

脳神経シナプス生理学研究：過去から未来へ

三木 崇史

秋田大学大学院医学系研究科 細胞生理学講座

(accepted 9 April 2024)

The past and future of synaptic physiology

Takafumi Miki

Department of Cell Physiology, Akita University Graduate School of Medicine, Akita, Japan

Key words: synapse, neurotransmitter release, calcium channel, synaptic vesicle, secretion

はじめに

生体で起こる分泌は、代謝の調整、ストレス反応、成長と発達、消化吸収、そして脳神経の情報伝達など、生体の様々な機能で重要な役割を果たします。脳神経系での分泌、特に神経伝達物質放出は、外界からの情報を素早く脳へと伝えたり、脳内での情報処理を担ったり、末梢へと指令を送ったりと、迅速な脳情報処理の基盤として働き、脳機能実現に重要です。

脳神経の情報伝達は、神経細胞間の接合部であるシナプスで起こります。情報を伝える側のシナプス前部にはシナプス小胞が多数存在し、活動電位依存的にシナプス前膜と膜融合することで、神経伝達物質が細胞外に放出されます。情報を受け取る側のシナプス後部では、受容体がこの放出された神経伝達物質を感知して、シナプス後膜のイオン透過を変化させることで、次の神経細胞へと情報が伝わります。1回の神経活動で伝達される情報量の大きさは、情報伝達効率と呼ばれ、精密に制御されています。例えば、この情報伝達効率の神経活動依存的な変化は、学習や記憶の細胞メカニズムと考えられています。また、シナプス前膜とシナプス小胞の膜融合は、アクティブゾーンと呼ばれるおよそ数百 nm 四方という非常に小さな領域で、時には数 kHz にも及ぶ高頻度で起こります。このように、伝達物質放出は、緻密にその量がコントロールされている「正確性」を有し、かつ微小な領域で起こる「局所性」と、高頻度で連続して起こる「高速性」という両立の難しい性質を有しています。このため、伝達物質放出は、生体の分泌のなかでも極めて特殊だと言えます。そしてこの特殊性が脳機能には重要です。伝達物質放出の特殊性がどのようなメカニズムで生じるかについて、私が行って参りました研究を中心にご紹介させていただきます。

シナプス生理学研究の歴史

まず、私の研究をご紹介する前にシナプス研究の歴史について簡単に説明いたします。

19世紀末に、チャールズ・シェリントン（1932年度ノーベル医学生理学賞受賞）は、反射の研究から2つの神経細胞の膜を超えて興奮が伝播すると考え、その2つの細胞の膜がつくる構造体をシナプスと命名しました¹⁾。1914年にヘンリー・デール（1936年度ノーベル医学生理学賞受賞）らによって神経伝達物質であるアセチルコリンが発見され^{2,3)}、1921年のオットー・レーヴィ（1936年度ノーベル医学生理学賞受賞）による心臓と迷走神経を用いた実験によりシナプスにおける情報伝達が化学物質（神経伝達物質）を介して起こることが示されました（化学伝達説⁴⁾。そして、ベルンハルト・カッツ（1970年度ノーベル医学生理学賞受賞）によって、この化学伝達が、神経伝達物質の量子的放出により行われることが示されました（量子仮説⁵⁾。量子的放出とは、ある一定量の整数倍の神経伝達物質が放出されることを意味しています。これが、シナプス小胞によるものであることが当時の電子顕微鏡画像から考察されました⁶⁾。その後、エルヴィン・ネーアーとベルト・ザクマン（1991年度ノーベル医学生理学賞受賞）によりパッチクランプ法が開発され⁷⁾、シナプスでおこる電気的応答がより詳細に測定、解析されるようになりました。1970年代にはシナプス可塑性が発見され、後にエリック・カンデルら（2000年度ノーベル医学生理学賞受賞）によってシナプス可塑性が動物の学習行動の基盤であることが示されました⁸⁾。さらに分子生物学の発展により、1980～2000年代にかけてシナプス小胞膜融合に関わるタンパク質が次々と発見され、シナプス伝達の分子レベルでの理解が深まりました（ジェームズ・ロスマン、トーマス・スードフら、2013年度ノーベル医学生理学賞受賞⁹⁾。

特に、シナプス生理学を理解する上で重要な発見が、ベルンハルト・カッツによって提唱された量子仮説です。量子仮説によると、シナプス前膜にはシナプス小胞が放出できる場所（放出部位）が存在します。そして、放出部位に存在するシナプス小胞が、活動電位に応じてある確率で膜融合し（放出確率）、伝達物質が放出されます。そのため、放出サイトの数を N 、放出確率を Pr 、1シナプス小胞あたりのシナプス応答の大きさを Q とすると、シ

Corresponding Author: Takafumi Miki
Department of Cell Physiology, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan
Tel: +81-18-884-6069
Fax: +81-18-836-2604
E-mail: tmiki@med.akita-u.ac.jp

*令和5年11月20日 秋田医学会教授就任特別講演

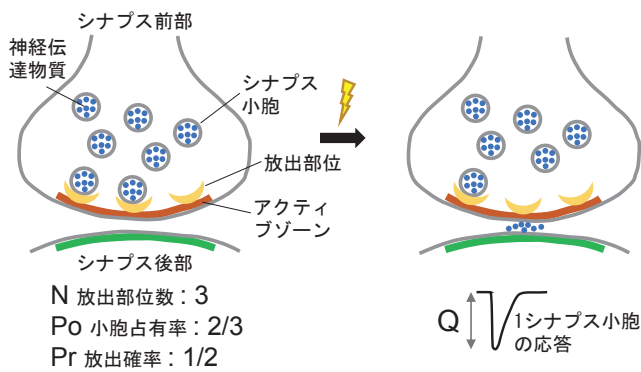
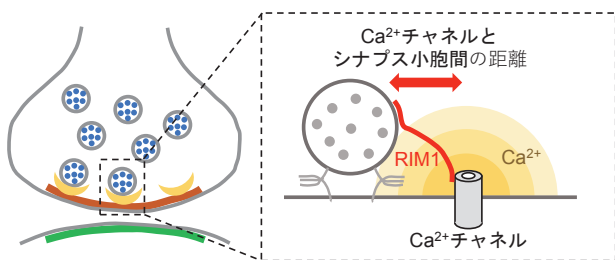


図1. シナプス伝達効率パラメータ

図2. 放出部位におけるシナプス小胞-RIM-Ca²⁺チャネル複合体¹²⁾

シナプス伝達強度 (情報伝達効率) は、 N と P と Q の積として表されます ($I = N \times Pr \times Q$)。その後、Zucker らによって、放出サイトにシナプス小胞が存在する確率 Po が新たなパラメータとして加えられました。そのため、現在ではシナプス伝達強度は $I = N \times Po \times Pr \times Q$ と表されています (図1)¹⁰⁾。

これまでの研究

1. 放出確率について

量子仮説のパラメータの1つである放出確率は、様々な因子によって決まります。その主な要因が、細胞内カルシウム濃度です。シナプス前部に活動電位が到達すると、その電位変化を感知してアクティブゾーンに存在する電位依存性カルシウムチャネルが開き、細胞外から細胞内へとカルシウムイオンを流入させます。この細胞内のカルシウム濃度上昇をシナプス小胞に存在するカルシウムセンサーが感知することで、タンパク質の構造変化が起こりシナプス小胞とシナプス前膜との膜融合が起こります。そのため、放出サイトに存在するシナプス小胞近傍でのカルシウム濃度は放出確率を決める鍵となっています。活動電位によるカルシウムチャネルの開閉時間は $\sim 1\text{ms}$ と短く、かつ、流入したカルシウムイオンはすぐに拡散したり、細胞内に存在するカルシウムバッファーによってキレートされてしまうため、放出に十分なカルシウム濃度上昇はカルシウムチャネル周辺のみでしか起こりません。例えば、聴覚中継シナプスの calyx of Held シナプスでは、カルシウムチャネルから半径 50 nm 以内にシナプス小胞が存在する必要があります¹¹⁾。しかし、当時、カルシウムチャネルとシ

ナプス小胞との距離を規定する分子実体は不明でした。

私は、カルシウムチャネルの β サブユニットと相互作用する分子を Yeast two hybrid 法にて網羅的に探索し、アクティブゾーンに存在する Rab3 interacting molecule (RIM) を見出しました¹²⁾。RIM は、シナプス小胞膜上のタンパク質 Rab3 と相互作用することが知られておりました。そこで、PC12 細胞を用いて分泌顆粒を蛍光ラベルし、全反射照明顕微鏡にて膜近傍にのみ存在する分泌顆粒を可視化する実験系を立ち上げました。この実験系を用いて、RIM とカルシウムチャネルとの相互作用によって膜近傍の分泌顆粒の量が増加することが分かりました。また、培養細胞 (BHK 細胞) にカルシウムチャネルを発現させ、カルシウムチャネルを介するカルシウム電流をパッチクランプ法にて測定したところ、RIM 共発現下では電流が増大することを見出しました。さらに、刺激により分泌される伝達物質の量は、カルシウムチャネルと RIM の相互作用により増大することを見出しました。以上のことから、RIM は、カルシウムチャネルと分泌顆粒との両者と結合することでカルシウムチャネルと分泌顆粒を近づける効果と、カルシウムチャネルからのカルシウム流入量を増大させる効果を持ち、この2つの効果により伝達物質放出量を増大させることが示されました¹²⁾。これは、RIM を中心とした分子複合体が、カルシウムチャネルとシナプス小胞との距離を規定し、放出確率を決定する分子メカニズムの1つであることを示唆しています (図2)。

2. 放出部位について

次に、量子仮説にある放出部位についてです。カッツらによる量子仮説の提唱以降、多く研究者が放出部位の実体に迫る研究を行ってきました。それらの研究の中で、1980年代に提唱されたのが One site one vesicle 仮説です。中枢神経細胞は主に、神経軸索上に複数の微小なこぶ状の構造物であるシナプス前終末 (ブートン) を形成します。このブートンの数が電気生理学的な解析で求めた放出部位の数と一致するという研究成果が発表されました¹³⁾。ほとんどの場合、1つブートンには1つのアクティブゾーンが存在することから、ブートン内のアクティブゾーンが放出部位の実体であるとする説が提唱されました¹⁴⁾。これが、one site one vesicle 仮説です。この仮説は金魚のマウスナー細胞のシナプスやげっ歯類の海馬や大脳皮質にあるシナプスなどで証明され、この仮説の普遍性が示されたかに思われました¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、2000年代に入り例外が報告されました。それは、いくつかのシナプスでは、1アクティブゾーン当たり複数のシナプス小胞が放出されるというものでした^{18,19)}。この実験結果は、1アクティブゾーンに複数の放出部位が存在することを意味しますので、one site one vesicle 仮説は否定される形となりました。その後、私たちの研究を含む多くの研究がなされてきましたが、現在に至るまで放出部位の実体については未だに議論が続いております (後述)。

3. 1ブートンにおける放出部位数の見積もり

私はこの問題を解決するためには、1ブートンあたりの放出部位の数を正確に見積もる必要があると考えました。そこで、当時1ブートンのシナプス生理学に着目して研究しておられたパリ第5大学のアラン・マーティー教授の研究室に合流し、放出部位数を見積もる研究を行いました。

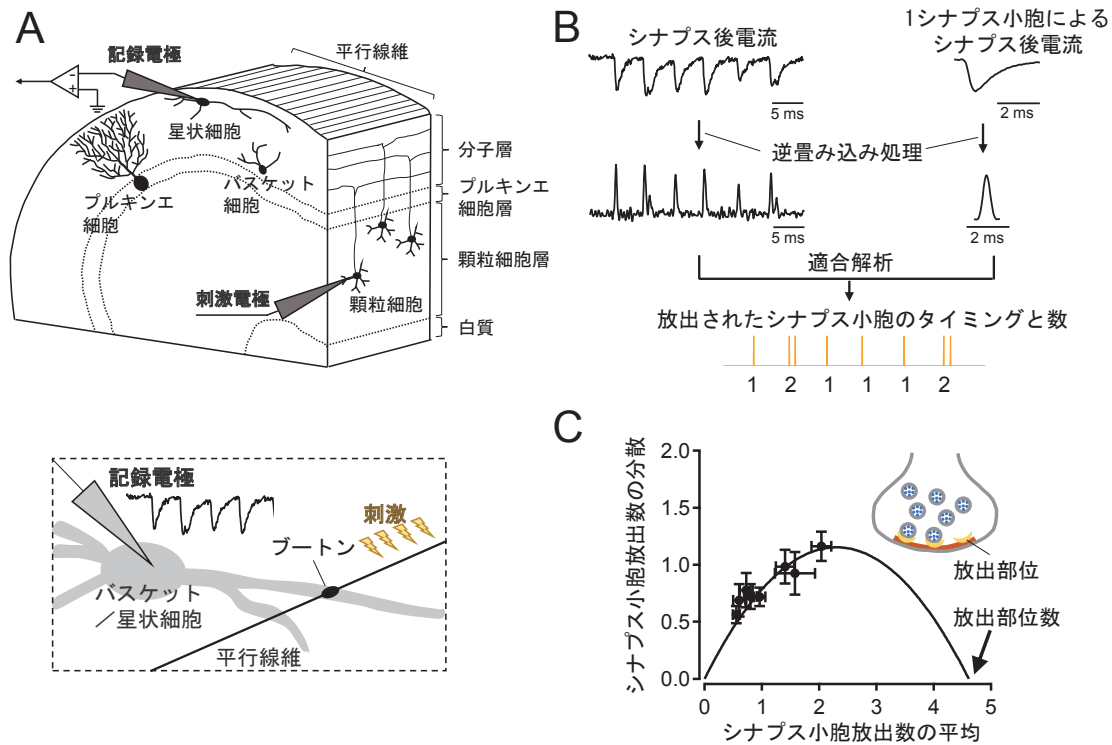


図3. 1ブートンでの放出部位数の見積もり²¹⁾ 小脳スライス標本を用いた平行線維-分子層抑制性神経細胞間シナプス1ブートンでのシナプス応答測定法(A). 測定したシナプス応答から放出されたシナプス小胞数を検出する逆畳み込み処理と適合解析(B). 放出されたシナプス小胞数の分散と平均プロットを用いた放出部位数算出法(C).

小脳の顆粒細胞は、その軸索を小脳分子層へ伸ばしたあと、2つに分岐して平行線維を作ります。この平衡線維は、分子層抑制性神経細胞（バスケット細胞、星状細胞）が樹状突起を伸ばす面とほぼ垂直に交わり、樹状突起の枝と接する部位で約1つのブートンを作ります²⁰⁾。そこで私たちは、分子層抑制性神経細胞をパッチクランプし、対象細胞にシナプスを作っている平行線維を1本刺激することで、1ブートンのシナプス応答を電気記録する実験系を立ち上げました(図3A)²¹⁾。さらに、この得られたシナプス応答から、何個のシナプス小胞が放出されたのかを見積もる新たな解析法(新 deconvolution 法)を開発しました。このシナプスでは、連続で刺激を与えると、刺激に同期した伝達物質の放出と、連続刺激後に起こる刺激に同期しない非同期性の伝達物質の放出が起こります。この非同期性の放出は、シナプス小胞1つ1つが個々のタイミングで膜融合することにより生じます。そのため、この非同期性のシナプス応答は、シナプス小胞1つ分の応答であると考えられます。このような非同期性の応答を集め平均して、1シナプス小胞分の応答のテンプレートとします。そして、このテンプレートを用いて deconvolution と適合解析を行うことで、シナプス応答から放出されたシナプス小胞のタイミングとその数を検出することができました(図3B)。この手法は、1ブートンからのシナプス応答を測定する必要があるため、適用できるシナプスが限られているものの、これまでではできなかったシナプス特性の詳細な解析ができることから(後述)、その有用性が評価されています²²⁻²⁵⁾。

この手法から求めたシナプス小胞数を用いて放出部位の数を算出しました。その算出法について説明いたします。量子仮

説によると、シナプス小胞数は放出部位数を N とする2項分布に従います(図3C)。2項分布では、平均値が NP 、分散が $NP(1-P)$ と表せます(P : 放出確率)。したがって、シナプス小胞数の分散を縦軸に、平均を横軸に取ると、上に凸の二次関数($y = \frac{1}{N}x^2 - x$)として表すことができます。実際のデータをこの二次関数でフィットすると、フィットした二次関数曲線と x 軸とが交わる点が放出部位数 N となります。このようにして求めた放出部位数は、平均5.1で、2~10の値をとりました^{21,26)}。この結果も、one site one vesicle 仮説を支持しておらず、複数のシナプス小胞が1ブートンから一度に放出されることを示しておりました。また、放出部位の数はアクティブゾーン間で一様ではないことを示していました。

4. 放出部位の分子実体について

このようにして求めた放出部位の分子実体は一体何でしょうか? この疑問に対して私たちが行った研究を紹介します。

小脳の平行線維に限らずシナプスのアクティブゾーンでは、カルシウムチャンネルがクラスター化していることが当時報告されつつありました^{11,27)}。およそ $0.01 \sim 0.1 \mu\text{m}^2$ のアクティブゾーン領域内に、直径数十 nm のカルシウムチャンネルクラスターが複数存在していることが電顕により示されました。放出確率の項でも述べたように、シナプス小胞とカルシウムチャンネルとの距離は、放出確率を決定する重要な因子です。そのため、カルシウムチャンネル近傍で最もシナプス小胞が膜融合すると考えられます。そこで、カルシウムチャンネルクラスターと放出部位とは関連があるのではないかと考え、カルシウムチャンネルクラスターの数と放出部位の

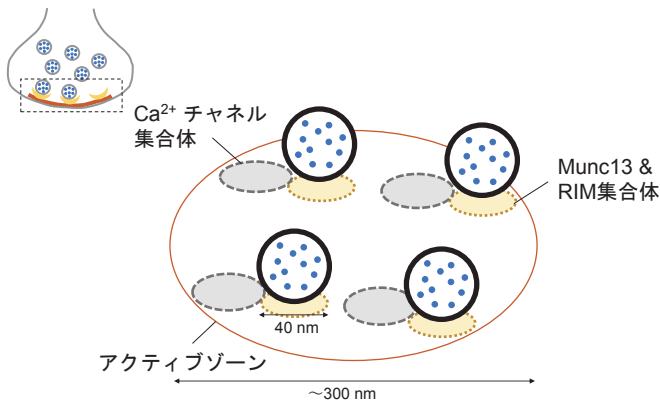


図4. アクティブゾーン内のタンパク質クラスター²⁸⁻³⁰⁾

プス小胞が膜融合する場所を詳細に調べた研究では、アクティブゾーン内にある特定のナノメートルスケールの領域で膜融合が繰り返し起こることが示されました³¹⁾。これは、カルシウムチャネルなどのアクティブゾーンタンパク質のナノクラスターが放出部位を規定するという仮説と矛盾しませんでした。一方で、この仮説と合わない研究成果も近年報告されています。カルシウムチャネルはクラスター化しておらず、シナプス小胞が膜融合する場所以外にランダムに存在するという報告や³²⁾、クラスター化はしているが放出部位の数とクラスター数との相関は生後発達時期によって異なるとの報告がなされました³³⁾。これらの研究結果を考慮すると、単純にカルシウムチャネルクラスターが放出部位の分子実体であるとは言い難いようです。しかし、シナプス可塑性に関する最近の研究で、可塑性誘導時にこれらのタンパク質のクラスターの大きさや配向が変化することが報告されており³⁴⁻³⁶⁾、アクティブゾーンタンパク質のクラスターがシナプス伝達効率を決める重要な因子であることは受け入れられつつあります。

5. シナプス小胞動員・放出モデルについて

ここまで、シナプス小胞の放出確率や放出部位について概説してきました。この放出確率や放出部位についての分子レベルでの理解は、はじめに述べました神経伝達の特徴である「正確性」や「局所性」のメカニズム解明に繋がります。次に、もう一つの特徴である「高速性」に関する研究について紹介いたします。

「高速性」とは、高頻度で伝達物質が放出されるという特徴を指します。この特徴を理解することは、すなわち、神経活動中にどのようにシナプス小胞が放出部位に動員され放出されるかを理解することです。シナプス小胞放出については量子仮説という普遍的な理論(モデル)が存在しましたが、シナプス小胞の動員については普遍性の高いモデルは存在しませんでした。そこで私たちは、小脳平行線維-抑制性神経細胞シナプスを用いて、まずシナプス小胞動員をモデル化する研究を行いました。

先に説明しました新 deconvolution 法を用いて、8回の連続刺激中に放出されたシナプス小胞の累積数を求めました。累積数は、1回目からある刺激回数までに放出された全てのシナプス小胞の数です。そのため、累積数は、ある刺激時の放出数だけでなく、ある刺激までに放出部位へ動員されたシナプス小胞の数の情報も含んでいます。この累積数を統計的に解析し、様々なモデルと比較したところ、2ステップモデルが最もよく実験データを説明できることが分かりました(図5)。2ステップモデルとは、放出部位の前に、充填部位というもう一つのシナプス小胞が存在できる部位が存在し、ひとたび放出部位のシナプス小胞が放出され、放出部位が空になると、充填部位に存在していたシナプス小胞が素早く放出部位へと移動し、次の刺激に備えることができるというモデルです²⁶⁾。このモデルは、これまでに知られている様々なシナプス特性を説明することができ³⁷⁾、またシナプス小胞数だけでなく放出キネティクスまで説明できることが分かりました³⁸⁾。さらに様々な刺激頻度や刺激パターンで得られるシナプス応答も再現することができました³⁹⁾。このように私たちは、2ステップモデルを小脳平行線維-抑制性神経細胞シナプスの小胞動員放出モデルとして確立しました。また、海馬状線維-抑制性神経細胞シナプスでもこのモデルが有用であることを示し²⁴⁾、モデルの一般化を推し進めてきました。

現在、シナプス小胞動員放出モデルとして、主に3つの有力な

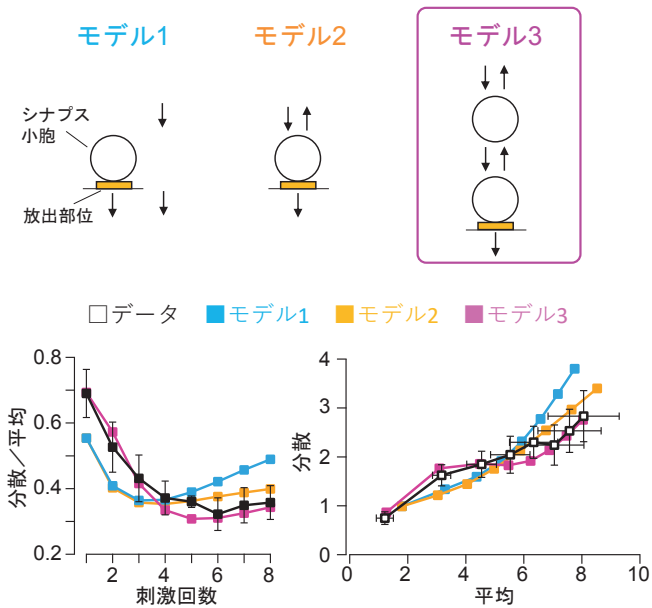


図5. シナプス小胞動員放出モデルの検証²⁶⁾

数を比較しました。実験に使用した標本は、先ほど放出部位の数を求める際に使用した小脳平行線維-分子層抑制性神経細胞シナプスです。オーストリア科学技術大学院大学(IST)の重本隆一先生の研究室にて、SDS処理凍結割断レプリカ免疫染色法を用いて、シナプス前膜上のカルシウムチャネル(Cav2.1)を金粒子ラベルし、電子顕微鏡にて観察しました。目的のシナプスであることは、抑制性神経細胞のマーカーであるKv4.3で確認しました。その結果、カルシウムチャネルクラスターの数、生後2週目のラットでは平均2.84個、範囲は1~8個であったのに対し、生後4週目のラットでは、平均2.37個、範囲1~5個でした。一方で放出部位の数は、生後2週目は平均3.15個、範囲1~10個、生後4週目では平均2.03個、範囲1~4個でした。以上のように両者の値が生後発達を通じてほぼ1:1対応していたことから、カルシウムチャネルクラスターが放出部位を規定しようという説を提唱しました(図4)²⁸⁾。私たちの報告とほぼ同時期に、異なる2つのアクティブゾーンタンパク質(RIM, Munc13)のクラスターが放出部位を規定しようという報告がなされました^{29,30)}。またシナ

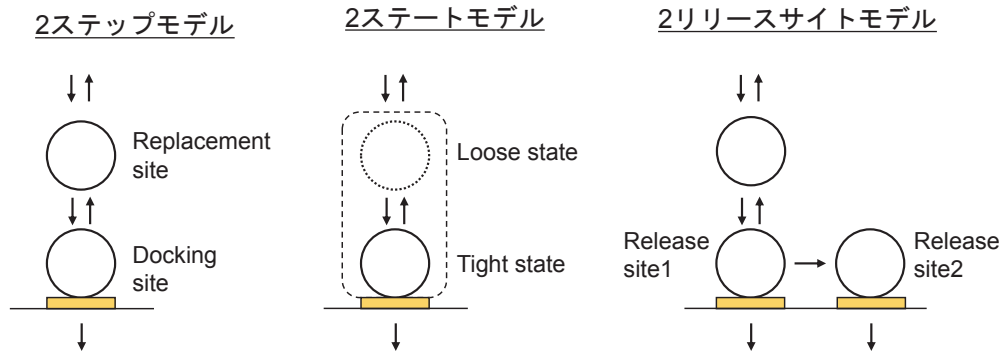


図6. 3つの有力なシナプス小胞動員放出モデル

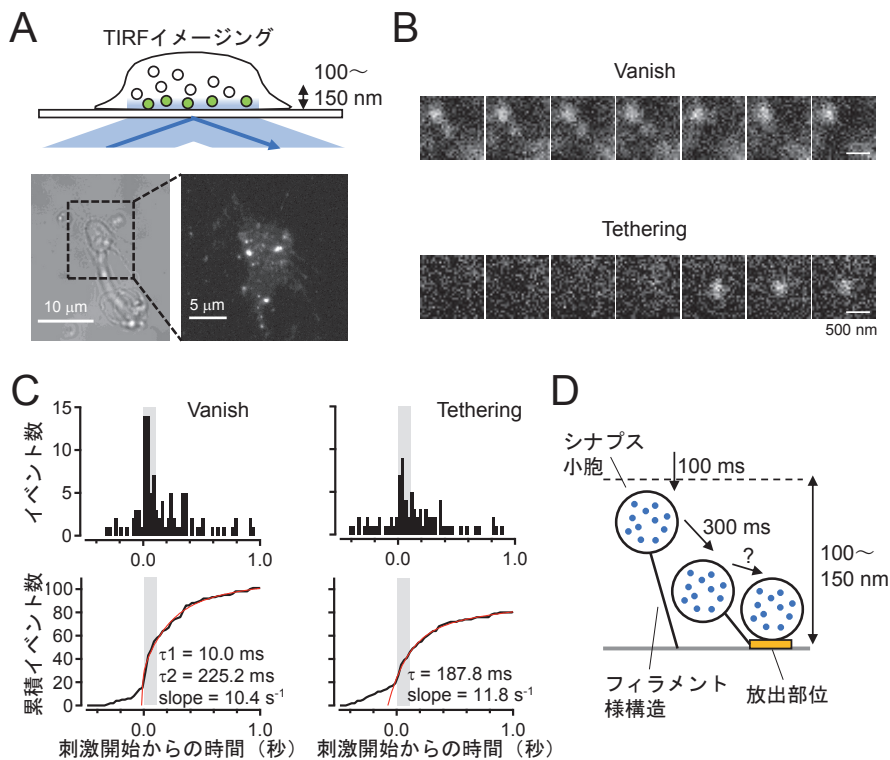


図7. シナプス小胞動態の直接観察⁴¹⁾

(A) 単離小脳苔状線維シナプス前終末でのシナプス小胞の TIRF 顕微鏡をもちいた観察. (B) 膜近傍のシナプス小胞動態 (vanish: シナプス小胞の消失, tethering: シナプス小胞の出現). (C) 脱分極刺激 (灰色部分) 前後の vanish と tethering イベントの経時変化. (D) 実験結果から得られた膜近傍でのシナプス小胞動態キネティクス.

モデルがあります (図6). 1つは私たちが提唱した2ステップモデルです. 2つ目はエルヴィン・ネアーとニルス・ブローゼが提唱した2ステートモデルです²²⁾. 3つ目はステファン・ハラマンが提唱した2リリースサイトモデルです⁴⁰⁾. 3つのモデルの中でも, 2ステップモデルと2ステートモデルは非常によく似ています. 大きな違いとしては, 2ステップモデルでは放出部位と充填部位が独立した部位になっており, それぞれの部位にシナプス小胞が同時に存在できるのに対し, 2ステートモデルでは, シナプス小胞が取りえる2つの異なる状態 (ステート) があると想定されているので, 2つ状態のうちのどちらかしかシナプス小胞は

存在できません. 2リリースサイトモデルは, 2ステップモデルの充填部位からもシナプス小胞の放出が可能であるというモデルです. いずれのモデルも様々なシナプス特性をよく再現するため, 現状, 伝達物質放出をシナプス応答 (シナプス後電流) として間接的に評価する電気生理学的手法ではこの3つのモデルを区別できないのではないかと私は考えています. 次の項でも示しますが, 今後は実際の分子やシナプス小胞を直接観察し, モデルの実体を探ることが必要であろうと考えています.

6. シナプス小胞動員の直接観察

シナプス小胞動員放出モデルで示された放出部位へのシナプス小胞の動員の実体を探るために、シナプス小胞を直接可視化する技術の開発を行いました。シナプス小胞を pH 感受性色素である FM1-43 (酸性下で蛍光を発する) で蛍光ラベルし、その後小脳苔状線維シナプス前終末を急性単離しカバーガラスに貼り付け、全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF 顕微鏡) で膜近傍のシナプス小胞の動きを観察する実験系を確立しました (図 7)⁴¹⁾。通常、シナプス小胞内の pH は pH5.8~6.0 と酸性に傾いているため、シナプス小胞内の FM1-43 は励起されると蛍光を発します。ひとたびシナプス小胞が膜融合するとシナプス小胞内腔が細胞外液 (pH7.4) に晒されるため pH が上昇し蛍光は消失します。TIRF 顕微鏡は、ガラス下面でレーザーを全反射させた際に生じるエバネッセント光により蛍光を励起します。エバネッセント光は、レーザーのガラス下面への入射角度にもよりますが、ガラス上面に約 100~150 nm 程度漏れ出ます。そのため TIRF 顕微鏡下では、ガラス面に張り付いているシナプス前終末の膜近傍に存在するシナプス小胞のみを可視化することができます。この実験系をもちいて、単離シナプス前終末をパッチクランプ法にて脱分極刺激を行いながら、TIRF 顕微鏡にてガラスに張り付いているシナプス前終末の膜近傍のみのシナプス小胞の動きを観察しました。その結果、脱分極刺激に依存した蛍光スポットの消失 (vanish) と共に、蛍光スポットの出現 (tethering) が観察されました (図 7B)。累積イベント数の経時変化を調べると、vanish と tethering イベントの時定数は共に約 200ms でした (図 7C)。脱分極刺激に依存した vanish イベントはほとんどシナプス小胞の膜融合であり、tethering イベントはシナプス小胞の膜近傍への動員であると考えられますので、シナプス小胞の動員は、シナプス小胞の膜融合と同期してほぼ同じスピードで起こることが分かりました。これは、驚くべき実験結果でした。なぜなら、これほど速いシナプス小胞の動員は、calyx of Held や海馬苔状線維シナプスなど他のシナプスでは観察されていなかったからです^{42,43)}。シミュレーションの結果、この速いシナプス小胞動員は膜近傍のシナプス小胞が放出された後のスペースを埋めるように起こることが推測されました。このように、シナプス小胞が刺激に同期して速く膜近傍へと動員されることで、即時放出可能となるための成熟過程 (300~400ms 程度) を速く終えることができ、刺激によりシナプス小胞が放出された後すぐに次のシナプス小胞を準備することができると考えられました (図 7D)。この仕組みにより、高頻度で持続した神経伝達が可能となることが示唆されました。また、前の項で提唱した 2 ステップモデルと比較すると、今回発見した速いシナプス小胞動員は、リサイクリングプールから充填部位へのシナプス小胞動員の一部ではないかと考えられました。

7. 高速小胞動員メカニズムについて

私たちが発見したシナプス小胞の速い膜への動員は、脳神経系分泌の「高速性」に重要でした。この速いシナプス小胞動員のメカニズムについて、私たちの最新の研究を最後に紹介いたします。この速いシナプス小胞動員に影響する因子を探索したところ、細胞骨格であるアクチンの重合阻害剤である Latrunculin A (LatA) を発見しました。LatA 存在下で脱分極刺激をおこなうと、vanish イベント (主にシナプス小胞の膜融合) は起こるもの、

tethering イベントはほとんど起こらないか極めて少なくなりました。電気生理学的手法を用いて膜容量を計測し、シナプス小胞の膜融合量を定量したところ、LatA 存在下では、脱分極刺激後の数百 ms 程度持続するシナプス小胞の膜融合が減弱しました。シミュレーションを用いて、LatA 存在時とコントロールとを比較したところ、LatA 存在下では、速いシナプス小胞動員の阻害が主な原因となって持続した放出が抑制されたことが分かりました。この速いシナプス小胞動員が阻害されたメカニズムを検証した結果、コントロール下では、シナプス前膜のアクティブゾーン上でシナプス小胞がトラップされるのに対し、LatA 存在下ではシナプス小胞はシナプス前終末内を自由に動き回っていることが分かりました。この動きの違いにより、速いシナプス小胞動員が阻害され、結果として持続的な伝達物質放出の阻害が起こることが示唆されました。細胞骨格であるアクチンは、アクティブゾーン上にシナプス小胞をトラップするための物理的な障壁になっている可能性が考えられました (Miki et al., *under revision*)。

おわりに (今後の展望)

「正確性」、「局所性」、「高速性」は脳神経系分泌の特徴で、脳機能を実現する上で重要です。これまでの研究でその一端が明らかにされてきましたが、まだ未解明な部分も多く存在します。

放出部位の項でも触れたように、アクティブゾーンタンパク質のクラスターは、シナプス伝達効率を決める重要な因子の一つであることは疑いようがありません。しかし、どのように個々のタンパク質がクラスターを形成するのかについてはよく分かっていません。このメカニズムは「局所性」を生み出す機構でも重要です。

「高速性」の視点からもタンパク質クラスターについて考えてみます。持続した神経活動時には、シナプス小胞はアクティブゾーン (もしくは放出部位) に次々と膜融合します。アクティブゾーンの面積は平均 $0.025\sim 0.04\ \mu\text{m}^2$ で、シナプス小胞 (直径 40~50 nm) の膜表面積は $0.005\sim 0.008\ \mu\text{m}^2$ ですので、5 つのシナプス小胞が膜融合すると、アクティブゾーンの膜はおよそ全て、シナプス小胞由来の膜に置き替わることになります。このようにアクティブゾーンの膜は常にダイナミックに変化しています。このような膜の入れ替わりが激しい環境下で、膜に存在するアクティブゾーンタンパク質がどのようにしてクラスターなどの特徴的な局在や配向を維持できるかは殆ど分かっていません。この維持機構は、「高速性」を支える重要なメカニズムです。

以上のことから、今後さらに脳神経系分泌について理解を深めていくには、アクティブゾーンタンパク質のクラスターの生成と維持機構を解明する必要があると考えています。またこれを解くうえで、実際のシナプスのタンパク質クラスターに摂動を加えてその影響を解析する研究に加えて、シナプスではないところ (非神経細胞など) に対象のタンパク質のクラスターを人工的に作りその過程を理解する研究が必要であろうと考えています。従来の要素還元的な研究と、「作って理解する」構成的な研究を組み合わせることで、分子-細胞機能という階層間の理解の隔たりを、両方向的なアプローチにより完全に埋めることができるのではないかと考えています。

人工的にタンパク質クラスターを作る構成的な研究は、将来的に脳神経系分泌を人工的に作る研究へと発展することが期待され

ます。脳神経系分泌の特殊性を作るためには、単純な分子のクラスターから単純な分泌機能を作るというように徐々に分泌能を高度化させる必要があります。その過程で様々な臓器での分泌能を作ることに繋がるため、脳の特殊性を作り理解することは、普遍的な分泌機構への理解も深まります。このように、このシナプス生理学研究成果は、生理学全般に亘ったインパクトが期待されます。今後、分子から如何に生体機能が生み出されるのかという生理学の本質への理解を深め、将来的に、人工シナプス創生を通じて、人工脳や人工知能、神経再生研究等にも貢献したいと考えています。

文 献

- 1) Foster M, Sherrington CS. A textbook of physiology, part three: The central nervous system, 7th ed. London: Macmillan and Co. Ltd., 1897.
- 2) Ewins AJ. Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J* **8**:44-49, 1914.
- 3) Dale HH. The action of certain esters and ethers of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* **6**:147-190, 1914.
- 4) Loewi O. Über humorale übertragbarkeit der Herznervenzirkung. *Pflügers Arch Ges Physiol* **189**:239-242, 1921.
- 5) Del Castillo J, Katz B. Quantal components of the endplate potential. *J Physiol* **124**:560-573, 1954.
- 6) Palade GE, Palay SL. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat Rec* **118**:335-336, 1954.
- 7) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**:85-100, 1981.
- 8) Kandel ER. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. *Science* **294**:1030-1038, 2001.
- 9) Südhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: Grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**:474-477, 2009.
- 10) Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* **64**:355-405, 2002.
- 11) Nakamura Y, Harada H, Kamasawa N, Matsui K, Rothman JS, Shigemoto R, Silver RA, DiGregorio DA, Takahashi T. Nanoscale distribution of presynaptic Ca²⁺ channels and its impact on vesicular release during development. *Neuron* **85**:145-158, 2015.
- 12) Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, et al. RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* **10**:691-701, 2007.
- 13) Korn H, Triller A, Mallet A, Faber DS. Fluctuating responses at a central synapse: n of binomial fit predicts number of stained presynaptic boutons. *Science* **213**:898-901, 1981.
- 14) Redman S. Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol Rev* **70**:165-198, 1990.
- 15) Gulyás AI, Miles R, Sík A, Tóth K, Tamamaki N, Freund TF. Hippocampal pyramidal cells excite inhibitory neurons through a single release site. *Nature* **366**:683-687, 1993.
- 16) Silver RA, Lubke J, Sakmann B, Feldmeyer D. High-probability unquantal transmission at excitatory synapses in barrel cortex. *Science* **302**:1981-1984, 2003.
- 17) Biró AA, Holderith NB, Nusser Z. Quantal size is independent of the release probability at hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci* **25**:223-232, 2005.
- 18) Wadiche JI, Jahr CE. Multivesicular release at climbing fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron* **32**:301-313, 2001.
- 19) Rudolph S, Tsai M-C, von Gersdorff H, Wadiche JI. The ubiquitous nature of multivesicular release. *Trends in Neurosci* **38**:428-438, 2015.
- 20) Xu-Friedman MA, Harris KM, Regehr WG. Three-dimensional comparison of ultrastructural characteristics at depressing and facilitating synapses onto cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* **21**:6666-6672, 2001.
- 21) Malagon G, Miki T, Llano I, Neher E, Marty A. Counting vesicular release events reveals binomial release statistics at single glutamatergic synapses. *J Neurosci* **36**:4010-4025, 2016.
- 22) Neher E, Brose N. Dynamically primed synaptic vesicle states: key to understand synaptic short-term plasticity. *Neuron* **100**:1283-1291, 2018.
- 23) Silva M, Tran V, Marty A. Calcium-dependent docking of synaptic vesicles. *Trends in Neurosci* **44**:579-592, 2021.
- 24) Tanaka M, Sakaba T, Miki T. Quantal analysis estimates docking site occupancy determining short-term depression at hippocampal glutamatergic synapses. *J Physiol* **599**:5301-5327, 2021.
- 25) Miki T, Hashimoto Y, Sakaba T. Chapter 13: Synaptic vesicle dynamics at the calyx of Held and other central synapses. Exocytosis: From molecules to cells. IOP publishing, 2022.
- 26) Miki T, Malagon G, Pulido C, Llano I, Neher E, Marty A. Actin- and Myosin-dependent vesicle loading of presynaptic docking sites prior to exocytosis. *Neuron*, **91**:808-823, 2016.
- 27) Indriati DW, Kamasawa N, Matsui K, Meredith AL, Watanabe M, Shigemoto R. Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *J Neurosci* **33**:3668-3678, 2013.
- 28) Miki T, Kaufmann WA, Malagon G, Gomez L, Tabuchi K, Watanabe M, Shigemoto R, Marty A. Numbers of presynaptic Ca²⁺ channel clusters match those of functionally defined vesicular docking sites in single central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**:E5246-E5255, 2017.
- 29) Tang A-H, Chen H, Li TP, Metzbow SR, MacGillavry HD, Blanpied TA. A trans-synaptic nanocolumn aligns

- neurotransmitter release to receptors. *Nature* **536**:210-214, 2016.
- 30) Sakamoto H, Ariyoshi T, Kimpara N, Sugao K, Taiko I, Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, Hirose K. Synaptic weight set by Munc13-1 supramolecular assemblies. *Nat Neurosci* **21**:41-49, 2018.
- 31) Gramlich MW, Klyachko VA. Nanoscale organization of vesicle release at central synapses. *Trends in Neurosci* **42**:425-437, 2019.
- 32) Rebola N, Reva M, Kirizis T, Szoboszlay M, Lorincz A, Moneron G, Nusser Z, DiGregorio DA. Distinct nanoscale calcium channel and synaptic vesicle topographies contribute to the diversity of synaptic function. *Neuron* **104**:1-18, 2019.
- 33) Chen J-J, Kaufmann WA, Chen C, Arai I, Kim O, Shigemoto R, Jonas P. Developmental transformation of Ca²⁺ channel-vesicle nanotopography at a central GABAergic synapse. *Neuron* **112**:755-771, 2024.
- 34) Fukaya R, Maglione M, Sigrist SJ, Sakaba T. Rapid Ca²⁺ channel accumulation contributes to cAMP-mediated increase in transmission at hippocampal mossy fiber synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**:e2016754118, 2021.
- 35) Fukaya R, Hirai H, Sakamoro H, Hashimoto Y, Hirose K, Sakaba T. Increased vesicle fusion competence underlies long-term potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *Sci Adv* **9**:eadd3616, 2023.
- 36) Kim O, Okamoto Y, Brose N, Shigemoto R, Jonas P. Pre-synaptic cAMP-PKA-mediated potentiation induces re-configuration of synaptic vesicle pools and channel-vesicle coupling at hippocampal mossy fiber boutons. *bioRxiv*:2023. **preprint** doi: <https://doi.org/10.1101/2023.12.04.569907>.
- 37) Pulido C, Marty A. A two-step docking site model predicting different short-term synaptic plasticity patterns. *J Gen Physiol* **150**:1107-1124, 2018.
- 38) Miki T, Nakamura Y, Malagon G, Neher E, Marty A. Two-component latency distributions indicate two-step vesicular release at simple glutamatergic synapses. *Nat Commun* **9**:3943, 2018.
- 39) Tran V, Miki T, Marty A. Three small vesicular pools in sequence govern synaptic response dynamics during action potential trains. *Proc Natl Acad Sci USA* **119**:e2114469119, 2022.
- 40) Hallermann S, Fejtova A, Schmidt H, Weyhersmüller A, Silver RA, Gundelfinger ED, Eilers J. Bassoon speeds vesicle reloading at a central excitatory synapse. *Neuron* **68**:710-723, 2010.
- 41) Miki T, Midorikawa M, Sakaba T. Direct imaging of rapid tethering of synaptic vesicles accompanying exocytosis at a fast central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**:14493-14502, 2020.
- 42) Midorikawa M, Sakaba T. Imaging exocytosis of single synaptic vesicles at a fast CNS presynaptic terminal. *Neuron* **88**:492-498, 2015.
- 43) Midorikawa M, Sakaba T. Kinetics of releasable synaptic vesicles and their plastic changes at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **96**:1033-1040, 2017.