

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430005

研究課題名(和文)シナプス逆行性情報伝達の解明

研究課題名(英文)Analysis of the properties of synaptic back propagating signal

研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI, Jun)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 微細構造研究部・室長

研究者番号：40421367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は樹状突起スパインの形態変化による機械的刺激が、シナプス後部から前部へと可塑性情報を伝達する可能性について検討した。まず、シナプス前部機能をFRET法により定量化する蛍光プローブを開発し評価を行った。このプローブ(iSLIM)によってシナプス前部機能の指標であるSNARE複合体形成を検出し、シナプス前部機能を評価できることを海馬培養スライス標本において我々は示した。次にsucrose高浸透圧刺激などの機械的刺激がプレシナプスに加わった際のシナプス前部機能の変化をこの機能プローブを用いて評価した。その結果、機械的刺激によりシナプス前部機能の変化が生じるという結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the synaptic plasticity information can be transmitted from post-synaptic to pre-synaptic sites by mechanistic stimulation of presynaptic membrane. First, we developed a fluorescent probe (iSLIM) which can quantitate presynaptic function using FRET method. Then we examined it in rat hippocampal slice CA1 area. We could detect accumulations of SNARE complexes which are the indicator of the presynaptic function in Schaffer collateral synaptic boutons using this probe.

Next, we evaluated the difference of presynaptic function after mechanistic stimulations such as high-osmotic pressure, using this functional probe. The results showed that the mechanistic stimulations for the presynaptic site cause an increase of presynaptic function.

研究分野：神経科学

キーワード：樹状突起スパイン プレシナプスブトン 逆行性シグナル 機械的刺激

## 1. 研究開始当初の背景

神経細胞の軸索終末をプレシナプス、これに相対する樹状突起側をポストシナプスと呼ぶ。このプレシナプスに TRPV4 や TREK1 などの機械的な刺激によって活性化するイオンチャネル(mechanosensitive channel)が存在することが知られている。中枢神経の海馬や大脳皮質軸索終末に存在する mechanosensitive channel の意義は十分に明らかになっていない。

一方研究代表者の所属するグループでは、海馬培養スライスにおいて、ポストシナプス(樹状突起スパイン)にケイジドグルタミン酸の2光子アンケイジングでグルタミン酸を局所投与する方法を開発した。刺激後樹状突起スパインは~200%にも達する非常に大きな体積増加を示し(一過性相)その後5-10分程度で50~100%程度の体積増加に戻り安定する(長期相)(Matsuzaki, M et al.,(2004) Nature.)。このような体積増加のonsetは刺激開始後10秒以内と極めて速く、シナプス可塑性(長期増強)の際生じるこのような急速な体積増加をもたらす機械的刺激による作用については、これまでほとんど研究がなされていない。

今回我々は、樹状突起スパインの体積増加がプレシナプス機能に機械的刺激により影響を与えうるか否かを検討することを試みた。電子顕微鏡を用いたシナプス形態に基づく研究によるとプレシナプスとポストシナプスの機能は相関しているとされる(Harris, KM, (1989) J. Neurosci.)。従って、シナプス可塑性が生じた場合、いずれかの時点でポストシナプスからプレシナプスへシナプス可塑性の情報が伝達される。ポストシナプスからプレシナプスのコミュニケーションがどのようにして達成されているかは現在残された課題である。我々はシナプスの機械的刺激を介した逆行性シナプス情報伝達の可能性について今回検討した。

## 2. 研究の目的

### (1) プレシナプス機能を定量する新規プローブの開発と評価

プレシナプス機能を評価するためには、実際に軸索線維を活動させ、シナプス後部において神経伝達物質放出を検出することによって行うことができる。しかしながら、この方法では放出確率を計算するために十分な回数刺激を繰り返す必要がある。我々のグループではプレシナプスの神経伝達物質放出確率と相関するSNARE複合体形成を定量化するイメージングプローブを開発することによって、リアルタイムにプレシナプス機能を評価することを試みた。

### (2) 機械的刺激を加えたときのプレシナプス機能の変化の検討

ラット海馬培養スライス錐体細胞樹状突起において、高浸透圧刺激、光依存的にスパイ

ン形態可塑性を誘導する融合タンパク質であるPA-racによるスパイン体積増加、シナプス可塑性刺激によるスパイン体積増加などの方法を用いてプレシナプスに機械的刺激を加え、プレシナプス機能の変化を調べる。これにより機械的刺激による逆行性情報伝達が存在するか否か、またその特性を明らかにできると我々は考えた。

## 3. 研究の方法

### (1) カルシウム測定実験系の確立

標本としてラット海馬培養スライスを用い、カルシウム検出タンパク質G-CaMP6sをCA1錐体細胞にGene gunを用いて発現させ、Schafferプレシナプス線維をガラス電極で刺激した。もしくはCA3領域にAAV(Adeno-associated virus)ベクターを用いてChR2(チャネルロドプシンタンパク質)を発現させ光刺激によってプレシナプス線維を活動させた。スパインの2光子カルシウムイメージングによって反応のあるスパインの可塑性刺激による放出確率(Pr)変化を定量した。

### (2) シナプス小胞SNARE複合体を検出するプローブによるPr変化の有無の検討。

シナプス小胞においてSNARE複合体形成が促進されることによりPrが上昇する。プレシナプスにおいて、SNARE複合体を検出するFRET(Foster resonance energy transfer)効果を利用するプローブを我々のグループでは開発することとした。具体的には形質膜上に発現するSyntaxin1A分子に蛍光タンパク質mTurquoiseを融合し、シナプス小胞膜上に発現するVAMP2分子に蛍光タンパク質Venusを融合して同一神経細胞軸索において発現させた。海馬培養スライスにおけるプレシナプス線維においてSNARE複合体が形成された場合、FRETによって蛍光寿命が短くなるため、リアルタイムでSNARE複合体の形成を評価することが可能であった。

### (3) 機械的刺激によるPr変化の有無の検討。

機械的刺激の一例としてSucrose高張液吹きかけによってプレシナプスに機械的刺激を導入してPrが変化するか否かを検討した。吹きかけはスライス表面からマイクロガラスピペットを用いて実施した。

### (4) 機能的なシナプス結合の有無の検討

ポストシナプスとプレシナプスを異なる蛍光色素で標識し、2光子顕微鏡で観察することにより、両者がオーバーラップする部分にプレシナプス機能の高い部分があるか否かを検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) プレシナプスプローブの開発と評価

我々はまず、プレシナプス機能を定量化する蛍光プローブを開発し培養海馬スライス標本において評価を行った(図1参照)。このプローブ(iSLIM)は神経伝達物質放出確率に相関するSNARE複合体形成を検出するために、それぞれ蛍光分子に融合された syntaxin 分子と VAMP2 分子で構成される。融合された蛍光分子の FRET を検出することによりシナプス前部機能が評価できるか否かを検討した。海馬培養スライス標本 Schaffer 側枝軸索線維においてシナプス前部機能をこのプローブを用いて可視化してみると、シナプス前部のふくらみ(synaptic bouton)の一部分にSNARE複合体形成の高い箇所が存在することがわかった。これは電子顕微鏡によるプレシナプス構造を可視化した場合と類似の位置であった。また、スパイン頭部体積とそのスパインに対応するシナプス前部機能は比例的な関係を有していた。さらに、シナプス後部局在タンパク質 PSD95 と、シナプス前部機能は、近接して局在することが観察された。以上からこのプローブは神経細胞形態をよく保存する培養海馬スライス標本においてシナプス前部機能を表示していると考えられた。

海馬 CA1 錐体細胞に結合するプレシナプスの場合はシナプス小胞の開口放出刺激前から SNARE 複合体形成が生じているが、インシュリンを放出する膵臓ベータ細胞では複合体形成は刺激前は生じていないことがこのプローブを用いて明らかとなった。すなわち、海馬シナプスにおいてシナプス小胞の開口放出が刺激後非常に素早く行われる仕組みが可視化された。

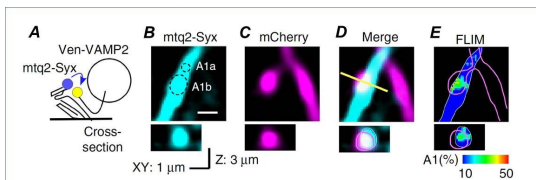


図1 プレシナプスプローブの動作原理と海馬培養スライス錐体細胞におけるSNARE複合体形成の検出 A. プレシナプスプローブ(iSLIM)模式図, mtq-Syx: mTurquoise-syntaxin1A, ven-VAMP2: venus-VAMP2). B. 軸索ブトン C. 樹状突起スパイン(mCherryタンパク質発現) D. 黄色の線の断面の図を下段に示す。 E. 蛍光寿命画像。A1値はSNARE複合体形成の程度を示す。(詳細は、Takahashi, et al. (2015) Nat. Commun.を参照)

##### (2) 機械的刺激によるプレシナプス機能変化の評価。

300 mM sucrose を用いた高浸透圧溶液を吹きかけることにより機械的な刺激を神経組織に与えた。そのときの变化的な変化を継時的に観察したところ、刺激直後からの急激な SNARE 複合体形成上昇が観察された。

また、シナプス可塑性刺激等によるスパイン体積増加などの機械的刺激が生じた際のシナプス前部機能の変化をこの機能プローブを用いて評価を行っている。予備的な結果

では、シナプス可塑性刺激によるスパイン体積増大時、あるいは PA-rac によるスパイン体積増大時にそれに伴うプレシナプス機能の上昇が観察された。

(3) スパイン細胞骨格制御タンパク質 cofilin によるシナプス可塑性制御の解明。シナプス可塑性情報が、一つのスパインからプレシナプスに伝達される可能性を上記では検討しているが、同時にスパインから他のスパインに可塑性情報が広がる可能性を解析することも同時に進めた。これは、スパインの体積増大に至る分子シグナル伝達の理解がプレシナプスに機械的刺激を与える過程の理解に不可欠だからである。解析の結果、樹状突起上の、シナプス可塑性刺激による細胞骨格制御タンパク質 cofilin のリン酸化が可塑性情報を制御していることが明らかになった。すなわち、脱リン酸化 cofilin を神経細胞内に灌流することで、スパイン収縮が惹起された。一方シナプス長期増大刺激によるスパイン体積増大の際にはリン酸化 cofilin が30分以上にわたって滞留することを示すことができた。これを取りまとめた論文報告した(Noguchi, et al. (2016) Sci. Rep.).

#### 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 6件)

Noguchi J, Hayama T, Watanabe S, Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H. State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. Scientific Reports. 2016: 6:32897. (査読有)  
DOI: 10.1038/srep32897.

Takehara H, Nagaoka A, Noguchi J, Akagi T, Kasai H, Ichiki T. Implantable Microfluidic Device with Hydrogel Permeable Membrane for Delivering Chemical Compounds and Imaging Neural Cells in Living Mice. J Photopolym Sci Technol. 2016: 29:513-518. (査読有)  
DOI: 10.2494/photopolymer.29.513.

Nagaoka A, Takehara H, Hayashi-Takagi A, Noguchi J, Ishii K, Shirai F, Yagishita S, Akagi T, Ichiki T, Kasai H. Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. Scientific Reports. 2016: 6:26651. (査読有)  
DOI: 10.1038/srep26651.

Takahashi N<sup>#</sup>, Sawada W<sup>#</sup>, Noguchi J<sup>#</sup>,

Watanabe S<sup>#</sup>, Ucar H, Hayashi-Takagi A, Yagishita S, Ohno M, Tokumaru H & Kasai H. (#Equally contributed). Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and cells. Nature Communications. 2015; 6: 8531. (査読有)  
DOI:10.1038/ncomms9531.

Takehara H, Nagaoka A, Noguchi J, Akagi T, Kasai H, Ichiki T. Lab-on-a-brain: Implantable micro-optical fluidic devices for neural cell analysis in vivo. Scientific Report. 2014: 4:6721. (査読有)  
DOI: 10.1038/srep06721.

Boinapally S, Huang B, Abe M, Katan C, Noguchi J, Watanabe S, Kasai H, Xue B, Kobayashi T. Caged Glutamates with -Extended 1,2-Dihydronaphthalene Chromophore: Design, Synthesis, Two-Photon Absorption Property, and Photochemical Reactivity. J Org Chem. 2014: 79(17):7822-7830. (査読有)  
DOI: 10.1021/jo501425p.

[学会発表](計 5件)

高橋 倫子、澤田 和可子、野口 潤、ハサン ウチャル、渡辺 恵、河西 春郎 (2016) 2光子励起蛍光寿命画像法を用いた SNARE 複合化の解析  
第 39 回日本神経科学大会  
2016 年 7 月 22 日, 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.

ハサン ウチャル、渡辺 恵、野口 潤、高橋 倫子、澤田 和可子、柳下 祥、河西 春郎 (2016) FRET-FLIM measurement with a trans-SNARE-probe detecting the mechanical force from dendritic spine to pre-synaptic bouton.  
第 39 回日本神経科学大会  
2016 年 7 月 22 日, 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.

高橋 倫子、澤田 和可子、野口 潤、河西 春郎 (2016) 膵内分泌腺の開口放出機構  
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2016 年 3 月 28 日, 福島県郡山市、ビッグパレットふくしま.

高橋 倫子、澤田和可子、野口 潤、渡辺 恵、河西 春郎 (2015) シナプス前終末における SNARE 複合化の 2 光子励起 FLIM 解析  
第 38 回日本神経科学大会  
2015 年 7 月 30 日, 兵庫県神戸市、神戸国際会議場.

野口 潤、渡辺 恵、高橋 倫子、Ucar Hasan、

河西 春郎 (2014) シナプス可塑性記録のためのプレシナプスプローブの海馬培養スライスにおける使用  
第 37 回日本神経科学大会  
2014 年 9 月 11 日, 神奈川県横浜市、パシフィコ横浜.

[図書](計 1件)

高橋良輔ほか編(執筆分担)、メディカルドゥ社、脳内環境辞典、2017、156 ページ (pp.48-49)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)  
取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_mic/index.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_mic/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口 潤 (NOGUCHI, Jun)

国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・室長

研究者番号: 40421367

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

河西 春郎 (KASAI, Haruo)

東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 60224375

高橋 倫子 (TAKAHASHI, Noriko)

東京大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 60332178

渡辺 恵 (WATANABE, Satoshi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 80302610

(4)研究協力者

ウチャル ハサン (UCAR, Hasan)

東京大学・大学院医学系研究科・博士研究員