

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650201

研究課題名（和文） 光学的シナプス不活化法による脳内局所神経回路の機能探索

研究課題名（英文） Functional analysis of neuronal circuit by synaptic photoinactivation

研究代表者

神谷 温之 (KAMIYA HARUYUKI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10194979

研究成果の概要（和文）：光反応性グルタミン酸受容体ブロッカーANQXによるグルタミン酸シナプス伝達の光学的不活化法を海馬スライス標本に適用することで、海馬神経回路におけるさまざまな入力興奮性シナプス伝達を遮断し、局所回路における各入力の機能的意義の解明を目指した。局所的な光照射と組み合わせることで、ANQXによるグルタミン酸伝達の光学的不活化法が、海馬スライスの入力(層)特異的な光遮断に利用可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：To clarify the roles of individual input in the complex neuronal circuitry, photochemical inactivation of glutamatergic transmission using a photoreactive AMPA receptor antagonist ANQX was adopted for hippocampal slice preparations. Input (layer) specific block was applicable to the hippocampal slice preparation using local UV illumination in combination with application of ANQX.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：海馬、シナプス、グルタミン酸受容体、光操作

### 1. 研究開始当初の背景

脳のニューロンは厳密な設計図に基づき多くの入力の収束と出力の発散を示す複雑な神経回路網を構成する。複雑な脳の神経回路網における情報処理機構を理解するうえで、特定のシナプス応答を任意の時空間パターンで制御することが可能になれば有用と考えられる。神経回路の機能解析を進めるうえで、「点」で刺激し「点」で記録する従前の電気生理学的手法では空間的な入力分布や複数入力間の相互作用などを解析するには困難を伴った。そこで本研究では、光学的な手法を取り入れることでこの点を克服し、新たに開発された光反応性 AMPA 型グルタミン酸受容体ブロッカーである ANQX を用いる

ことで時空間的に制御されたシナプス不活化を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では、光反応性 AMPA 型グルタミン酸受容体ブロッカーである ANQX の光分解をスライス標本に適用することで、海馬神経回路のシナプス機能を光照射により任意の時間的・空間的パターンで不活化し（シナプス光不活化法）、それぞれの入力の機能的意義や微小局所回路の演算原理について明らかにすることを目的とした。その第一歩として、シナプス特異的光不活化の有用性を検討するために、入力ごとの層状分布が明確な海馬 CA3 野の神経回路に着目し、光 (UV) 照射の

範囲をそれぞれの入力層に局限することで、入力特異的な興奮性シナプス伝達の光遮断が可能かについて検証を試みた。

### 3. 研究の方法

光反応性グルタミン酸受容体ブロッカー ANQX は紫外線 (UV) 照射によりグルタミン酸受容体と分子間架橋 cross link を形成し、不可逆的に受容体応答を抑制する。紫外線照射の領域やタイミングを制御することにより空間的・時間的にコントロールされた興奮性シナプス伝達の不活化 (抑制) が可能になる。本研究では、光学的なアプローチによる優れた空間分解能の利点を生かしてシナプス入力特異的な不活化を行うことを目指した。マウス海馬スライス標本において、UV 照射の領域を限定することで特定のシナプス入力のみを不活化した。シナプス伝達強度の測定には、電気生理学的解析により興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potential: EPSP) ないし興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) を測定した。シナプス入力特異的な不活化法の評価にあたり、本研究では CA3 野ニューロンに収束する苔状線維入力と連合線維入力の2つのシナプス入力に着目して、その機能的意義について検討した。苔状線維シナプスと連合線維シナプスは CA3 野の異なる細胞層 (透明層と放線層) に入力することが知られており、UV 照射の範囲をそれぞれに局限することで、どちらかの入力を選択的に抑制することを試みた。

### 4. 研究成果

ANQX は古典的な AMPA 型グルタミン酸受容体である DNQX に光反応性の azide 基を導入した化合物である。UV 照射によりリガンド結合部位とクロスリンクを形成することで AMPA 型グルタミン酸受容体を不可逆的にブロックする。この際に、光分解されなかった ANQX はそれ自身で可逆的な AMPA 型グルタミン酸受容体ブロッカーとしての性質を有するため、実際の実験条件では ANQX と AMPA 型グルタミン酸受容体のクロスリンクによる不可逆的なシナプス伝達の抑制と、未分解の ANQX による可逆的な抑制の両者が混在した状態を生じると想定される。このため、未分解の ANQX の除去を速やかにするために、記録部位の海馬 CA3 野のスライス表面を持続的に局所灌流し、また ANQX の投与もこの局所灌流系を通じて行った。通常の灌流投与に比してはるかに高速に ANQX の急速投与と急速除去が可能になった。

これまでの実験により、マウス海馬スライス標本において ANQX による光不活化が可能であることを示し、光照射のタイミングを制御することで、長期増強に伴い AMPA 型グルタミン酸受容体がシナプス後部に移行する時間経過の概要を明らかにした (Kamiya, J. Neurosci., 2012)。これらの実験ではシナプス応答は細胞外記録を用いて測定した。AMPA 受容体の光不活化解析には ANQX の急速投与と急速除去が不可欠であることが指摘されており、スライス表面の細胞から記録をするホールセルクランプ法を用いることで、スライス深部から記録を行う細胞外記録に比して改善した条件で AMPA 受容体の光不活化が可能になると予想される。また、照射光 (紫外線) もスライス深部に到達する際に散乱により減弱すると考えられることから、スライス表面から記録を行うスライスパッチクランプ法が有利と考えられる。そこで、単一ニューロンレベルで ANQX による光不活化の作用を検討するために、ホールセルクランプ法を用いて CA1 野錐体細胞からシャーファー側枝入力の興奮性シナプス後電流 (EPSC) を膜電位固定下に記録し、ANQX 投与と光 (紫外線) 照射を組み合わせることで光不活化解析を行った。ANQX を記録部位に局所的に投与し、短時間の紫外線照射と組みあわせると、EPSC は持続的に抑制されほとんど回復しなかったことから、細胞内プールからの AMPA 受容体の恒常的なシナプス移行は極めて遅いと考えられた。スライスパッチクランプ法ではスライス表面の細胞から記録するため、スライス深部で記録する細胞外記録での実験に比べてスライス表面の局所灌流による ANQX の投与と除去が速やかであり、また、紫外線の組織による吸収も少ないため、光不活化による抑制の程度も強かった。ホールセルクランプ法を用いることで、改善した条件で AMPA 受容体動態の解析が可能となった。そこで、CA3 野での入力特異的な不活化を検証する以下の実験では、CA3 野ニューロンからホールセルクランプ法により EPSC を記録し、シナプス伝達の指標とした。

マウス海馬スライス標本において、局所灌流系を用いて CA3 野に ANQX の急速投与を行った。苔状線維入力と連合線維入力は、それぞれ透明層と放線層の異なる層に空間的に分離して存在することが知られている。そこで、同一の標本で交互に苔状線維入力と連合線維入力の2つの入力を刺激し、それぞれの EPSC の大きさを経時的にモニターした。苔状線維入力の入力 (層) 特異的な光遮断が可能

かについて検討する目的で、矩形絞りをを用いて光 (UV) 照射を記録部位の透明層に局限して短時間照射し、ANQX の局所投与と組み合わせると、苔状線維応答は 1 時間以上にわたって持続的に抑制された。この際、光照射を与えなかった連合線維入力への応答は ANQX 投与後一過性に抑制されたが、光不活化の 1 時間後にはほぼコントロールのレベルにまで回復した。ANQX の投与と光 (UV) 照射を組み合わせただけの場合にのみ不可逆的なシナプス伝達の抑制が生じたことから、海馬スライス標本内のシナプスでも ANQX を用いた入力特異的な光遮断が可能であることがわかった。

脳の多くの興奮性シナプスでは AMPA 型グルタミン酸受容体を介してシナプス伝達が行われていることから、ANQX を用いた入力特異的な光遮断は汎用性の高い研究手法になることが期待される。今後は、本手法を用いて入力特異的な不可逆的な光遮断を行った標本を用いることで、海馬スライス標本における各入力の特異的な機能的意義を明らかにしていく応用を目指していきたい。特に海馬 CA3 野に特徴的な反回性興奮性回路 (反響回路) を構成する連合線維入力を選択的に遮断した標本で CA3 野での情報処理やてんかん原性にどのような変化を生じるかに着目して研究を進めていきたいと考えている。

#### 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 3 件)

- ① Kamiya H. Photochemical inactivation analysis of temporal dynamics of postsynaptic native AMPA receptors in hippocampal slices. *Journal of Neuroscience* 32(19): 6517-6524, 2012 査読有  
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0720-12.2012.
- ② Uchida T., Fukuda S., Kamiya H. Heterosynaptic enhancement of the excitability of hippocampal mossy fibers by long-range spill-over of glutamate. *Hippocampus* 22(2): 222-229, 2012 査読有  
doi: 10.1002/hipo.20885
- ③ Sato I., Kamiya H. Assessing the roles of presynaptic ryanodine receptors and adenosine receptors in caffeine-induced enhancement of hippocampal mossy fiber transmission.

*Neuroscience Research* 71(3): 183-187, 2011 査読有  
doi:10.1016/j.neures.2011.07.001

[学会発表] (計 5 件)

- ① 神谷温之、AMPA 受容体ダイナミクスの光化学的解析、第 90 回日本生理学会大会 (シンポジウム)、2013/3/27、タワーホール船堀 (東京都)
- ② Kamiya H. Photoinactivation of AMPA receptors in hippocampal CA1 synapse at physiological temperature. *Neuroscience* 2012. 2012/10/13, Ernest N. Morial Convention Center (USA)
- ③ 神谷温之、光反応性ブロッカーを用いたグルタミン酸受容体動態のシナプス「その場」解析、第 89 回日本生理学会大会 (シンポジウム)、2012/3/31、信州大学 (長野)
- ④ Kamiya H. Photoinactivation analysis of postsynaptic AMPA receptor dynamics during hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 2011. 2011/11/16, Washington Convention Center (USA)
- ⑤ 神谷温之、単一神経終末エレクトロポレーション法による海馬苔状線維軸索と神経終末の蛍光観察、第 34 回日本神経科学学会大会、2011/9/17、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[その他]

プレスリリース  
海馬神経伝達を光でスイッチ・オフ～記憶形成の時間経過を解明～  
[http://www.hokudai.ac.jp/news/120509\\_pr\\_med.pdf](http://www.hokudai.ac.jp/news/120509_pr_med.pdf)  
(北海道大学ホームページ)  
研究論文名: Photochemical inactivation analysis of temporal dynamics of postsynaptic native AMPA receptors in hippocampal slices (海馬スライスにおけるシナプス AMPA 受容体動態の光化学的不活化解析)  
著者: 神谷温之 (北海道大学大学院医学研究科)  
公表雑誌: *Journal of Neuroscience* (May 9, 2012)  
公表日: 日本時間 (現地時間) 2012 年 5 月 9 日 (水) 午前 6 時 (米国東部時間 5 月 8 日 午後 5 時)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神谷 温之 (KAMIYA HARUYUKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10194079

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

なし ( )