

東北大学医学部

医学基礎生物学「生理学:細胞間信号伝達」

2016年12月15日 東北大学医学部6号館1階講堂 8:50-12:10



授業担当: 新医学領域創生分野 **松井 広**

matsui@med.tohoku.ac.jp

<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/>

内線 8208

～試験想定問題集＋解説～

(質問1)

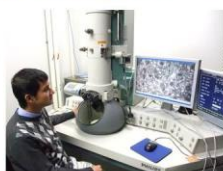
シナプスの微細構造を理解するにあたり、光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いた方法のそれぞれの利点や欠点を挙げてください。

シナプスの構造

● 光学顕微鏡



● 電子顕微鏡

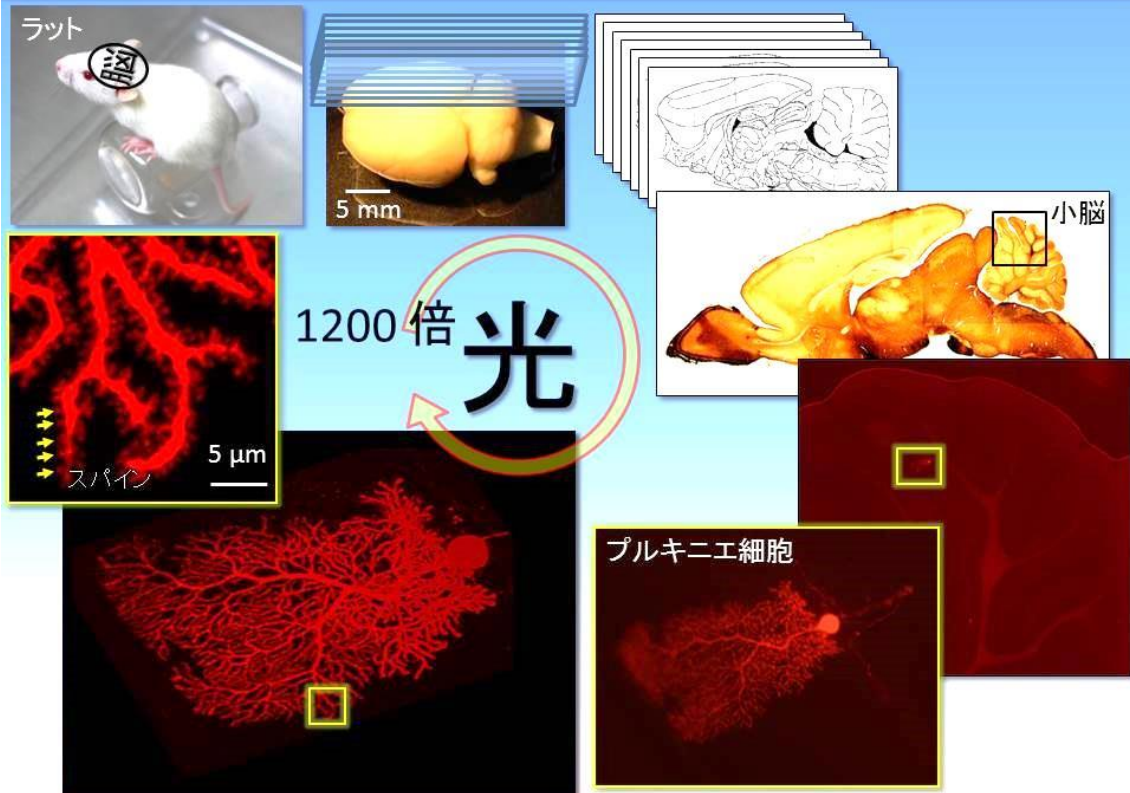


モノの形を見るには、大きく分けて、光を使う方法と電子を使う方法があります。まずは、光学顕微鏡の限界に迫ってみます。

比較的若めのラットは、図のような格好をしています。脳を取り出してみます。形を仔細に調べるには、数十～数百ミクロン程度の厚さの薄切り切片を作製するのは、よくある手です。これのうちの一枚を取り出してみます。図のもの自体は、ホルマリンに

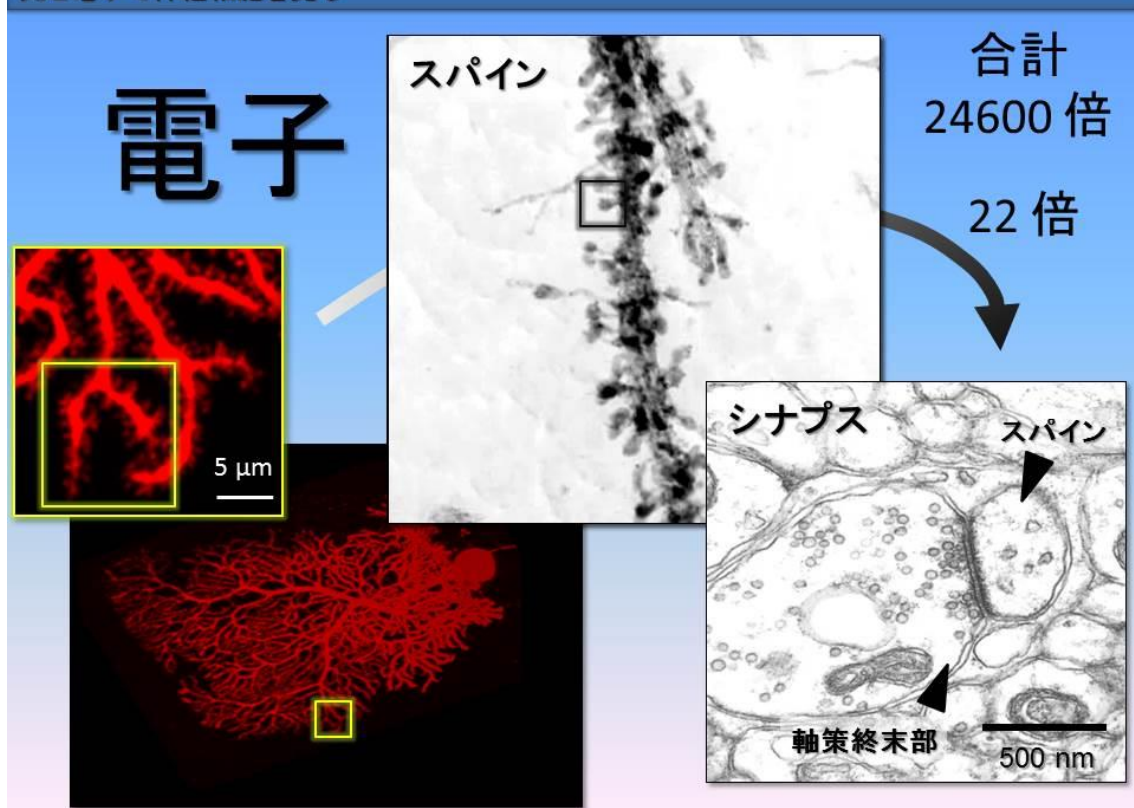
よって化学固定した標本ですが、脳出しからスライス作製までを手早く行うことで、生きたままの脳組織標本作製することもできます。脳の中の小脳という箇所に注目して、拡大します。この組織の中のたったひとつだけの神経細胞に、赤い蛍光色素を入れてみました。拡大するとこのように見えます。これがプルキニエ細胞です。通常の落射蛍光顕微鏡では、このくらいの解像度が限界です。そこで、二光子レーザー顕微鏡という最新の顕微鏡を使って、さらに細かく見てみることにします。この顕微鏡では、細胞の形を三次元的に再構築することができるので、回転させてみることもできます。この細胞の樹状突起の一部を拡大していきます。樹状突起の一部に、とげ状の突起が見えてきました。これをスパインと呼びます。このスパインという構造で、シナプス結合をしていて、シナプス前細胞からの信号を受け取ることが知られています。

光と電子で神経細胞を見る



光学顕微鏡で見えるのは、ここまでです。しかし、最新の二光子レーザー顕微鏡によって、生きたままの脳組織のシナプス部位までは、何とか見る事ができるわけです。ここから先は、電子顕微鏡を使うことになります。

生命活動を瞬間的に停止し、電子を使った方法に切り替えれば、細胞の形態をさらに細かく見る事ができるようになります。こちらは、超高压電子顕微鏡で見た樹状突起上のスパインの画像です。超高压電子顕微鏡では、比較的厚い組織切片を観察することが可能です。しかし、細胞の中の小器官も含めて、さらに高解像度で観察しようとすると、数十 nm の超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡で観察することになります。これでようやくシナプスの形が見えてきました。信号を受け取る部分のスパイン、神経信号が出力される箇所である軸索終末部と呼ばれる構造などが見られます。軸索終末部にある小さな球状の構造がシナプス小胞であり、これに神経伝達物質が詰まっています。二つの細胞が接している箇所が、少し黒く見えていますが、このような構造のことを、post synaptic density、略して PSD と呼びます。この PSD に神経伝達物質に結合する受容体がたくさん発現していることが知られています。



これがシナプス構造の全貌です。まとめますと、生きた細胞を観察するには光を使って行い、さらなる微細構造の追究には電子を使った観察を行うわけです。光学顕微鏡では数百ミクロンの切片を使い、落射蛍光装置や二光子イメージング法によって、細胞を観察します。電子顕微鏡には、厚い切片を扱える超高圧電顕などありますが、通常は、数十ナノメートルの超薄切片を作製します。また、電顕観察の利点は、細胞の表面だけでなく、細胞内小器官まで見ることができる点です。

シナプスの構造

● 光学顕微鏡

▶ 生きた組織の観察

数百ミクロン切片、落射蛍光、二光子イメージング

● 電子顕微鏡

▶ さらなる微細構造の追究

超高圧電顕、数十ナノ切片、細胞内小器官観察

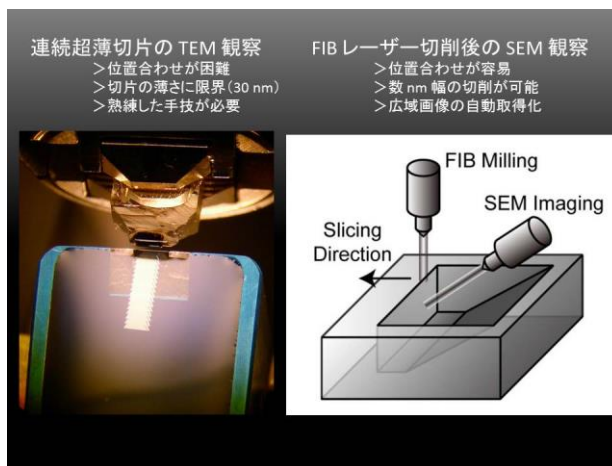
(質問2)

脳神経回路の全配線図を明らかにしようとする試みのことをコネクトミクスと呼びます。コネクトミクスのアプローチとして考案されている方法をいくつか挙げ、それぞれの利点と欠点を挙げてください。また、線虫では、神経系の細胞 302 個全てが同定されていて、その間の接続も明らかになっています。一方、ヒトの脳には 1000 億個の神経細胞と 1 兆もの接続があると言われています。ヒトやマウスなどにおけるコネクトミクスを実現するには、今後、どのような技術革新が必要になるか、自由に論じてください。

個々のシナプスが同定できる解像度で、脳回路全体を展望することは可能でしょうか。

上に示したような電子顕微鏡像は、1枚の超薄切片の画像です。ブロック状に固めた脳組織からダイヤモンドナイフを使って、次々と 70 nm 程の超薄切片を作製していった、それを透過型電子顕微鏡で観察すると、脳組織の三次元像を得ることができます。

こういった画像の積み重ねで問題になるのは、位置合わせです。従来は手作業で100枚近くの画像の位置合わせを行うだけで、丸一日以上かかっていたのですが、画像情報から特徴抽出するなどの情報処理を行うことで、半自動化が達成でき、10分程度での位置合わせができるようになりました。

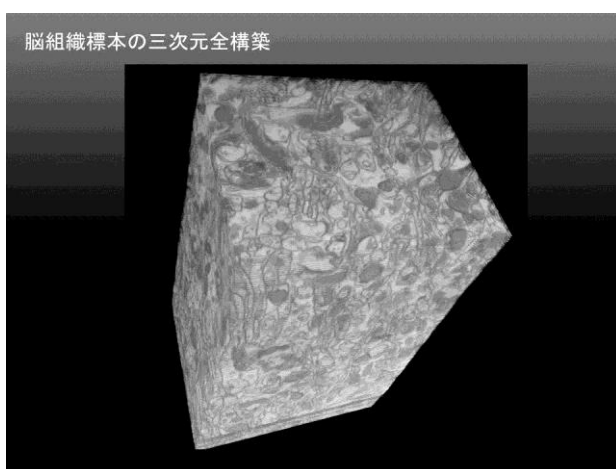


しかし位置合わせの問題は、画像処理で何とかならなくもないのですが、とにかく、このような連続超薄切片を作製して、透過型電子顕微鏡でひとつひとつ写真を撮っていくのは手間がかかり、また、熟練した手技を必要としています。ところが、最近、FIB-SEM という新しい手法が開発されました。FIB というのは、focused ion beam の略であり、これによって、脳組織ブロックを数 nm 単位で切削することができます。また、

従来は、電子線を超薄切片に通過させて観察する方法、つまり、透過型電子顕微鏡、trans electron microscope、略して TEM を使って観察していました。しかし、切削したブロックの表面に電子線をあてて、跳ねかえってきた電子を観察するなどの方法を使う、走査型電子顕微鏡、serial electron microscope、略して SEM を使う観察でも、かなり、微細な構造を観察できることが分かってきました。つまり、FIB レーザーを使って試料を数ナノメートル単位で切削し、残った試料ブロックの方を走査型電子顕微鏡で観察するという手法を用いれば、より広域の画像が自動的に取得できる可能性があります。この FIB-SEM の生物試料への適用は始まったばかりであり、また、1台2億円ほどする機材になります。

また、レーザーではなくて、ダイヤモンドナイフを使って、組織の表面を薄く削って、やはり、SEM観察をするという手法もあります。これはいわば鉋を使って木材を削って、その表面の写真をどんどん撮っていくようなものです。いずれにせよ、ブロック状に固めた組織の切片ではなく、ブロックの表面を観察するという意味で、こういった手法のことを **serial block-face SEM** というようにも呼びます。これも1台2億円くらいするので、まだ、世界にも数少ない機械ですが、愛知県岡崎市の生理学研究所に、2年ほど前に2台導入されており、共同利用できる体制になっています。

通常、透過型電子顕微鏡に比べて、走査型電子顕微鏡は、解像度が落ちます。この機器を使う際に心配だったのは、走査型電子顕微鏡で果たして、目的とする構造が見られるかどうかという点でした。しかし、シナプス構造がはっきり見え、シナプス小胞の数まで数えられるほどの解像度が得られることが判明しました。

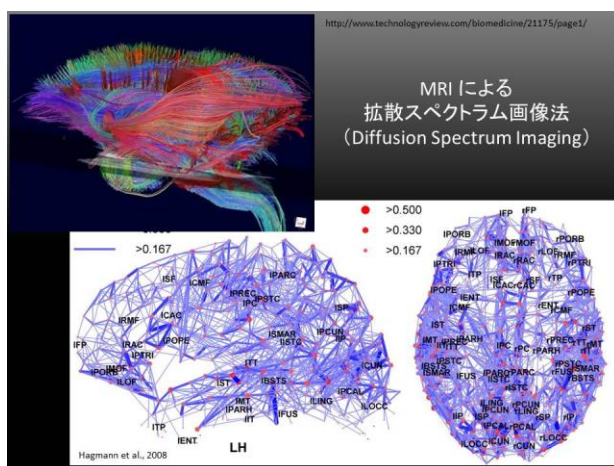


このように **serial block-face SEM** を使えば、数ミクロン立方の空間なら、そこに存在する全ての構造を完全に把握できる時代がやってきたのです。これは6ミクロン x 6ミクロンを30 nm 毎に300枚ほど切削して再構築した像です。しかしこの辺りが現在の限界です。脳全体の回路を再構築するほどのレベルには、現在の技術では達していません。

脳回路を理解するのは、仕様書のない電子回路基盤を読み解くのに似ています。例えば、ジャンクヤードから何だかわからない基盤を拾ってきた場合、これが何のボードなのか、どういった働きがあるのか、皆目見当が付きません。脳回路も同じで、設計書が添付されていないので、何が何だかわかりません。こういった場合にできるアプローチとしては、まずは、とりあえず全配線図を書き出すということから始めるということが考えられます。回路の全配線図を明らかにしようというのがコネクトミクスと呼ばれるアプローチです。

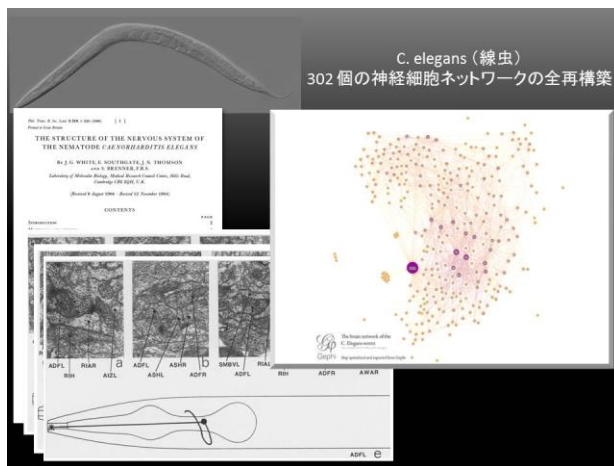
ヒトの脳には1000億個ほどの神経細胞があり、それらの間には1兆ほどの接続が存在すると考えられています。コネクトミクスとは、全ての神経細胞の間の接続状態を表した地図、すなわち神経回路の全地図を明らかにしようという試みのことです。ヒトゲノムの解読は2003年に終了しましたが、ヒトゲノムは30億ほどの塩基対で構成されており、ヒト・コネクトミスを追求するのは、それよりはるかに難しい試みであると言えます。





の局所血流量動態を測定することができ、この手法のことを **fMRI** と呼びますが、脳血流量は神経活動の指標として使うことができます。**fMRI** によって測定された神経活動で、相関の高い領域を抽出し、先ほどの拡散スペクトラム画像法と組み合わせることで、どの領域とどの領域の神経結合が強いのかを、地図として表現することが可能です。

ただこの手法では、脳領野間の結合を調べる程度で、どの細胞とどの細胞がつながっているか、単一細胞レベルで明らかにすることができません。神経細胞をひとつひとつ同定して、どこでどのようなシナプスが形成されているのかを明らかにするには、どうしても電子顕微鏡の解像度が必要です。



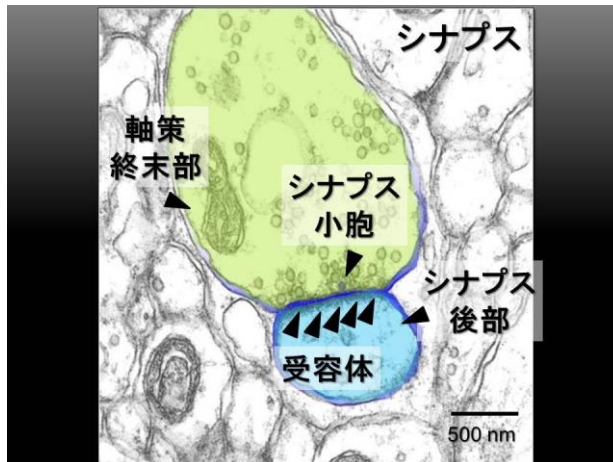
現在、神経系の全てのコネクションが明らかになっているのは、*C. elegans*、いわゆる線虫だけです。*C. elegans* とは、体長 1 mm 程度の生き物で、神経系を構成する細胞 302 個全てが同定されています。頭の先が尻尾の先まで、50 nm 間隔で超薄切片を作製して、計 8000 枚の電子顕微鏡画像を 10 年かけて撮影し、解析した論文が 1986 年に発表されました。この論文だけで 340 ページもあるので、この雑誌の 1 号がまるまる使われています。302 個全ての細胞

間のコネクションを調べ上げて、マップが作製されています。

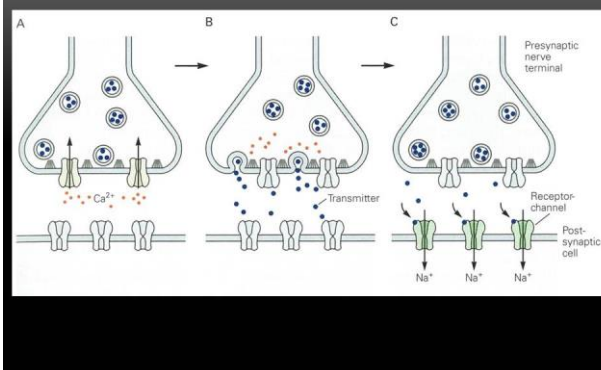
マウスの脳、あるいは、ヒトの脳でこれをやろうとすると、気の遠くなるような作業量と情報量になりますが、技術革新によって、そのうちにできるようになると考えています。

(質問3)

シナプスにおいては、 Ca^{2+} イオンが引き金となって伝達物質放出が起こると考えられています。この Ca^{2+} 仮説を支持する実験の例をいくつか挙げてください。



● Ca^{2+} 仮説

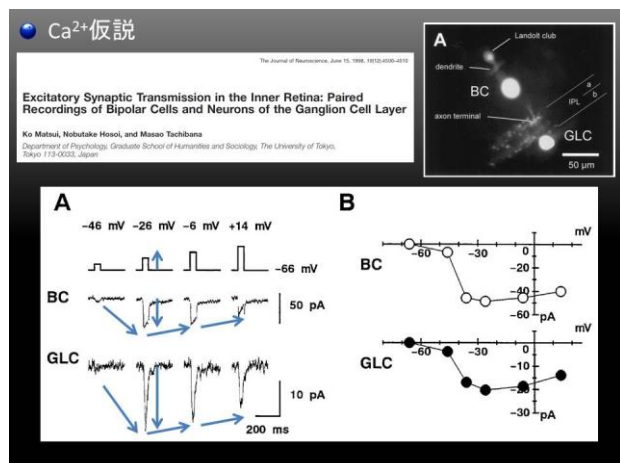


こちらは、脳から薄い切片を作製し、電子顕微鏡で観察したシナプスです。信号の送り手である軸索終末部、信号の受け手であるシナプス後部があります。軸索終末部には、神経伝達物質の詰まったシナプス小胞があります。神経細胞が興奮すると、細胞は脱分極します。脱分極すると軸索終末部の Ca^{2+} チャンネルが開き、細胞外から細胞内へと Ca^{2+} が流入します。これが引き金となって、シナプス小胞が開口放出されます。シナプス小胞の中に入っていた神経伝達物質は、シナプス前細胞とシナプス後細胞の間、シナプス間隙を拡散し、受容体を活性化させることで、信号が伝わります。これが基本過程です。

神経伝達物質の放出が Ca^{2+} に依存するという仮説を検証するのに、主に使われた3つの実験を紹介します。まずは、シナプス前細胞 Ca^{2+} と神経伝達物質放出量の間で相関を示した実験。続いて、シナプス前

細胞への Ca^{2+} 流入路である Ca^{2+} チャンネルを薬理的に阻害すると、神経伝達物質放出が抑えられたという実験。最後に、シナプス前細胞内の Ca^{2+} を、 Ca^{2+} チャンネルを介さずに人工的に上昇させたときでも、伝達物質放出が起こることを示した実験です。

こちらは、網膜の双極細胞 BC と神経節細胞 GLC の間のシナプスを解析した論文です。双極細胞を脱分極すると、双極細胞に流入する Ca^{2+} が電流として計測されます。それとともに、双極細胞のシナプス後細胞にあたる神経節細胞に、興奮性の内向き電流が生じます。これが、双極細胞から放出されたグルタミン酸に対する

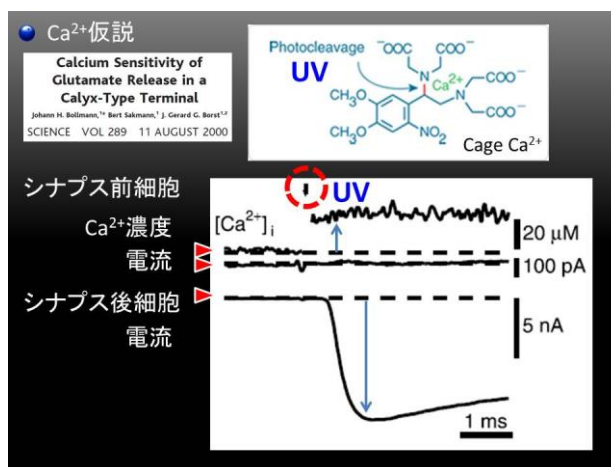
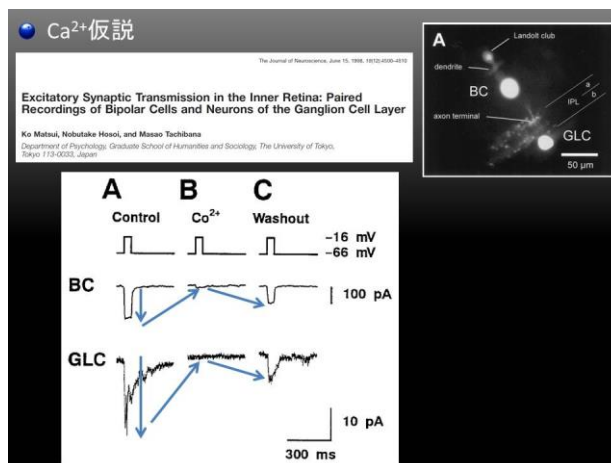


神経節細胞の反応です。

双極細胞への脱分極の度合いを変えると、双極細胞の Ca^{2+} チャネルの活性化の度合いが変化するので、 Ca^{2+} 電流の振幅が変化します。それとともに、神経節細胞の応答も変化することが明らかになりました。つまり、シナプス前細胞への Ca^{2+} 流入量が多いほど、シナプス後細胞の反応が大きいわけです。 Ca^{2+} 流入量と伝達物質放出量の間の相関を示したこの実験は、 Ca^{2+} 仮説を支持するひとつの実験となります。

また、こちらでも、シナプス前細胞への Ca^{2+} 流入にともない、シナプス後細胞からシナプス応答が記録されているのが分かります。ここで、 Ca^{2+} チャネルの阻害剤である、 Co^{2+} を投与しました。すると、シナプス前細胞への Ca^{2+} 流入が阻害され、それに伴い、シナプス応答も完全になくなりました。 Co^{2+} を洗い流せば、応答は復活してきます。このような Ca^{2+} チャネルを阻害する実験でも、 Ca^{2+} 仮説を支持することができました。

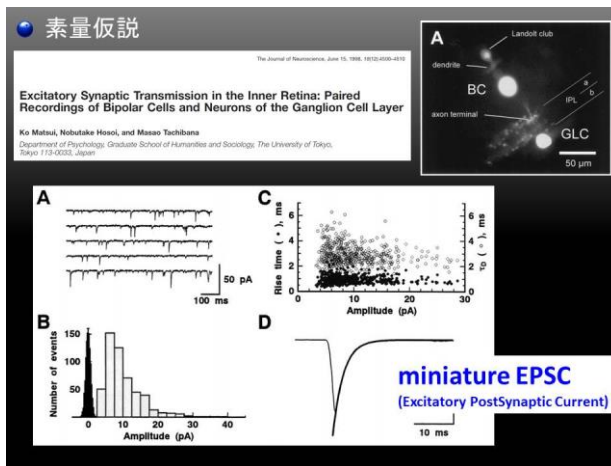
最後に決定的な実験です。こちらでは、caged Ca^{2+} という薬物を使いました。 Ca^{2+} イオンを閉じ込めてある分子のことを caged Ca^{2+} と言います。この分子に強力なUV光を照射すると、分子の一部が壊れて、 Ca^{2+} が遊離されます。瞬間的に、高濃度の Ca^{2+} イオンを出現させるのに使います。この caged Ca^{2+} をシナプス前細胞内に詰め込みました。そこで、UV照射をすると、細胞内の Ca^{2+} 濃度が瞬間的に上昇することが、 Ca^{2+} イメージング法により確認されました。シナプス前細胞では、 Ca^{2+} 濃度が変化しただけなので、電流は流れません。一方、シナプス後細胞からは、放出された伝達物質に反応したシナプス応答を記録することができました。シナプス放出には、 Ca^{2+} イオンそのものが引き金となっていることを示す、決定的な実験になります。



(質問4)

シナプスにおける伝達物質放出は、何千分子かのまとまった単位で生じると考えられています。これを素量仮説と呼び、シナプス小胞からの開口放出によって伝達物質が細胞外空間にもたらされていると考えられています。このような、素量仮説・小胞仮説・開口放出仮説を支持する実験の例を挙げてください。

素量仮説とは、伝達物質の放出は、ある程度のまとまりをもって放出されるとする仮説です。これが小胞仮説につながります。つまり、直径 30 nm ほどのシナプス小胞の中に伝達物質が詰め込まれていて、これが放出されるので、放出量の単位は、シナプス小胞が1個とか2個とか数えられる単位で起こると考える説です。それで、どのようにして、シナプス小胞に詰められた伝達物質が、細胞外空間へと放出されるのかについては、開口放出仮説というのにつながります。



素量仮説というのは、例えば、このような実験を通して、考えられてきました。シナプス後細胞からじっと記録していると、シナプス前細胞は刺激されていないのに、時々、散発的な応答が記録されます。この小さな応答は、だいたい似たような振幅で、この細胞の場合、およそ 10 pA 程度の振幅になります。こういった散発的なイベントの平均を取ると、このような形になります。こういったイベントのことを miniature EPSC、

excitatory postsynaptic current と呼んだりします。似たような応答が散発的に生じるので、何千個かの伝達物質分子がまとまって放出されていることが想像されます。

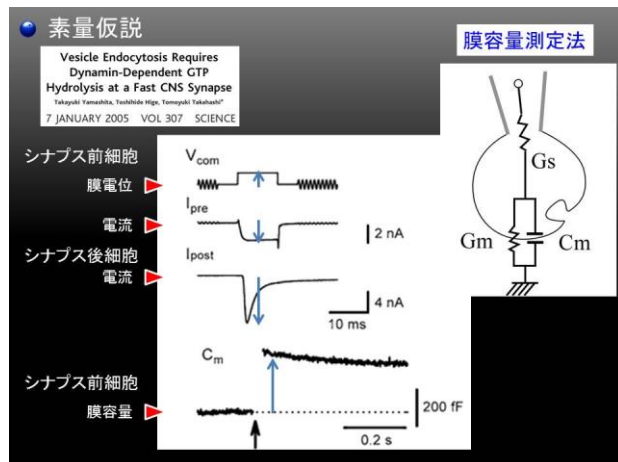
電子顕微鏡を使った研究でも、素量仮説は支持されています。神経終末部位には、伝達物質の詰まった小胞が集積しているのが観察されるのですが、うまくタイミングで固定された標本を観察すると、ちょうど開口放出の瞬間のオメガシェイプを観察することができます。また、開口放出された膜が回収される、endocytosis の瞬間も見ることができます。

こちらは、凍結割断レプリカ法という方法で、細胞を輪切りにするのではなく、細胞膜面を二次元的に観察したものです。この方法でも、exocytosis や endocytosis の瞬間を捉えることが可能です。

本当に、シナプス前細胞を刺激した瞬間に、シナプス小胞の開口放出が起きて、伝達物質の放



出が生じているのか。これを検証する手段として、膜容量測定法というのが開発されました。



細胞膜というのは、抵抗とキャパシタンスの並列回路と見做すことができます。開口放出が起きるとすると、細胞膜の面積が増えるのですから、キャパシタンスが増えると考えられます。この回路に、サイン波状の電圧変化を与えやると、膜容量のチャージングによって流れる電流と、細胞膜の抵抗を通して流れる電流のふたつの成分が出てきます。この二つの成分は、位相がちょうど90度ずれています。サイン波状の電圧

に対して、流れる電流成分の位相を分けて抽出すると、膜容量の大きさを実測することができます。

そこで、まず、シナプス前細胞の膜電位をサイン波状に振って、流れる電流を計測し、そこから、膜容量成分を抽出します。途中で、シナプス前細胞に大きな脱分極刺激を与えると、シナプス前細胞への Ca^{2+} 流入が、電流として計測されます。シナプス後細胞からは、伝達物質放出によって生じるシナプス応答が記録されます。その後、シナプス前細胞へのサイン波状の膜電位変化を続けると、膜容量成分が増えたことが分かりました。

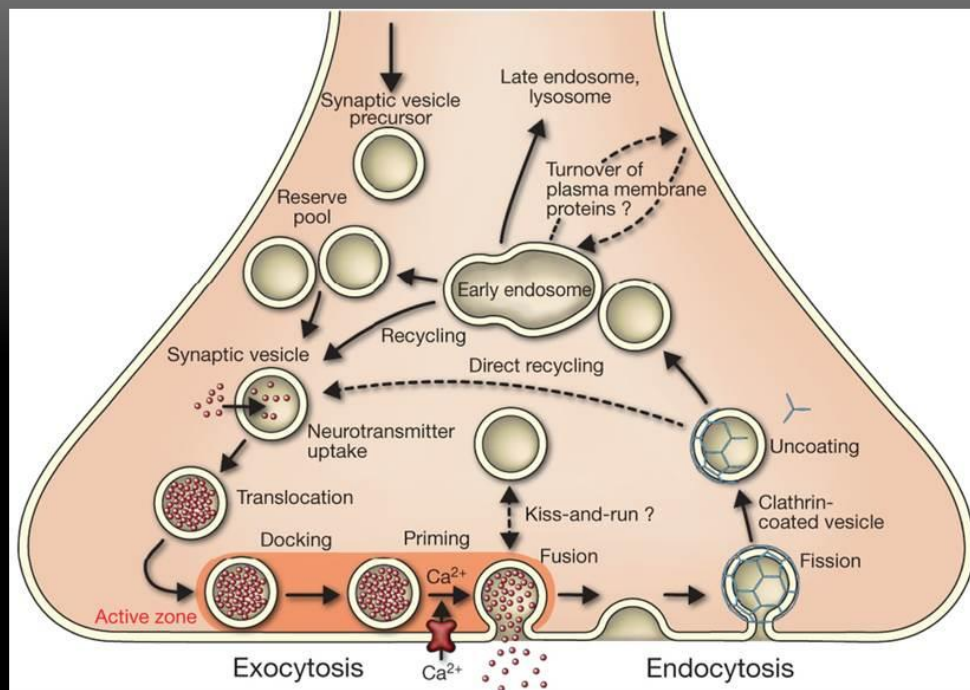
このような実験により、シナプス前細胞から伝達物質放出が起こる際に、膜容量が増えることが分かり、本当に、シナプス小胞の開口放出によって、伝達物質が放出されていると考えるのが妥当だと考えられるようになりました。

(質問5)

シナプス小胞に伝達物質が充填された後、アクティブゾーンと呼ばれるシナプス前構造にシナプス小胞が集積されて、Docking, Priming と呼ばれる過程を経て、開口放出の準備ができると考えられています。この過程に関わる分子群のことを総称して SNARE と呼びますが、この SNARE を構成する分子の名前を3つ挙げてください。また、開口放出の準備ができた後、 Ca^{2+} イオンに結合して、放出へとつなげるのに重要な役割を果たしていることが知られている分子の名前を挙げてください。さらに、強固に構成された SNARE complex を解散させるのに働く2つの分子の名前を挙げてください。シナプス小胞が放出されてリサイクルされるまでの1サイクルの間で、これらの分子がどのタイミングでどのように働くのかを解説してください。

シナプス前終末部の中では、まず、シナプス小胞に伝達物質が充填されて、これが active zone と呼ばれるシナプス前部に docking され、すぐに放出ができるように、priming されると考えられてい

● SNARE仮説

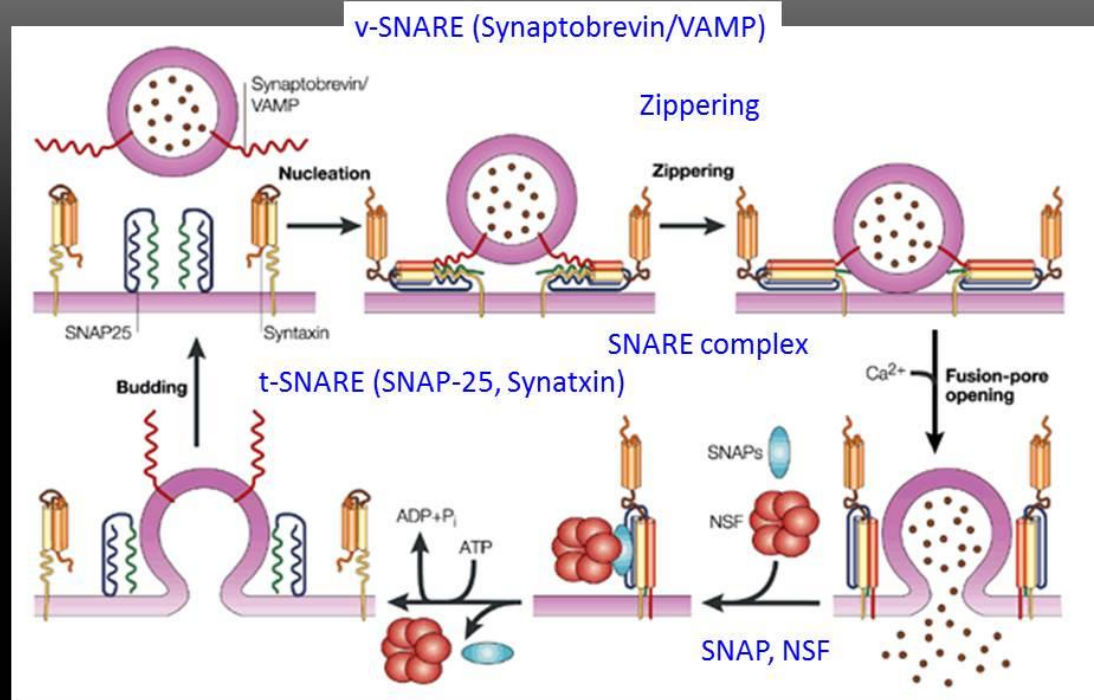


ます。ここで、 Ca^{2+} イオンの流入があれば、すぐに、シナプス小胞は開口放出されます。その後、膜が endocytosis という過程を経て回収され、これがリサイクルされて、再び、伝達物質が充填されることになります。これが、シナプス前終末部におけるシナプス小胞の一生です。シナプス小胞の開口放出に関わる分子の一群を総称して、SNARE と呼ばれます。今のところ、こんな感じに、分子の連携があると考えられています。

シナプス小胞に突き刺さっている膜タンパク質を Synaptobrevin/VAMP と呼びます。これが、vesicle 側の SNARE ということで、v-SNARE と呼ばれます。また、細胞膜側に突き刺さっている膜タンパク質は、SNAP-25 と Syntaxin です。この二つのことを t-SNARE と呼びます。これら三つのタンパク質は、非常に強固な結合をして、SNARE core complex という複合体を作ります。この三つが複雑に絡み合って、coiled-coil 状態になることで、シナプス小胞を細胞膜に近づける作用が生まれるわけですが、この過程のことを zippering と呼びます。これでいつでも、放出ができる準備ができたというわけです。ここに Ca^{2+} イオンが作用すると、SNARE complex に何かが起こって、シナプス小胞と細胞膜は融合します。ここで、何が起こるのかは、いったん飛ばします。

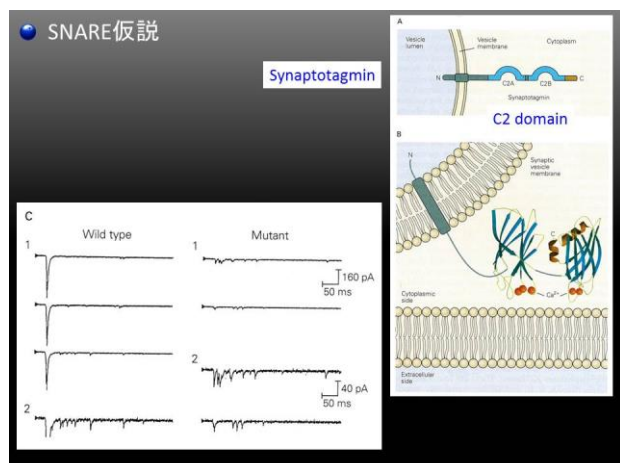
開口放出が起きたあとも、SNARE complex は、強固に結びついているので、そのままでは解除されません。そこで、SNAP と NSF という分子が結合し、ATP の加水分解作用を通して、ようやく、この強固な complex が解除される、という過程を経て、最終的に、シナプス小胞が回収されて、endocytosis が生じます。

● SNARE仮説



それでは、肝心の、 Ca^{2+} イオンを感知して、細胞膜融合へと結びつけるタンパク質は何でしょうか。もっとも有力な候補は、**Synaptotagmin** です。シナプス小胞膜に突き刺さったこの膜タンパク質には、 Ca^{2+} 結合モジュールである C2ドメインが2つついていることが知られています。

野生型の神経細胞と、**Synaptotagmin** の変異タンパク質で、機能しないタンパク質を発現させた神経細胞を比較してみました。野生型では、シナプス刺激でシナプス応答が記録されるのですが、変異型では、シナプス放出がほとんど起きないということが分かりました。ただ、面白いことに、全く起きないわけではないのです。刺激から少し遅れて出てくる成分が、野生型の神経細胞でもあるのですが、この非同期的な放出に関しては、**Synaptotagmin** の変異型は、影響を与えません。こういったゆっくりとした開口放出を起こすのは、**Synaptotagmin** とは別のメカニズムが介在しているようです。

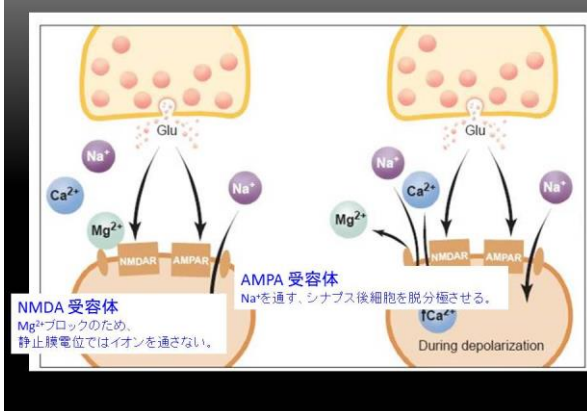


(質問6)

中枢神経系において、興奮性伝達物質として働くことを知られているのは、グルタミン酸です。グルタミン酸受容体のうち、イオンを透過するタイプの名称を2つ挙げてください。この2つの受容体の間での性質の違いを挙げてください。

中枢神経細胞では、興奮性の信号伝達に使われている主な神経伝達物質は、グルタミン酸です。グルタミン酸に対して、素早く反応する受容体は、大きく分けて、AMPA 受容体と NMDA 受容体の二つになります。

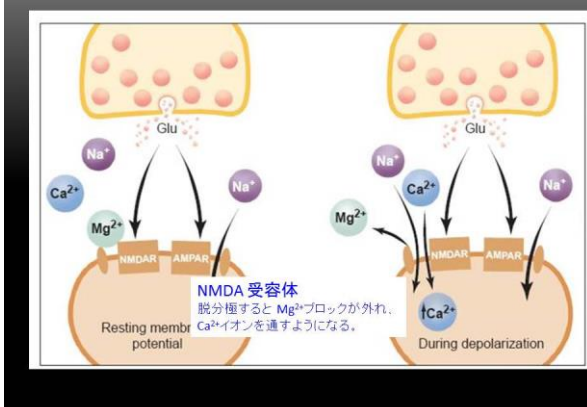
● グルタミン酸受容体



シナプス前細胞からのグルタミン酸放出に対して、まず、最初に反応するのは、AMPA 受容体です。グルタミン酸が AMPA 受容体に結合すると、イオンチャネルが開き、主に Na^+ イオンが細胞外から細胞内へと流れ込みます。これによって、シナプス後細胞の膜電位は脱分極します。

一方、NMDA 受容体のほうは、AMPA 受容体より、グルタミン酸に対する親和性が高いくらいなので、グルタミン酸は、すぐに NMDA 受容体に結合します。NMDA 受容体は、それで、イオンチャネルを開こうとするのですが、NMDA 受容体のチャネルの通り道は、特殊な構造をしていて、生来、細胞外にある Mg^{2+} によって、チャネルの通り道がブロックされてしまいます。したがって、NMDA 受容体にグルタミン酸は結合するのですが、NMDA 受容体を通しては、電流は流れ

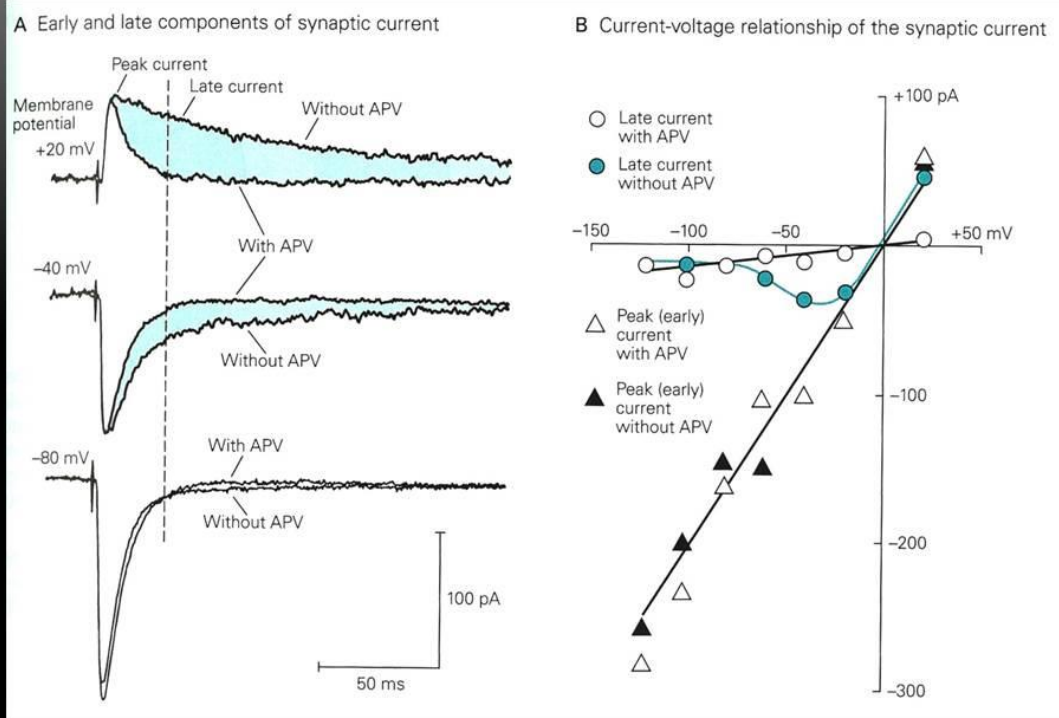
● グルタミン酸受容体



ません。

ところが、シナプス後細胞の膜電位が脱分極していくと、この Mg^{2+} ブロックが外れていきます。すると、イオンチャネルの通り道が解放されるので、AMPA 受容体と同じく、 Na^+ イオンを通すようになります。また、NMDA 受容体のイオンチャネルの通り道の構造上、 Na^+ イオンに加えて、 Ca^{2+} イオンも通すようになります。これが、NMDA 受容体の重要な役割になります。

● グルタミン酸受容体



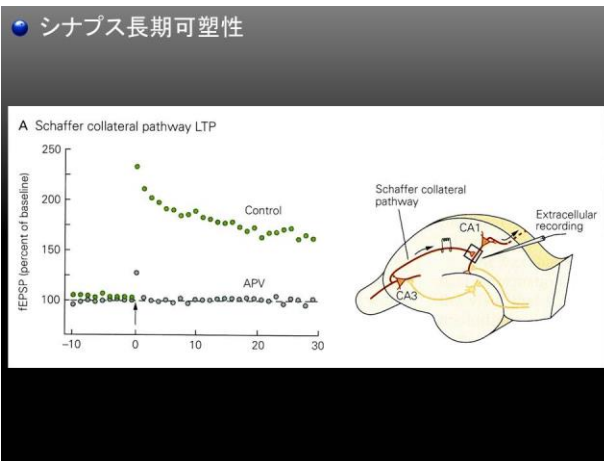
グルタミン酸受容体を介したシナプス応答を計測すると、このようになります。まず、-80 mV の過分極状態で、シナプス後細胞の膜電位を固定し、シナプス前細胞を刺激して、シナプス後細胞の細胞膜を横切る電流を計測します。すると、このような一過性の興奮性内向き電流が記録されます。ここで、NMDA 受容体の阻害剤、APV を投与しても、応答はほとんど変化しません。

ところが、少し脱分極した状態、-40 mV に膜電位固定した状態だと、ゆっくりしたシナプス応答成分がでてきます。このゆっくりした成分は、NMDA 受容体の阻害剤 APV によって、阻害されました。この二つの波形の差分が、NMDA 受容体を介した成分だということになります。-40 mV の膜電位で、 Mg^{2+} ブロックが外れて、NMDA 受容体を介した電流が生じるようになったというわけです。0 mV を越えて、+20 mV に、さらに脱分極させて、膜電位を固定した条件だと、シナプス電流は反転します。主に細胞内から細胞外へと K^{+} イオンが流れ出ているのを計測していることになります。プラスの電位に保持すると、なおさら、NMDA 受容体を介した成分が顕著になります。

(質問7)

海馬におけるシナプス長期増強のメカニズムを述べてください。どのタイプのグルタミン酸受容体の活性化がシナプス可塑性につながるのか。シナプス後細胞において、 Ca^{2+} に結合して長期増強へと導くタンパク質の名前は何か。シナプス増強の際には、グルタミン酸受容体のリン酸化や、新たなグルタミン酸受容体のシナプス後膜への挿入が生じると考えられていますが、それぞれの過程に関わることが知られている酵素の名前を教えてください。

シナプス伝達の効率が変化する状況について解説します。シナプス伝達効率が変化することをシナプス可塑性と呼び、変化が長く維持される状況を長期可塑性と呼びます。シナプス長期可塑性は、学習や記憶といった脳機能の基盤となると考えられています。いろいろなメカニズムでシナプス長期可塑性が生じるのですが、一番、良く調べられているのは、NMDA 受容体を介した長期可塑性です。NMDA 受容体を介した Ca^{2+} 流入が重要な役割を果たします。シナプス長期可塑性のうち、長期的にシナプス伝達効率が上がる現象を、Long-term potentiation、略して LTP と呼びます。



例えば、海馬のグルタミン酸作動性シナプスですが、このシナプスを特定の周波数で、高頻度刺激すると、その後、シナプス応答が増強されて、この増強された状態が少なくとも30分以上、維持されることが知られています。このような増強作用は、APV という NMDA 受容体の阻害剤を投与した条件では生じません。したがって、NMDA 受容体の活性化が、この LTP 現象につながっていることが示唆されました。

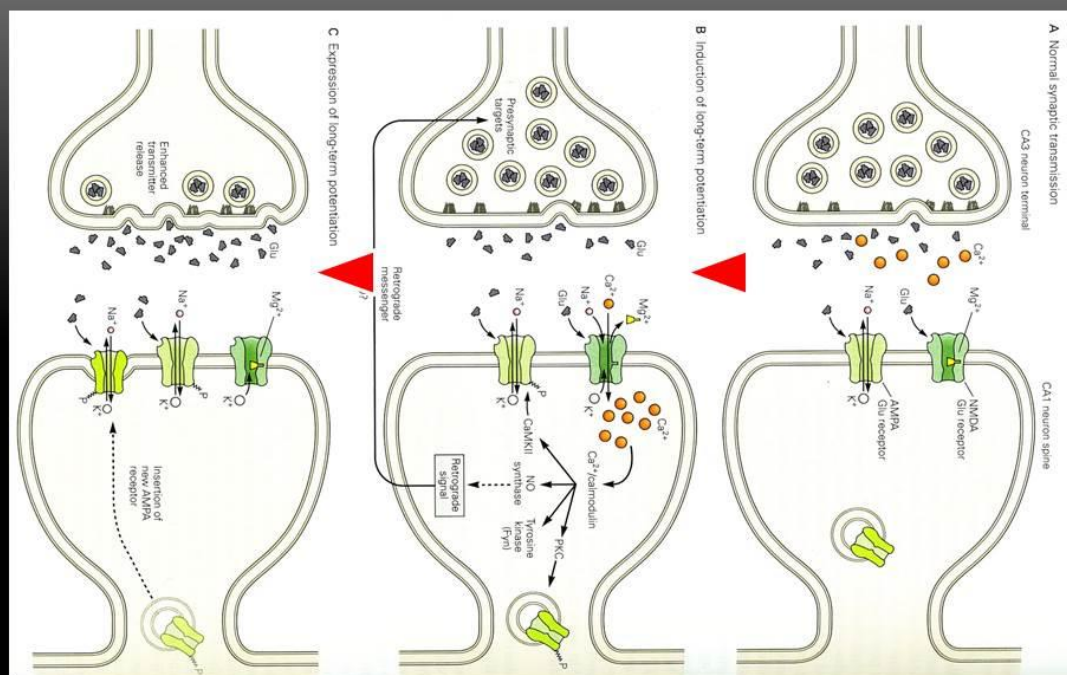
実際には、何が起きているのでしょうか。先程、示したように、シナプス前細胞からグルタミン酸が放出されると、シナプス後細胞の AMPA 受容体が活性化します。これによって、細胞内に陽イオンが流れ込み、シナプス後細胞は脱分極していきます。シナプス前細胞からの放出が高頻度に生じると、シナプス後細胞は十分に脱分極していき、NMDA 受容体の Mg^{2+} ブロックが外れていきます。すると、NMDA 受容体を介して、シナプス後細胞内に Ca^{2+} イオンが流入します。この Ca^{2+} イオンが、calmodulin に結合します。 Ca^{2+} と結合した calmodulin は、CamKII という酵素に働いて、これが、AMPA 受容体をリン酸化すると考えられています。これによって、AMPA 受容体の特性が変化して、同じ、グルタミン酸放出に対しても、より長く開くようになり、シナプス後細胞内への陽イオン流入が増えると考えられます。

また、細胞内に流入した Ca^{2+} と結合した calmodulin は、PKC という酵素にも働いて、これが、シ

ナプス後細胞内に控えていた AMPA 受容体を、細胞膜上まで誘導する働きがあると考えられます。LTP の後期相では、このように AMPA 受容体が挿入され、シナプス後膜での AMPA 受容体の数が増えるということで、シナプス伝達効率が上昇するのだと考えられています。

記憶や学習といった脳機能は、シナプスといったミクロの空間でのちょっとした変化が支えているということになります。

● シナプス長期可塑性



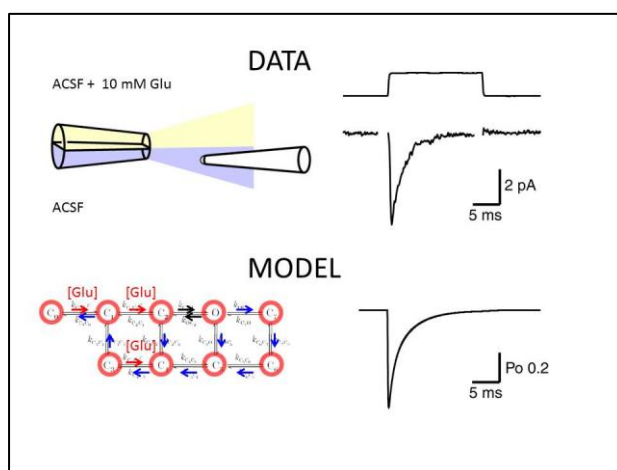
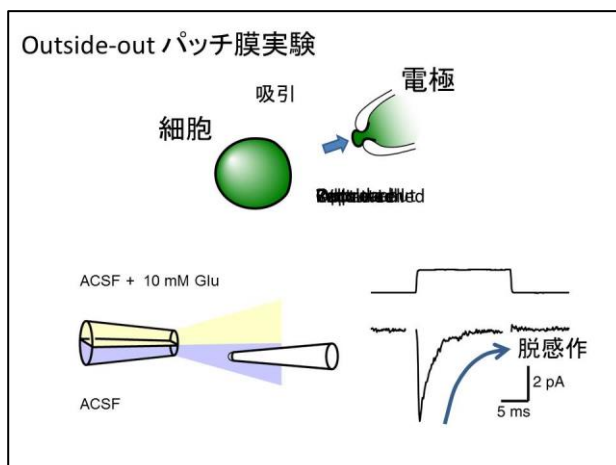
(質問8)

伝達物質受容体の応答特定を計測する手法として、outside-out パッチ膜実験というものがあります。この手法について解説してください。

神経細胞に発現している受容体の性能を調べるには、細胞膜を一部だけ切り剥がしてくる手法、通称、outside-out パッチ膜実験を行います。

どのようにやるかというと、細胞にガラス電極を近づけて行って、適切なタイミングで吸引を行い、電極を後退させると、細胞膜の一部を切り取ってくることができます。切り剥がしてきた細胞膜は、電極の先端についているのですが、この膜上に AMPA 受容体がたまたまついてきてくれていると、この膜に対して、グルタミン酸を投与することで、AMPA 受容体のグルタミン酸応答を測定すること

ができます。グルタミン酸の投与には、シータ管を使います。シータ管とは、ひとつのガラス管が二つの区画に分かれているもので、片方にコントロール溶液、もう片方にグルタミン酸を含んだ溶液を流します。このシータ管の位置をピエゾ素子を使って高速に動かすことで、グルタミン酸を瞬時に投与することができます。AMPA 受容体は、グルタミン酸が投与されてからミリ秒単位で応答し、脱感作もしちゃうので、ミリ秒以内に溶液交換ができるシステムでないと、この受容体の性質を完全に把握することができないわけです。この場合は、グルタミン酸は 10 ms 以上、定常的に高い状態なのですが、グルタミン酸応答はすぐに小さくなってしまいます。このように応答がなくなってしまう現象を「脱感作」と呼びます。

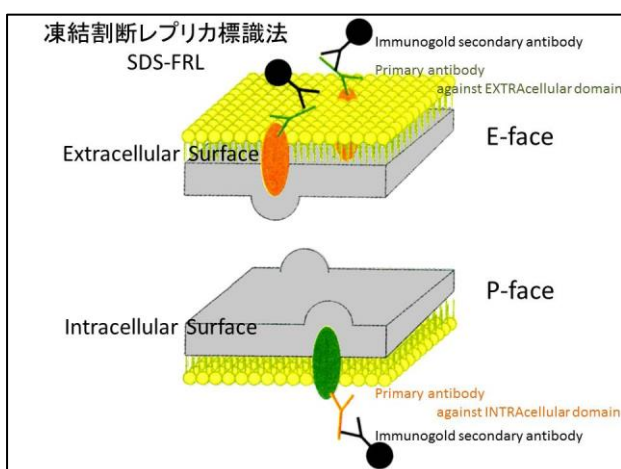
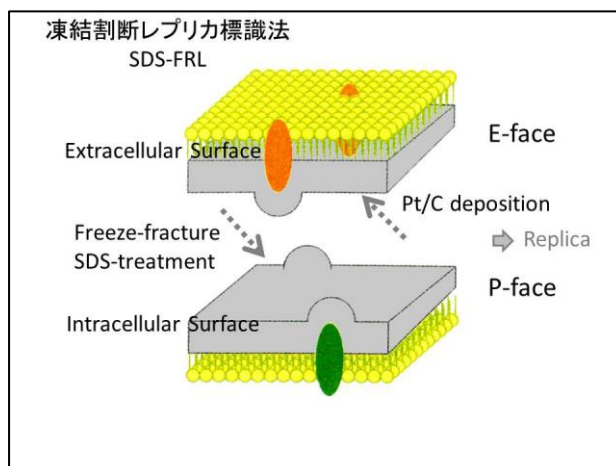
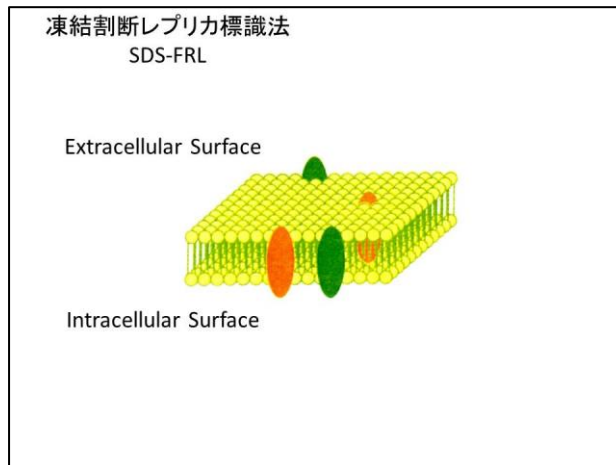


このような方法で、様々な濃度のグルタミン酸を投与したり、グルタミン酸の投与時間を変えたりして、この膜に発現している AMPA 受容体の応答特性を詳しく調べていきます。続いて、AMPA 受容体の応答特性モデルを作製します。いったい、いくつのグルタミン酸分子が結合して、受容体チャネルが開くのか、どの時点で、脱感作という状態になって、チャネルは閉じてしまうのか、等を詳細に検討すれば、実際の

データが再現できるような反応モデルを作製することができます。

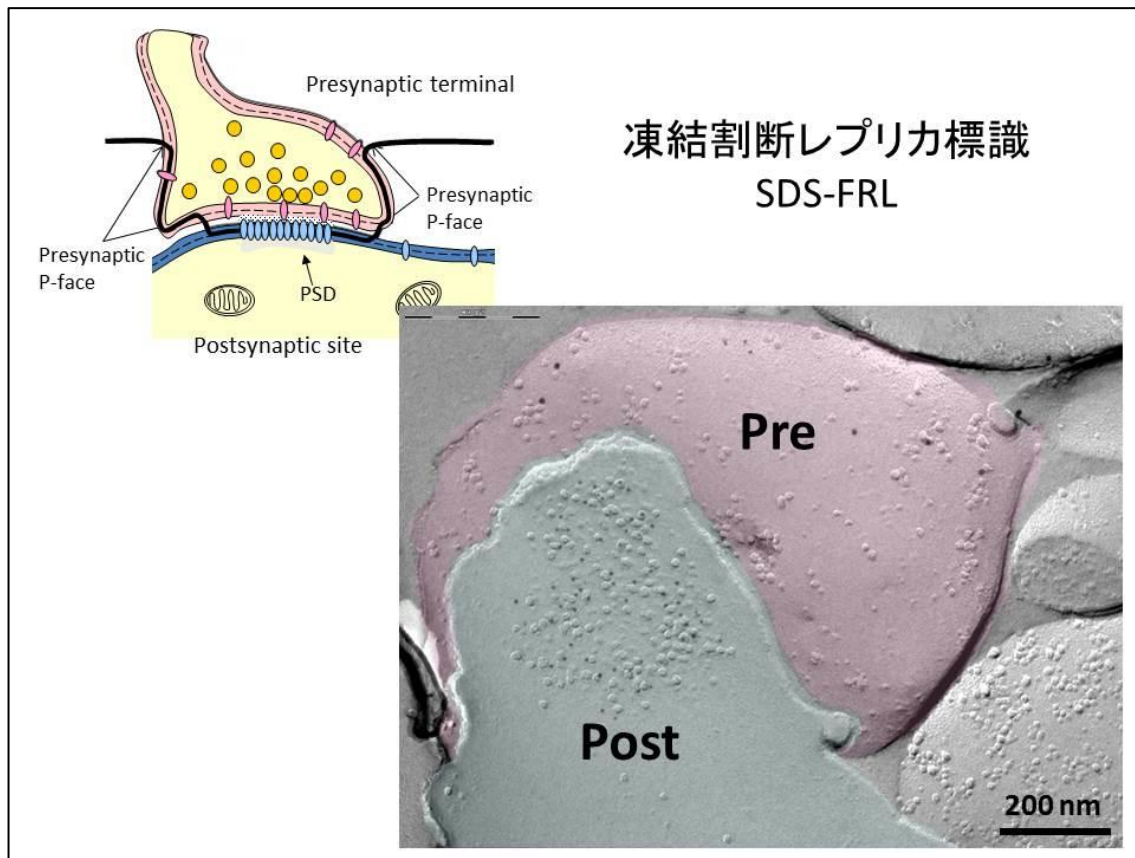
(質問9)

凍結割断レプリカ標識法を説明してください。この手法でどういったことが分かるかも挙げてください。



細胞は細胞膜で覆われており、細胞膜は脂質、つまり脂でできた二重の層でできています。脂質二重層を貫通するような膜タンパク質が受容体の正体です。急速に凍結した脳組織標本を割断すると、脂質二重層のちょうど真ん中で割れることが多いです。この箇所が物理的に最も弱い箇所であるからだとされています。脂質二重層に埋まっていた膜タンパク質は、脂質二重層が割れる際に、細胞外に面した膜と一緒に連れて行かれる場合と、細胞内に面した膜と一緒に連れて行かれる場合があります。どちらに連れて行かれるのかは、膜タンパク質の種類によって異なると考えられています。プラチナとカーボンに脂質二重層の内側に向けて薄く吹きかけることで、膜のレプリカを作製します。細胞膜以外を構成する余分な組織は、SDS という界面活性剤によって洗い流します。続いて、それぞれの膜タンパク質に対して特異的に結合する一次抗体をかけ、さらに金粒子を付着させた二次抗体をかけます。金粒子の場所は電子顕微鏡で見分けることができるので、標的とする膜タンパク質の位置や分布を明らかにすることができます。

シナプスにおける凍結割断レプリカ標本は、このように見えます。ピンクがシナプス前構造、水色がシナプス後部構造です。この標本では AMPA 受容体に対する抗体を用いて、金粒子標識してあるので、

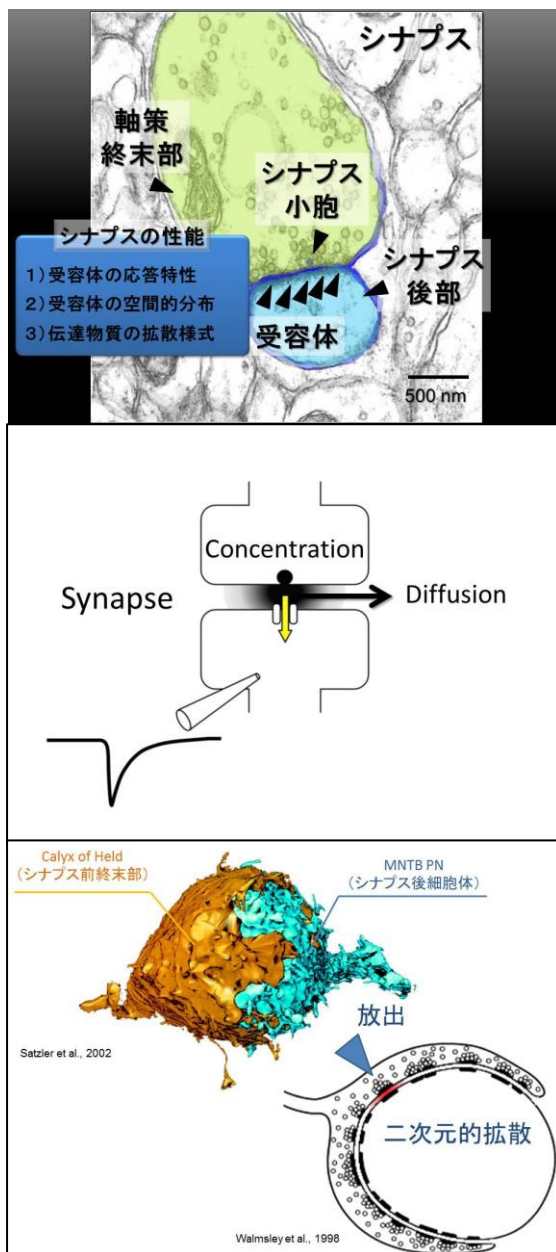


AMPA 受容体の位置は黒い小さな点として観察することができます。このようにして、どのような性能の受容体がどのように細胞膜上で二次元的に配置されているのかが分かります。

(質問10)

シナプス間隙や細胞外空間において、伝達物質グルタミン酸がどのくらいの濃度になって、どのくらいの速さで薄まって消えていくのかを推定するのは困難です。これは、シナプス小胞内に詰まっているグルタミン酸分子の数(N)が分からないことと、細胞間隙におけるグルタミン酸分子の拡散係数(D)が不明だからです。水における拡散とは異なり、細胞間隙では拡散が遅くなっていると予想されるのですが、どの程度、遅くなっているのかが分かりません。上記2つのパラメーターを求めるために、どういった実験が考えられるのか。授業で紹介した内容を詳述してください。

シナプスの信号伝達性能を調べるには、どのような性能の受容体が、どのように配置されているのかを調べる必要があります。これには、outside-out パッチ膜実験や、凍結割断レプリカ標識法などが活用できます。加えて、シナプス間隙を含む細胞外の空間を、グルタミン酸がどのように拡散するのかを知る必要があります。しかし、これを求めることは非常に困難であることが知られていま



二次元的拡散の場合、拡散方程式に対する解が得られています。それぞれのパラメーターは、こちらの通りですが、このうち、放出されるシナプス小胞内の伝達物質分子の数、 N 、と細胞間隙での伝達物質の拡散係数、 D 、の二つのパラメーターが分からないわけですが、とにかく状況は単純なわけです。

Calyx of Held シナプスの凍結切断レプリカ標識像は、このように見えます。まず、シナプス前細胞の細胞質を横切るようにして、割れた箇

す。

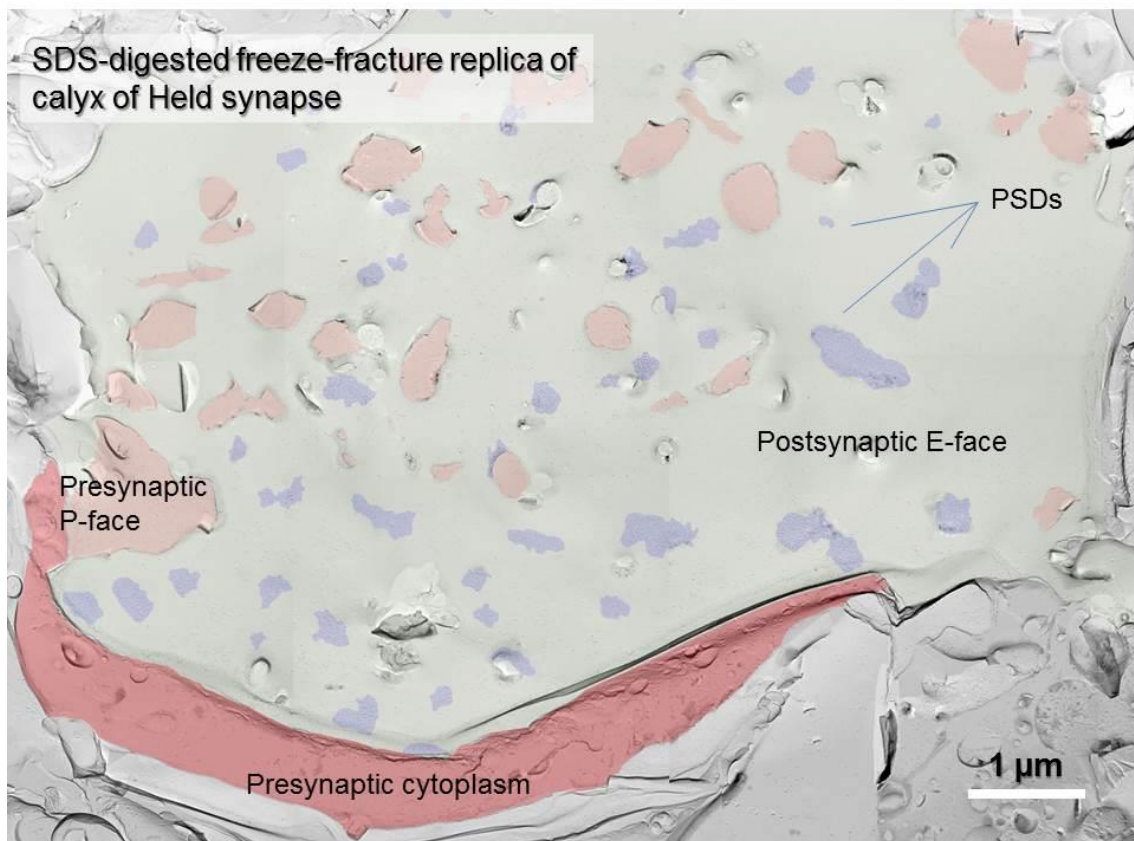
なぜ、細胞間隙におけるグルタミン酸の拡散が分からないのか。それは、まず、シナプス小胞にどれだけのグルタミン酸分子が詰まっているのかが分からないのと、細胞間隙でのグルタミン酸分子の拡散係数が分からないからです。いろいろな間接的な証拠から、細胞外の空間は、ただの水とは異なることが分かっています。ただの水だったら、グルタミン酸分子がどのくらいのスピードで拡散するのかが実測できます。ただの水ではなく、なぜか、拡散が遅くなる作用がある空間なのです。どのくらい遅いのが実測できない。この二つのパラメーターをどうにかして求めることはできないでしょうか。

脳内の多くのシナプスでは、伝達物質はシナプス間隙に放出された後、複雑な拡散経路をたどります。拡散経路の複雑さの度合いでも、グルタミン酸の薄まるスピードが影響されてしまうので、これでは、不確定なパラメーターがひとつ増えてしまうのです。そこで、まずは単純な形態のシナプスに注目しました。聴覚伝導路の Calyx of Held シナプスでは、シナプス前細胞の軸索終末部がカップ状に、シナプス後細胞の細胞体を取り囲んでおり、放出された伝達物質は、細胞間隙に沿って、二次元的にしか拡散できません。

二次元的拡散方程式に対する解

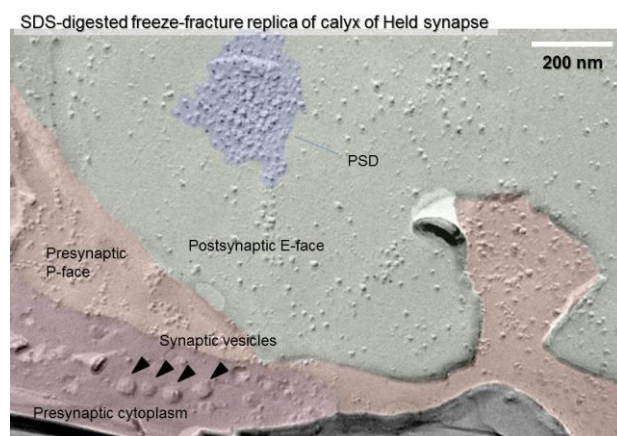
$$C(r, t) = \frac{N}{4\pi htD} e^{-r^2/4tD}$$

r 放出からの距離
 t 放出からの時間
 h 細胞間隙の幅 (20 nm)
 N 小胞内の伝達物質分子の数
 D 伝達物質の拡散係数



所があり、こういった割れ方をする箇所を **cross fracture** と呼びます。シナプス前細胞の細胞膜のうち、細胞質に面した内側の膜のことを **P-face** と呼びますが、ここに **P-face** が見えています。シナプス前細胞に対して、反対側に接している、シナプス後細胞の膜も見えます。この膜は、シナプス後細胞の細胞膜のうち、外側に面したほうの膜であり、これを **E-face** と呼びます。このシナプス後細胞膜の青で示した領域が、いわゆる **postsynaptic density**、略して **PSD** になります。ここが、シナプスの形成される箇所であり、ここに **AMPA** 受容体が高密度に集積しています。このように、**calyx of Held** シナプスにおいては、ひとつの軸索終末部とひとつの細胞体の間に、たくさんのシナプスが形成されているということが分かります。

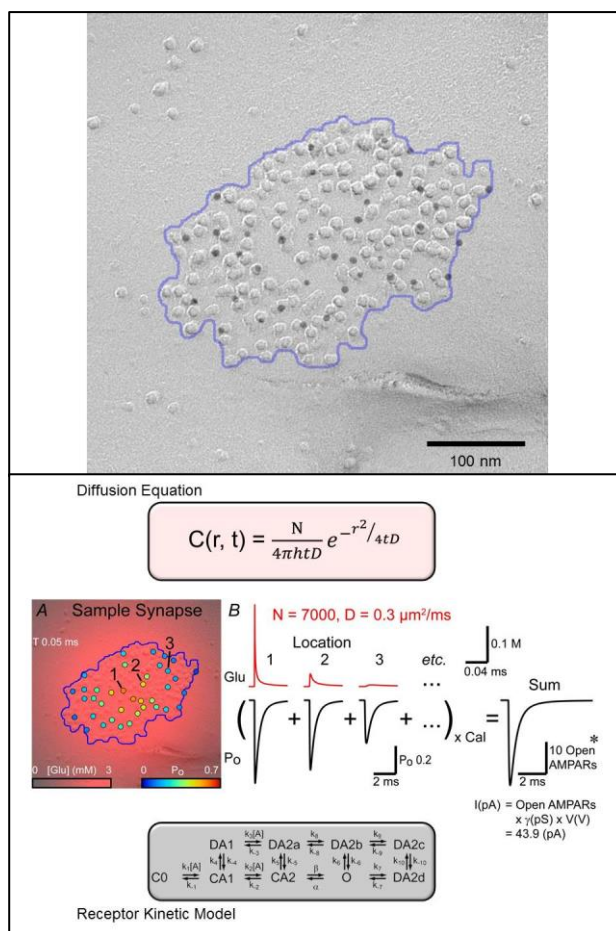
このようなレプリカの拡大像を示します。シナプス前細胞の細胞質を横切る **cross-fracture** が見え、矢印の位置に見えるのが、細胞質の中にあるシナプス小胞です。シナプス前細胞の細胞膜が見え、それに対するシナプス後細胞の細胞膜が見えます。シナプス後細胞の細胞膜には、形態学的に特徴のある領域があって、この領域こそが、シナプス部位であると考えられています。さらに、このシナプス部位のところ



だけを拡大します。黒く点々に見えているのが、AMPA 受容体に対する金抗体標識です。

さて、こういった神経と神経の間の接合部のあちこちでシナプス小胞の放出があると考えられます。シナプス後部の受容体の位置は測定できるので、このシナプスで放出が起こったと仮定します。そのとき、このシナプスで期待されるシナプス応答のシミュレーションをやってみました。

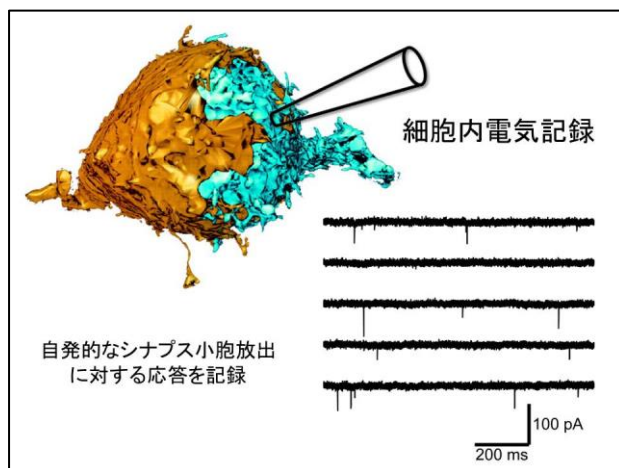
シミュレーションは、具体的には、このようにしてやりました。まず、シナプスの中心でグルタミン酸の放出があると仮定します。グルタミン酸は、拡散方程式に従って広がります。この式のうち、グルタミン酸分子の数 N と拡散係数 D が求まっていません。これを仮に $N = 7000$, $D = 0.3 \mu\text{m}^2/\text{ms}$ と仮定します。そうすると、個々の AMPA 受容体の位置でのグルタミン酸濃度変化を計算することができます。Outside-out パッチ



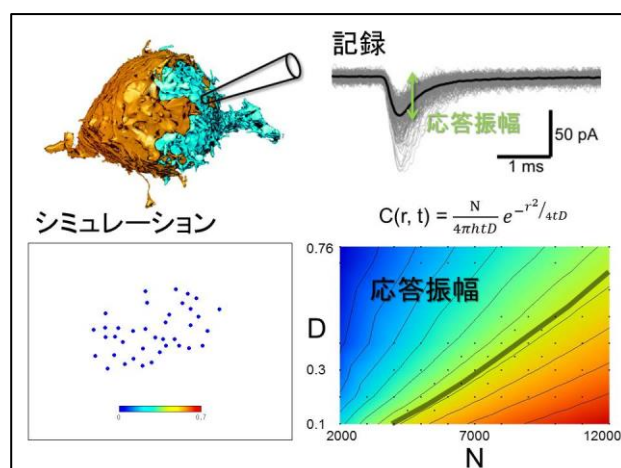
膜実験で、受容体応答特性の数値モデルを作ることができます。これを適用すれば、どのようなグルタミン酸濃度変化に対して、どのように受容体が応答するのかをシミュレーションすることができます。それぞれの受容体の応答をシミュレーションしてみました。全ての受容体でのシミュレーションを行い、これらの値を加算していくと、このシナプスでの応答を再現することができます。

問題は、 N と D の値が求まっていないことです。 $N = 7000$, $D = 0.3$ として、拡散が起こるとすると、個々の受容体の応答はこのように推移すると考えられます。一方、例えば、 N を二倍にすると、応答の大きさも大きくなると予想されます。実際の N と D の組み合わせはいくつなので

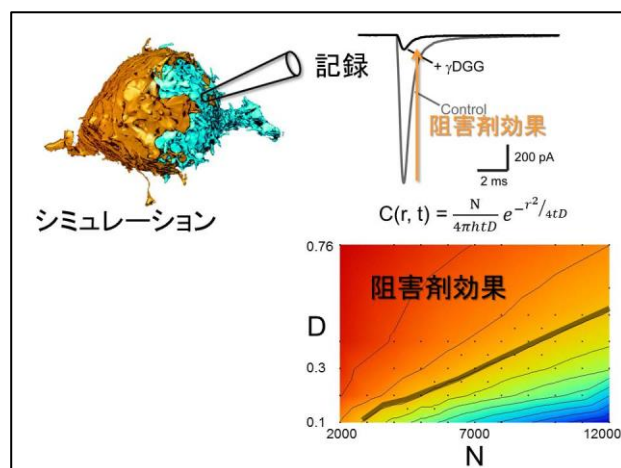
でしょうか。これを求めるため、実際のシナプス応答を再現できるような、 N と D の組み合わせを探していくという手順になります。



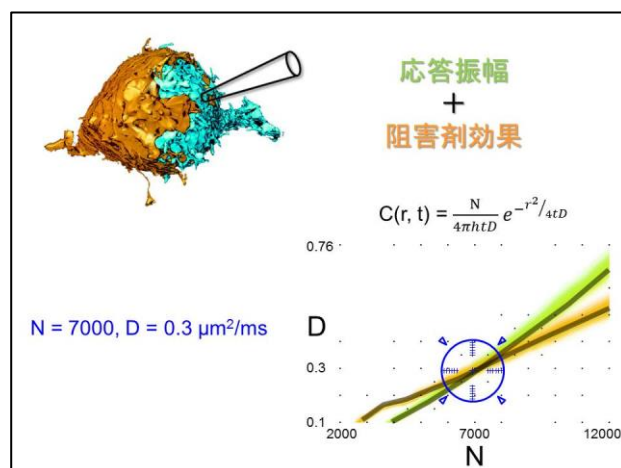
実際に生きているシナプス後細胞から記録をしました。シナプス前細胞からは、自発的に一つ一つのシナプス小胞の放出が起こるのですが、これに対する電気的な応答を記録しました。個々のシナプス小胞放出に対する応答を揃えて、平均応答振幅を計測しました。続いて、シミュレーションによって、予想される応答振幅を計算しました。これを様々な N , D の組み合わせで計算し、予想される応答振幅を疑似カラー表示しました。実験的に記録される応答振幅を再現する、 N , D の組み合わせは一つには定まらず、この灰色の線上の組み合わせなら、どれでも実験結果を再現できてしまうことが明らかになりました。



そこで、続いて、再びシナプス応答を実際に記録し、受容体に対する競合的阻害剤の効果を調べました。競合的阻害剤とは、基本的に、伝達物質濃度が高ければ高いほど、阻害効果が小さくなる性質を持つ薬物です。同様にシミュレーションを繰り返したところ、実験的に記録される阻害効果を再現するには、灰色の線上の N , D の組み合わせが必要であることが分かりました。

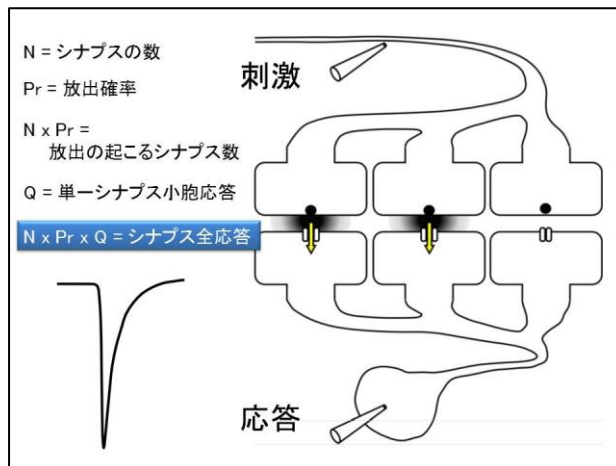


実験的に記録された応答振幅および阻害剤の効果を、ともにシミュレーションで再現するには、 $N = 7000$, $D = 0.3$ の組み合わせが必要であることが求まりました。これで、細胞間隙における伝達物質濃度の推移を、初めて定量的に評価することができたわけです。



(質問11)

シナプス応答は、 $N \times Pr \times Q$ の式で表現できます。これらのパラメーターの意味を解説してください。また、シナプス伝達における確率的挙動が二項分布で表現できると仮定した場合、シナプス応答の平均は、 $N \times Pr \times Q$ と表現できます。それでは、シナプス応答の分散はどのような式で表現できるでしょうか。また、シナプス伝達における Mean-Variance Analysis を解説してください。どのような実験・解析によって、 N , Pr , Q の値を抽出できるのかを詳述してください。

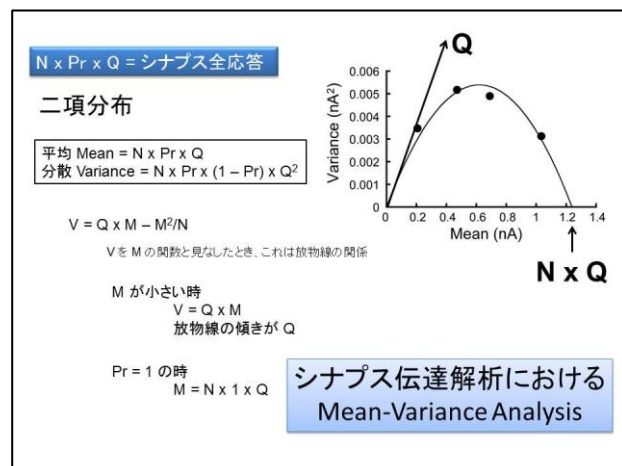


一つの神経細胞ともう一つの神経細胞の間に形成されるシナプスの数は、ひとつとは限らず、複数のシナプスがある場合があります。この数を N とします。また、シナプス前細胞が刺激されたからと言って、必ずしも伝達物質が放出されるとは限りません。ひとつのシナプスにおいて、伝達物質が放出される確率のことを、放出確率 Pr と呼びます。したがって、一つの軸索線維が複数のシナプスを作っている場合、放出が

起こるシナプスの数の期待値は、 $N \times Pr$ になります。たったひとつのシナプス小胞からの放出によって生じる応答の大きさを Q と表現すると、 $N \times Pr \times Q$ という式で、シナプス応答全体を表現することができます。この、 N , Pr , Q の三つのパラメーターを求めることが、シナプス伝達を理解することへの第一歩となります。

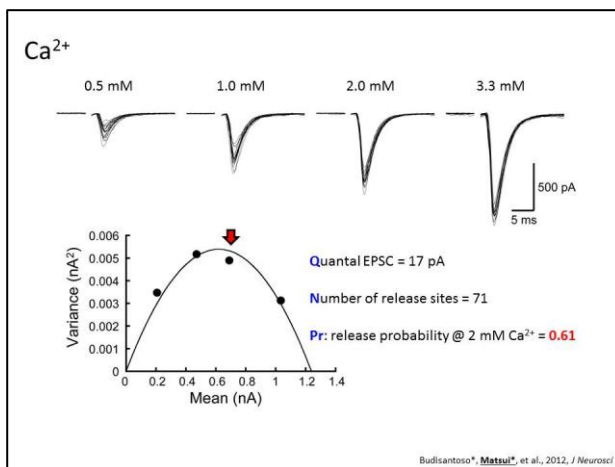
また、シナプスにおける放出の過程は、それぞれ独立であるとみなすと、二項分布の関係が成立するはずで、二項分布とは、コインをいくつか投げた時に、表になる枚数の挙動を表した統計用語です。二項分布の場合は、平均と分散が計算できます。シナプスのパラメーターに合わせて表現すると、このような数式になります。平均と分散の間の関係を、数式で表現すると、このようになります。これで、分散 V を平均 M の関数と考えると、ここに二乗の項があるわけですから、放物線の関係と考えることができます。これをグラフにするとこのようになります。平均に対して、分散をプロットすると放物線になるわけです。

この式を細かく見ていくと、 M が十分に小さいときは、 M^2 の項が消えていくわけですから、 $V = Q$



× M と近似できます。つまり、この放物線の初期の傾きが Q になるわけです。続いて、 $Pr = 1$ の状況を考えてみますと、平均 $M = N \times Q$ 、分散 $V = 0$ になります。つまり、放物線の X 切片をみれば、 $N \times Q$ の値が分かるというわけです。 Q は求まっているわけですが、これで N が求まります。 N と Q が求まっているわけですから、これで、シナプス応答の平均値が求まれば、その時の Pr も求まることになります。こういった解析のことを、シナプス伝達における **Mean-Variance Analysis** と呼びます。

実際の視神経線維と外側膝状体中継細胞との間のシナプス伝達記録から、平均と分散を求めて、プロットしたものがこちらになります。放物線をフィットすることで、シナプス応答を定める3つのパラメーター、 N , Pr , Q を全て求めることができます。この図の例では、ひとつのシナプス小胞放出による応答は、17 pA と推定されました。ちなみに、 Sr^{2+} を使って、非同期的にシナプス小胞の放出を起こすことで、素量応答を



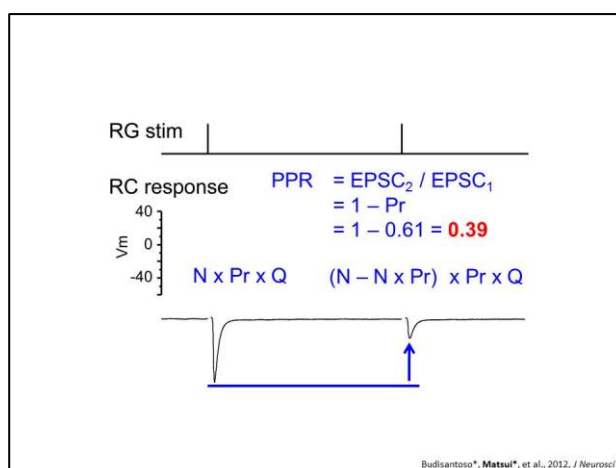
直接計測することもできます。その場合も 10-20 pA 程度の素量応答が記録され、今回の統計的手法での値とほぼ一致することが分かりました。また、シナプスの総数は、71 個と計算されました。生理的な細胞外液の Ca^{2+} 濃度が 2 mM だと考えれば、この濃度での放出確率は、0.61 と計算されました。この 0.61 という値は非常に高いと言えます。海馬のシナプス、小脳の平行線維シナプス、MNTB の calyx of Held シナプスなどの多くのシナプスでは、放出確率は、0.1 から 0.3 程度であると推定されています。一方、これまで計測された最大の放出確率は、小脳の登上線維シナプスであり、ここでは 0.9 を越えるという報告もありますので、それよりは、小さいということが分かりました。

(質問12)

連続する 2 回のシナプス刺激に対する応答の比を paired pulse ratio (PPR) と呼びます。二発の刺激の間で、シナプス小胞の補充が起こらないと仮定すると、PPR はどのような式で表現できるのでしょうか。 N , Pr , Q を用いて、式を使って解説してください。

視神経線維と外側膝状体中継細胞との間のシナプスにおいて、二発の刺激に対する応答を良く見てみます。一発目の刺激に対する応答は、 $N \times Pr \times Q$ で表現されます。ひとつひとつのシナプスでは、放出の準備が整ったシナプス小胞がひとつずつしかないと仮定します。すると、一発目の刺激で、 $N \times Pr$ 個のシナプス小胞を使ってしまったので、残っているシナプス小胞の数は、 $N - N \times Pr$ 個ということになります。二発目の刺激では、残っているシナプス小胞が Pr の確率で放出されるので、二発目の刺激に対する応答として期待される値は、この式で表現できます。二発の刺激に

対する応答の比を Paired Pulse Ratio、PPRと表現しますが、比を取ると、NおよびQの項が消えるので、PPRは $1 - Pr$ となることが期待されます。Mean-Variance Analysisにより放物線をフィットさせた先ほどの実験より、 $Pr = 0.61$ と求まっているので、PPRは、0.39となることが期待されます。



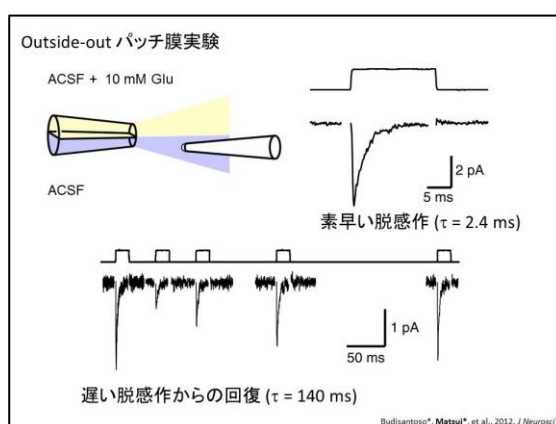
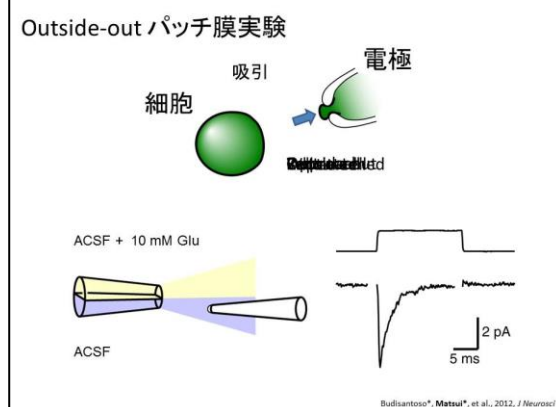
(質問13)

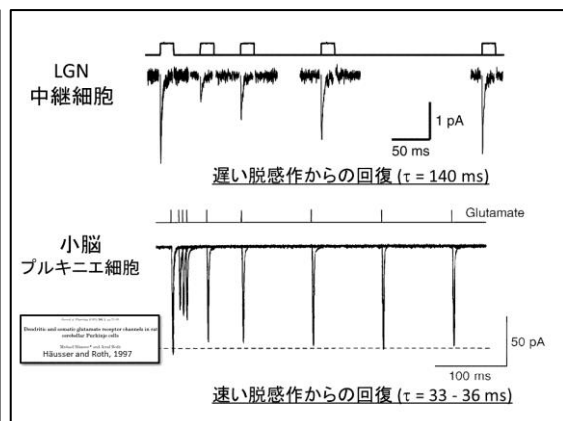
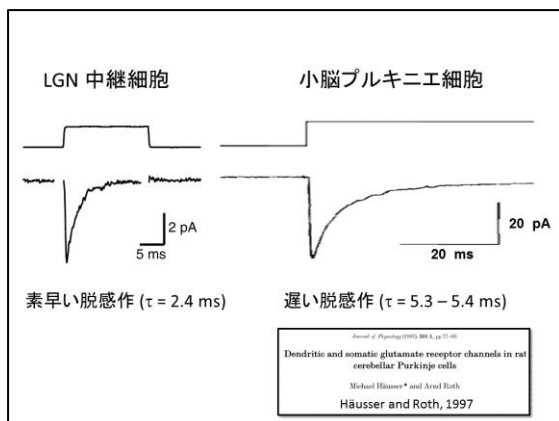
受容体の脱感作とはこういった状態のことを指すのでしょうか。また、脱感作からの回復とはどのような現象を指すのでしょうか。Outside-out パッチ膜実験の図を描き、記録される電流波形を描いて解説してください。

外側膝状体中継細胞に発現している AMPA 受容体の性質を調べる実験を例に挙げます。細胞の細胞膜を一部だけ切り剥がしてくる手法を outside-out パッチ膜実験と呼びますが、これを行います。上の波形がグルタミン酸の投与時間を示しており、下の波形は、AMPA 受容体の活性化のタイムコースを示しています。AMPA 受容体は素早く活性化されましたが、わずか 2.4 ms の時定数で、脱感作してしまいました。グルタミン酸自体は、十数 ms の間、ずっと同じ濃度で投与され続けているにもかかわらず、応答は最初だけで、すぐに応答がなくなっているのが分かります。

続いて、このようなグルタミン酸を2度、様々な間隔で投与しました。これによって、脱感作からの回復過程が計測できます。脱感作からの回復は、驚くほど遅く、時定数にして 140 ms ほどかかることが分かりました。

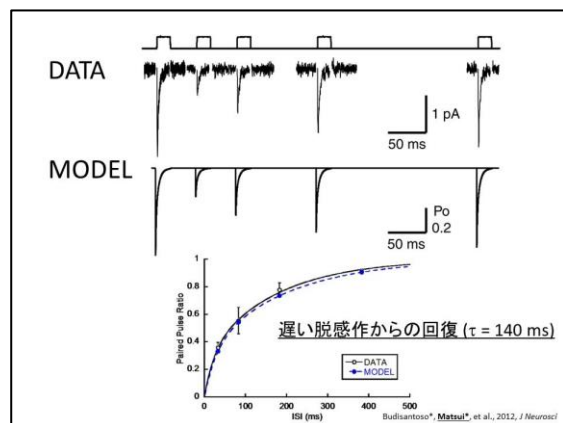
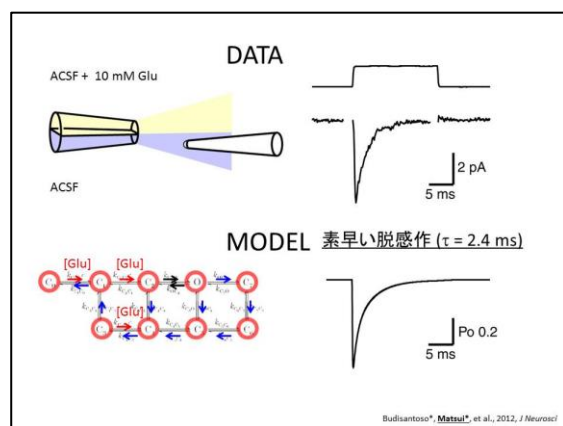
他の神経細胞、例えば小脳プルキニエ細胞に発現している AMPA 受容体と比較すると差は歴





然です。まず脱感作する過程は、プルキニエ細胞の AMPA 受容体のほうがはるかに遅いです。また、脱感作からの回復過程ですが、プルキニエ細胞の AMPA 受容体の場合、ほんの 30 ms 程度で、グルタミン酸応答が元のレベルまで回復します。

このようにして受容体の応答特性を様々に測定できるわけですが、これらのデータをもとに、外側膝状体中継細胞の AMPA 受容体の状態を化学反応の組み合わせで表現した Markov 型動態モデルを作製しました。パラメーターを調整することで、記録された AMPA 受容体応答を完全に再現できるようにしました。また、このモデルを使って、脱感作からの回復過程も完全に再現することができました。実験的には、矩形波状の伝達物質濃度変化しか与えることができませんが、この動態モデルが手に入れば、いかなる濃度変化に対しても、受容体の応答を予測することができるようになります。

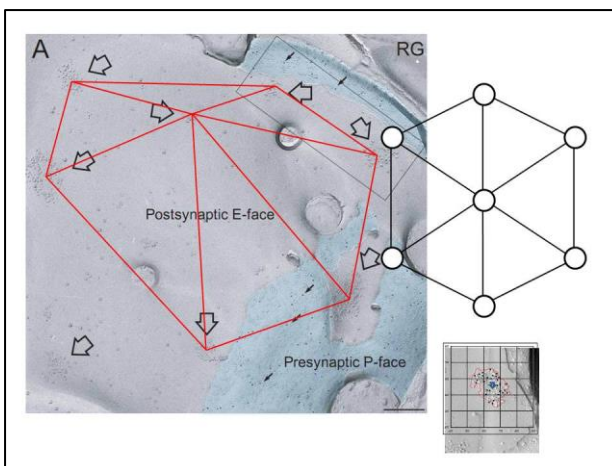


(質問14)

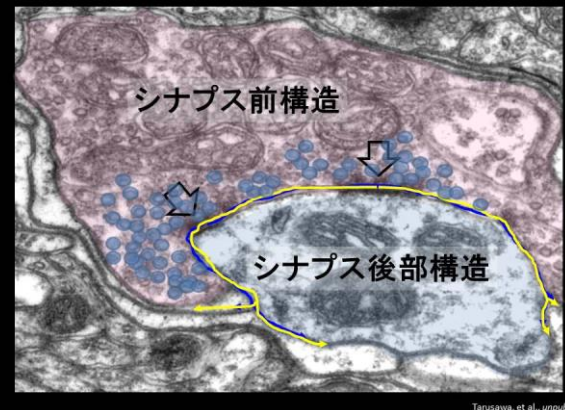
ひとつのシナプス間隙から伝達物質が溢れ出る現象、いわゆるスピルオーバー（漏出）現象に関して、解説してください。スピルオーバーが生じて、近接するシナプスまで伝達物質が届くと、何が起きるのかを考えてください。また、スピルオーバーが起きると、シナプス伝達特性がどのような影響を受けるのかを考察してください。

こちらは、視神経線維と中継細胞の間のシナプスを電子顕微鏡で観察した像です。超薄切片像なので、細胞の断面が見えています。視神経線維のシナプス前構造をピンク色、中継細胞のシナプス後部構造を水色で表示します。伝達物質グルタミン酸の詰まったシナプス小胞は小さい丸丸の構造として観察され、これらのシナプス小胞は、電子密度の高い、矢印のような位置で放出されることが知られています。矢印の箇所を「シナプス」と定義すると、ここに見えているシナプス前構造とシナプス後部構造の間には、少なくとも二つのシナプスが存在することになります。ひとつのシナプスから伝達物質グルタミン酸が放出されると、もう一つのシナプスまで、グルタミン酸が溢れ出ることが容易に想像できます。

多くの中枢神経細胞間のシナプスは、このような構造をしていません。シナプスひとつひとつがグリア細胞によって覆われており、シナプス毎に流れる信号が混線しないような工夫が施されています。グリア細胞には、放出された伝達物質を取り込むトランスポーターが発現しており、シナプスから溢れ出た伝達物質を貪欲に取り込むので、隣のシナプスまで、伝達物質が溢れ出ことは稀



視神経線維と中継細胞間のマルチ・シナプス・コンタクト

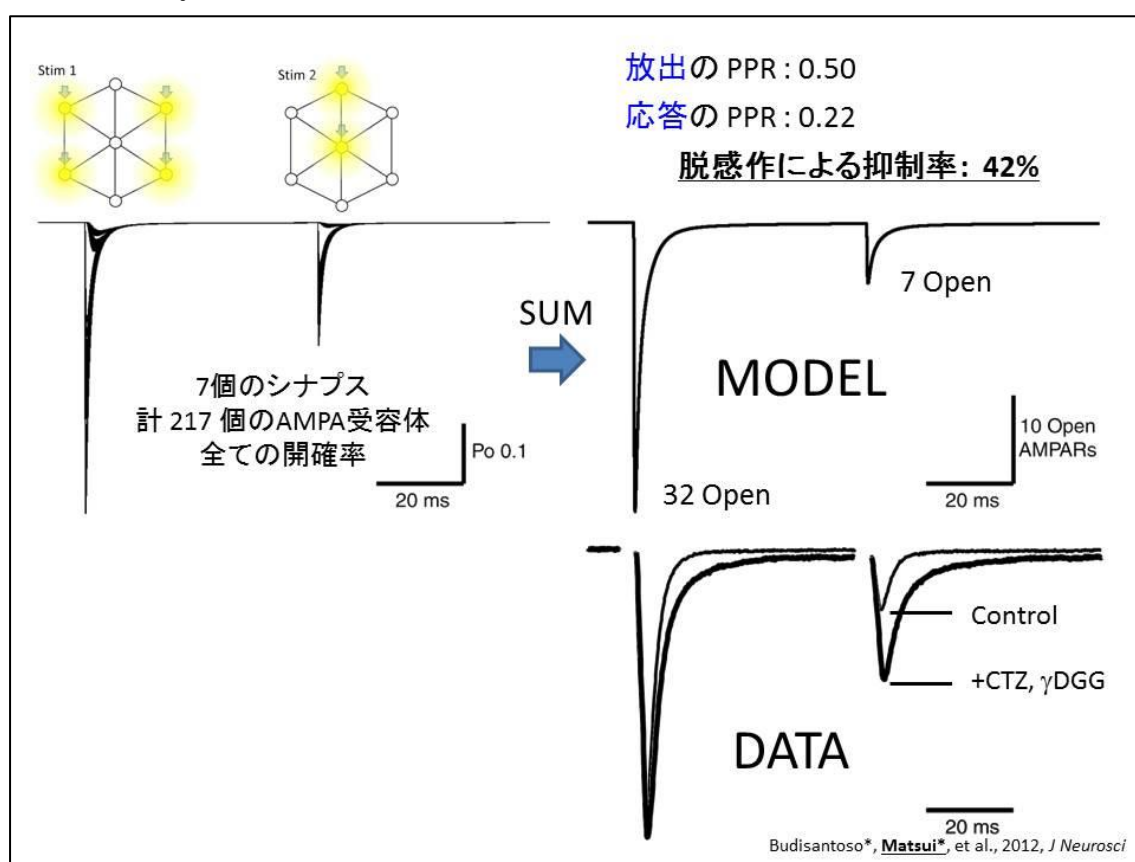


です。それに対して、このようにふたつの細胞が接触する箇所に、複数のシナプスが並んでいる形状は、他の脳部位ではあまり見られず、この構造のことをマルチ・シナプス・コンタクトと名付けました。

さて、上述した例では、ひとつのシナプスでの応答をシミュレーションしました。外側膝状体・中継細胞の凍結切断レプリカ像を低倍で撮影すると、いくつものシナプスが近傍に存在することが分かります。シ

ナプスの位置は矢印で示してあります。それぞれのシナプスの間の間隔は1ミクロン以内であることが分かり、このようにシナプスが所せましと並んでいる様は、連続超薄切片の三次元再構築像から得られた知見と一致しました。これらのシナプスで、それぞれに放出が起きた場合、どのようなシナプス応答が生じるのか。また、シナプスから溢れ出たグルタミン酸によって、近傍のシナプスの AMPA 受容体がどのように影響を受けるのか。このようなマルチ・シナプス・コンタクトでのシミュレーションを行うことにしました。

まずは、先ほどと同様に、ひとつのシナプスでの AMPA 受容体の配置を調べました。このシナプスで放出が起こる場合、シナプスの中央で起こると仮定しました。続いて、7つのシナプスの配置を考慮に入れました。簡略化のため、図のように 1 ミクロン間隔でシナプスを並べた状態をシミュレーションしました。



さて、先ほど紹介したように、シナプス応答の平均と分散に対して放物線をフィットさせた実験から、個々のシナプスでの放出確率は、およそ 0.5 – 0.6 であると推定されました。そこで、一発目の刺激では、7個あるシナプスのうち4か所で放出が起こると仮定しました。いったん放出が起こると、放出の準備が整った小胞の数が減ってしまうことが予想されることも、これまでの実験で紹介しました。シナプス後細胞の AMPA 受容体の脱感作を阻害した条件で実験をやった場合、二発目の刺激では、一発目での刺激に対して、応答は半分に減ることが分かっています。したがって、このシミュレーションでは、二発目では一発目での放出より、半分の2個のシナプス小胞が放出されと考えました。

これまでは、ひとつひとつのシナプスで発生する応答のみを抽出してきましたが、想定した7個のシナプスに配置された217個全部のAMPA受容体の応答をシミュレーションしました。この細胞の応答は、これらの受容体応答全ての総和になります。このモデルでは、一発目の刺激では、32個のAMPA受容体が開き、二発目の刺激では、7個のAMPA受容体が開くことが推定されました。シナプス前細胞からのシナプス小胞の放出は、1発目で4個、2発目で2個です。したがって、放出のpaired pulse ratioは、0.5です。一方、シナプス応答のほうは、一発目で32個で、二発目で7個のAMPA受容体が開いたので、応答のpaired pulse ratioは、0.22です。したがって、放出された量に比べて応答のほうは42%も小さく、これはAMPA受容体の脱感作によるものであることが分かりました。

これはシミュレーションモデルでの計算結果ですが、実際のシナプス応答と再び比較してみましょう。一発目のシナプス応答と比べて、二発目のシナプス応答は非常に強く抑制されています。しかし、AMPA受容体の脱感作を阻害する薬を投与すると、二発目の抑制が緩和され、実際の放出量を反映した応答を示すようになりました。

以上の実験およびシミュレーションより、多数のシナプスが1ミクロン程度の間隔で並んでおり、それぞれから放出が起こる確率が高い状態だと、シナプスの間で伝達物質グルタミン酸の漏出が起こり、漏出によってAMPA受容体が強く脱感作されることが明らかになりました。このようなメカニズムによって、視神経線維を伝わってくる信号が、外側膝状体・中継細胞へ入力する段階で、フィルタリングされることが明らかになりました。

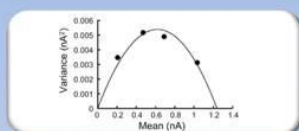
(質問15)

授業では、網膜から外側膝状体へのグルタミン酸作動性シナプスに関して、詳細に解説しました。このシナプスでは、網膜から立て続けに伝わる信号を、ばつさりと切り落とすための仕組みがいくつも用意されていて、信号伝達特性としては、主に、ローパスフィルターの性質を持っています。このシナプスにおいて、信号の高周波成分を切り落とすための仕組みを解説してください。

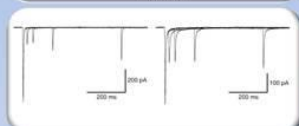
視神経線維と中継細胞の間のシナプス伝達に関して、シナプス入力の大さきの平均・分散を解析した結果、このシナプスではシナプス小胞の放出確率が高いことが分かり、高い放出確率によって、シナプス小胞が枯渇しやすいことが分かりました。また、脱感作阻害剤を利用する実験を通して、このシナプスでは、一発目の刺激によって、AMPA受容体は脱感作され、二発目の刺激に対する応答が抑制されるということが分かりました。続いて、外側膝状体・中継細胞から引きはがしてきたパッチ膜を使った実験を通して、この細胞に発現しているAMPA受容体は脱感作しやすく、脱感作からの回復が遅いことが分かりました。また、電子顕微鏡を用いた解析より、一本の視神経線維と中継細胞の樹状突起の接する箇所には、複数のシナプスが1ミクロン単位で並ぶ、マルチ・シナプス・コンタクトを形成していることが分かりました。このように複数のシナプス間で生じるグルタミ

ン酸の漏出によって、AMPA 受容体の脱感作が進むことがシミュレーションより示唆されました。

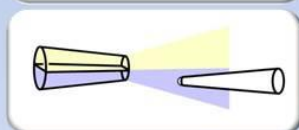
視覚伝導路における信号フィルタリングのメカニズム



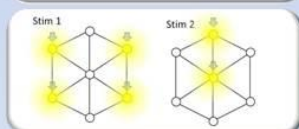
高い放出確率によって、シナプス小胞が枯渇する。



AMPA 受容体の脱感作によって、シナプス抑制が進む。



LGN中継細胞のAMPA受容体は脱感作からの回復が遅い。

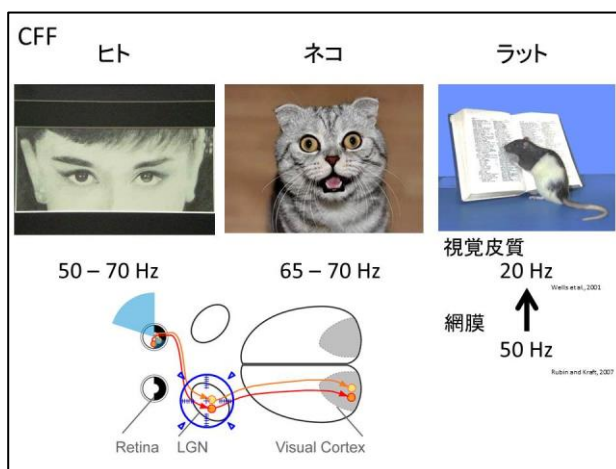


シナプス間のグルタミン漏出によって脱感作が進む。

ラットの視覚野皮質での Critical Flicker Frequency は極端に低いのですが、網膜ではそれほど低くありません。したがって、網膜から視覚野皮質に至る経路のどこかで、強力な信号フィルタリングがかかっていることが予想されたので、視神経線維から外側膝状体へのシナプス伝達を調べました。その結果、このシナプスでのフィルタリングを支配する様々なメカニズムを発見することができ、わずかに数ミクロン程度の微細な構造や分子の配置が、究極的には視覚の性質を支配しているということが分かりました。

ここで当然、疑問になってくるのが、もっと視覚の性能が良い、ヒトやネコの外側膝状体がどうなっているのかということです。同じような法則があるのか、それとも、もっと高周波数成分まで追いつけるような工夫が施されているのか。また、ラットの場合、なぜ、せっかく網膜で作り出した 50 Hz の応答性能を捨ててしまっているのか。外側膝状体で強力なフィルタリングをすること

で、単純に CFF を測定しているだけでは分からない、何らかのメリットがあるのか。また、本実験結果より、そもそものシナプス入力の変幅に従って、フィルタリングの性質はだいぶ異なることが分か



りました。それでは、シナプスを多く作る視神経線維と少なくしか作らない視神経線維とで、そもそも何が違うのか。網膜神経節細胞にもさまざまな種類が存在しますが、それらの種類の違いと投射シナプス数との間に、何らかの相関はあるのか。これらは未解決の問題であり、今後、追求していきたいテーマであります。

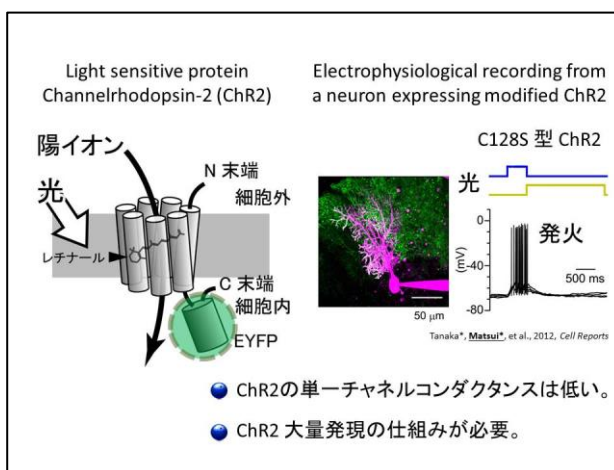
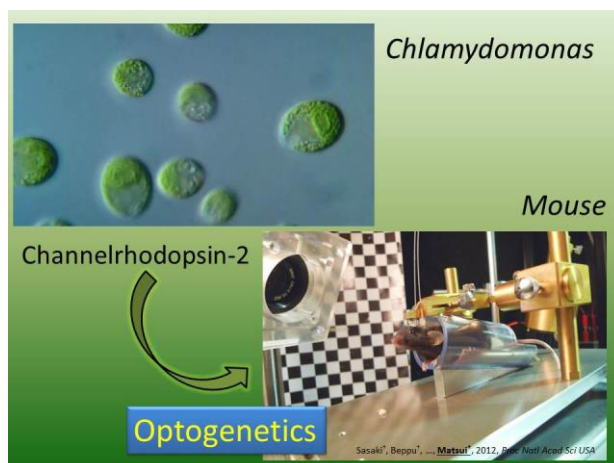
(質問16)

細胞間の信号伝達過程を調べる画期的なツールとして、オプトジェネティクス(光遺伝学)というものが生まれました。このツールはどのようなものであるかを解説してください。

脳内の神経細胞やグリア細胞の間で交わされる信号伝達過程を調べるのに使える、オプトジェネティクスという画期的なツールがあります。オプトジェネティクスは、7～8年ほど前に生まれた技術ですが、これは、光を使って脳細胞の活動を自在に操作する新技術です。世界中の脳科学者がこれに飛びついて、次々と新しい発見をしています。これ自体は、言ってみればただのツールですが、これを使うと脳研究の考え方がこれまでと全く変わるといって過言ではなく、まさにパラダイムシフトと呼ぶべき事態に我々は直面していると言えます。

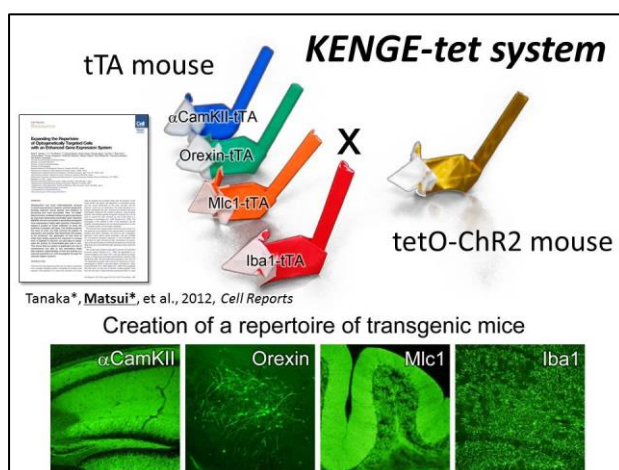
鍵になったのは、クラミドモナスという藻です。この単細胞生物にはチャネルロドプシン2(ChR2)という光感受性分子が発現しています。クラミドモナスには、鞭毛が生えていて、光を感じて、光を避けたり、逆に寄っていったりすることが知られています。この ChR2 を発現する遺伝子を取り出して、マウスなどの動物の細胞に発現させる工夫をしたのがオプトジェネティクスです。

ChR2 は細胞膜に発現するタンパク質で、これに光をあてると、陽イオンを透過するチャンネルが開きます。陽イオンが流れ込むと細胞は脱分極し、この状態を興奮していると表現します。この ChR2 を脳細胞に発現させれば、光を使って、細胞の興奮状態を人工的に制御できるというわけです。こちらの例では、小脳プルキニ



エ細胞に ChR2 を発現させました。この ChR2 には蛍光タンパク質 EYFP を融合させてあります。したがって、ChR2 を発現している細胞は、緑色に見えます。また、記録した細胞には、赤色の色素を注入しました。この細胞に光をあてると、記録電極を介して、この細胞で光に応じて活動電位が発火していることが分かりました。ちなみに、ここでは、野生型の ChR2 をいちアミノ酸だけ、変異させた C128S 型の ChR2 を用いています。この変異体は、光に対する感度が 100 倍以上に上昇しているので、ツールとして非常に使いやすい特徴があります。また、野生型の ChR2 は、青色の光でチャネルが開き、青色を止めればチャネルが閉じる性質があるのですが、この変異体は、野生型にはない特徴が生まれており、このチャネルは青色の光で開き、黄色の光で閉じるという性質を持ちます。

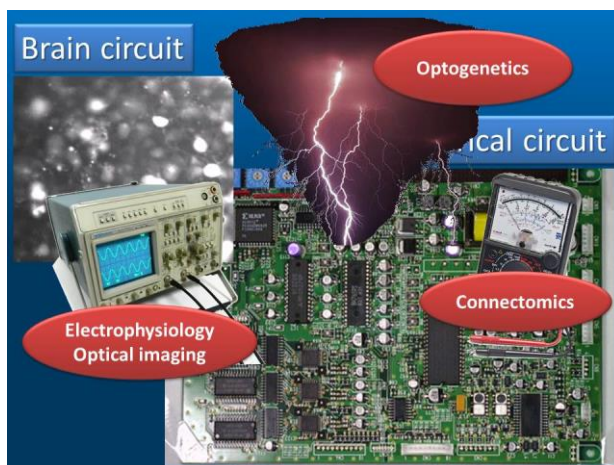
さて、このように、特定の細胞に ChR2 を発現させれば、その細胞の活動だけを制御できます。ただ、ひとつ問題がありました。ChR2 の単一チャネルコンダクタンスは物凄く低く、他のイオンチャネルと比べて、1000 分の 1 程度しかイオンを通す力がありません。細胞活動を制御しうるだけの電流入力を得るには、大量の ChR2 を発現させなければなりません。発現を特定の細胞種に絞って、かつ、大量に発現させる仕組みを開発して、はじめて、この分子がツールとして役立つわけです。



そこで、我々は KENGE-tet system を開発しました。まず、特定の細胞種だけで働くプロモーター下に、テトラサイクリントランスアクティベーター tTA を発現する遺伝子改変マウスを用意しました。tetO プロモーターというのは、tTA が結合して初めて発現を誘導するプロモーターです。そこで、続いて、tetO プロモーター下で、ChR2 を発現する遺伝子改変マウスを用意しました。鍵になったのは、この tetO-ChR2 カセット

をβ-actin サイトの下流にノックインしたことでした。最も簡便に遺伝子操作マウスを作る場合は、DNA のランダムな位置に、外来遺伝子を組み込むことを行います。しかし、ここでは、生来の DNA 配列の特定の箇所を目指して、外来遺伝子を挿入するという手段を使いました。このβ-actin というのは、どの細胞でも良く発現するものなので、tTA は、このサイトにアクセスしやすいのではないかと考えてのことでした。この二種類のマウスのいずれかと掛け合わせることで、2つの遺伝子がそろい、特定の細胞種に ChR2 を発現するという仕組みです。このようにして、いろいろな細胞種の活動を制御できる、遺伝子改変マウスのレパートリーを作製することができました。

脳とはいわば、ジャンクヤードで拾った電子基盤です。当然、取扱説明書はついてきていません。これはいったい何の装置なのでしょう。身元不明の装置を相手にする場合、通常は、まずはテスターを使って、どことどこがつながっているのかを調べることから始めます。これを形態的にやるのか機能的にやるのかに違いはありますが、全配線図を明らかにする試みをコネクトミクスと呼びます。次に、オシロスコープを使って回路を流れる信号を計測します。これが電気生理学や光学イメージ



オプトジェネティクスで何をやるか

光で細胞活動を操作し、



光で計測する。



電気で計測する。



形態・分子を計測する。



行動を計測する。

ング法です。今、第三のアプローチとして、オプトジェネティクスが生まれました。これを使えば、回路の特定の素子に入力を与えることで、回路の動作がどのように変化するかを調べることができます。今回ご紹介した方法では、ChR2 の発現を十分に誘導することができたので、これをツールとして実用化できるレベルまで来たと言えます。

さて、オプトジェネティクスを使って、具体的には何ができるのでしょうか。光を使って細胞活動を操作し、その結果を、光で計測する方法、電気で計測する方法、形態や分子の変化を計測する方法、行動の変化を計測する方法などが考えられます。下の三つはうまくいっているのですが、誰もが憧れる光操作—光計測のオールオプティカル系、これは、今のところ、我々のところではうまく確立するに至っていません。技術革新によって、何とかかなりそうな雰

囲気になってきましたが、別にオールオプティカルなんていらないうちやいらないうち。電極を下す手間が省けるだけという考えもできます。そんなことより、今あるツールで、何をやるのかということが重要です。これまでの脳科学研究では、例えば、動物の行動と細胞の活動との相関を調べる研究等が行われてきました。一方、オプトジェネティクスの登場によって、細胞の活動がどういった行動や心の状態を生むのか、といった因果関係の研究ができるようになったというわけです。ただの物質であるはずの脳に、どのようにして「心」が生まれるのか。オプトジェネティクスは、これを解き明かす挑戦への強力な武器になるのです。

(質問17)

脳虚血時には、グリア細胞内が酸性化することが知られています。酸性化に至るプロセスを詳述してください。また、細胞内が酸性化することで、細胞間信号伝達がどのような影響を受けるのかを考察してください。

授業で紹介したグリア細胞と脳虚血の研究内容は、2014 年 1 月に、Neuron 誌に掲載されました (Beppu,...Matsui*, Neuron, 2014)。論文本体を参照するか、ラボのホームページの研究内容の項を参照してください。

参考文献

- Beppu K[†], Sasaki T[†], Tanaka KF, Yamanaka A, Fukazawa Y, Shigemoto R, **Matsui K*** (2014) Optogenetic countering of glial acidosis suppresses glial glutamate release and ischemic brain damage. *Neuron*, **81**: 314–320.
([†] equal contribution, * corresponding author)
- Budisantoso T, Harada H, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R, **Matsui K*** (2013) Evaluation of glutamate concentration transient in the synaptic cleft of the rat calyx of Held. *Journal of Physiology*, **591**: 219–239.
(* corresponding author)
- Sasaki T[†], Beppu K[†], Tanaka KF, Fukazawa Y, Shigemoto R, **Matsui K*** (2012) Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**: 20720–20725.
([†] equal contribution, * corresponding author)
- Tanaka KF*, **Matsui K***, Sasaki T, Sano H, Sugio S, Fan K, Hen R, Nakai J, Yanagawa Y, Hasuwa H, Okabe M, Deisseroth K, Ikenaka K, Yamanaka A (2012) Expanding the repertoire of optogenetically targeted cells with an enhanced gene expression system. *Cell Reports*, **2**: 397–406.
(* equal contribution)
- Budisantoso T[†], **Matsui K**^{†*}, Kamasawa N, Fukazawa Y, Shigemoto R (2012) Mechanisms underlying signal filtering at a multi-synapse contact. *Journal of Neuroscience*, **32**: 2357–2376.
([†] equal contribution, * corresponding author)
- Tarusawa E, **Matsui K***, Budisantoso T, Molnár E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y*, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *Journal of Neuroscience*, **29**: 12896–12908.
(* corresponding authors)
- Matsui K**, Hosoi N, Tachibana M (1998) Excitatory synaptic transmission in the inner retina: paired recordings of bipolar cells and neurons of the ganglion cell layer. *Journal of Neuroscience*, **18**: 4500–4510.
- 別府 薫, **松井 広** (2014) 光遺伝学のグリア細胞への応用と新発見. *日本臨床*, **72**: 2243-2249.
- 松井 広** (2014) グリア機能の光制御から見えてきた脳科学研究の新しい地平. *細胞工学*, **33**: 275-280.
- 松井 広** (2013) 心に占めるグリア細胞の役割ー光操作技術のもたらすパラダイム・シフト. *実験医学*, **31**: 1712-1717.
- 松井 広** (2013) マウスの心の光操作ー脳細胞活動と心の機能の因果関係を探る. *BRAIN and NERVE*, **65**: 609-621.
- 松井 広** (2013) 視床:単なる中継核ではないー生理学的基础. *Clinical Neuroscience*, **31**: 24–26.
- 松井 広**, 田中謙二 (2012) 生きたままのマウスの脳細胞を光で操作する技術の開発. *OplusE*, **396**: 1085–1090.
- 深澤有吾, 足澤悦子, **松井 広**, 重本隆一 (2008) グルタミン酸受容体のシナプス内分布とその生理的意義. *蛋白質核酸酵素*, **53**: 435–441.
- Bollmann JH, Sakmann B, Borst JG. Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science*. 2000 Aug 11;289(5481):953-7.
- Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):717-27.
- Heuser JE, Reese TS. Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J Cell Biol*. 1981 Mar;88(3):564-80.
- Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, Jan Y, Jan L, Evans L. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J Cell Biol*. 1979 May;81(2):275-300.

Jahn R, Fasshauer D.
Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles.
Nature. 2012 Oct 11;490(7419):201-7. doi: 10.1038/nature11320.

Malenka RC, Nicoll RA.
Long-term potentiation--a decade of progress?
Science. 1999 Sep 17;285(5435):1870-4.

Morgan SL, Teyler TJ.
Electrical stimuli patterned after the theta-rhythm induce multiple forms of LTP.
J Neurophysiol. 2001 Sep;86(3):1289-96.

Rizo J, Südhof TC.
Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion.
Nat Rev Neurosci. 2002 Aug;3(8):641-53.

Sätzler K, Söhl LF, Bollmann JH, Borst JG, Frotscher M, Sakmann B, Lübke JH.
Three-dimensional reconstruction of a calyx of Held and its postsynaptic principal neuron in the medial nucleus of the trapezoid body.
J Neurosci. 2002 Dec 15;22(24):10567-79.

Südhof TC.
The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions.
Nature. 1995 Jun 22;375(6533):645-53.

Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT.
Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution.
Nature. 1998 Sep 24;395(6700):347-53.

Walmsley B, Alvarez FJ, Fyffe RE.
Diversity of structure and function at mammalian central synapses.
Trends Neurosci. 1998 Feb;21(2):81-8.

White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S.
The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1986 Nov 12;314(1165):1-340.

Yamashita T, Hige T, Takahashi T.
Vesicle endocytosis requires dynamin-dependent GTP hydrolysis at a fast CNS synapse.
Science. 2005 Jan 7;307(5706):124-7.

Principles of Neural Science
Eric R. Kandel, James H. Schwartz, Thomas M. Jessell
McGraw-Hill, Health Professions Division

Synapses
W. Maxwell Cowan, Thomas C. Südhof, Charles F. Stevens
The Johns Hopkins University Press

<http://www.technologyreview.com/biomedicine/21175/page1/>