

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700362

研究課題名（和文） 脂質シグナルのシナプス間クロストークへの関与

研究課題名（英文） Elucidation of effect of lipid signaling on cross talk between synapses

研究代表者

上田 善文 (UEDA YOSHIBUMI)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム研究チーム・基礎科学特別研究員

研究者番号：60391877

研究成果の概要（和文）:

活動によるスパインへの刺激の入力は、スパインの形状や連結の具合を変化させ、記憶の根底となる LTP を制御している。しかしながら、スパインの形状がどのような因子によって制御されているかについては、依然としてわかっていなかった。本研究では、PIP<sub>3</sub> が刺激依存的に、スパイン上の spinule の形成に必須であることを証明し、さらにその spinule に PIP<sub>3</sub> が蓄積することを証明した。この PIP<sub>3</sub> は、spinule を介して presynapse に送り込まれ、シナプスの逆行性シグナルとして働く可能性がある。

研究成果の概要（英文）:

Activity input to spines changes its morphology such as the size and shape related to structural plasticity, contributing to acquire long-term potentiation (LTP) underlying learning and memory. However what kind of factor regulates the change in the morphology remains. We found that the number of the spinule and the degree of PIP<sub>3</sub> accumulation in spinules increased in a PIP<sub>3</sub>-concentration dependent manner. Spinules accumulating PIP<sub>3</sub> may be sent to presynaptic side through trans-endocytosis proposed in electromicroscopy study, resulting in strengthen synapse connectivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸, PIP<sub>3</sub>, 蛍光寿命, 蛍光共鳴エネルギー移動, シナプス可塑性, スパイン

## 1. 研究開始当初の背景

神経回路網において、シナプスは、記憶、学習の根底をなす最小素子と考えられている。故に、シナプスにおいてシグナル分子がどのように振舞うのかを知ることは、記憶、学習を理解するうえで必須である。脂質分子、DAG および PIP<sub>3</sub> は、ホスファチジルイノシトール三リン酸 (PIP<sub>2</sub>) を基質としてそれぞれ、ホスホリパーゼ C およびホスファチジルイノシトール-3-キナーゼにより産生される。これらの脂質分子は、神経伝達物質などの刺激により産生し、シナプスの可塑性に重要であることが知られている。しかし、これらの結果は、脂質産生酵素の阻害剤と電気生理的手法を用いた研究から得られた結果であり、樹状突起に一万個近く存在するシナプスの総和から得られた情報である。個々のスパインは、個々の神経細胞から入力を受けているために、それぞれ独立した個性を持っており、個々のスパインで引き起こされるシグナルを観察することが必須である。これら一つのスパインでのシグナル伝達は、近年、隣接するスパインのシナプス可塑性に影響を及ぼすことが報告されている (Nature, vol 450, 1195-1200 (2007))。

## 2. 研究の目的

神経回路網において、シナプスは、記憶、学習の根底をなす最小素子と考えられている。シナプス後部(スパイン)に局在するグルタミン酸受容体とその下流のシグナリングが、どのようにシナプスの可塑性に関与しているかは現在不明である。ホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸 (PIP<sub>3</sub>) およびジアシルグリセロール (DAG) は、グルタミン酸受容体シグナルの直下に位置し、PKC、Akt、アクチン重合の調節、細胞膜やオルガネラの形態などに関与する、いわゆる「シグナルの司令塔」である。そこで、本研究では、申請者が開発してきた PIP<sub>3</sub> および DAG の FRET プロブを用い、単一のスパインにおいて、記憶学習の基礎となる、構造可塑性を引き起こしたときに、脂質分子のスパイン内および樹状突起上での広がりを観察し、隣接するスパインにどのように影響を及ぼすのかを探っていく。

## 3. 研究の方法

申請者は、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を基にした DAG および PIP<sub>3</sub> の新規蛍光プロブ (FRET プロブ)を開発し、培養細胞レベルで脂質分子の動態を明らかにしてきた (Nature Methods, 3:797 - 799 (2006). Nature Cell Biol.

5:1016-1022 (2003))。プロブの設計としては以下の通りである。CFP、YFP、脂質結合ドメイン (LBD、lipid binding domain) をプロブに導入する。このプロブの特徴は、LBD を選ぶことによって、興味のある脂質分子を検出することができることである。そこで、LBD として DAG を認識するために、C1 ドメイン、PIP<sub>3</sub> を認識するために、PH ドメインを用いた。CFP-LBD-YFP 間を剛直な、 $\alpha$  ヘリックスで連結し、このヘリックスに Gly-Gly を1箇所導入することによって、ここを起点にプロブが回転できるようにした。さらに膜局在シグナルを連結することで、興味のある膜に局在させ、その膜での脂質分子の産生を測定した。細胞膜内で DAG および PIP<sub>3</sub> が産生されると LBD に結合し、CFP、YFP 間の距離及び相対的配向の変化によって FRET が変化する。このように遺伝子工学的に開発した DAG および PIP<sub>3</sub> の蛍光プロブを flip と名付けた。現在、微小空間スパインで脂質動態を明らかにできるのは、このプロブのみである。

本研究では、神経回路網が in vivo の特異性を維持しているラット海馬スライスを用いた。その際問題となったのが、波長依存的な蛍光の散乱である。これは、2波長の蛍光の強度比を測る ratiometry を基にした脂質プロブの応答に影響を与え精度の高いデータが取るのが困難であった。そこで、Ratiometry を基にした Daglas および flip を fluorescence lifetime (FLIM) を基にしたプロブ (FLIM-flip) に作り変えた (図 1)。

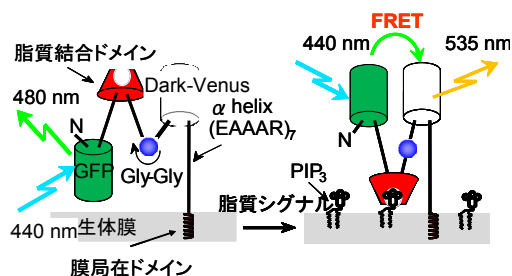


図1) 緑色蛍光タンパク質 (GFP)、蛍光を発しない YFP (Dark-YFP) をプロブに導入する。脂質分子を選択的に認識する部位として、脂質結合ドメイン (LBD、lipid binding domain) を導入する。CFP-LBD-YFP 間を剛直な、リックスで連結し、このヘリックスに Gly-Gly を1箇所導入し、ここを起点にプロブが回転できるようにした。膜局在ドメインを用いて膜に連結する。膜内で脂質分子が産生されると脂質結合ドメインに結合し、GFP、Dark-YFP 間の距離及び相対的配向の変化によって FRET が変化する。この際、GFP の蛍光寿命が変化するため、これより脂質の量を定量する。

方法としては、CFP を GFP に、YFP を蛍光を発しない YFP (darkVenus) に置換する。励起光によって、励起された GFP 分子は、 $\exp(-t/\tau)$  ( $\tau$  = fluorescence lifetime) の式に従い半減期 2.4 nsec で、標準状態まで減衰していく。この減衰する様子をプロットし、減衰曲線を作製し、蛍光寿命を導出する。近傍に蛍光の acceptor が存在すると FRET が起き、蛍光寿命は短くなる。FLIM の最大の利点は、蛍光寿命を観察するため、組

織内で光散乱が起きても、蛍光寿命にはほとんど影響を与えないことである。脂質分子が結合していない状態では、GFP および darkVenus 間の距離が遠く、FRET が起きず、蛍光寿命が長い。結合した状態では、FRET が起き、蛍光寿命は短くなる。この原理に従って、脂質分子の増減を可視化、定量する。FLIM の測定は、Becker&Hickl 社の SPC-730 を用いた。

近年、二光子顕微鏡下でグルタミン酸をマスキングした caged-グルタミン酸に photouncaging を施す事で、局所にグルタミン酸を産生させ、一つのスパインにおいて構造可塑性を誘導することが可能となった (Nature, 429 761-6 (2004))。申請者は、このシステムをいち早く取り入れ、現在構造可塑性を 80%の確率で成功させることが可能である。

#### 4 . 研究成果

1) 海馬スライス CA1 錐体細胞に遺伝子銃によって、申請者の作製した PIP<sub>3</sub> プローブを導入した。PIP<sub>3</sub> が、スパインに局在していることがわかった。PIP<sub>3</sub> の産生酵素の阻害剤を加えると、樹状突起よりも、スパインにおいて、PIP<sub>3</sub> の減少が起きた。これは、PIP<sub>3</sub> 産生酵素の活性が、スパインにおいて高いことを示している。過去の論文において、PIP<sub>3</sub> 産生酵素は、スパイン、樹状突起両方に存在するが、スパインに存在する AMAP 受容体と結合し、そこで、高い活性を保っていることが報告されている。申請者の結果は、この過去の文献と一致するものである。また、PIP<sub>3</sub> 代謝酵素の阻害剤を加えると、PIP<sub>3</sub> は、スパインよりも樹状突起において増加することがわかった。これは、PIP<sub>3</sub> 代謝酵素の活性が樹状突起に存在していることを示している。過去の論文において、PIP<sub>3</sub> 代謝酵素がスパインよりもっぱら樹状突起に存在することが示されている。この報告は、申請者が得たデータを支持するものである。これらの結果より、PIP<sub>3</sub> がスパインに局在しているのは、PIP<sub>3</sub> 産生および代謝酵素の活性の局在の違いによって起きるものであることがわかった。2) 次に、グルタミン酸をスパインに与え、構造可塑性を誘導すると、始めから存在した PIP<sub>3</sub> が速やかに消去されることがわかった。当初、この反応は、PIP<sub>3</sub> を脱リン酸化する酵素 PTEN タンパク質によるものだと考えられたが、実は、スパインのサイズの変化に伴う、PIP<sub>3</sub> の濃度が低い樹状突起からの膜の流入によって、PIP<sub>3</sub> 濃度が薄まった結果であることがわかった。よって、当初予想した、一つのスパインで産生した PIP<sub>3</sub> がその他のスパインに移動するという事は起きないことがわかった。

3) 次に、薄まった PIP<sub>3</sub> がスパインのどこに局在しているかを調べるために、スパイン内の PIP<sub>3</sub> の

局在を調べた。スパインにグルタミン酸アンケイジング法によって、シナプス可塑性を誘導したときに、時々、スパインの頭部より spinule が伸長することが観察された。Spinule と spine 全体の PIP<sub>3</sub> の濃度を比較したところ、PIP<sub>3</sub> は、spinule において、より蓄積していることが分かった。この spinule の頻度は、PIP<sub>3</sub> を増やした状態においては、特に顕著に spinule の数を増やし、より多くの PIP<sub>3</sub> を spinule に蓄積した。また、PIP<sub>3</sub> の濃度を変化させたときに、形成された spinule の長さには変化がなかった。これより、PIP<sub>3</sub> は、刺激依存的に、spinule の産生確率を上げることがわかった。

4) 電子顕微鏡によって、スパイン上 postsynaptic density (PSD) の隙間から spinule が産生していることが報告されている。また、グルタミン酸刺激、電気的なテタヌス刺激、高濃度のカリウム刺激によって、spinule が産生することが知られている。さらに、シナプス結合を形成しているシナプス前膜の中に spinule の破片が存在することが報告されている。Spinule の意義は、2つ考えられている。一つは、PSD を再構成するために、余分な膜として除かれる説。もう一つは、シナプス前膜に取り込まれた spinule が、逆行性のシグナルとして働いている可能性があるという説である。申請者の研究において、グルタミン酸刺激を受けたスパインは、spinule を形成し、そこに PIP<sub>3</sub> が蓄積することがわかった。これは、電子顕微鏡の研究から提唱されている trans-endocytosis によって、シナプス前膜に spinule が送られ、シナプスの結合の強化につながっている可能性がある。

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 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  
上田 善文 (UEDA YOSHIBUMI)  
独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム  
研究チーム・基礎科学特別研究員  
研究者番号：60391877