置を調整することで一軸索のみを刺激し、単一シナプスからの記録を確立した。細胞外カルシウム濃度が 3 mM の時、連続刺激を行うと短期抑圧が観測された。刺激後半部分では小胞の複数同時放出はほとんど起こらなかった。よって、刺激後半のシナプス電流をテンプレートとし、刺激に同期して何個の小胞が放出されたかを脱畳み込み法(deconvolution)で検出した。電流の振幅から得た短期抑圧の程度と放出小胞数の短期抑圧の程度を比較すると差が無く、Q は連続刺激中には殆ど変化していないことが分かった。

分散解析と二項分布へのフィットという 2 つの方法で N を調べたところ、両方法で得られた N には差がないことが分かった。また、N が変化することで高頻度刺激時の短期抑圧が起こると仮定したシミュレーションは、累積の平均分散プロットの実験データと一致しないことが分かった。よって、N は連続刺激中に変化していないと考えられた。

累積小胞放出数を用いた分散解析と小胞放出・動員の数値モデルを組み合わせることで連発刺激時の  $\delta$  と p を推定できた。また、小胞放出の分散分析から得たグラフの放物線と累積小胞放出数の平均・分散プロットから得られる直線の交点から静止状態の  $\delta$  を視覚的に導出できた。また、後者の方法で導出した  $\delta$  の値は、小胞の動員が遅く  $\delta$  と p の値が大きい時はモデルから得られる推定値と 10%以内の誤差になることが分かった。モデルシミュレーションを用いて  $\delta$  と p の変化が短期抑圧に及ぼす影響を調べたところ、 $\delta$  が減少し p が少し増加ないし変化しない場合、実験データをよく説明できることが分かった。つまり、細胞外カルシウム濃度が 3mM の時は  $\delta$  の減少が主要要因で短期抑圧が起こっていると考えられる。

次に、細胞外カルシウム濃度を 2mM、1.2mM に変化させ、同様に連続刺激を与えてシナプス

電流の記録を行った。2mM の時、一発目の刺激に対するシナプス応答が小さくなり短期抑圧の程度が 3mM の時よりも減少した。3mM の時と同様に刺激中の  $Q$  に変化は無く、分散解析と二項分布へのフィットにより  $N$  の変化も見られず、一発目の刺激時の応答の減少は  $P$  の減少に起因することがわかった。分散解析によって得た放物線と累積小胞数の平均・分散から得られる直線の交点から  $\delta$  と  $p$  の値を求めると、両方とも 3mM の時より減少していた。1.2mM の時は連続刺激に対しほぼ一定のシナプス応答を記録した。刺激の後半部分は脱感作により  $Q$  がわずかに減少したが、小胞放出数の検出には影響がなかった。累積分散解析とモデルから各パラメータを推定すると  $N$  は 3mM や 2mM 時と変化していなかったが、一発目の刺激時の  $\delta$  と  $p$  は 2mM の時より減少していた。

これらの結果から、 $N$  と  $Q$  は短期抑圧に殆ど影響しないこと、細胞外カルシウム濃度が 3mM の時は  $\delta$  が短期抑圧の主な要因であること、細胞外カルシウム濃度を下げることで静止状態の  $\delta$  と  $p$  の初期値が小さくなり、これが原因で短期抑圧の度合いが変化していることが分かった。

二つの研究結果から、海馬苔状線維—CA3 錐体細胞間シナプスのシナプス前終末からの直接記録によりグループ III mGluR はカルシウム流入を抑制することでシナプス伝達を抑制しており、その効果は主に mGluR4/8 であることが示唆された。また、海馬苔状線維—CA3 抑制性介在細胞間シナプスではシナプス伝達強度を決めるパラメータそれぞれの短期抑圧への影響を調べ、シナプス小胞が放出部位にドッキングしている確率 ( $\delta$ ) の変化が主な要因の 1 つであること、細胞外カルシウムによって静止状態の  $\delta$  と  $p$  が変化することが分かった。

苔状線維—CA3 抑制性介在細胞間シナプスは  $\delta$  を含む全パラメータを定量的に測定できるので、グループ III mGluR の活性化の下流にある cAMP/PKA 経路がこのシナプスでも長期増強に関わりがあることから (Greengard et al., 1993; Evans et al., 2001; Castillo et al., 2002; Leenders & Sheng, 2005; Lonart et al., 2003; Pelkey et al., 2008)、将来的に cAMP/PKA 経路を介した長期増強について、苔状線維—CA3 抑制性介在細胞間シナプスの各パラメータが長期増強へ与える影響を調べることで、短期可塑性のみならず、長期増強の細胞メカニズムの解明にも貢献できると考えられる。