

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04280

研究課題名(和文) アストロサイトとシナプスのコンタクトダイナミックスの機構

研究課題名(英文) Mechanisms underlying astrocyte-synapse contact dynamics

研究代表者

合田 裕紀子 (GODA, YUKIKO)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：40614897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス強度の設定とシナプスリモデリングを誘発・制御する、アストロサイトとシナプスのコンタクトダイナミックスの細胞および分子メカニズムへの知見を得ることを目的とした。海馬においてアストロサイト特異的に発現を誘導するベクターを構築して、最適なプロモーターを評価し、ウイルス作成およびウイルスインジェクションシステムを導入して、海馬急性切片においてのアストロサイト特異的な遺伝子操作を伴う実験を稼動させた。またアストロサイトとシナプスのコンタクトサイトでアストロサイトに発現するギャップ結合分子がシナプス強度制御に関わることを新たに見いだした。

研究成果の概要(英文)：Towards the goal of characterizing the dynamic interaction between astrocytes and synapses and identifying the underlying molecular mechanisms, we first constructed astrocyte-specific probes and validated promoters for astrocyte-specific expression. We then established virus production and stereotactic injection system to enable astrocyte-specific molecular manipulation in acute hippocampal slice preparations. Furthermore, we explored the role for gap junctions, which had previously been implicated in affecting astrocyte-synapse structural contacts, and identified a functional role for the connexins, the gap junction proteins, in controlling synaptic strength and plasticity.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：シナプス強度 シナプス可塑性 アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

シナプス回路の制御メカニズムは未だに完全に理解されていない。シナプスの伝達効率(シナプス強度)は神経細胞の活動により変化して可塑性をおこす。とくに学習に伴うヘップ型シナプス可塑性は記憶形成に重要な役割を果たし、そのシナプス強度変化は活性化したシナプスで特異的に起こるとされてきた(Chen and Sabatini, 2012; Yuste, 2013)。しかしながら、必ずしも学習シグナルを直接受けていなくても、場合によっては近隣シナプスでも学習シグナルの入力の影響を受けてシナプス強度変化が起こる(Harvey & Svoboda, 2007; Govindarajan et al., 2011; Lynch et al., 1977; Scanziani et al., 1996)。またシナプス回路形成の過程ではシナプス間の競合によってシナプス強度変化を促してシナプス刈り込みが生じ(Colman et al., 1997; Hashimoto & Kano, 2003)。成熟したシナプス回路でも同様にシナプス間の競合が起こり、シナプス強度変化を左右していると言われている。したがって、個々のシナプスが特異的にその強度を調整するだけではなく、その上にシナプス間の相互的な強度制御機構の存在があると思われる。

グリア細胞の一種であるアストロサイトは、従来の認識ではパッシブに神経細胞の機能を保持して、主には脳内環境を整備する役割を果たしていると言われてきた。ところが近年において、アストロサイトがアクティブにシナプス伝達制御に関与していることが認められつつある(Araque et al., 2014; Min et al., 2012)。一個のアストロサイトはその微細に伸びる突起上に多くのシナプスとの接点を持ち、かつアストロサイト同士でギャップ結合による合体体を形成する。したがって、アストロサイトは局所的と統合的な双方のシナプス制御シグナリングに適している。とくに、海馬ではアストロサイトがヘップ型シナプス可塑性に伴う近隣シナプスの強度変化を促進しているとの報告がある(Chen et al., 2013; Manzoni et al., 1994; Serrano et al., 2006)。

当研究チームでは、海馬分離培養細胞を用いて、意図的にシナプス可塑性を起こしていない基底状態でアストロサイトがシナプス強度を調整していることを新しく見いだした。アストロサイトのカルシウムシグナリングを阻害すると、通常起こる学習シグナルに伴う近隣シナプスの強度変化が抑制されることを確認した。興味深いことに、学習シグナルの刺激がない基底状態でアストロサイトのカルシウムシグナリングを阻害すると、シナプス強度の分布が狭まり、類似化がみられた。その結果、海馬分離培養細胞ではアストロサイトのシグナリングが常にシナプス強度の差異を広げていることがわかった。さらには、ネイティブな海馬回路でもアストロサイトが同様な働きを持つかどうか

かの課題が残された。

## 2. 研究の目的

本研究においては、シナプス強度の設定とシナプスリモデリングを誘発・制御する、アストロサイトとシナプスのコンタクトダイナミックスの細胞及び分子メカニズムへの知見を得ることを目的とした。その一角として、アストロサイト突起における骨格分子の制御を観察してその制御機構への洞察を深めることを目指した。同時に、アストロサイトシグナリングによるシナプス強度制御機構の解明へ向けて、海馬本来の回路構造が維持される海馬急性切片でアストロサイト特異的な遺伝子操作を伴う実験を進めて行く体制を整えた。

## 3. 研究の方法

(1) 当チームで深い経験がある海馬分離培養細胞を用いてアストロサイトに発現するタンパクを蛍光ライブイメージング手法と免疫染色法で観察した。

(2) また、クローニングにより、アストロサイト特異的に標的分子を発現するベクターを構築して、その発現を分離培養細胞で確認した。その後アストロサイト発現用ベクターをもとにアデノ随伴ウイルス(AAV)を作成し、マウス脳海馬への感染実験を試みて、ウイルスタイター、ウイルス注入後のタイミングなど、stereotaxic gene deliveryによるアストロサイト発現の最適条件を検討した。

(3) AAVのインジェクションシステムが整った後、急性切片によるイメージングと電気生理実験を行った。

## 4. 研究成果

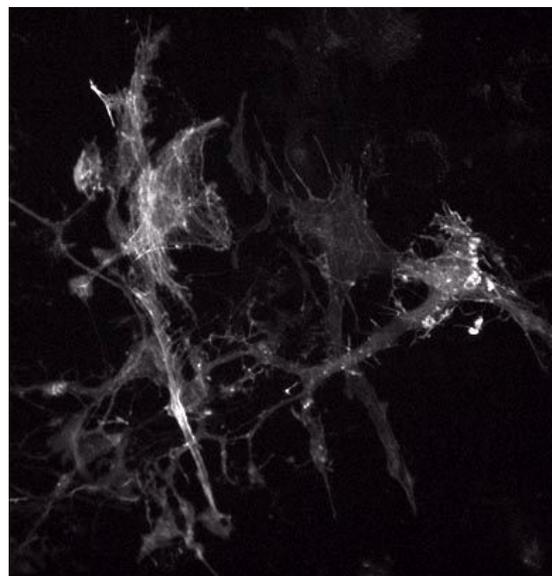


図1 アストロサイト LifeAct-GCaMP3 シグナル

(1) 海馬分離培養細胞を使い、シナプス入力とアストロサイト内の活性化の関連性を観察するためにアストロサイトに GCaMP3 を発現させ、カルシウムシグナルを可視化した。様々なシグナリングがあり、シナプス入力に依存的なシグナルを同定するのは困難であった。したがって、シナプスと接触するとされるアストロサイト突起のカルシウムシグナルを識別する目的で、骨格分子であるアクチンをターゲットする LifeAct に GCaMP3 を連結してアストロサイトに発現させた(図1)。想定どおりタグなしの GCaMP3 と比べると LifeAct-GCaMP3 のシグナルは細胞骨格に沿っていて、アストロサイト突起のシグナルの観察が可能だとわかった。

(2) 海馬本来の回路構造でアストロサイト特異的な遺伝子操作を行うために、ウイルス作成およびウイルスインジェクションシステムを導入した。海馬において、アストロサイト特異的に外因性タンパク(e.g. LifeAct-GCaMP3, ArchT, Cre recombinase)の発現を誘導するベクターを構築して、AAV5, AAV9, DJ8 の異なる serotype の AAV を作成してプロモーターの評価を行った。ヒト由来の full length GFAP promoter、あるいは視覚野でアストロサイト特異的な発現が確認されている、短縮された GFAP104 promoter (Perea et al., 2014)、GFAP104 からさらに 164bp を削ったバージョン (Ortinski et al., 2010) を精査した。それぞれの標的分子についてニューロンへのオフターゲット発現を NeuN ラベルとのダブル免疫染色法で観察した結果、海馬 CA1 領域ではニューロンへの発現が感染した細胞の 1% 以下だった。AAV serotype については、DJ8 は多量の発現を促進するもののウイルスインジェクション後 3 週間経つと感染した組織の健康状態が悪化するため、長期間の発現を必要とする実験には AAV9 が適していた。AAV5 はアストロサイトへの発現量が弱かった。この実験で得られたウイルス作成およびウイルスインジェクションシステムを用いて、野生型マウスのアストロサイトに ArchT、あるいは GluN1 floxed mice のアストロサイトに Cre を発現させ、アストロサイトの過分極と NMDA 受容体 GluN1 サブユニットノックダウンがシナプス強度制御のバラツキを減少させることを新しく見いだした(Letellier et al., 2016)。

(3) アストロサイトとシナプスのコンタクトサイトでアストロサイトに発現するギャップ結合分子がシナプス伝達に与えるかを検討した。アストロサイト特異的なギャップ結合分子の発現ベクターを作成したが、海馬アストロサイトの培養細胞では非常に弱い発現しか確認出来なかったため、薬理学的実験を優先的に進行させた。アストロサイトのギャップ結合分子を薬理学的に阻害するとシナプス強度のバラツキが減り、その状態

でシナプス可塑性を誘発すると、通常刺激されていない異シナプスでおこる可塑性の減少がみられた。したがって、アストロサイトのギャップ結合分子はシナプス強度制御に関わることを確認した。次にアストロサイト間のギャップ結合によるカップリングの度合いを、一個のアストロサイトへ色素を注入して調べた。パイロット実験では、10 個前後のアストロサイトのカップリングが見受けられたが、急性切片の状態などによりカップリングの個数差が大きかったため、今後はさらなる条件検討が必要とみなされる。

#### <引用文献>

- Chen Y, Sabatini BL (2012) *Curr Opin Neurobiol* 22, 389-396.  
Yuste R (2013) *Annu Rev Neurosci* 36, 429-449.  
Harvey CD, Svoboda K (2007) *Nature* 450, 1195-1200.  
Govindarajan A, et al. (2011) *Neuron* 69, 132-146.  
Lynch G, Dunwiddie T, Gribkoff V (1977) *Nature* 266, 737-739.  
Scanziani M, Malenka R, Nicoll R (1996) *Nature* 380, 446-450.  
Colman H, Nabekura J, Lichtman JW (1997) *Science* 275, 356-361.  
Hashimoto K, Kano M (2003) *Neuron* 38, 785-796.  
Araque A, et al. (2014) *Neuron* 81, 728-739.  
Min R, Santello M, Nevian T (2012) *Front Comput Neurosci* 6, 93.  
Chen J, et al. (2013) *Glia* 61, 178-191.  
Manzoni OJ, Manabe T, Nicoll R (1994) *Science* 265, 2098-2101.  
Serrano A, et al. (2006) *J Neurosci* 26, 5370-5382.  
Perea et al., (2014) *Nat Comm* 5, 3262.  
Ortinski et al., (2010) *Nat Neurosci* 13, 584-589.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Letellier M, Park YK, Chater TE, Chipman PH, Gautam SG, Oshima-Takago T, \*Goda Y. (2016) Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks. 査読有, *Proc Natl Acad Sci USA* 113, E2685-2694.

[学会発表](計8件)

平成29年度

Blankenese Conference on 'Synaptic Plasticity versus Stability - Information Uptake, Processing and Coding'. Yukiko Goda. Hamburg-Blankenese, Germany. ISN-ESN Advanced School 'The Energetic Brain', Lecturer, Yukiko Goda. Varennes Jarcy, France. International Symposium on Frontiers in Neurophotonics. Yukiko Goda. Bordeaux, France.

平成28年度

Max Planck Florida Institute for Neuroscience, Sunposium 2017. Yukiko Goda. Jupiter, Florida, USA. Glia Assembly Summer Workshop. Yukiko Goda. Yamagata, Japan. National University of Singapore, Department of Physiology Symposium on "Models of Physiology and Disease", Yukiko Goda. Singapore.

平成27年度

FAONS Congress and 11th Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society. Yukiko Goda. Wuzhen, China. CFC symposium "Illuminating neuronal circuits: development to function". Yukiko Goda. Seoul, Korea.

〔図書〕(計0件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 裕紀子 (GODA, Yukiko)  
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー  
研究者番号：40614897

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

マチュー・レテリエ (LETELLIER, Mathieu)  
パク・ユンギョン (PARK, Yun Kyun)  
トーマス・チャーター (CHATER, Thomas)  
ピーター・チップマン (CHIPMAN, Peter)  
スニタ・ゴータム (GAUTAM, Sunita)  
河井 敦 (KAWAI, Atsushi)