

# 博士学位論文審査要旨

2023年1月30日

論文題目: **The characteristics of synaptic vesicle dynamics at hippocampal mossy fiber terminals**

(海馬苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の特徴)

学位申請者: 宮野 里菜子

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 櫻井 芳雄

副査: 脳科学研究科 教授 御園生 裕明

要 旨:

海馬は記憶・学習を司っており、なかでも海馬歯状回の顆粒細胞から CA3 野へと投射している苔状線維シナプスは顕著な短期増強を示すシナプスとして、記憶・学習に寄与していると考えられている。このシナプスは、放出確率が非常に低いため単一の活動電位ではシナプス応答は誘発されず、バースト発火などの連続した活動電位でのみシナプス後細胞に情報を伝達することができることから、高頻度刺激を選択的に伝えるハイパスフィルターとして働くと思われている。宮野氏は、海馬苔状線維シナプス前終末に膜容量測定法を適用し、当該シナプスにおけるシナプス小胞動態の特徴を明らかにする研究を行い、博士学位論文として提出した。以下に、本学位論文を構成する2つの項目について要旨を記す。

(1) 海馬苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の解析: 生後 19-28 日齢の Wistar ラットから海馬急性スライス標本を作成し、海馬苔状線維シナプス前終末にホールセルパッチクランプ法を用いた膜容量測定法により、刺激依存的なシナプス小胞の開口放出、連続刺激時の即時放出可能プールの補充速度、エンドサイトーシスの速度を定量的に解析した。その結果、即時放出可能プールには 600-650 個のシナプス小胞が存在し、それらが時定数 30-40 ミリ秒で放出されること、即時放出可能プールの補充は時定数 0.85 秒で起こること、エンドサイトーシスは時定数 25-60 秒で起こることなどを明らかにした。次に、カルシウムキレート剤を用いて各過程のカルシウム依存性を調べるところ、開口放出のカルシウムとの共役が比較的「疎(loose)」であることがわかった。さらに興味深いことに、開口放出以外の過程、すなわち即時放出可能プールの補充とエンドサイトーシスの両過程がカルシウム濃度に依存しないことを明らかにした。これらの特徴は、開口放出とカルシウムの共役が「密(tight)」であり、即時放出可能プールの補充がカルシウム濃度に強く依存する聴覚系のカリックス型シナプスとは異なることから、異種シナプスにおいて異なる分子機構が存在することが示唆された。

(2) 海馬苔状線維シナプス前終末におけるアクティブゾーンタンパク質 RIM-BP2 の役割: アクティブゾーンはカルシウムチャンネルが集積した部位であり、シナプス小胞の開口放出はアクティブゾーンにおいてのみ起こる。アクティブゾーンには特殊なタンパク質が密に集積しており、それらのタンパク質の存在がカルシウムチャンネルの局在化、開口放出のカルシウムとの共役の度合いを規定していることが提唱されている。本項では、アクティブゾーンタンパク質の一つである RIM-binding protein 2 (RIM-BP2) の海馬苔状線維シナプス前終末での役割を明らかにするために、RIM-BP2 ノックアウト(KO)マウスに上記で確立した実験方法を適用した。その結果、RIM-

BP2-KO マウスではカルシウム電流の減少、シナプス小胞の開口放出量の減少が見られた。次に超解像顕微鏡(STED 顕微鏡)を用いて、免疫染色によるカルシウムチャネルの可視化を行ったところ、放出部位のマーカーである munc13-1 クラスターとカルシウムチャネルクラスターの距離には変化が認められず、カルシウムチャネルの密度を反映する蛍光輝度の減少が認められた。これらのことから、RIM-BP2 が不在の海馬苔状線維シナプス前終末ではカルシウムチャネルの密度が減少し、その結果としてシナプス伝達強度が減弱することが明らかとなった。

本学位論文に記述された研究成果は、従来知られていなかった海馬苔状線維シナプスの特性を定量的に記述したのみならず、開口放出とカルシウムの共役機構の分子基盤の一端を明らかにするなど、シナプス生理学の先端的なものである。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

2023年1月30日

論文題目: **The characteristics of synaptic vesicle dynamics at hippocampal mossy fiber terminals**

(海馬苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の特徴)

学位申請者: 宮野 里菜子

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 櫻井 芳雄

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、2018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に膜容量測定法を適用し、シナプス小胞動態の特徴に関する研究を行った。本研究を通じて、微小シナプスにおける膜容量測定法など非常に高度な電気生理学的手法を体得すると共に、遺伝子改変マウスの解析では超解像顕微鏡の手法も学んだ。本博士論文の骨子となる研究内容は、すで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。

2023年1月27日午前9時より約1時間30分、公聴会にて提出論文の内容を英語でプレゼンテーションを行い、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、2023年1月27日午後3時30分より約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。

## 博士学位論文要旨

論文題目： The characteristics of synaptic vesicle dynamics at hippocampal mossy fiber terminals (海馬苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態の特徴)

氏名： 宮野 里菜子

### 要旨：

神経細胞どうしの情報伝達は、神経細胞と神経細胞の接合部であるシナプスで行われる。シナプスは、情報を送る側のシナプス前終末と受け取る側のシナプス後細胞、その間にあるシナプス間隙で構成されている。活動電位がシナプス前終末に到達すると、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが開き、 $\text{Ca}^{2+}$  がシナプス前終末内に流入する。 $\text{Ca}^{2+}$  の流入によって細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上昇し、シナプス小胞が細胞膜と融合する。シナプス小胞内の神経伝達物質はシナプス間隙に開口放出され、シナプス後細胞の受容体と結合することでシナプス後細胞を興奮(脱分極)または抑制(過分極)させる。このように、シナプス前終末からシナプス後細胞へ情報が伝わることをシナプス伝達という。このとき、活動電位の到達に伴って迅速に開口放出できる状態にあるシナプス小胞群を即時放出可能プール (RRP) とよぶ。開口放出後、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたシナプス小胞は貯蔵プール (RP) に蓄えられ、刺激に応じて RRP へと補充される。一連のサイクルはシナプス伝達を持続的に行うために必要な過程であり、これをシナプス小胞サイクルとよぶ。また、RRP からの開口放出はアクティブゾーンとよばれる場所で起こる。アクティブゾーンには様々なタンパク質が存在し、それらがお互いに、あるいはシナプス小胞や  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと相互作用することで、シナプス小胞の膜融合や  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの局在を制御している。

シナプス伝達の効率が活動依存的に変化することを活動依存性シナプス可塑性とよび、シナプス強度の増強あるいは抑圧が数分続くものを短期可塑性という。短期可塑性はミリ秒単位の短い時間尺度で伝達効率を変化させるため、神経回路における情報処理に重要な役割を果たすと考えられている。シナプス伝達の効率は、神経伝達物質の放出確率や小胞プールの枯渇、シナプス後細胞の受容体の数や性質により変化する。特に短期増強は、放出確率の変化により起こる。シナプス前終末では、シナプス小胞と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの距離が放出確率に関わっており、距離が近いシナプスでは放出確率が高く、距離が遠いシナプスでは放出確率が低い。シナプス小胞と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの距離の調節にはアクティブゾーンタンパク質が関わっていることから、各アクティブゾーンタンパク質のシナプス前終末における役割を調べることは、シナプス可塑性の分子メカニズムを理解する上で重要である。また、開口放出には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が必要であることや、シナプス小胞と  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの距離が放出確率に関わることなどから、 $\text{Ca}^{2+}$  のシナプス小胞サイクルへの影響を調べることは、シナプスにおける情報伝達の調節機構を理解する上で重要である。

本研究では、海馬歯状回にある顆粒細胞の軸索(苔状線維)終末と、海馬 CA3 野にある錐体細胞からなるシナプスを対象に実験をおこなった。海馬苔状線維シナプス前終末は放出確率が低く、顕著な短期増強を示すことが知られている。苔状線維シナプスは単一の活動電位ではシナプス後細胞の応答を誘発することができず、バースト発火などの連続した活動電位によりシナプス後細胞に情報を伝達することができる。このように、苔状線維シナプスは高頻度の刺激を選択的に伝えるハイパスフィルターとして働く。海馬苔状線維シナプスにおけるシナプス小胞サイクルの特徴やアクティブゾーンタンパク質の働きを調べ、それらを他のシナプスと比較することで、それ

それぞれのシナプスの特性を理解し、シナプス多様性を生み出すシナプス可塑性のメカニズムを解明することにつながるのではないかと考えた。苔状線維シナプスは直径 5  $\mu\text{m}$  ほどの比較的大きなシナプス前終末をもち、シナプス前終末から電流・電位応答を直接記録することができるため、電気生理学的な特性を調べるのに適したシナプスである。

まず、シナプス小胞サイクルへの  $\text{Ca}^{2+}$  の影響を調べた。Wistar ラット（生後 19–28 日）の海馬急性スライス標本を使用し、シナプス前終末にホールセルパッチクランプ法を適用した。シナプス小胞の開口放出及びエンドサイトーシスは、細胞膜の表面積を変化させる。そこで、膜面積を推定することができる膜容量測定法を用いて膜容量の経時変化をみることで、開口放出やエンドサイトーシス、シナプス小胞補充の速度を調べた。また、 $\text{Ca}^{2+}$  のキレート剤である EGTA あるいは BAPTA を細胞内液に加え、シナプス小胞サイクルの各過程の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を調べた。即時放出可能プール (RRP) からのシナプス小胞の開口放出は 30–40 ミリ秒の時定数で起こり、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性であった。RRP と貯蔵プール (RP) の大きさはどちらもシナプス小胞 600–650 個分で、 $\text{Ca}^{2+}$  の流入量によりそのサイズが大きく変わることはなかった。また、エンドサイトーシスの時定数は 25–60 秒で  $\text{Ca}^{2+}$  に依存せず、開口放出された小胞の数に依存することが明らかになった。さらに小胞は、RP へは 1 秒、RRP へは 0.85 秒の時定数で補充され、この過程が  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しないことを見出した。これらの数値を、少なくとも 2 つの小胞プールがシナプス前終末にあると仮定したモデルにあてはめると、実験結果を矛盾なく説明することができた。また、海馬苔状線維シナプス前終末ではエンドサイトーシスおよびシナプス小胞の補充が  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性であり、同じ大きさの小胞プールが 2 つ存在する可能性を新たに示した (Miyano et al., 2019)。

次に、シナプス前終末におけるアクティブゾーンタンパク質の役割を調べた。アクティブゾーンタンパク質の 1 つである RIM-BP2 は、RIM や  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに結合し、チャネルの局在やシナプス小胞のプライミングに影響を与えることが示唆されている。マウス（生後 35–40 日）の海馬急性スライス標本を作製し、苔状線維シナプス前終末からパッチクランプ記録を行った。シナプス前終末を膜電位固定し、脱分極刺激を与えた時の膜容量変化によってシナプス小胞の開口放出量を測定した。さらに、細胞外の TTX 投与下で  $\text{Na}^+$  チャネルを阻害し、パッチ電極を Cs 溶液にすることで  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルを介した電流成分を分離、測定した。細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度や細胞内液の EGTA 濃度を変化させたときの膜容量と  $\text{Ca}^{2+}$  電流を測定し、開口放出や  $\text{Ca}^{2+}$  流入への影響を WT マウスと RIM-BP2 KO マウスとで比較した。その結果、RIM-BP2 KO では  $\text{Ca}^{2+}$  電流の流入量が減少し、それによりシナプス小胞の開口放出量が減少している可能性が示唆された。電気生理学的な実験は時間分解能に優れているが、伝達物質放出機構を可視化できないため、メカニズムの実体に迫ることができない。放出機構を可視化するため、共同研究で STED 顕微鏡を用いて、伝達物質放出に関わるタンパク質の分布や位置関係の解析を行った。電気生理学的手法と超解像顕微鏡を用いた実験により、RIM-BP2 KO マウスでは、シナプス前終末内の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル密度が減少し、それに伴ってシナプス小胞の放出量が減少することが分かった。

以上の実験から得た海馬苔状線維シナプスの特徴を、ヘルド萼状シナプスと比較した。ヘルド萼状シナプスには、シナプス小胞と  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの距離が近く放出が速い小胞プール (FRP) と距離が遠く放出が遅い小胞プール (SRP) が存在する。FRP と SRP の開口放出の時定数はそれぞれ、2–3 ミリ秒と 20–30 ミリ秒である。また、FRP へのシナプス小胞の補充は  $\text{Ca}^{2+}$  依存性であり、SRP への補充は  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性である。苔状線維シナプス前終末の RRP は開口放出の時定数が遅くシナプス小胞の補充が  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性であることから、ヘルド萼状シナプスの SRP と性質が似ていると考えられる。また、RIM-BP2 KO マウスのヘルド萼状シナプスではシナプス小胞と  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの距離が遠くなった。 $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの数の減少は見られなかったことから、苔状線維シナプス前終末とヘルド萼状シナプスで RIM-BP2 の役割が異なると考えられる。ヘルド萼状シナプスは、多数

のアクティブゾーンと高い放出確率により、低頻度のシグナル伝達でも確実な情報伝達が可能である。また、ヘルド萼状シナプスは複数の小胞プールを持ち、シナプス小胞の補充が比較的速く、持続的な活動が可能である。このような特性は、高頻度で安定したシグナル伝達を必要とする音源定位に寄与する。一方、海馬苔状線維シナプスでは、単発刺激での放出確率は低いが、短期増強により高頻度発火でのみシナプス後部の発火を惹起する。この特性は、顆粒細胞から CA3 錐体細胞への情報伝達には顆粒細胞のバースト発火が必要であることを示している。歯状回から CA3 錐体細胞への情報伝達が海馬の神経回路において上流に位置することからも、苔状線維シナプス特性は、海馬に伝わってきた情報を処理するために独自の役割を果たすと考えられる。このように、放出機構の違いは、それぞれのシナプス特有のシナプス可塑性を生み出し、機能的な違いを作り出すと考えられる。シナプス伝達の分子機構を解明し、放出確率の低いシナプスと高いシナプスの間で放出機構の違いを見出し、シナプス可塑性の分子機構を明らかにするためには、さらなる実験が必要である。しかし、本研究で用いた遺伝学、電気生理学、超解像光学顕微鏡を組み合わせたアプローチは、アクティブゾーンタンパク質が放出機構を制御し、シナプスの可塑性と多様性を生み出す仕組みの解明につながるだろう。