

令和元年8月29日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221001

研究課題名(和文) 大脳の記憶シナプスや回路の2光子顕微鏡と新規光プローブとを用いた研究

研究課題名(英文) Study of cerebral synapses and circuits using two-photon microscopy and novel optoprobes

研究代表者

河西 春郎 (Kasai, Haruo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：60224375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 155,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は強化増大した樹状突起スパインシナプスを特異的に標識するASプローブを構築し、運動学習が増強・新生スパインに依存することを操作的に証明し(Nature 2015)、ケタミンの抗うつ作用に前頭葉のスパイン新生が関与することを明らかにした(Science 2019)。同様な標識手法が軸索にも応用可能であり、増強スパインに入力するシナプス終末であることがわかってきた(未発表)。条件学習のドーパミン過程についてシナプスレベルではD1細胞のスパインが増強すること(Science 2014)、また、弁別学習の際にはD2細胞のスパインが増強し、それが弁別学習に関与することを明らかにしつつある(未発表)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心を育む脳の働きは神経回路の電気化学的活動で起きると信じられている。しかし、学習するときには、これに加えて神経を繋ぐシナプスが運動することを我々は見出し、これが運動学習、うつ症状など個体レベルで使われていることを証明した(Nature 2015, Science 2019)。また、条件付け学習の際には、脳内報酬信号であるドーパミンは適切なタイミングで神経から放出されれば記憶を強く促す作用があることを明らかにした(Science 2014)。この個性的に運動する脳の描像は我々の個性や病気を理解する新しい鍵となるであろう。

研究成果の概要(英文)：We have developed the synaptic probe (AS-probe) that can label and erase the labeled dendritic spines by blue laser irradiation. Using AS-probe, we have operationally shown the involvement of spines in motor learning in the motor cortex (Nature 2015) and anti-depressant effects of spine generations in the prefrontal cortex by s-ketamine (Science 2019). We are extending our technique to presynaptic boutons (in preparation). We also studied the cellular mechanisms of the reward classical conditioning, and found that the spine enlargement of D1 neurons can explain the reward timing found in earlier works (Science 2014). We have also clarified that discrimination learning involves spine enlargement of D2 neurons, and is impaired in psychotic symptoms which can be ameliorated by D2 antagonist (an antipsychotic drug), pointing to a new understanding of D2 receptors (in preparations).

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 学習・記憶 ドーパミン 大脳皮質 大脳基底核 グルタミン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、2光子励起をケイジドグルタミン酸に初めて適用し、大脳皮質錐体細胞の樹状突起の単一スパインシナプスを刺激する方法を確立した(*Nature Neurosci.* 2001)。スパインシナプスとは錐体細胞においてグルタミン酸作働性の作るシナプスで、樹状突起スパイン(棘突起)をシナプス後部構造に持ち、著しい多型性を有し、精神神経疾患ではその形態・密度異常が起きる。我々の研究から、スパインの**形態と機能**の強い連関があり(*Neuron* 2005)、長期増強はスパイン個別的に起きスパイン頭部増大を伴う(*Nature* 2004)。この形態変化の基盤にはアクチン再構築があり(*Neuron* 2008)、長期記憶形成には更に**蛋白質合成に依存的な頭部増大**がある(*Science* 2008)。一方、頭部収縮はGABAが促進し、側方に広がり競合的選別を起こし、スパインの増大収縮は通常の細胞運動の様にコフィリンリン酸化・脱リン酸化のバランスで起き、細胞内Ca²⁺が見事に二つの過程を競合させている(*Nature Neurosci.* 2013)。こうして、我々はスパインシナプスの増大と収縮・除去の両方の現象を自ら発見しそれらの分子基盤も明らかにした。大脳スパインの機能にはその形態・運動が重要であるとする我々の考え方は現在では広く受け入れられ、教科書にも引用されている。しかし、ケイジドグルタミン酸では動物行動を改変する程多数のシナプスを刺激することが不可能である。そこで、我々は、これまでにわかってきたスパインの特徴を利用して、個体において**頭部増大に関係したスパインを標識し、光で除去する蛋白性で遺伝子導入可能な記憶シナプス光プローブ(記憶光プローブ)の作成**に取り組み、ついに研究分担者の林朗子がこの目標を達成しつつある。本研究はこのプローブを改良し応用を進めことを基軸として、大脳の記憶回路をシナプスレベルで可視化し操作する新しい学習記憶研究を開拓する。

2. 研究の目的

大脳の興奮性神経回路を形成するスパインシナプスの動態は、記憶、知覚、情動などの認知過程の基盤を成し精神疾患の原因となる。当研究室は2光子顕微鏡による光刺激法を開発し、スパインの動的特性や分子基盤を世界に先んじて解明してきた。この成果に基づき記憶関連スパインを標識し、その後改変する技術：記憶シナプス光プローブ(**記憶光プローブ**)の開発に最近成功しつつある。本研究では、このプローブやシナプス前部の機能を反映する光プローブなどの確立・改良・応用を進め、スパインシナプスの認知機能への関与を可視化や操作的手法で明らかにする。また、記憶光プローブと脳透明化技術を組み合わせて広い脳領域で記憶回路をシナプスの解像で標識する技術を開発する。こうして、学習記憶・精神疾患に関わる神経回路の理解をシナプス前部、後部(スパイン)、そして両者の相互作用まで踏み込んだ統合的な戦略により飛躍的に推し進める。

3. 研究の方法

我々は、スパイン頭部の形態可塑性を誘発するプローブを開発する過程で、蛋白合成依存性な頭部増大を生じたスパインを非常に特異的に標識するASプローブ(記憶光プローブの原型)を開発した。さらに光刺激の最適化により、記憶光プローブを発現するスパインだけを特異的に収縮させる技術にも成功し、この操作により通常の運動には影響を与えることなく既得学習だけを消失することが可能になった。これは、記憶・学習に必要とされたスパインを可視化するのみでなく、記憶の本体を操作する synaptic optogenetics を実現できることを意味し、本研究では、この記憶光プローブを確立・改良し、脳の幾つかの領域の学習記憶現象に応用し、各脳領域の学習記憶を可視化定量化し操作する方法を確立する。

開口放出を直接起こすSNARE蛋白質の会合状態をFRET蛍光寿命でモニターする *trans*-SNARE プローブの作成に成功しており、これが刺激によって *cis*-SNARE となったり、phorbol ester で会合が増え、シナプス前部の機能指標となることがわかっている(Takahashi et al. 論文投稿中)。また、スパイン頭部増大の際には、会合状態が増し、開口放出が促進する予備的な知見が得られており、頭部増大とシナプス前開口放出の力学的関係を明らかにする。一方、このプロ

ープを個体動物に導入して、シナプス前終末の機能を経時的に観察し、シナプス前部の記憶に果たす役割を可視化する。

4. 研究成果

研究項目 記憶光プロ-ブの応用・改良

増大シナプスを標識する AS プロ-ブの構築と論文発表を行なった。AS プロ-ブは Arc プロモータ下にシナプス後肥厚に標的する配列を持ち、3' UTR に mRNA が樹状突起に輸送される配列を持っている。このプロ-ブは蛋白合成依存的に増大したスパインを特異的に標識する機構の全ては明らかでないが、PEST 配列により標的され

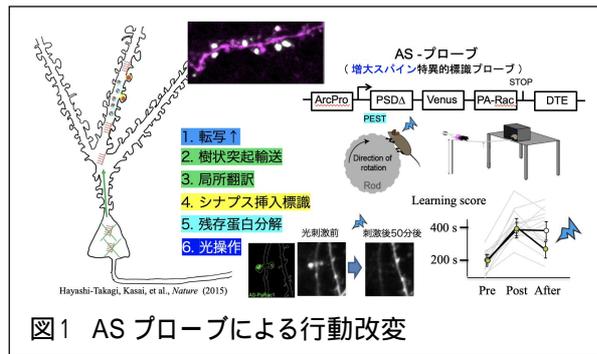


図1 AS プロ-ブによる行動改変

なかった余剰蛋白が壊されることによると考えられる。2つの運動タスクで運動野の異なるスパインの集団を標識し、光刺激でそのスパインを除去すると標識が残っている方のタスクだけが障害されたので、行動とシナプスレベルで標識の特異性は証明された(図1, Nature 2015)。このプロ-ブは発表後世界の30箇所の研究室に配り共同研究を進めているが、Listonのグループはケタミンによる前頭葉のスパイン新生が抗うつ作用に必須であることを証明し(Science 2019)、KimはAS発現とAFMで見たmiR-134の調整が逆相関を明らかにした(PNAS 2019)。

研究項目 記憶光プロ-ブによる記憶神経回路の複数脳領域での可視化

AS プロ-ブは改変困難性に直面したため作業が遅れたが現在は修復して、頭頂連合野と前頭前野・線条体での応用を開始している。全脳ウイルスやKI動物で全脳の検索ができる様に技術を発展させることにより、脳研究に大きな改革をもたらす方法論となることが期待される。

研究項目 覚醒動物のシナプス・回路活動のイメージング

覚醒動物の行動実験系としては頭部固定した動物に音-水-リックの条件学習を構築して、また、そのシナプス過程は側坐核スライスで調べた(図2)。側坐核スライス標本では、グルタミン酸入力に対するSTDPによる可塑性に対してドーパミンが有効な時間枠がSTDP後の1秒に限られていることを明らかにした(Science 2014)。そこで、個体でも同様な報酬時間枠が検出されるかを見た所、0.5秒の音で条件付けした場合には報酬時間枠は音の後1秒で、この時間枠は側坐核への扁桃体からの入力を光遺伝学で刺激しても同様に見られるので、側坐核で作られていると考えられた。また、側坐核のD1神経に特異的なCaMKIIの阻害やD1受容体の阻害

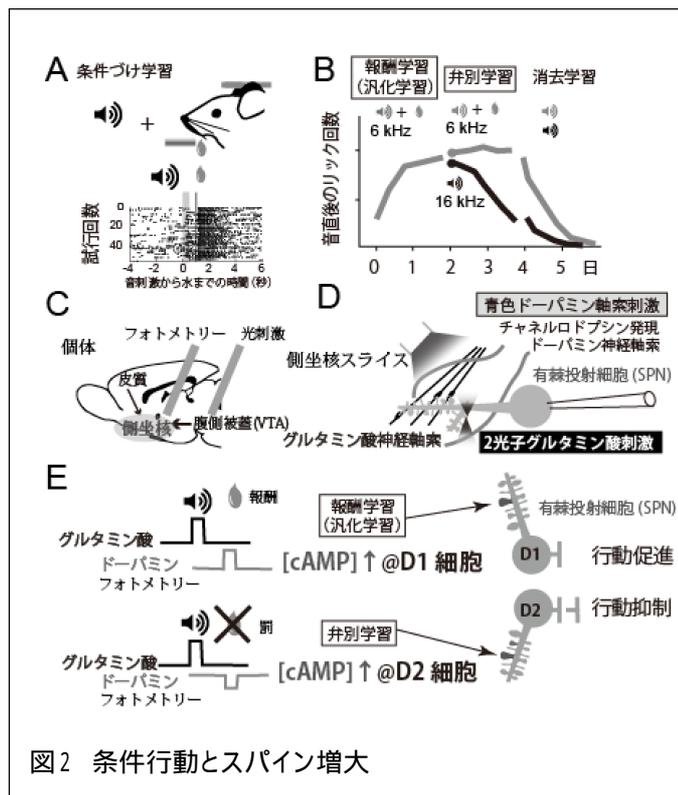


図2 条件行動とスパイン増大

で学習が止まることが確認された。これらにより、生物にとって基本的な条件付の報酬時間枠

は側坐核の回路でなく、シナプスの cAMP のダイナミズム (AC の Ca プライミング) で作られる可能性が濃厚となってきた (論文投稿中)。Hebb 則を作るのが Ca であることと著しい対比をなす。やや人工的な条件付けがアメフラシや昆虫で cAMP であると言われており、今回哺乳動物で確認されたことは種間で共通である可能性がある。

一方、調査の進んでいなかった D2 受容体と罰学習の関係については、覚醒個体動物とスライス実験の両方を進めた結果次のことがわかってきた (図 2)。1) 弁別学習時の報酬除去の様な罰に対してはドーパミン神経の 0.5 秒位の発火停止がフォトメトリーで見られる。これに対して、報酬が一切出ない消去学習のときにはドーパミン発火停止は起きない。2) スライス標本で STDP 刺激に短いドーパミンの発火停止が続いた場合は非常に感度良く D2 神経のスパイン増大が CaMKII 依存的に起きる。3) 弁別学習は D2 神経の CaMKII を抑制したり、A2A 受容体阻害で D2 神経の cAMP シグナルを止めると阻害された (論文準備中)。

研究項目 シナプス前終末の *trans*-SNARE プロープによる可視化解析

スパイン頭部増大は必然的にシナプス前終末を推すので、何らかの効果をシナプス前終末に及ぼすと考えられるが、この 1 シナプスの前後の性質の調査は難しく調査が進んでいなかった (図 3)。この解明を我々は以下の様に進めている。終末を推すことの影響を純粋に見るために、細いガラス管で終末を推すと、刺激による開口放出が増すことがわかった。そこで、小胞で開口放出を起こす SNARE 蛋白の複合化を FRET 蛍光寿命法で測定した所 (Nature Comm. 2015)、推すと SNARE 複合化が著しく促進することがわかった (図 2)。即ち、頭部増大はスパイン自身を強化するだけでなく、シナプス前終末を推すことで神経修飾因子の様に開口放出を調節している。この伝達様式は化学的でも電氣的でもないの、力学的伝達という新たなシナプス伝達様式が見つかったことになる (論文準備中)。

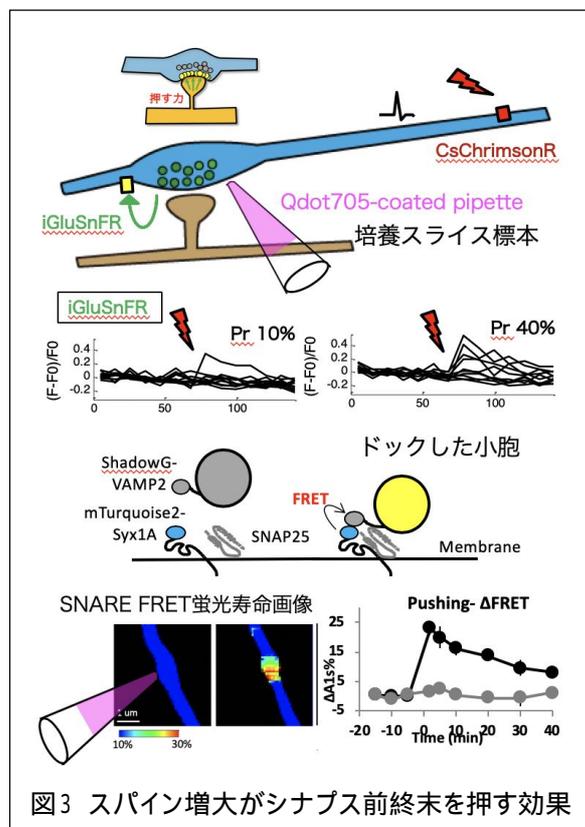


図3 スパイン増大がシナプス前終末を推す効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 件) 【すべて査読あり】

1. Park, I., Kim, H.-J., Kim, Y., Kasai, H., Kim, J.-H., Park, J.-W. (2019), Nanoscale imaging reveals miRNA-mediated control of functional states of dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116:9616-9621. DOI 10.1073/pnas.1819374116
2. Moda-Sava, R.N., Murdock, M.H., Parekh, P.K., Fetcho, R.N., Huang, B.S., Huynh, T.H., Witztum, J., Shaver, D.C., Rosenthal, D.L., Always, E.J., Lopez, K., Meng, Y., Nellissen, L., Grosenick, L., Deisseroth, K., Bito, H., Kasai, H. & Liston, C. (2019). Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced postsynaptic spine formation. *Science*, 364: eaat8078. DOI: 10.1126/science.aat8078.
3. Ishii, K., Nagaoka, A., Kishida, K., Okazaki, H., Yagishita, S., Ucar, H., Saito, N. & Kasai, H. (2018). Volume dynamics of dendritic spines in the neocortex of wild type and *Fmr1* KO mice *in vivo*. *eNeuro* 5, e0282-18.2018, 1-13. DOI: 10.1523/ENEURO.0282-18.2018
4. Okazaki, H., Hayashi-Takagi, A., Nagaoka, A., Negishi, M., Ucar, H., Yagishita, S., Ishii, K., Toyozumi, T., Fox, K., & Kasai, H. (2018) Calcineurin knockout mice show a selective loss of small spines, *Neurosci Lett* 671:99-102. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.02.006

5. Noguchi, J., Hayama, T., Watanabe, S., Ucar, H., Yagishita, S., Takahashi, N. & Kasai, H. (2016) State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. *Scientific Reports* 6: 32897. DOI: 10.1038/srep32897
6. Jakkampudi, S., Abe, M.*, Komori, N., Takagi, R., Furukawa, K., Katan, C., Sawada, W., Takahashi, N. & Kasai, H. (2016) Design and synthesis of a 4-nitrobromobenzene derivative bearing an ethylene glycol tetraacetic acid unit for a new generation of caged calcium compounds with two-photon absorption properties in the near-IR region and their application in vivo. *ACS Omega* 1(2): 193-201. DOI: 10.1021/acsomega.6b00119
7. Nagaoka, A., Takehara, H., Hayashi-Takagi, A., Shirai, F., Ishii, K., Noguchi, J., Ichiki, K. & Kasai, H. (2016) Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. *Scientific Reports* 6: 26651. DOI: 10.1038/srep26651
8. Takahashi, N., Sawada, W., Noguchi, J., Watanabe, S., Ucar, H., Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Ohno, M., Tokumaru, H. & Kasai, H. (2015). Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and beta cells. *Nature Communications* 6:8531. DOI:10.1038/ncomms9531.
9. Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M. and Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* (Article), 525:333-338. DOI:10.1038/nature15257
10. Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S. & Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine action on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, 345:1616-1620. DOI:10.1126/science.1255514
11. Hayashi-Takagi, A., Araki, Y., Nakamura, M., Vollrath, B., Duron, S.G., Yan, Z., Kasai, H., Haganir, R.L., Campbell, D.A. & Sawa, A. (2014) PAKs inhibitors ameliorate schizophrenia-associated dendritic spine deterioration in vitro and in vivo during late adolescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 6461-6. DOI: 10.1073/pnas.1321109111.

〔学会発表〕（計 49 件）

1. Haruo Kasai (2019.3.30) Mechanical forces of spine enlargement detected by presynaptic FRET/FLIM imaging, Federation of the Asian and Oceanian Physiologocial Societies (FAOPS), Symposium (Kobe).
2. Haruo Kasai (2019.2.11) Dopamine receptors, synaptic plasticity and psychiatric disorders. Japan-UK Neuroscience Symposium 2019, AMED/MRC (Kazusa).
3. Haruo Kasai, Y. Iino, R. Nakazato, K. Yamaguchi, T. Sawada, S. Yagishita (2018.7.27) Bidirectional tuning of behavioral conditioning and synaptic plasticity by dopamine in the nucleus accumbens, Japan-Canadian Joint Symposium, Japanese Society of Neuroscience 2018 (Kobe).
4. Haruo Kasai & M. Negishi (2018.7.2) Synaptic optogenetics for memory structures. World Congress of Pharmacological Sciences 2018 (Kyoto).
5. Haruo Kasai (2017.7.22) Plasticity and fluctuations of dendritic spines – synaptic bases of memory and mental disorders. Special Lecture, Neurosci 2017（幕張、千葉）
6. Haruo Kasai (2017.6.1) Dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines, Gordon Research Conference on Synaptic Transmission (Les Diableres, Swiss).
7. Haruo Kasai (2017.4.24) Identification of the synapses involved in memory formation, The Brain Conferences (Rungstedgaard, Denmark).
8. Haruo Kasai (2016.12.8) Spine synapses shaping memory and behavior, Lecture, Nanyang Technical University (Singapore).
9. Haruo Kasai (2016.11.13) Dendritic spines shaping memory and behaviors, Special Lecture, Society for Neuroscience (San Diego, USA).
10. Haruo Kasai, Sho Yagishita, Yusuke Iino, Yosuke Nakazato, Yoshitomo Maeda (2016.5.19) Rapid regulations of spine plasticity by dopamine in the D1 and D2 projection neurons in the nucleus accumbens. Cold Spring Harbor Asia Conference (Suzhou, China).
11. Haruo Kasai (2016.3.22) Plasticity and fluctuations of dendritic spines studied with synaptic optogenetics. iCeMS, MRC and AMED workshop (Cambridge, UK).
12. Haruo Kasai (2016.3.3) Structural Plasticity of Dendritic Spines in NAc for Reinforcement Learning, Gordon Research Conference (Ventura, CA, USA).
13. 河西春郎, 林(高木)朗子, 柳下祥, 根岸真紀子 (2015.4.12) 大脳の記憶素子である樹状突起スパインの2光子顕微鏡によるイメージング, 第29回日本医学会総会(京都).
14. H. Kasai (2015.3.26) Dendritic spine dynamics underlying animal behaviors, Keynote speaker, Academia Europea Symposium (Cardiff, UK).
15. H. Kasai (2015.2.12) Imaging and optogenetics of dendritic spines. BSI seminar series (Wako).

16. H. Kasai & S. Yagishita (2014.9.11) The critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines in the nucleus of accumbens, Symposium on “Emotional mechanisms” Neuro2014 (横浜).
17. H. Kasai & N. Takahashi (2014.8.5) FRET/FLIM analysis of SNARE structure and function in presynaptic terminals. Gordon Research Conference on Synaptic Transmission (New Heaven, USA).
18. H. Kasai & S. Yagishita (2014.8.5) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. Gordon Research Conference on Synaptic Transmission (New Heaven, USA).
19. H. Kasai & A. Hayashi (2014.4.2) Labeling and erasure of dendritic spines and motor learning with novel synaptic optogenetic probes *in vivo*. Janelia Conference for “Structure and function of synapses” (Dulles, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：シナプス増強を可視化するプローブ

発明者：林朗子、河西春郎

権利者：東京大学

種類：特許

番号：2014-120841

出願年：平成 26 年

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

(1)ホームページ

<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp>

(2)H. Kasai (2018.10.26) HFSP 研究グラントの経験、AMED HSFP 説明会 (東京)

(3)高校生に対するアウトリーチ

H. Kasai (2018.12.27) 脳は運動する!?, WPI Science Symposium (名古屋)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：林 朗子

ローマ字氏名：(HAYASHI, Akiko)

所属研究機関名：群馬大学

部局名：生体調節研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：60415271

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 倫子

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Noriko)

研究協力者氏名：野口 潤

ローマ字氏名：(NOGUCHI, Jun)

研究協力者氏名：柳下 祥

ローマ字氏名：(YAGISHITA, Sho)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。