

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500304

研究課題名（和文） シナプス分子輸送の2光子吸収を用いた光標識による解析

研究課題名（英文） Analysis of synaptic molecules trafficking by using 2-photon activation of photo-activatable molecule

研究代表者

清末 和之 (KIYOSUE KAZUYUKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ付

研究者番号：50356903

研究成果の概要（和文）：

シナプスの可塑変化は“電気活動の履歴”が“蛋白質と構造の変化”として記憶される現象として考えることができる。シナプスに構成する分子は能動的輸送と他の分子との結合特性により自立的に局在性と分布の特性をもつが、この“記憶”に伴う、分子の挙動は不明である。本研究ではシナプス可塑性の発現に重要な役割をもつリン酸化酵素の動態を光活性化タンパク質のキメラとして解析を行った。その結果、スパインに局在する CaMKII の挙動は遅く、同様に局在する AMPA 受容体より、安定にシナプス後部に存在する事を明らかにした。これは、活性化されてリン酸化酵素が持続的にシナプスへ導入される AMPA 受容体を活性化することを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

“Memory formation” at synapse is a kind of transformation from electrical activity to morphological and composing protein changes. Although synaptic molecules are localized at synapse by passive and positive transportation and assembled by themselves autonomically, it is unclear whether the behavior of synaptic molecules are changed by synaptic activation. We examined paGFP-tagged CaMKII behavior at synapse by 2p-photoconversion. The motility of CaMKII were slower than that of GluR1 receptors. This indicates that CaMKII which has been activated once can activate AMPA receptors coming into the synapse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：分子・細胞神経科学

キーワード：神経科学、脳・神経科学、光スイッチ、可視化

## 1. 研究開始当初の背景

海馬興奮性シナプスの伝達効率の長期的変化（長期増強：LTP）が発見されて以来、記憶学習の細胞レベルのモデルとして、その分子機構が詳細に研究されてきた（Bliss and Collinglidge, 1993）。その可塑性発現には、

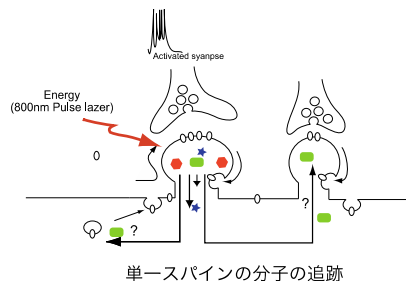
入力特異性があることが、また、他のシナプスの促進、抑圧といったシナプス間の相互作用(空間的)を伴う可塑性もある(協同性)。さらに、Spike-time dependent plasticity といった時間軸上のシナプス活動の相互作用による可塑性の発現も知られているが、その時空

間に渡るシナプス可塑性の制御が如何なる機構で実現されているかは不明である。

興奮性シナプスはスパインと呼ばれる微細な構造上に形成されており、この形態的制限がシナプス可塑性の入力特異性等の性質を可能としていると考えられる。また、リン酸化酵素等は細胞内シグナル伝達において重要な働きをしており、シナプス可塑性にも重要な働きをしているが、このリン酸化酵素がシナプス局所でどのような動態をしているかは不明である。

## 2. 研究の目的

シナプスの可塑性は“電気活動の履歴”が“蛋白質と構造の変化”として記憶される現象である。このシナプスを構成する蛋白質分子は自身の輸送と結合等の特質により自立的に集積、解離するが、この“記憶”に伴う、分子の挙動は不明である。シナプスには多種の蛋白質分子があるが、本研究ではシナプス可塑性の発現に重要な役割をもつリン酸化酵素 (CaMKII 等) に注目する。1つのスパインにあったリン酸化酵素を、光活性化により標識、追跡し、その分子の神経細胞内の挙動を明らかにする。この研究は、いわば、“記憶を持った分子”が神経細胞内でどのように振舞うのかを可視化することで、シナプス可塑性発現の入力特異性、および協同性の理解に繋がる基盤的研究となる。(下図参照)。また、この新しい手法を用いることで、任意の場所にあった分子を追跡することを可能にして、細胞生物学上の多くの問題にアプロ



光学的に分解能の高い2光子吸収をもちいて単一スパイン内の分子を光標識。その後の動態を追跡解析を行う。

一ちできると考えている。

## 3. 研究の方法

(1) シナプス可塑性に関連するリン酸化酵素を光活性化 GFP (paGFP)、Dronpa 等のキメラ蛋白質としてコードするプラスミドを作成。神経細胞に安定に発現させる。

(2) 光活性化するための光学系 (短パルスレーザーと観察用の光学系を組み合わせ、任意の場所を光活性化できる測定系の確立。また、任意のシナプスを活性化する手法の確立。

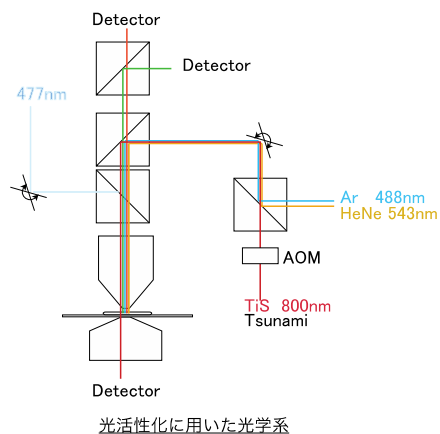
(3) 上記、マテリアルと計測技術の確立の

もと、神経細胞内で、特定のシナプス部位に存在するリン酸化酵素の動態を解析。

## 4. 研究成果

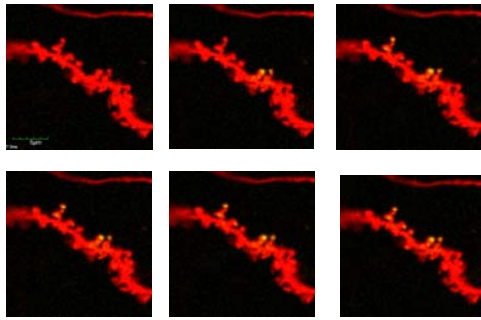
(1) 光標識に用いる蛍光性蛋白質の評価。高空間分解能を有する光活性化を行うため、2光子吸収現象を用いた励起を行う。一方、光活性化蛍光蛋白質の2光子吸収効率には明らかではなく、最適な蛍光蛋白質の選定が必要である。paGFP、Dronpa は無蛍光から緑色の蛍光を有する蛍光蛋白質であるが、前者は一回のみの光活性化が可能であるたんぱく質であるが、後者は繰り返し光活性化が可能であり、同一のスパインからの経時的動態変化を、何度も計測することが可能となる。また、Dendra は緑色から赤色へ変化する蛍光蛋白質で、光刺激するためのマーカー分子の導入を省略できる。検討の結果、Dendra は700nm-850nmの波長では十分に光標識することができず不適であった。Dronpa は、自発的な発色団形成割合が高く、一度消光させることが必要であった。しかし神経細胞は、100um以上に及ぶ長い樹状突起・軸索を持つため、想定外からの蛍光分子の流入の恐れが排除できないため、今回は不適とした。以上のことから、paGFP がもっとも有効に利用できることが明らかとなった。

(2) 単一シナプスを活性化させるための方法確立。任意のシナプス終末の刺激方法として、ChannelRhodopsin2 を用いた方法を検討した。光刺激用に長波長 (800nm 程度) とイメージング用に 488nm、543nm、さらに ChannelRhodopsin2 の刺激用に 477nm の光を導入し、制御する系の構築を行った (下図)。



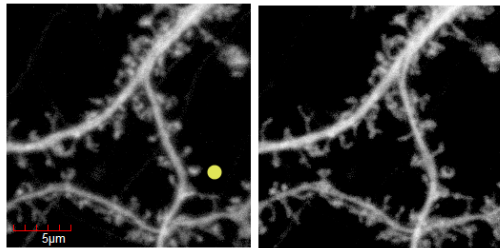
・Ti:Sバルスレーザーにて、光活性化 (Photoconversion とケージドグルタミン酸のUncaging) を、Arレーザーで光標識された分子の追跡、HeNeレーザーで神経細胞の形態をイメージング、また、477nmレーザーで、チャンネルロドプシンを活性化を行った。

結果として、光刺激は可能であったが機器の操作が煩雑であり、連続的かつ繰り返し実験を行うには困難さを持つことが明らかとなった。今後、全自動化を含めシステム化をする事で実現は可能であるが、本課題中での実



単一スパインの2光子励起法を用いた光活性化

paGFP-CamKIIを発現させた神経細胞の任意のスパインを光活性化を起こった典型例（赤：神経細胞の形を明らかにするためのmCherry, 緑：GFPシグナル）。任意のスパインヘッドにある蛋白質を光活性化できる。



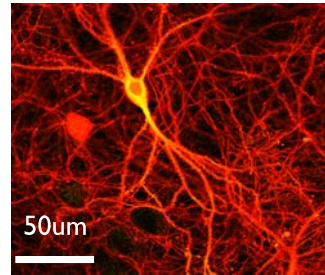
単一スパインの2光子光解除を用いた刺激

・720nmのパルスレーザーを照射（低頻度、繰り返し、黄色の丸）（左図）、その後スパインの増大が確認できる。

施は予算的に不可と判断をした。別の方法として、ケージドグルタミン酸を用いた光刺激を行った。河西らの報告の方法に従い、2光子吸収をもちいたケージドグルタミン酸の光解除を低頻度の繰り返し行うことで、特定のスパインの形態変化を誘導する事ができた。電気生理にて単一スパイン刺激による興奮性シナプス後電流の計測は行っていないが、長期増強に伴う形態的变化が誘導されていると考えられる。

(3) 神経細胞における安定的遺伝子系の導入法の検討。 神経細胞に外来遺伝子を導入、発現させるには、リン酸カルシウム法、リポフェクトアミンに代表される脂質との複合体形成による方法、また、ウイルスを用いる方法がある。しかし、神経細胞に導入し長期に安定に、複数の遺伝子を簡便に導入する方法は少ない。レンチウイルスを用いて高効率で安定に発現を維持する事は可能であるが、複数の遺伝子や長い遺伝子を導入することは困難である。それらの問題を乗り越える方

法として、川上らの報告をもとに、組換え酵素をもちいて、神経細胞での染色体への外来遺伝子の組み込みによる遺伝子の安定発現を試みた。ドキシサイクリンを用いた発現誘導系をもつプラスミドを導入に、安定に発現



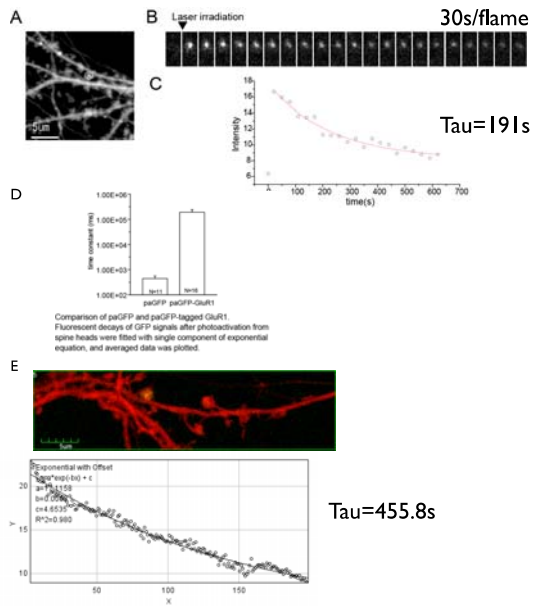
神経細胞での安定遺伝子発現

・培養2週間後にGFPを発現誘導

可能であるかを検討した。神経細胞に遺伝子導入後、2週間後に発現誘導を行った。組換え酵素無しでは、発現は誘導できないが、酵素ありの場合に十分な発現が誘導できた。このことから、外来遺伝子が安定に染色体に組み込まれ、発現誘導が可能であることを明らかにした。

#### (4) リン酸化酵素のシナプスでの動態

paGFP で標識した CaM キナーゼの動態を 2光子励起法で光標識して明らかにした。解析の結果、スパインに繫留時間の半値は paGFP で 50ms 程度、それに対して、paGFP-CaMKII は 600s 程度であった。GFP は粒状の特有的結合相手をも有しない分子であるため、単純な拡散であると考えられる。これに対して、CaMKII は GFP の 4 桁ほど遅く、一旦活性化されると、その活性化された分子が長時間にわたり、基質をリン酸化すると考えられる。一方、基質の一つであるグルタミン酸受容体のサブユニットの一つである GluR1 について計測すると、CaMKII よりもそれより短い時間であった。このことは、ある時点のシナプス活動によりリン酸化された AMPA 受容体が、そのシナプスから移動して別のシナプスへ移動し、機能を調節する可能性を示唆している。我々はこれまでの研究で、AMPA 受容体があるシナプスから別のシナプスへ移動する現象を観察している。この事実と合わせると、スパインの繫留時間の分子による差異はシナプス間の機能調節に一役を担っていることを示唆している。また、AMPA 受容体でみられるシナプス間の移動は観察されなかった。



#### 単一スパインでの分子の動態

光学的に分解能の高い2光子吸収をもちいて単一スパイン内の分子を光標識。その後の動態を追跡解析を行った。A. 樹状突起の形態。B. 単一スパインの蛍光強度の変化の典型例とpaGFP-GluR1の繫留時間変化時間経過 (C)。D. paGFPとpaGFP-GluR1とのスパインでの滞在時間比較。E. paGFP-CaMKIIの場合。樹状突起の形態とスパインに局在するCaMKIIの動態例 (写真) とその分子の繫留時間変化

## 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 1 件)

清末和之、受容体の膜輸送によるシナプス機能制御、生体の科学 特集 シナプスをめぐるシグナリング Vol161, No5, (2010)、5 3 4-5 3 6、査読無し

[学会発表] (計 1 件)

清末和之、Tracking of synaptic proteins at synapse by photoactivatable GFP in hippocampal neurons、日本生物物理学会、2009年10月30日、アスティ徳島 (徳島県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

清末 和之 (KIYOSUE KAZUYUKI)

独立行政法人 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ付

研究者番号：50356903

(2) 研究分担者

亀山 仁彦 (KAMEYAMA KIMIHIKO)

独立行政法人 産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：50224697