

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18338

研究課題名(和文)新可視化実験系を用いた海馬抑制性長期増強の発現機構の解明

研究課題名(英文)Change of gamma-aminobutyric acid receptors amount during hippocampal long-term potentiation of inhibition

研究代表者

田中 洋光(Tanaka, Hiromitsu)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：30705447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス入力に応じて情報処理機能が変化する「シナプス可塑性」は、記憶・学習の細胞基盤と考えられている。本研究では、比較的研究が遅れている抑制性シナプス可塑性に着目し、海馬の抑制性長期増強や抑制性長期抑圧が起こる際に、GABAA受容体の数が、シナプス後部タンパク質Gephyrinと共に増減することを示唆する結果を、全反射顕微鏡を用いて得た。また、この手法を発展させて、海馬の長期抑圧発現時におけるグルタミン酸受容体のエンドサイトーシスの一過的な増加の可視化に成功した。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of synaptic transmission changes depending on the pattern of neuronal activity. This synaptic plasticity has been regarded as a cellular basis of learning and memory. In this study, we have suggested that the amounts of gamma-aminobutyric acid receptor on postsynaptic membrane and gephyrin are changed during hippocampal inhibitory synaptic plasticity by experiments using total internal reflection fluorescence microscopy. In addition, we have succeeded in visualization of transient increase of glutamate receptors' endocytosis during hippocampal long-term depression

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：神経科学 分子生物学 ライブイメージング シナプス可塑性 抑制性長期増強 抑制性長期抑圧 GABA受容体 全反射顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

我々が何かを学習する時、または記憶が形成される時には、神経細胞間の情報を伝える部位「シナプス」において、情報伝達の効率に変化すると考えられている。シナプスには大別して、興奮性シナプスと抑制性シナプスがある。興奮性シナプスは、シナプス後細胞における活動電位の発生を促進させるシナプスで、抑制性シナプスは逆に、シナプス後細胞における活動電位の発生を抑制するシナプスである。先行研究ではとりわけ、海馬の興奮性シナプスの可塑的变化について、国内外を問わず多くの研究がなされてきた (Malinow & Malenka, *Annu. Rev. Neurosci.*, 2002; Huganir & Nicoll, *Neuron*, 2013)。一方で、抑制性シナプス可塑性についての研究は大きく遅れている。

近年、中枢神経系における抑制性シナプスの伝達は、細胞の発火パターンを調節するだけでなく、神経発生や回路形成などにも重要な役割を担うことが明らかになってきた (Luscher et al., *Neuron*, 2011; Tyagarajan & Fritschy, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2014)。例えば海馬では、抑制性シナプス応答が持続的に増強する抑制性長期増強現象 (iLTP: long-term potentiation of inhibition) が、CA1 錐体細胞における時間依存的な興奮性 LTP の形成に重要である (Lamsa et al., *Nat. Neurosci.*, 2005)。また、抑制性シナプス伝達の異常は、てんかん、不安障害、うつ病、統合失調症などの精神疾患に関連していることも明らかになってきた (Marin, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2012; Lewis, *Eur. J. Neurosci.*, 2012)。これらの知見から、抑制性シナプス伝達機能の生理的意義は極めて深いと考えられ、海馬 iLTP 発現機構の解明が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では iLTP 発現時における GABA_A 受容体数の変化を明らかにすることを目指した (図 1)。GABA_A 受容体は、中枢神経内で速い抑制性シナプス応答を担う Cl⁻チャンネル共役型受容体であり、主に α 、 β 、 γ サブユニットからなる複種類の 5 量体を形成する。海馬 iLTP 発現時に、いかなる型の GABA_A 受容体の数が、どのように増加または減少するのか？また、シナプス後膜の足場タンパク質 Gephyrin が関与するのか？本研究では、これらの分子を直接可視化することで、以上の未解決の問題点に取り組んだ。

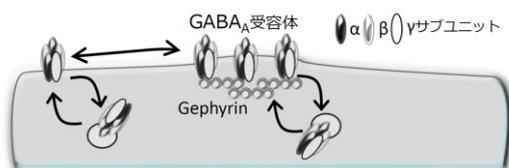


図 1. 本研究の目的。シナプス可塑性発現時に GABA_A 受容体や Gephyrin の量は変化するのか？

3. 研究の方法

(1) 抑制性シナプス後膜における GABA_A 受容体の新たな可視化実験系の構築

研究代表者は先行研究より、海馬の興奮性シナプス後膜内外における AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の動態を高シグナル・ノイズ比、高時空間分解能でライブイメージングできる実験系を構築した (Tanaka & Hirano, *Cell Rep.*, 2012; Tanaka et al., *Nat. Protoc.*, 2014)。具体的には、シナプス後膜内外における受容体を効率良く、安定的に可視化するために、全反射顕微鏡を用いた。全反射顕微鏡は、背景光を極端に減らすことにより、ガラス面の極近傍 (約 100 nm) にある蛍光分子のみを観察できる (Toomre & Mainstein, *Trends Cell Biol.*, 2001)。条件によっては、蛍光 1 分子をも観察可能で定量性に優れている。本研究ではこの手法を応用して、抑制性シナプス形成を誘導する型のニューレキシンをガラス面にコートし、その上にラットの海馬神経細胞を初代培養した。そして、蛍光標識した GABA_A 受容体、及び抑制性シナプス後部タンパク質である Gephyrin を観察した (図 2)。

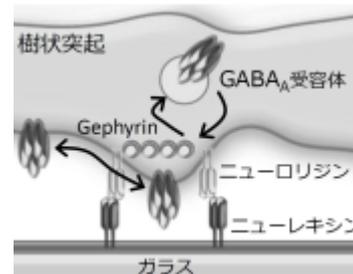


図 2. ガラス面上に形成された抑制性シナプス後膜様構造の模式図。ガラス面にコートしたシナプス接着分子ニューレキシンはニューロリジンと結合し、抑制性シナプスへの分化を誘導する。

(2) 抑制性シナプス可塑性の誘導実験

神経細胞に低濃度の NMDA (N-methyl-D-aspartate) を投与して比較的弱く刺激することにより、iLTP を誘導した (Luscher et al., *Neuron*, 2011)。また、GABA_A 受容体と Gephyrin の量的変化が iLTP 特異的であるか否かを検討するために、異なるシナプス可塑性の抑制性長期抑圧 (iLTD: long-term depression of inhibition) の誘導実験も行った。iLTD は、iLTP とは逆に、抑制性シナプス応答が持続的に減少する可塑性である。神経細胞に高濃度の NMDA を投与して強く刺激することにより、iLTD を誘導した (Marsden et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.*, 2010; Luscher et al., *Neuron*, 2011)。

(3) シナプス可塑性発現時における受容体の

エンドサイトーシスの頻度変化解析

研究代表者はこれまで、AMPA 受容体の個別のエンドサイトーシスを可視化する新たな実験系を構築した。この系をシナプス可塑性研究にも適用するために、まずは比較的知見の多い長期抑圧 (LTD) 発現時における AMPA 受容体のエンドサイトーシスに応用した (Beattie et al., Nat. Neurosci., 2000; Lee et al., Neuron, 2002; Collingridge et al., Nat. Rev. Neurosci., 2010)。具体的には、U 字形で先端に小孔を開けたガラス管 (U 字管) を全反射顕微鏡に追加導入し、細胞外液の pH を 6.0 と 7.4 に素早く繰り返し切り替えることを可能にした。そして、AMPA 受容体を SEP (super-ecliptic pHluorin) で蛍光標識し全反射顕微鏡で観察した。SEP は、GFP 変異体の一つで、細胞膜表面やエンドサイトーシスされた直後の小胞内などの pH 中性下で発現した場合に、緑色蛍光を発する。そのため U 字管を用いると、エンドサイトーシスされた直後の AMPA 受容体のみを可視化できる (図 3)。

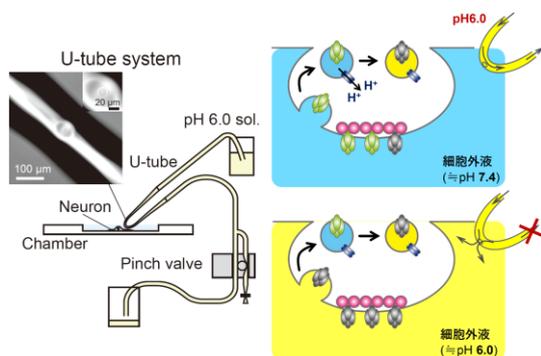


図 3. 個々のエンドサイトーシスの可視化方法。SEP が pH7.4 では蛍光を発し、pH6.0 では消光する性質を用いて、酸性化がまだ始まっていない小胞内にある AMPA 受容体を可視化できる。

4. 研究成果

(1) 抑制性シナプス後膜における GABA_A 受容体の新たな可視化実験系の構築

ニューレキシン (Neurexin) とニューロリジン (Neurologin) には、多数のスプライシングバリエーションがあり、その結合の組み合わせによって興奮性シナプス、または抑制性シナプスへの形成が誘導される (Ullrich et al., Neuron, 1995; Südhof, Nature, 2008)。本研究では、特に抑制性シナプスへ誘導する Neurexin1 β (+4) と Neurologin2 との結合に着目し、その型のニューレキシンとニューロリジンを用いた。また、複数のサブユニット構成がある GABA_A 受容体から、海馬のシナプスに比較的多く存在する構成 ($\alpha 2 \beta 3 \gamma 2$) と、シナプス外に存在する構成 ($\alpha 5 \beta 3 \gamma 2$) に着目した (Crestani et al., Proc. Natl Acad. Sci. U S A., 2002; Kasugai et al., Eur. J. Neurosci., 2010)。具体的には、上述のニューレキシンをコートしたガラ

ス面上に海馬の神経細胞を培養した。そして、SEP で蛍光標識した $\gamma 2$ サブユニット ($\gamma 2$ -SEP) と、赤色蛍光タンパク質 TagRFP_T で蛍光標識した Gephyrin (RFP-Gephyrin) を観察した (図 3)。その結果、全反射顕微鏡の観察領域内に抑制性シナプス後膜様構造の形成が確認できた。

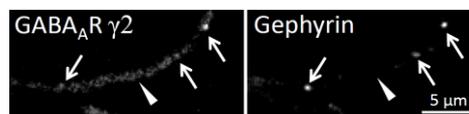


図 4. 全反射顕微鏡を用いた抑制性シナプス後膜内外での、GABA_A 受容体と Gephyrin の観察例。矢印はガラス面上に形成されたシナプス後膜、矢頭はシナプス外を示す。

(2) 抑制性シナプス可塑性の誘導実験

次に、(1)で形成されたシナプス後膜内外における GABA_A 受容体と Gephyrin が、iLTP 発現時においてどのように変化するかを明らかにするために、タイムラプスイメージングを行った (図 5)。各分子の輝度変化を解析した結果、RFP-Gephyrin のシグナルはコントロール (NMDA を溶かすための溶媒のみを投与) に比べて、刺激数分後で有意に増加した。また、 $\gamma 2$ -SEP は刺激十数分後で有意に増加した。以上の結果より、抑制性シナプス後部での iLTP 発現時には、まず足場タンパク質の Gephyrin が増加し、その後 GABA_A 受容体が増加することが示唆された。

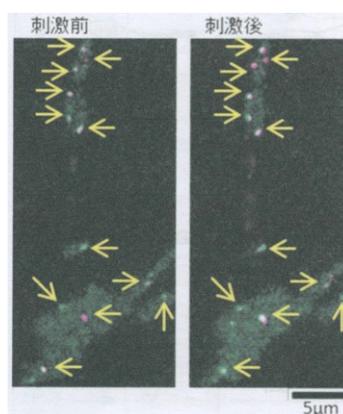


図 5. iLTP 誘導刺激前後での輝度変化。 $\gamma 2$ -SEP (緑) と RFP-Gephyrin (マゼンタ) の輝度は共に、刺激後増加し、シナプス後膜 (矢印) での集積が観察された。

この結果は、Gephyrin が受容体の足場を提供する以上の機能を持つ可能性を示唆する意外性の高い結果であった。そこで、この特徴の一般性を調べるために、異なるシナプス可塑性の iLTD 発現時における GABA_A 受容体と Gephyrin をタイムラプスイメージングした (次ページの図 6)。解析の結果、抑制性シナプス後膜における RFP-Gephyrin と $\gamma 2$ -SEP のシグナルは共に、刺激数分後に有意に減少した。以上の結果より、Gephyrin はシナプス可塑性を誘導する刺激依存的に、その量を増減する性質があることが示唆された。

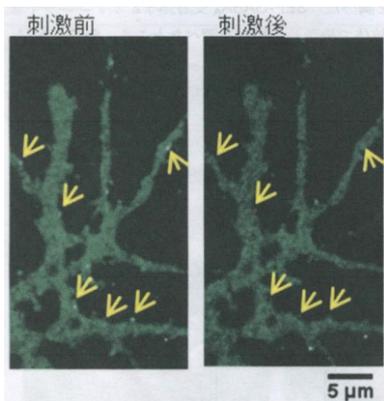


図 6. iLTD 誘導刺激前後での輝度変化。iLTP とは逆に、 $\gamma 2$ と Gephyrin の輝度は共に、シナプス後膜（矢印）において刺激後減少した。

(3) シナプス可塑性発現時における受容体のエンドサイトーシスの頻度変化解析

(2)より明らかとなった受容体数の変化は、エキソサイトーシス、エンドサイトーシス、側方移動の組み合わせにより起こると考えられる。しかしながら、これまでの実験系だけではエンドサイトーシスを効率的に観察できていなかった。そこで研究代表者は、U 字管を新たに追加導入することで、個々のエンドサイトーシスの可視化に成功した。そして、この手法をシナプス可塑性研究に適用した。まずは、比較的知見の多い海馬 LTD 発現時における AMPA 受容体のエンドサイトーシスに着目した。これまで、AMPA 受容体のエンドサイトーシスがいつ神経細胞のどこで増加するのか、十分に明らかでなかった。そこで本研究では、LTD 発現を NMDA 投与で化学的に誘導し、刺激前後における AMPA 受容体サブユニット GluA1 のエンドサイトーシスをタイムラプスイメージングした (図 7)。解析の結果、興奮性シナプス後膜における GluA1 のエンドサイトーシスが刺激直後に増加することを明らかにした (Fujii et al., *Gene Cells*, published online)。

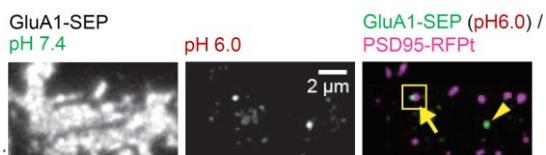


図 7. シナプス後膜近傍（矢印）またはシナプス外（矢頭）で起こった GluA1 のエンドサイトーシス例。細胞外液を一過的かつ局所的に pH7.4 から pH6.0 へ変えると、エンドサイトーシスした直後の受容体の蛍光シグナルが観察できた。

以上をまとめると、本研究により①全反射顕微鏡の観察領域内に抑制性シナプス後膜という特定の細胞膜構造を誘導形成させた、② iLTP や iLTD といった抑制性シナプス可塑性発現時における $\gamma 2$ サブユニットを含む GABA_A 受容体や Gephyrin の経時的かつ量的変化を明らかにした、③LTD 発現時における AMPA 受容体のエンドサイトーシスの一過的な頻度増加を明らかにした、という大別して

3つの成果を挙げられた。これらの成果は、抑制性シナプス可塑性発現時における神経伝達物質受容体とシナプス後部タンパク質の変化を、リアルタイムにタイムラプスイメージングした国内外で初めての研究と位置付けられる。また、興奮性シナプスにおける受容体のエンドサイトーシスを長時間観察できたことで、今後、抑制性シナプスにおける受容体の動態変化解析も展開できると期待される。これにより両者の知見を統合把握することで、哺乳類の中枢神経内でどのようにシナプス伝達が制御されているのかを理解する研究へつなげられると思われる。

今後の展望としては、シグナル・ノイズ比の良い新たなエンドサイトーシスの可視化法を抑制性シナプス可塑性に適用し、記憶・学習が成立する基礎過程の解明に貢献する。具体的には、iLTP または iLTD 発現に際して、 $\gamma 2$ サブユニット等を含む GABA_A 受容体のエンドサイトーシスの頻度変化を解析することで、どのようなサブユニット構成の GABA_A 受容体のエンドサイトーシスがシナプス可塑性の発現に寄与するのを明らかにする。また、この方法をアルツハイマー病の実験モデル等に応用することで、シナプス病変の病態解明やその治療薬開発への貢献を目指す。

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 1 件)

- ① Shumpei FUJII, Hiromitsu TANAKA, Tomoo HIRANO. “Detection and characterization of individual endocytosis of AMPA-type glutamate receptor around postsynaptic membrane” *Genes to Cells*, 査読有, published online
DOI: 10.1111/gtc.12493

[学会発表] (計 15 件)

- ① 田中洋光 「シナプスにおける受容体動態の可視化法構築とその応用展開」大阪市大セミナー、大阪市立大学 (大阪)、2017 年 5 月 12 日
- ② 田中洋光 「人工シナプス後膜の形成法開発と神経変性疾患研究への応用」第 6 回神経内科リサーチセミナー、東北大学 (仙台)、2017 年 5 月 10 日
- ③ Hiromitsu TANAKA “Imaging pathological effects of amyloid beta oligomers at synapses” The UK-Japan Spring Neuroscience Symposium, 京都ガーデンパレス (京都)、2017 年 3 月 16 日
- ④ 田中洋光 「シナプス後膜における神経伝達物質受容体の動態変化と数的変化の定

量解析」定量生物学の会 第 8 回年会、
岡崎コンファレンスセンター (岡崎)、
2017 年 1 月 8-9 日

- ⑤ Junichiro Funahashi, Hiromitsu Tanaka, Tomoo Hirano “Dynamics of synaptic vesicle protein after single vesicle exocytosis at a hippocampal presynaptic active zone recorded by a novel live-cell imaging method” Neuroscience 2016 (Society for Neuroscience), San Diego (USA), 2016 年 11 月 14 日
- ⑥ Shumpei Fujii, Hiromitsu Tanaka, Tomoo Hirano “Analyses of cell-surface amount, individual endo- and exocytosis of AMPA receptors, revealed suppression of exocytosis is important in hippocampal LTD” Neuroscience 2016 (Society for Neuroscience), San Diego (USA), 2016 年 11 月 13 日
- ⑦ 田中洋光 「シナプス形成を誘導する接着分子と全反射顕微鏡の特性を利用したシナプス機能素子の動態イメージング」日本発生物学会秋季シンポジウム 2016、三島市民文化会館 (三島)、2016 年 10 月 19 日
- ⑧ 田中洋光、坂口大輝、平野丈夫 「アミロイドベータは海馬長期増強に際して GluA1 サブユニットを含む AMPA 型グルタミン酸受容体のエキソサイトーシスを阻害する」第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (横浜)、2016 年 7 月 21 日
- ⑨ 田中洋光、藤井俊平、平野丈夫 「シナプス後膜内外におけるグルタミン酸受容体の個々のエキソサイトーシスとエンドサイトーシスの検出法開発 (口演発表)」第 68 回日本細胞生物学会大会、京都テルサ (京都)、2016 年 6 月 15 日
- ⑩ Hiromitsu Tanaka, Shumpei Fujii, Tomoo Hirano “New method to live-cell image individual exocytosis and endocytosis of glutamate receptors in postsynaptic and extrasynaptic membrane (ポスター発表)” 第 68 回日本細胞生物学会大会、京都テルサ (京都)、2016 年 6 月 15 日
- ⑪ 船橋潤一郎、田中洋光、平野丈夫 「海馬シナプス前部におけるエキソサイトーシスとエンドサイトーシスの全反射顕微鏡による可視化」第 93 回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター (札幌)、2016 年 3 月 22 日
- ⑫ 藤井俊平、田中洋光、平野丈夫 「海馬長期抑圧時における膜表面 AMPA 受容体の

量的変化の精確な推定」第 93 回日本生理学会大会、札幌コンベンションセンター (札幌)、2016 年 3 月 22 日

- ⑬ 船橋潤一郎、田中洋光、平野丈夫 「海馬シナプス前部におけるエキソサイトーシスとエンドサイトーシスの可視化」生理研研究会、生理学研究所 (岡崎)、2015 年 12 月 3 日
- ⑭ Hiromitsu Tanaka, Daiki Sakaguchi, Tomoo Hirano “Pathological effects of amyloid beta oligomers on synaptic plasticity” Brain protein aging and dementia control 1st international symposium、名古屋大学 (名古屋)、2015 年 10 月 9-10 日
- ⑮ 船橋潤一郎、田中洋光、平野丈夫 「海馬シナプス前部における Ca²⁺濃度変化とエキソサイトーシスの全反射蛍光顕微鏡による可視化」第 38 回日本神経科学大会、神戸国際会議場 (神戸)、2015 年 7 月 28 日

〔その他〕

所属研究室のホームページ

<http://www.neurosci.biophys.kyoto-u.ac.jp/main.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 洋光 (TANAKA Hiromitsu)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号： 30705447

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし