

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06728

研究課題名(和文) 光によるLTPと記憶の消去

研究課題名(英文) Erasure of LTP and memory by light

研究代表者

後藤 明弘 (Goto, Akihiro)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：10741332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：LTPの初期段階で、シナプスの樹状突起にcofilinが集積しF-アクチンと安定的な構造を形成することで、スパインの拡大の維持に寄与する。LTPにおけるこのcofilinの集積を制御することでLTPを時空間的に制御することを目指し、CALIのシステムを導入した。この手法では、SuperNova(SN)とCofilinの融合タンパク質を作成することで、光によるcofilinの不活化が可能である。LTP誘導後、光によってcofilinを不活化することで、LTP後40分以内でLTPの解除に成功した。また脳内での光照射によるLTP解除によって記憶の解除にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We previously found that in the initial phase of LTP, cofilin is transported to the spine, forms a stable complex with F-actin, persistently accumulates at the spine, and consolidates spine expansion. To spatiotemporally regulate cofilin activity during LTP, we introduced CALI (chromophore-assisted light inactivation) system, a technique to inactivate target proteins with light irradiation through reactive oxygen. For this purpose, we generated a fusion protein between cofilin and SuperNova (SN), a protein of GFP family that generates reactive oxygen upon light illumination.

We showed cofilin is critical for maintenance of LTP up to 40 min after induction, and the inactivation of cofilin had negligible effect on LTP induction and the volume of unstimulated spine

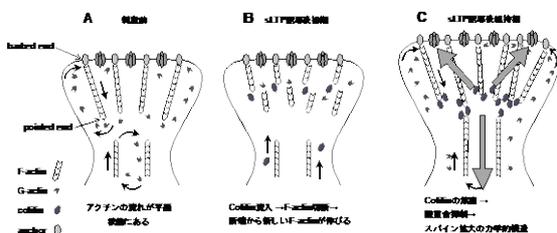
Memory was significantly impaired when 593 nm was irradiated on CA1 neurons expressing CFL-SN after memory task.

研究分野：神経科学

キーワード：cofilin LTP SuperNova

1. 研究開始当初の背景

長期増強現象(LTP)は記憶学習の細胞機構として多くの研究がなされてきた。これまでに LTP に伴い AMPA 型グルタミン酸受容体がシナプスへ急速に移行していく事、またそれに伴い樹状突起スパイン形態が拡大する事 (structural LTP; sLTP) が明らかになっている。FRET を用いた観察から、sLTP には F-actin/G-actin の平衡が F-actin 側に傾くとともに、actin 自体が増加し、それが少なくとも 1 時間程度続く事が基盤となると考えられる。F-actin はシナプスの形態を決定しているのと同時に、種々のシナプス蛋白質と直接、間接に相互作用している。そのため、F-actin の増加が、シナプスの結合容量を増加させる事で、形態ばかりでなく、シナプス反応の大きさも規定していると考えられる。すなわち、actin の制御機構を理解する事が、シナプス可塑性を理解する事に直接繋がっていくと考えられる。



本研究の作業仮説 (上図)

- A. LTP 前はスパイン周辺部から中心部へ向かうアクチンのトレッドミリング、ならびに樹状突起シャフトからスパインへ向かうトレッドミリングが存在し、スパインの形態と長さを維持している。
- B. LTP 誘導に伴い、コフィリンがスパインに流入し、既存の F-actin を切断する事で、新しい断端が出来、そこから新しいフィラメントが伸展する。
- C. その後、コフィリンがスパインの頭底部に集積し、アクチンを安定化し脱重合を抑える。一方で、スパイン周辺での重合が続くとアクチンフィラメントの長さが長くなり、スパインを拡大する力となる。

LTP を起こす前のシナプスには cofilin

2. 研究の目的

本研究ではコフィリンの動態に主眼を当てて、その生理学的意義を解明すると共に、さらにそれを応用して光にて LTP を解除する方法を開発し、行動実験に応用していくことを目的とした。

LTP 誘導後 cofilin が急速にスパインに流入し、スパインの拡大に伴い全体に広がるが、次第に頭底部へ集積する。この構造は少なくとも 1 時間は継続する。代表者は、スパイン頭底部で cofilin が F-actin と高密度で相互作用し F-actin を安定化させる事で、F-actin 脱重合が阻害され、その結果、個々の F-actin が長くなり、スパインを拡大する力学的構造を形成すると考えた。本課題はこの仮説を実

証するとともに、この機構として cofilin の協調的結合の役割を検討した。さらにそれを応用して光にて LTP を解除する方法を開発し、行動実験に応用した。

具体的な目的は3つに大別され、S.A.1 光不活性化技術による cofilin の不活化によるスパイン形態維持への関与の解明。S.A.2 Cofilin による actin treadmilling 制御の可視化と cofilin 不活化の影響。S.A.3 CALI による cofilin 不活化システムの動物行動実験への応用。

3. 研究の方法

以下、3つの目的につき方法を記載する。
S.A.1 光不活性化技術による cofilin の不活化によるスパイン形態維持への関与の解明
方法: Cofilin、SN と CFP の融合蛋白質 cofilin-SN-CFP と YFP を海馬神経細胞に共発現する。まず、二光子顕微鏡観察下、グルタミン酸脱ケージ化にて sLTP を誘導し、cofilin-SN-CFP が cofilin-GFP で見られたようにスパイン頭底部へ集積する事を確認する。観察は 920 nm で行う。その後、1030 nm のレーザーでスパインにある SN を活性化し CALI をおこし、スパイン形態を観察する。

S.A.2 Cofilin による actin treadmilling 制御の可視化と cofilin 不活化の影響

方法: Cofilin-SN-mKeima と PA-GFP を海馬神経細胞に共発現する。mKeima を用いるのは、GFP と同じ波長 (920 nm) で励起できるのに関わらず、Stokes shift が大きい為、KR を活性化せず赤領域の蛍光を発する為である。グルタミン酸脱ケージ化にて sLTP を誘導し、cofilin-SN-mKeima がスパイン頭底部へ集積する事を確認する。同時に 720 nm レーザーを用い、PAGFP を光活性化し、actin のターンオーバーを観察する。

S.A.3 CALI による cofilin 不活化システムの動物行動実験への応用

方法: Cofilin-SN-GFP を AAV ベクターを用い野生型マウス海馬神経細胞に発現する。また光ファイバーを挿入できるカニューレを両側背側海馬直上に装着する。学習課題は比較的短時間でできる inhibitory avoidance test を用いる。このタスクでは、Whitlock ら (2006) の in vivo 記録により実際に学習に伴い LTP が起こる事が判っている。マウスをテストチャンバーの明側に入れる。通常マウスは暗いところを好む為暗側へ入るが、その3秒後電気ショックを与える。さらに 10 秒後置くとその間にマウスは暗側が危険である事を学習する。その後ホームケージに戻すと同時に光ファイバーでレーザー光源に接続する。

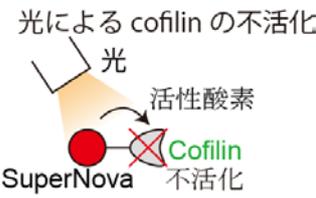
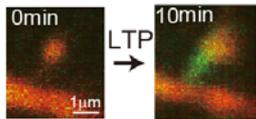
4. 研究成果

光によるスパインの sLTP 解除

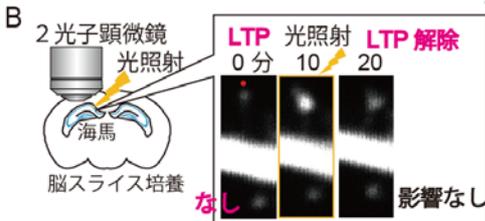
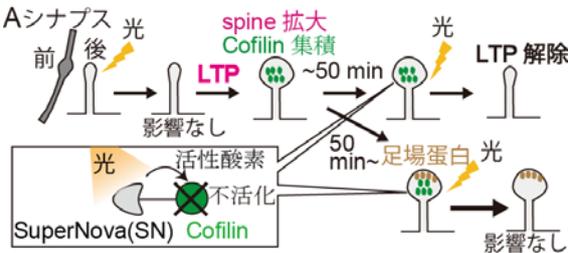
光で Cofilin を不活化するためには、光照射により活性酸素を産生し近傍 (5-10 nm) に存在する蛋白質等を不活化できる技術であ

る CALI を導入した。SuperNova (SN) は 1 光子 500~600 nm 及び 2 光子 (~800, 1000~nm) 励起によって高効率で CALI を誘導できる (Takemoto, SciRep, 2013)。そこで SN と Cofilin の融合蛋白質

LTP による cofilin 集積
spine 拡大 RFP
Cofilin 集積 Cofilin

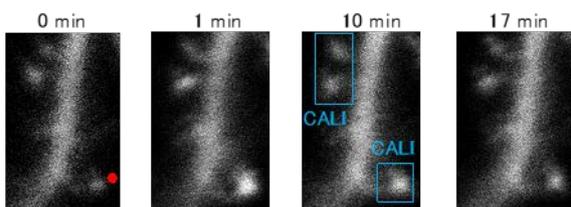


(Cofilin-SN) をスライス培養海馬神経細胞の spine に発現させた。二光子グルタミン酸刺激によって単一スパインに sLTP 誘導し、



上図。A. 光による LTP 解除法のモデル。SN 融合 cofilin (緑) を光により不活化することで LTP 誘導後 ~50 分でのみ LTP が解除される。B. 光照射による sLTP の解除。Cofilin-SN と GFP を発現した spine の GFP 画像。上側の spine で sLTP を誘導し、10 分後にスライス全体へ光照射。

その 10 分後にスライス全体に光を照射すると、sLTP が誘導されたスパインだけが縮小し、sLTP を誘導していない spine には影響がなかった。sLTP の誘導 1 分前、50 分後の光照射ではそれぞれ影響がなかった。SuperNova 単独を発現した spine では光による体積変化は見られず、光毒性や褪色による spine 縮小の可能性は排除できる。

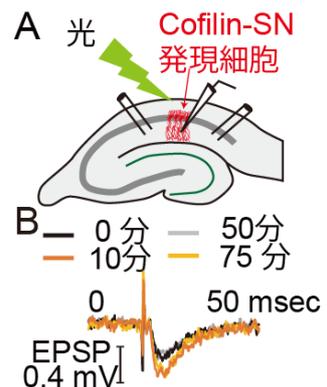


コフィリンの不活化による LTP を起こしたスパイン特異的な LTP 解除 (上図)

Cofilin-SN を GFP と共発現した神経細胞にグルタミン酸脱ケージ化により sLTP を誘導した (○印のスパイン)。10 分後、1030 nm パルスレーザーの 14 秒の照射で SN を活性化させた CALI を起こした (右下の箱の領域)。コントロールとしてグルタミン酸刺激を行っていないスパイン (左上の箱の領域) に同様に CALI を起こした。

光による LTP 解除の電気生理を用いた確認

さらに光照射によって sLTP が解除されることで、シナプス伝達効率の上昇が解除されることを確認した。AAV vector を用いて Cofilin-SN を CA1 神経細胞に発現させ、Schaffer 側枝への電気刺激にตอบสนองする局所電位 EPSP を測定した。高頻度刺激 (HFS) によって LTP を誘導すると、長期的な EPSP の増強が見



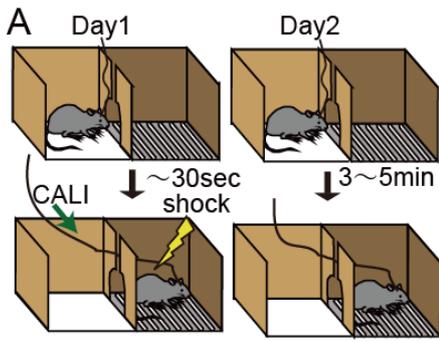
上図 光照射による電気生理 LTP の解除 A. 電気生理実験の模式図 B. EPSP の例。LTP 誘導 10 分後に光照射し、50 分後に再び LTP 誘導。

られ、その 10 分後、光を照射すると、EPSP は徐々に低下した。光照射 40 分後には EPSP はほぼ LTP 誘導前まで戻り LTP が解除された。続いて HFS を再び加えたところ、正常に LTP が誘導された。これは光による LTP 解除が神経機能を阻害せず、LTP 誘導と可逆的なプロセスであることを示す。HFS を加えず LTP を誘導しない電極 (control pathway) の EPSP 応答は有意な変化を示さなかった。また SuperNova を単独で発現させた場合 (図 7C 青)、光照射による EPSP の抑制が見られないことから、光毒性などの非特異的な影響は排除できる。

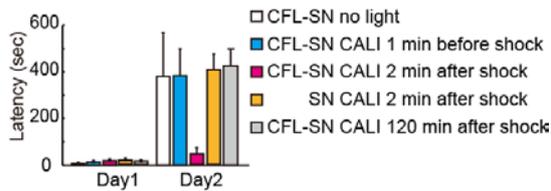
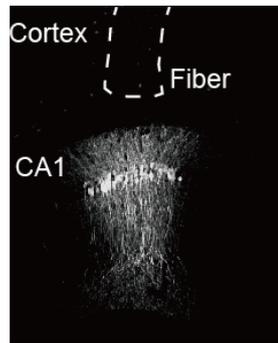
海馬への光による LTP 解除と短期記憶の消去

LTP の抑制を脳内で行うために、Cofilin-SN を flox で発現制御可能な AAV vector を用いて CaMKII-Cre マウス両側海馬 CA1 の錐体細胞に発現させ、海馬直上に光ファイバーを挿入した。記憶の評価は IA テストを用いた。マウスを明室に入れた後、電気刺激を加える。この時点で、恐怖条件づけの記憶が誘導されると想定される。翌日再び明

箱にマウスを入れ、暗箱に入るまでの時間を計測する。



電気刺激によりLTPが誘導され記憶が形成されれば、暗箱へ入るまでの時間が遅延する。記憶タスク 2-20 分後に光照射を行うと記憶が消去された。一方で記憶タスク 60 分以降、1 分前に光照射行ってもそれぞれの記憶



上図. in vivo LTP 解除法 A.IA テスト. B. 脳スライス. C. IAtest2 日目の記憶成績。電気刺激 1 分前と 2-120 分後に光照射。

に影響はなかった。これは、海馬における LTP は学習直後に誘導されており、学習後 40 分後までに光照射で LTP を解除した結果、短期記憶が消去されたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

なし

〔学会発表〕 (計 1 件)

日本神経科学大会 2017 年
海馬 LTP と記憶の消去を可能とする新規光学技術

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
後藤 明弘 (Goto, Akihiro)
京都大学・大学院医学研究科・特定助教
研究者番号 10741332

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者

(0)