

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12765

研究課題名(和文)超長期可塑性の光制御と記憶形成メカニズムの解明

研究課題名(英文)Optogenetically induced super long term plasticity

研究代表者

松井 広 (MATSUI, Ko)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20435530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：長期的な「記憶」は、我々が自身のアイデンティティを保つために不可欠である。ところが、長期記憶の細胞生理学的な基盤に切り込んだ研究は、未だにほとんどない。急性脳スライス標本を用いて実験のできる、ごく短い時間制限内で生じる長期増強・抑制過程は、その後、数時間かけて生じる超長期可塑性過程とは、質的に全く異なるものである可能性が高い。本研究では、生きたままの動物を使い、光照射領域の多くのシナプスに一気にシナプス可塑性を引き起こすというモデル実験系を立ち上げた。小脳虫部領域では、ほぼ非侵襲的に光刺激・神経活動記録ができる。この利点を活かし、超長期可塑性に関わる基本原理を解明していくことを目指した。

研究成果の概要(英文)：Long term memory is the foundation of our own identity. However, little is known about the cell physiological change associated with long term memory. Using acute brain slices, synaptic plasticity has been well studied; however, changes occurring within 30 minutes to a few hours at most may be well different from what is happening after several hours and days. We have created an optogenetic model to study super long term changes in synaptic plasticity. Vermis region of the cerebellum was used for this study because it allows near non-invasive optical stimulation and neuronal activity monitoring in vivo. We aimed to understand the basic mechanisms underlying super long term plasticity.

研究分野：脳生理学

キーワード：光遺伝学 オプトジェネティクス シナプス可塑性 小脳 脳波

1. 研究開始当初の背景

記憶が記録される瞬間、特定の神経細胞集団が特有の順番とリズムで旺盛な活動をするが、記憶の書き込みが済めば、そのダイナミックな神経活動パターン自体は消失する。後に残るのは神経回路に刻まれた痕跡。この記憶痕跡は、短期的にはシナプス受容体の増減であり、長期的にはシナプスそのものの形成・消失である。本研究では、光遺伝学を用いて、生きたままの動物の特定の脳領域に一気にシナプス可塑性を引き起こすことに成功し、それが数日以上にわたり持続することを観測した。こうした「超」長期可塑性こそが、我々のアイデンティティの根源である「記憶」が形成される過程であると考えられる。この斬新なモデル実験系を使い、シナプス機能・関連分子の変化を追跡した。

これまでの急性脳スライス標本を使った電気生理学実験では、およそ1時間以上の可塑性過程を追跡することは不可能であった。そのため、便宜的に、数分以内に消失するシナプス機能の変化を短期可塑性、それ以上持続するものを長期可塑性と呼ぶ。しかし、いわゆる長期記憶は、何日～何年も持続する。脳全体に強い電気刺激を加えて、脳内電気活動をリセットするような電気痙攣療法(ECT)でも、短期的な逆行性健忘は生じるものの、長期的な記憶は破壊されない。このように、長期記憶とは、神経回路の中に深く刻まれた痕跡によるものである。神経信号が回路を通過する際、神経信号がその痕跡に影響されれば、記憶が想起されるという仕組みと考えられる。

2. 研究の目的

長期的な「記憶」は、我々が自身のアイデンティティを保つために不可欠である。このことは、認知症や健忘症患者の例を見れば明らかであり、記憶を理解することは、我々の心や人間性を理解することにつながる。ところが、長期記憶の細胞生理学的な基盤に切り込んだ研究は、未だにほとんどない。急性脳スライス標本を用いて、実験のできるごく短い時間制限内で、シナプス後膜での受容体数の増減や、シナプス前細胞からの放出確率に変化はあるかどうか、などという議論がされているに過ぎない。こういった～30分以内に生じる長期増強・抑制過程は、その後、数時間かけて生じる超長期可塑性過程とは、質的に全く異なるものである可能性が高い。

本研究では、脳神経回路の「超」長期的な可塑性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。通常の学習課題による記憶痕跡は、何兆もの脳回路素子の接点のうち、ほんのいくつかだけに刻まれる。そこで、神経活動を光で制御する技術、オプトジェネティクス(光遺伝学)を用いたところ、小脳平行線

維プルキニエ細胞間のシナプスに超長期可塑性が誘導できた。本実験系を用いて、光照射により領域一体に可塑性を引き起こし、超長期可塑性が成立するまでの各時点で、シナプス前部・後部構造におけるチャンネルや受容体分布を凍結切断レプリカ標識法で分析した。このシナプスでは、シナプス結合そのものが減ることが予想され、発達期におけるシナプス刈込現象と同様、ミクログリアやアストロサイトの活性化が、シナプス消失に関与するかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究を行うにあたり、光遺伝学を用いて、超長期可塑性を、小脳虫部の比較的広い領域に一気に引き起こし、これを安定的に数日以上追跡する方法を開発した。続いて、超長期可塑性誘導後の様々な時点で、脳を灌流固定し、凍結切断レプリカ標本を作製。シナプス後部のグルタミン酸受容体の分布や、シナプス前部において、伝達物質放出を制御する、Ca²⁺チャンネルの分布を解析した。

4. 研究成果

本研究では、生きたままの動物を使い、光照射領域の多くのシナプスに一気にシナプス可塑性を引き起こすという、斬新なモデル実験系を立ち上げた。小脳は、運動学習に関わる領域であるが、中でも頭蓋骨直下に位置する小脳虫部領域では、ほぼ非侵襲的に光刺激・神経活動記録ができる。この利点を活かし、まずは小脳で、超長期可塑性に関わる基本原理を解明していくことを目指した。

本研究では、まずは、光感受性分子 ChR2 が神経細胞に特異的に発現するトランスジェニックラットを用い、急性脳スライス標本で30分程度持続するシナプス伝達の可塑性を調べたり、また、二光子イメージング法を用いて、スパイン構造変化を4時間にわたって追跡する実験を実施した。さらに、これ以上の長期観測を目指して、麻酔下・固定下で、プルキニエ細胞からユニット記録を取り、光刺激で惹起されるスパイクも観測。連発光刺激後に、プルキニエ細胞応答の後期成分が抑制されることを明らかにした。しかし、麻酔の影響も無視できないので、自由行動下のラットに光ファイバーを刺し、ネジ電極による脳波記録も行ってみたところ、連発光刺激後、数日以上に渡って持続的に、光惹起性脳波応答が減弱することが分かった。さらに、超長期可塑性が安定化する直前、連発光刺激から1～2時間後に、いったん、シナプス抑制が緩和される現象も新たに発見された。このような現象はこれまで報告されておらず、まさにこの時点こそが、超長期可塑性のメカニズム

が発動して、脳回路へ記憶痕跡が刻み込まれるタイミングと考えられる。

微細形態学的な変化としては、光刺激によって、刺激部位近傍の *c-fos* が上昇すること、また、シナプス前終末部で伝達物質放出を制御する P/Q 型 Ca^{2+} チャンネル (Cav2.1) の分布がダイナミックに変化することなどを見出した。従来、このシナプスでは、シナプス後膜での変化のみが長期可塑性につながると解釈されてきたが、超長期可塑性へと移行する瞬間に、シナプス前部への影響もあることを示す発見があった。

なお、本研究課題に関連し、小脳以外の他のシナプスに関する研究も進めることができた。どの細胞の間でも、信号を伝え合うことで、多細胞生物としての協調的活動が可能になるが、細胞間の信号伝達には、細胞間隙に放出される伝達物質が使われることが多い。どのくらい信号が良く伝わるのかを明らかにするには、伝達物質受容体の分布様式をナノ単位で明らかにする必要がある。また、伝達物質放出に大きな役割を果たす Ca^{2+} チャンネルについても、ナノ単位でのクラスター様式が信号伝達に大きな影響を及ぼす。今回の研究では、中枢神経系の様々なシナプスで、これらの受容体やチャンネルの神経細胞での分布様式を調べ、各シナプスの信号伝達特性に応じて、分布のパラメーターが最適化されていることを示唆された。異なるシナプス間を比較する研究を通して、ひとつの種類のシナプスで生じるダイナミックな変化には、どのような生理的な意義があるのかを検討することができた。

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 7 件)

Rubio ME, Matsui K, Fukazawa Y, Kamasawa N, Harada H, Itakura M, Molnár E, Abe M, Sakimura K, Shigemoto R (2017) The number and distribution of AMPA receptor channels containing fast kinetic GluA3 and GluA4 subunits at auditory nerve synapses depend on the target cells.

Brain Structure and Function, doi:10.1007/s00429-017-1408-0.

査読有

松井 広 (2016) 脳内情報処理を担う pH の役割: アストロサイト光操作法を用いた新展開. 日薬理誌, 148: 64-68.

査読無

[http://plaza.umin.ac.jp/~JPS1927/fpj/issue/TOC16-148\(2\)/16-148-2.htm](http://plaza.umin.ac.jp/~JPS1927/fpj/issue/TOC16-148(2)/16-148-2.htm)

松井 広 (2016) 神経科学を越えた光遺伝

学の応用可能性. 日本レーザー医学誌, 36: 473-477.

査読無

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jslsm/-char/ja/>

Nakamura Y, Harada H, Kamasawa N, Matsui K, Rothman JS, Shigemoto R, Silver RA, DiGregorio DA, Takahashi T (2015) Nanoscale distribution of presynaptic Ca^{2+} channels and its impact on vesicular release during development.

Neuron, 85: 145-158.

査読有

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.019>

Masamoto K, Unekawa M, Watanabe T, Toriumi H, Takuwa H, Kawaguchi H, Kanno I, Matsui K, Tanaka KF, Tomita Y, Suzuki N (2015) Unveiling astrocytic control of cerebral blood flow with optogenetics.

Scientific Reports, 5: 11455.

査読有

doi:10.1038/srep11455

Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu S, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima Y, Teplow DB, Hoshi M (2015) Na,K-ATPase α 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- β assembly.

Proc Natl Acad Sci U S A, 112: E44655-E4474.

査読有

doi: 10.1073/pnas.1421182112

松井 広 (2015) イオン濃度操作ツールとしてのオプトジェネティクス. 実験医学, 33: 3074-3078.

査読無

<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101462/index.html>

[学会発表](計 6 件)

Ko Matsui

Optogenetic Control of Astrocytes and Mind. Gordon Research Conferences 「Glial Biology: Functional Interactions Among Glia & Neurons」, 2017 年 03 月 09 日
Ventura (USA)

Ko Matsui

Neural signal modulation by astrocyte activity. 第三回 Neuroscience Network in Kobe シン

ポジウム「グリア細胞の生理と病理～脳機能変化と精神・神経疾患～」、2017年02月17日
神戸大学大学院医学研究科・神緑会館・多目的ホール(兵庫県・神戸市)

Ko Matsui

Functional editing of brain function via glial control.

JSPS Core-to-Core Program & OIST Joint Symposium "Nanoscope Synaptic Functions" (Organizer: Takeshi Sakaba, Doshisha University) 2016年09月25日-27日
沖縄科学技術大学院大学・OIST Main Campus, Seminar Room C209(沖縄県・国頭郡)

松井 広

光遺伝学による脳虚血神経障害発生メカニズムの解明。

日本酸化ストレス学会「低酸素応答とチャネル制御」(オーガナイザー: 東北大学・鈴木教郎) 2016年08月31日
仙台国際センター(宮城県・仙台市)

松井 広

グリア光操作による脳虚血ダメージの軽減。

生体機能と創薬シンポジウム「疾患とグリア細胞-創薬を目指して」(オーガナイザー: 東京大学・池谷裕二) 2016年08月25日
東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

松井 広

神経信号のグリア増幅回路の光制御。
公益財団法人千里ライフサイエンスセミナー「光遺伝学による脳・生物学研究最前線」(コーディネーター、名古屋大学・山中章弘、慶應義塾大学・田中謙二) 2016年02月26日
千里ライフサイエンスセンタービル(大阪府・豊中市)

[図書](計 1件)

Ko Matsui (2015) Chapter 22. Casting Light on the Role of Glial Cells in Brain Function. in "Optogenetics: Light-sensing proteins and their applications.", (Springer): 315-327. (DOI 10.1007/978-4-431-55516-2)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

該当無し

○取得状況(計 0件)

該当無し

[その他]
ホームページ等

東北大学・松井広研究室
<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/matsui/>

光操作研究会 in 東北大学 2014
<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/optogenetics2014/>

東北大学知のフォーラム「脳科学最前線」
<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/fbs2015tools/>

Young Glia
<http://www.ims.med.tohoku.ac.jp/youngglia/>

2016年08月01日
日本経済新聞 朝刊 掲載
「脳を光で自在に制御 光遺伝学、東北大など研究進む」

2015年04月07日-12日
河北新報 科学の泉 全6回コラム 「こころの源を探して」

2015年03月20日～04月14日
共同通信社取材 掲載新聞各紙
中国新聞、岐阜新聞、信濃毎日新聞、福井新聞、山陽新聞、山形新聞、山梨日日新聞、山陰中央新報、神戸新聞
「細胞の活動 光で操作」
(計9報)

6. 研究組織

(1)研究代表者
松井 広 (MATSUI, Ko)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 20435530

(2)研究分担者
該当無し

(3)連携研究者
該当無し

(4)研究協力者
原田 晴美 (HARADA, Harumi)
重本 隆一 (SHIGEMOTO, Ryuichi)
須原 佑樹 (SUHARA, Yuki)
久保 尚子 (KUBO, Naoko)
權 秀珍 (KWON, Soojin)