

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650207

研究課題名(和文) ゆらぎ原理にしたがう長期シナプス可塑性

研究課題名(英文) Long-lasting synaptic plasticity subjected to the stochastic principle

研究代表者

小倉 明彦 (Ogura, Akihiko)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：30260631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が記憶の固定過程のモデル実験系と提唱する「繰返しLTP誘発後のシナプス新生」と「繰返しLTD誘発後のシナプス廃止」について、その進行過程を、同一細胞の同一部位を経時的に観測することで解析した。その結果、シナプスは常時新規伸出と退縮を行う「ゆらぎ」状態にあるが、シナプス新生はまず「ゆらぎの増大」期、ついで「ゆらぎのバイアス(伸出率>退縮率)」期を経て、確率論的に進行することがわかった。しかし、シナプス廃止は「ゆらぎの増大」期を経ることなく、刺激後直ちに「ゆらぎのバイアス(伸出率<退縮率)」期に入った。様々な点で鏡像的な性質をもつシナプス新生と廃止は、途中過程の点では鏡像的ではなかった。

研究成果の概要(英文)：We have proposed that 2 novel synaptic plasticity phenomena in the stable cultures of hippocampal slice should serve as suitable models for the analyses of cellular mechanisms underlying memory consolidation. Those are RISE (long-lasting synaptic enhancement after 3 repeated inductions of LTP supported by new synapse formation) and LOSS (long-lasting synaptic weakening after 3 repeated inductions of LTD supported by synapse elimination). In the present study we demonstrated that RISE develops through the following phases: a) the synapses are under constant generation and retraction; b) both the rates of generation and retraction increase transiently after a RISE-producing stimulus, c) the retraction rate returns to the basal level earlier than the generation rate, leading to a net increase in synapse density. However, LOSS develops without the phase of b. The 2 apparently symmetric phenomena are in fact asymmetric in the process of development.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経生理学・神経科学一般

キーワード：シナプス可塑性 シナプス新生 シナプス廃止 ゆらぎ 脳切片培養

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類脳における記憶の細胞基盤については、これまで主として海馬長期増強現象(LTP)・抑圧現象(LTD)を解析モデル系として解析が行われてきた。しかし、LTP・LTDは、成熟動物から摘出して薄切した標本(急性切片)で解析されるのがほとんどであり、標本の制約から数時間以上の観測は困難で、誘発したLTP・LTDによる伝達の強化・弱化状態が、日・週オーダーの長期にわたって維持されるか否かは、判断できなかった。

そこで申請者らは、新生げっ歯類脳から作成し、培養下で生体内と相同な回路を構築した海馬切片(培養海馬切片)を用いて長期間の観察を行ったところ、1回誘発したLTP・LTDは24時間以内に消失してしまうこと、しかし、LTP・LTDを3回繰り返し誘発すると、シナプス構造の新生・廃止を伴って3週間以上の長期間持続する強化・弱화가成立することを見出した。申請者らは、これらの現象をそれぞれRISE・LOSSと呼び、記憶の長期化(固定)過程の解析モデル系として提唱し、解析を進めている。

(2) 申請者らは、予備実験の中で、RISEは刺激後に単に「スイッチが入る」ような形でシナプス形成が始まるのではなく、「ゆらぎの増大期」と「ゆらぎのバイアス期」を経て、いわば結果的にシナプス数(密度)増加が起こる、との示唆をえた。これは、シナプス新生に関して広く想定されている決定論的な機構に対して、確率論的機構を主張することに相当し、一つのパラダイム転換といえるもので、詳細な解析の裏付けが必要な段階にある。

### 2. 研究の目的

(1) 上記のように、本課題の第一の目的は「RISEに伴うシナプス形成はゆらぎ原理に従う」ことを、定量的に確実なものにすることである。また、種々の様相でRISEと鏡像的な「LOSSにおけるシナプス廃止もゆらぎ原理に従うか」どうかを検討することである。

(2) また、第二の目的は、シナプス形成のゆらぎ原理が、他のタイプのシナプス形成、たとえば脳発達期のシナプス形成にも当てはまるかどうかを検討し、一般原理として適用可能か探ることである。

### 3. 研究の方法

(1) マウス新生仔(生後7日)脳より海馬を摘出し、薄切した後、多孔膜フィルター上で2週間以上培養して安定を待つ。これを安定培養海馬切片とよぶ。海馬CA1錐体ニューロンの一部に黄色蛍光蛋白(YFP)を発現する遺伝子改変マウス(以下YFP-mouseとよぶ)を米ジャクソン研究所より導入し、この動物より安定培養海馬切片を作り、同一細胞同一樹状突起部位について、適当な時間間隔で継時的に共焦点レーザー顕微鏡観察を行う。

(2) YFP-mouse 培養海馬切片に forskolin (FK ; アデニル酸シクラーゼ活性化剤)を投与してLTPを誘発する。これを1日1回3日間繰り返してRISEを誘導する。

(3) YFP-mouse 培養海馬切片に DHPG(代謝型グルタミン酸受容体活性化剤)を投与しLTDを誘発する。これを1日1回で3日間繰り返してLOSSを誘導する。

(4) その他の実験手法は成果項に個別に記す。

### 4. 研究成果

(1) 定量的かつ継時的な観察により、CA1錐体ニューロンの樹状突起棘(シナプス後構造)の動態を明らかにした。安定培養海馬切片の樹状突起棘は、a「常時伸出と退縮を行っているが両者は均衡して総数は不変」である。RISE誘導刺激後には、まずb「伸出率・退縮率がともに増しながらも、両者は均衡して総数は不変」な時期、ついでc「伸出率と退縮率が不均衡になり、結果的に総数が増す」時期、d「伸出率と退縮率が再度均衡して、増加した総数で安定する」時期、の各相を経る。

(2) CA1錐体ニューロンの樹状突起には、棘密度の高い部分と低い部分が混在する。RISEに伴うシナプス新生は、既存棘密度の低い部分で優占的に見られる(密度の関数である)ことがわかった。この際、既存棘密度が高い部分では、c「ゆらぎの不均衡」が起きないのではなく、そもそもb「ゆらぎの増大」が起きない。

(3) ところが、LOSSに伴うシナプス廃止では、予想に反して「ゆらぎの増大」期はみられず、LOSS誘導刺激後に「ゆらぎの不均衡(ただし、伸出率<退縮率)」が始まった。

(4) 3のシナプス廃止は、既存棘密度の高低に関係なく進行した。3と4の結果は、RISEとLOSSがその発達経過に関しては鏡像的ではないことを示す。

(5) 研究方法1で、培養は2週間以上後の安定状態で実験に供するとしたが、それ以前の時期の切片は、盛んに軸索と樹状突起の伸長およびシナプス新生を行っており、発達期脳の状態を模擬すると考えられる。そこで、培養開始初期の標本について、同様の継時的観察を行った。その結果、最初からc「ゆらぎの不均衡」状態にあることがわかった。ただし、伸出だけが見られて「ゆらぎがない」ということではなく、一定の退縮はある。

(6) 培養初期の棘ゆらぎを定量的に検討すると、退縮率が培養日数を追って大きくなり、10日前後で安定切片における退縮率に追いついて、1のa「ゆらぎの均衡」状態に至ることがわかった。いっぽう、伸出率は期間中不変であった(とくに発達期で高いことはない)。

(7) 5-6の経過は培養という人為的操作に伴う動態変化である可能性がある。そこで、培養開始を生後3日に繰り上げて行ったところ、棘の動態は培養の経過日数ではなく細胞の

age によることがわかった。つまり 5-6 のシナプス動態は細胞に内在的な性質だといえる。

(8) 1-7 を通じてわかったことは、ゆらぎ原理は全状態を通して適用可能なこと、および結果的なシナプスの増減を決める「ゆらぎの不均衡」を主導するのは、伸出率ではなく退縮率であること、である。今後、生体の記憶に影響を与えることが知られている状況、たとえばストレスや報酬刺激などが、シナプスのゆらぎ原理にどのような影響を及ぼすかを検討し、一般原理とみなすことができるかに見通しをえる必要がある。

#### 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 5 件)

- 1 Shimada, T., Takai, Y., Shinohara, K., Yamasaki, A., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A., Toi, A., Asano, K., Shintani, N., Hayata-Takano, A., Baba, A. & Hashimoto, H. (2012) A simplified method to generate serotonergic neurons from mouse embryonic stem and induced pluripotent stem cells. *J. Neurochem.* 122, 81-93. 査読あり
- 2 Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Hasegawa, S. & Ogura, A. (2013) Dendritic spine dynamics in synaptogenesis after repeated LTP inductions: Dependence on pre-existing spine density. *Sci. Rep.* 3, 1957 doi:10.1038/srep01957 (on line publication). 査読あり
- 3 Sakuragi, S., Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. (2013) Involvement of TrkB- and p75<sup>NTR</sup>-signaling pathways in two contrasting forms of long-lasting synaptic plasticity. *Sci. Rep.* 3, 3158 doi:10.1038/srep03158 (on line publication). 査読あり
- 4 冨永恵子, 小倉明彦 (2013) 長期記憶の細胞機構解明を目指して. *日薬理誌*, 142, 122-127. 査読あり
- 5 小倉明彦, 冨永恵子 (2014) 記憶固定の細胞生物学. *科学*, 83, 256-262. 査読なし

[学会発表](計 11 件)

- 1 桜木繁雄, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 海馬培養切片での長期シナプス可塑性における BDNF-TrkB 信号経路の関与. 日本神経科学学会 (名古屋) 2012.9.
- 2 有賀理瑛, 谷本浩亀, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 苔状線維 - CA3 間シナプスで繰り返し長期増強の誘発が引き起こす長期シナプス強化の可能性. 日本神経化学会 (神戸) 2012.9-10.
- 3 Sakuragi, S., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Involvement of the

BDNF-TrkB signaling pathway in the long-lasting synaptic plasticity in hippocampal slice cultures. Society for Neuroscience (New Orleans) 2012.11.

- 4 桜木繁雄, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 繰り返し LTP・LTD 誘発後のシナプス新生・廃止現象と BDNF・proBDNF シグナリング. 生理研研究会 (岡崎) 2012.12.
- 5 長谷川翔, 大江祐樹, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 繰り返し LTD 誘発後の長期持続的シナプス減弱におけるスパイン動態. 日本生理学会 (東京) 2013.3.
- 6 桜木繁雄, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; BDNF とその前駆体分子の作用による対照的な長期可塑性. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会 (京都) 2013.6.
- 7 長谷川翔, 大江祐樹, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 繰り返し LTD 誘発後の長期持続性シナプス減弱での海馬錐体細胞樹状突起の動態. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会 (京都) 2013.6.
- 8 有賀理瑛, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 苔状線維 CA3 間シナプスで繰り返し長期増強の誘発後に生起する可塑的变化. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会 (京都) 2013.6.
- 9 Hasegawa, S., Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Asymmetric dendritic spine dynamics in the apparently symmetric long-lasting synaptic plasticity phenomena after repeated LTP/LTD inductions. Society for Neuroscience (San Diego) 2013.11.
- 10 長谷川翔, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; 繰り返し LTD 誘発後の長期持続的シナプス減弱 (LOSS) 生起時の樹状突起棘の動態. 生理研研究会 (岡崎) 2013.12.
- 11 永岡昭吾, 浦久保知佳, 冨永-吉野恵子, 小倉明彦; RISE (繰り返し LTP 誘発後の長期シナプス強化) の生理的意義: 個体での検討. 日本生理学会 (鹿児島) 2014.3.

[図書](計 2 件)

- 1 Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. An in vitro model for analyzing the conversion of short-term to long-term memory. In "Short-Term Memory: New Research" Eds Kalivas, G. & Petralia, S. F., Nova Science Pub., New York. 2012
- 2 小倉明彦 記憶と夢の仮説. 近藤寿人編 「芸術と脳」大阪大学出版会 2013

[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

小倉明彦 (Akihiko Ogura)  
大阪大学 大学院生命機能研究科・教授  
研究者番号：30260631

##### (2)研究分担者

富永恵子 (吉野恵子) (Keiko  
Tominaga-Yoshino)  
大阪大学 大学院生命機能研究科・准教授  
研究者番号：60256196