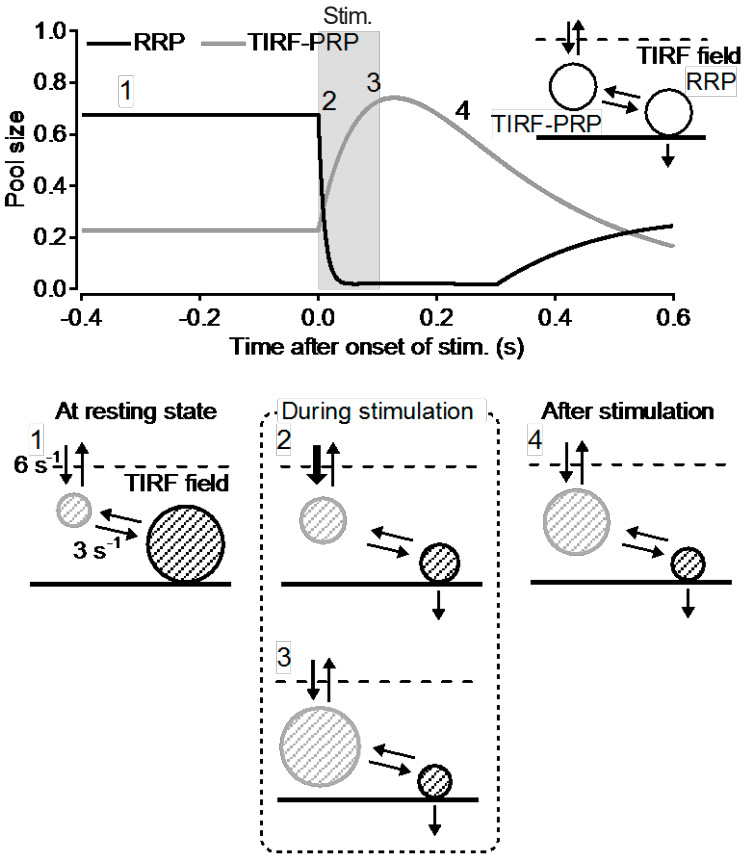
153　放出前シナプス小胞ナノスケール動態の計測法の開発	三木　崇史

【目的】高次脳機能を支えるシナプスは時に数 kHz もの頻度で活動する。このような高頻度での神経伝達を行うために、シナプス前終末ではシナプス小胞がシナプス前膜にある放出部位で活動依存的に次々と膜融合される。しかし、どのように小胞が放出部位に動員され高頻度な伝達物質放出に寄与するのか、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究ではこの高頻度神経伝達メカニズムの解明を目的として、運動時などの体の動きを高頻度で小脳へ伝える小脳苔状線維シナプス前終末を標本とし、神経活動中の放出部位近傍のシナプス小胞動態を観測した。

【方法】小脳苔状線維シナプス前終末を急性単離し、ガラスに貼り付け蛍光色素でラベルしたシナプス小胞の動態を全反射照明蛍光顕微鏡（TIRF 顕微鏡）で観察した。同時に単離シナプス前終末をパッチクランプし、前終末に刺激を与えるとともに伝達物質放出をシナプス小胞膜融合による膜容量変化として定量した。薬理実験などを行い、小胞動態と神経伝達の関連性について研究を行った。

【結果】TIRF 顕微鏡下で単離シナプス前終末に電気生理にて脱分極刺激を行った際、神経伝達物質放出とほぼ同期したシナプス小胞の放出部位への速い動員が観察された。この速い小胞動員は小胞の放出に依存し、また細胞骨格であるアクチンの活性に依存することが薬理学的実験により示唆された。モデルシミュレーションの結果から、高速動員された小胞は、刺激時に放出された小胞の膜近傍のスペースを瞬時に埋め、数百 ms かけて放出可能な小胞となり持続的な神経伝達を担うことが示唆された。

刺激前後の膜近傍シナプス小胞プールダイナミクス



153. 放出前シナプス小胞ナノスケール動態の計測法の開発

三木　崇史

同志社大学 研究開発推進機構

Key words：シナプス，神経伝達，シナプス小胞，小脳

緒　言

神経活動時にシナプス前終末では、シナプス小胞が放出部位にて繰り返し膜融合を起こすことで神経伝達物質放出を行っている。1 つのシナプス小胞が放出部位で膜融合を起こすと、次の小胞が空になった放出部位へ動員され放出可能な小胞となる。そのため持続した神経伝達には小胞の放出部位への連続した動員が必要である［1]。小胞の動員には大きく 2 つのステップが存在すると考えられている。1 つは、シナプス前終末内にある小胞プールからシナプス前膜へつなぎ留められるステップ（tethering）、もう 1 つは前膜につなぎ留められた小胞が膜と近接し放出を引き起こすタンパク質群と複合体を形成するステップである（docking／priming）［2]。小胞の動員速度は電気生理やモデルシミュレーションなどから求められてきた［3]。これら 2 つのステップを分けて速度を見積もることは直接観察しか方法がなく技術的に困難であった。このためこれらのステップのどちらが持続した神経伝達の律速となり重要なのか不明であった。

小脳顆粒細胞は小脳苔状線維シナプスを介して脊髄等からの感覚情報を受け取り、小脳皮質へ情報を伝達している。この小脳苔状線維シナプス前終末は、1 kHz を超える高頻度で発火することが知られており、シナプス小胞の速い再充填が情報伝達に重要であると考えられている［4]。特に放出確率は他のシナプスに比べて高く、またシナプス前膜のシナプス小胞放出領域であるアクティブゾーンの面積も小さいため、超高速なシナプス小胞動員が予測されていたが、直接観察されたことがなくそのメカニズムも不明であった。

本研究では、この小脳苔状線維シナプス前終末における高速小胞動員を直接観察しその動員メカニズムを明らかにすることを研究目的とした。全反射照明蛍光顕微鏡を用いて小脳苔状線維シナプス前終末で蛍光ラベルしたシナプス小胞を観察し、電気生理を用いて刺激を行った。結果、小胞がシナプス前膜へつなぎとめられる tethering ステップがシナプス小胞の放出とほぼ同期して高速で起こることを見出した。この tethering ステップは、小胞放出とアクチン活性に依存することを明らかにした。また高速で tethering した小胞はすぐには放出されず、約 300 ms の時定数で放出されることを実験データとモデルシミュレーションから明らかにした。この 300 ms の小胞膜近傍滞在時間が docking／priming ステップにあたると想定された。以上の結果から、高速で tethering された小胞は、刺激時に放出された小胞の膜近傍スペースを瞬時に埋め、数百 ms かかる docking／priming ステップを経て持続的な神経伝達を担うことが示唆された［5]。

方　法

1.　小脳苔状線維シナプス前終末の急性単離

生後 21～36 日齢の Wister ラットを麻酔下で断頭し、小脳を取り出し小脳虫部のスライス（300 μm）を作製した。シナプス小胞に FM 色素を導入するため、FM1-43（15 μM）を含む生理食塩水にスライスを浸し、細胞外電極を用いて 7、8 番目の小葉を 2 Hz で 2 分間刺激した。FM 蛍光色素は低 pH で蛍光強度が高くなるため、pH の低いシナプス小胞内では強い蛍光を発する。これにより終末内のシナプス小胞を蛍光ラベルすることができる。またシナプス小胞がシナプス前膜と膜融合を起こした場合、シナプス小胞内が外液にさらされるため FM 色素の蛍光が減弱し、小胞放出を検出することができる。FM 色素を取り込ませた小葉部位を酵素処理し、ガラスピペットでピペッティングすることで

機械的に小脳苔状線維シナプス前終末を単離した。単離した前終末を含む溶液は、concanabalinA でコートしたガラスボトムディッシュにまき 15〜20 分間の静置後測定に用いた。

2. TIRF イメージング、電気生理の同時記録

ガラスボトムディッシュ内の小胞苔状線維シナプス前終末を FM 色素の蛍光の有無や形態で同定し、ホールセルパッチクランプを行った。ガラスピペット内液組成（mM）は、140 Cs-gluconate、20 TEA-Cl、10 HEPES、5 Na_2-phosphocreatine、4 MgATP、0.5 NaGTP、0.5 EGTA（pH7.3）である。通常は−60 mV に、記録時は−80 mV に膜電位を固定した。膜容量変化を測定する際は、刺激前後でサイン波（振幅 : 30 mV、周波数 : 1000 Hz）を与えた。細胞外液組成（mM）は、125 NaCl、2.5 KCl、25 HEPES、1.25 NaH_2PO_4、0.4 ascorbic acid、3 myoinositol、2 Na-pyruvate、25 glucose、2 $CaCl_2$、1 $MgCl_2$、0.001 TTX（pH7.4）である。

パッチクランプしているシナプス前終末を TIRF 顕微鏡で観察した。対物レンズ（×100）を通過した 488 nm レーザー光をガラスボトムディッシュのガラス面で全反射させ、生じたエバネッセント光（減衰係数 : 100 nm）で励起した蛍光を観察した。この手法によりシナプス前膜近傍に存在する蛍光ラベルされたシナプス小胞の動態を観察することができる。画像は 20 ms 毎に取得し合計 2 秒間の測定を行った。“Tethering”をシナプス小胞の蛍光スポットが現れるイベント、“vanish”を蛍光スポットが消失するイベントとして解析を行った。

3. モデルシミュレーション

TIRF 顕微鏡で観察できる領域に 2 つのシナプス小胞プールが存在すると仮定し、1 つを即時放出可能プール（RRP）、もう一つを TIRF 内放出可能プール（TIRF-PRP）とした（各プール内小胞数 : N_{RRP}、$N_{TIRF\text{-}PRP}$）。静止状態の RRP と TIRF-PRP はそれぞれ流入速度定数 k_{+1}, k_{+0} と流出速度定数 k_{-1}, k_{-0} で平衡に達しており、それぞれのプールへの小胞の充填率の初期値は 90%とした（$P_{occ,RRP}(0) = 0.9$、$P_{occ,TIRF\text{-}PRP}(0) = 0.9$）。モンテカルロ法を用いて tetanus toxin 存在下でのシナプス小胞が現れて消えるまでの時間（“tethering-vanish”の滞在時間）を適合解析し、k_{+0} を得た（60 s^{-1}、$k_{-0} = k_{+0}(1 - P_{occ,TIRF\text{-}PRP}(0)) / N_{TIRF\text{-}PRP}(0)$）。実験から得られた小胞放出量、“vanish”イベント数の時間経過から、RRP と TIRF-PRP 内の小胞数の比（3 : 1）と、k_{+1} の値を得た（3 s^{-1}, $k_{-1} = k_{+1} N_{TIRF\text{-}PRP}(0)(1 - P_{occ,RRP}) / N_{RRP}(0)(1 - P_{occ,TIRF\text{-}PRP})$）。各プールの小胞数の時間経過は以下の式で表される:

$$\frac{d}{dt}N_{RRP}(t) = k_{+1}\left(1 - P_{occ,RRP}(t)\right)N_{TIRF-PRP}(t) - k_{-1}\left(1 - P_{occ,TIRF-PRP}(t)\right)N_{RRP}(t)$$

$$\frac{d}{dt}N_{TIRF-PRP}(t) = k_{+0}\left(1 - P_{occ,TIRF-PRP}(t)\right) - k_{-0}N_{TIRF-PRP}(t) - k_{+1}\left(1 - P_{occ,RRP}(t)\right)N_{TIRF-PRP}(t) + k_{-1}\left(1 - P_{occ,TIRF-PRP}(t)\right)N_{RRP}(t)$$

コントロール実験で見られた刺激依存的な tethering イベントを再現するため、刺激開始時の $k_{+0}(1 - P_{occ,TIRF\text{-}PRP}(0))$ の項を一過的に上昇させ（50 s^{-1}）、0.4 秒後に 6s^{-1}へ戻るように変化させた。小胞の放出速度定数は異なる時間の脱分極刺激をした際の膜容量変化の実験データから設定した（100 s^{-1}）。膜容量変化が刺激後 200 ms にわたって持続することから放出速度は刺激後 200 ms まで一定とした。

結果および考察

1. 単離小脳苔状線維シナプス前終末でのシナプス小胞の高速動員

小脳苔状線維シナプス前終末を単離しシナプス小胞を FM 色素によりラベルし、TIRF 顕微鏡にて同定した（図 1A）。この単離シナプス前終末にパッチクランプ法を適用し、脱分極刺激（0 mV、100 ms）を与えたときのシナプス小胞の動きを TIRF 顕微鏡にて観察した。ラベルされたシナプス小胞が膜近傍へ動員されるイベントを“tethering”、膜近傍からの離脱（untethering）もしくは膜融合し放出されるイベント（fusion）を“vanish”として解析を行った（図 1B）。結果、刺激に応じて“vanish”“tethering”ともによく似た時間経過（時定数 200 ms）で起こることが示された。また“vanish”“tethering”ともに刺激のない静止状態でも一定の速度で起こることがわかった（図 1C）。

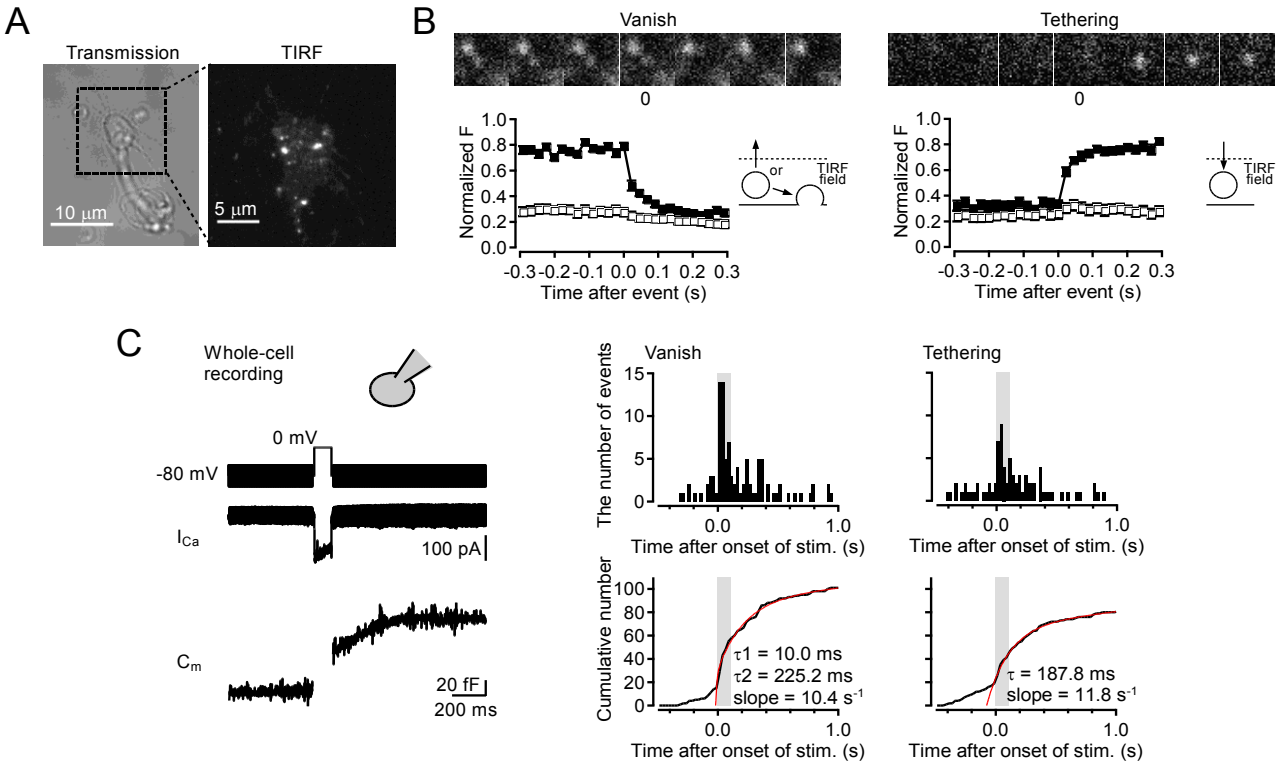


図 1. 小脳苔状線維シナプス前終末におけるシナプス小胞動態観察

A) シナプス小胞をラベルした単離小脳苔状線維シナプス前終末の典型例。

B) シナプス小胞の膜近傍での動き（“vanish”：シナプス小胞の膜近傍からの消失、“tethering”：膜近傍への動員）。

C) 脱分極刺激（0 mV、100 ms）を行った際の Ca 電流と膜容量変化（左）とシナプス小胞イベント発生時間を示したヒストグラムと累積イベント発生数（中央：“vanish”、右：“tethering”）。グラフ内の灰色は刺激時間を表している。累積イベント発生数は指数関数と直線で適合解析している（赤線）。

2. Tetanus toxin、latrunculinA の小胞高速動員への効果

刺激で誘発されるイベントと静止状態で一定して起こるイベントの違いを調べるために、SNARE 複合体の Synaptobrevin／VAMP を切断することでシナプス小胞の膜融合を阻害する tetanus toxin（TeNT）を投与した際の“vanish”と“tethering”を観察した。結果、共に静止状態で起こるイベントは残ったものの、刺激に依存して起こるイベントは消失した（図 2A）。このことから刺激依存的な“vanish”はシナプス小胞の放出であることが示唆された。また、一定して起こる“vanish”は膜近傍からの離脱であることが示唆された。さらに刺激依存的な“tethering”は、Synaptobrevin／VAMP 依存的、もしくは小胞放出依存的であることが示唆された。

刺激依存的な“tethering”のメカニズムを調べるため、アクチンの重合阻害剤である LatrunculinA（LatA）の効果を検証した。過去の報告から LatA は小脳苔状線維シナプスにおいて持続した神経伝達のみを阻害することが知られていた。LatA 投与により、刺激依存的な“tethering”は消失し、持続的なシナプス小胞の放出も減弱した（図 2B）。以上のことから刺激依存的に放出部位にリクルートされた小胞が持続的な神経伝達を担っている可能性が示唆された。

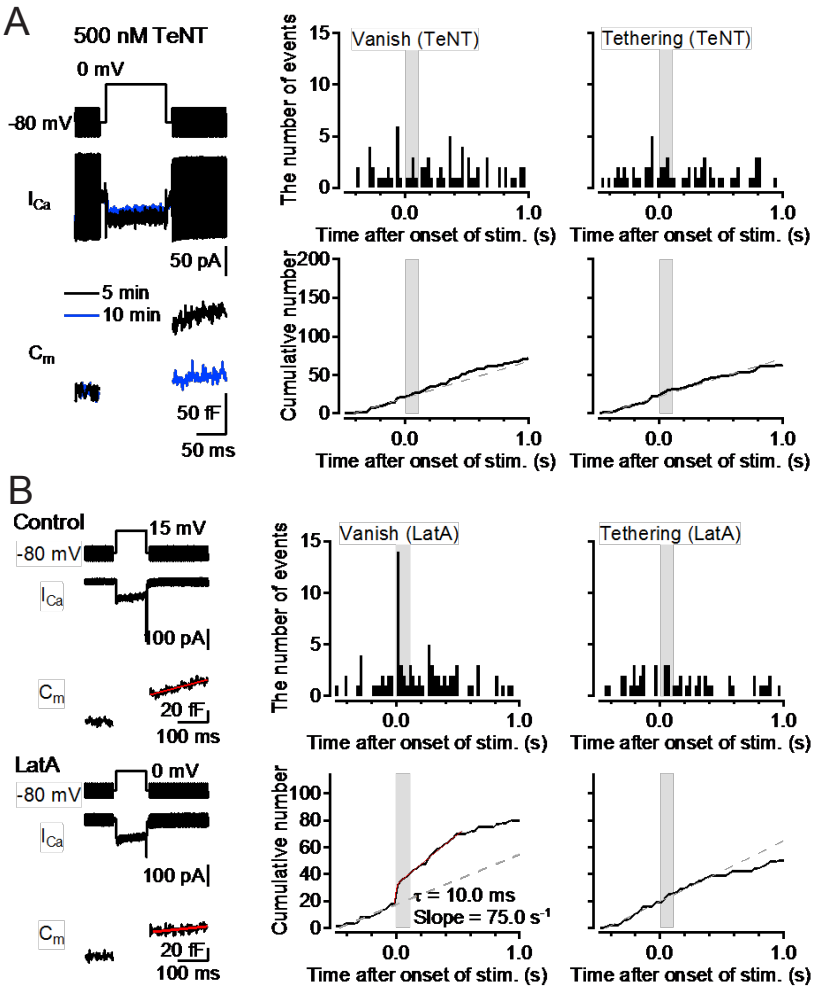


図 2. Tetanus toxin（TeNT）と LatrunculinA（LatA）の小胞イベントへの効果

A) ガラスピペット内から 500 nM TeNT 投与時の Ca 電流、膜容量変化と小胞イベント発生時間経過。グラフ内の灰色は刺激時間を表している。

B) ガラスピペット内から 25 μM TeNT 投与時の Ca 電流、膜容量変化と小胞イベント発生時間経過。刺激後の膜容量変化は直線で、累積“vanish”イベント数は指数関数と直線で適合解析した（赤）。

3. モデルシミュレーションによる膜近傍における小胞プール動態解明

膜近傍に 2 つの小胞プール（TIRF-PRP、RRP）が存在するモデルを用いて、TIRF-PRP への小胞の補充をイメージングから得られた“tethering”、TIRF-PRP からの小胞の細胞質内への移動と RRP からの小胞放出を“vanish”、RRP からの小胞放出を刺激による膜容量の変化量と比較し適合解析した（図 3）。TeNT、コントロール実験との適合解析の結果、TIRF-PRP への小胞の動員速度（6 s^{-1}）、TIRF-PRP と RRP のプールサイズ比（1 : 3）、TIRF-PRP から RRP への小胞の移動速度（3 s^{-1}）を得た（図 3B、C）。これらのパラメータ値を固定し、刺激に依存した“tethering”の増加のみを消失させることで、LatA 実験で得られた膜容量変化と“vanish”を再現することができた（図 3D）。このモデルから、ひとたび RRP が刺激により枯渇すると速い小胞の動員により TIRF-PRP が増加し、この充填された小胞が約 300 ms をかけて RRP へと移行し持続的な神経伝達に寄与することが明らかになった。

以上の結果から、小脳苔状線維シナプスでは、他のシナプスでは見られない高速なシナプス小胞動員により律速となる docking／priming ステップの時間を稼ぐという効率的なシステムによって高頻度で持続した情報伝達を可能にしていることが示唆された。

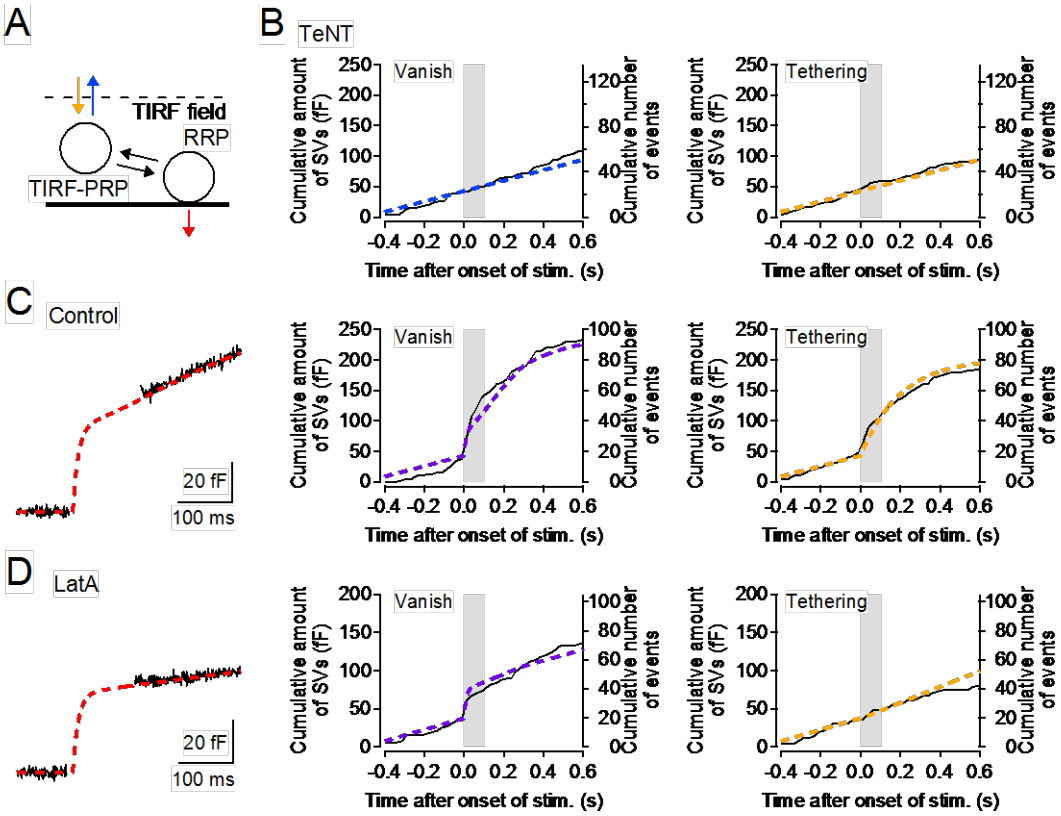


図 3. 2 プールモデルを用いた数理シミュレーション

A) 2 プールモデル。

B) TeNT 実験結果をモデルで適合解析した。黒の実線は実験データを、点線はシミュレーション結果を示している（青点線：モデルの青矢印の小胞の動き、黄点線：黄矢印の小胞の動き）。

C) Control 実験のシミュレーション結果（赤点線：小胞放出、紫点線：青＋赤矢印の小胞の動き）。

D) LatA 実験のシミュレーション結果。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、同志社大学脳科学研究科シナプス分子機能部門の坂場武史教授と東京女子医科大学医学部生理学研究室の緑川光春准講師である。

文　献

1) Elmqvist D, Quastel DMJ. A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. J. Physiol. 1965 Jun;178(3):505-29. PMID: 5827910 DOI: 10.1113/jphsiol.1965.sp007639

2) Südhof TC. Neurotransmitter release: the last millisecond in the life of a synaptic vesicle. Neuron. 2013 Oct 30;80(3):675-90. PMID: 24183019 DOI: 10.1016/j.neuron.2013.10.22

3) Pan B, Zucker RS. A general model of synaptic transmission and short-term plasticity. Neuron. 2009 May 28;62(4):539-54. PMID: 19477155 DOI: 10.1016/j.neuron.2009.03.025

4) Ritzau-Jost A, Delvendahl I, Rings A, Byczkowics N, Harada H, Shigemoto R, Hirrlinger J, Eilers J, Hallermann S. Ultrafast action potentials mediate kilohertz signaling at a central synapse. Neuron. 2014 Oct 1;84(1):152-63. PMID: 25220814 DOI: 10.1016/j.neuron.2014.08.036

5) Miki T, Midorikawa M, Sakaba T. Direct imaging of actin-dependent rapid tethering of synaptic vesicles accompanying exocytosis at a fast central synapse. PNAS under review.