

研究種目：特別推進研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16002012

研究課題名（和文）2光子励起顕微鏡法を用いたシナプス・開口放出機構の研究

研究課題名（英文） Dynamics of synapse and exocytosis studied with two-photon excitation microscope

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

2光子励起顕微鏡法を用いて、ケイジドグルタミン酸の2光子アンケイジングを行うことにより、大脳のスパインにできるシナプスが学習刺激に伴って速く運動すること、その運動のアクチン基盤、また、スパインが長期間に涉って形態痕跡を留めるメカニズムを明らかにした。更に、ケイジドグルタミン酸と共用可能なケイジド GABA 試薬の開発に成功した。また、分泌現象を可視化する新たな原理を確立し、その分子基盤を可視化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Using two-photon microscope and uncaging of caged-glutamate compounds, we have revealed that rapid motilities of dendritic spines underlie plasticity of excitatory synaptic transmission in the cerebral cortex. We have visualized how actin reorganization underlies the motilities, and how spine sizes can be maintained over days even though the synapses are living small structures, and cannot avoid the natural fluctuations. We have developed a new caged-GABA compound, which can be used simultaneously with caged-glutamate compound. A new principle for visualization of exocytosis with two-photon microscope has been established, and applied to analyze conformational changes of responsible molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	113,700,000	34,110,000	147,810,000
2005年度	136,400,000	40,920,000	177,320,000
2006年度	102,900,000	30,870,000	133,770,000
2007年度	82,900,000	24,870,000	107,770,000
2008年度	49,800,000	14,940,000	64,740,000
総計	485,700,000	145,710,000	631,410,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：生物・生体工学、シグナル伝達、生理学、糖尿病、脳・神経

1. 研究開始当初の背景

2光子励起断層顕微鏡法は近赤外のフェムト秒レーザーを光源として用い、他の顕微鏡法では観察できないインタクトな組織内部の分子細胞機構の観察を可能とする。更に、我々はこの顕微鏡法の新しい応用を開拓した。まず、2光子励起をケイジドグルタミン酸に適用し、大脳皮質錐体細胞の樹状突起の単一スパイン（シナプス後部構造）を刺激する方法を確立し（*Nature Neurosci.* 4(2001)1086）、スパインの形態と機能に強い相関があることを解明した。加えて、この2光子励起グルタミン酸法によって、単一スパインレベルで可塑性を誘発することに成功し、シナプス可塑性の基盤に早期から形態変化が伴うこと、及び、長期可塑性はスパインの初期形態に依存することを見出している。このシナプスの形態・安定性・機能の連関は大脳の記憶の分子細胞的実態と考えられる（*Trends Neurosci.* 26(2003)360）。この仮説を検証するために、シナプスの形態・安定性・機能連関の定量的解明を進める（目的1-3）。更に、この形態可塑性や2光子励起グルタミン酸法を利用したシナプスレベルの脳機能解析法を開拓する（目的4）。一方、開口放出はシナプス前終末のみならず内分泌細胞、血液細胞の主要な機能でありシナプス後部でも重要な役割を果たすと考えられているが、観察技術の不足のために分子機構の解明が遅れている。我々は、2光子励起法の同時多重染色性を生かした開口放出の新しい網羅的解析法を分泌細胞において確立した（*Science* 297(2002)1349; *Nature Cell Biol.* 3(2001)253）。本研究ではこれを発展させ、代表的な分泌細胞の開口放出機構の解明を更に進め（目的5）、これに基づきシナプスでの開口放出の直接的測定法を開発し、シナプス機能の統合的理解を進める。

2. 研究の目的

以下のことを目的とした。

- (1) 海馬錐体細胞の単一スパインの形態可塑性分子基盤の解明
- (2) 大脳皮質の錐体細胞での単一シナプス

の可塑性法則の解明

- (3) 大脳皮質の単一シナプスの安定性の解明
- (4) 新規光刺激法の開発
- (5) 分泌細胞における開口放出の分子細胞機構の解明

3. 研究の方法

2光子励起顕微鏡を用いて、ネズミの脳標本や分泌標本を蛍光観察し、また、ケイジドグルタミン酸に代表される光刺激法を駆使して、単一シナプスレベルの大脳神経回路の性質を調べる。

4. 研究成果

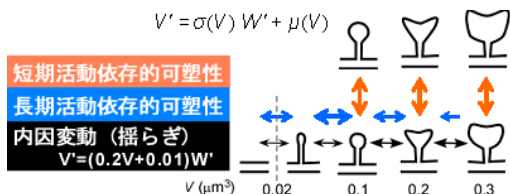
研究目的に沿い以下のような研究成果を発表した。

- (1) スパインの形態・運動におけるアクチン繊維基盤
我々は、大脳の興奮性シナプスができるスパインは、その頭部形態とグルタミン感受性が比例すること（*Nature Neurosci.* 4(2001)1086）、また、学習のシナプスレベルの過程と考えられている長期増強に際しては、スパインのグルタミン酸の感受性が増大し、同時に頭部が増大することを見出した（論文29）。こうして、スパインの形態多型性とシナプスの可塑性が整合的に説明されるようになった。この形態変化の分子基盤を明らかにするために、スパインの細胞骨格であるアクチン繊維の構築を光標識可能なGFPプローブ(PAGFP)で明らかにした。静的な状態では、動的なプールが頭部全体にあり、これが一分間に一回転することで、常に力を出しており、頭部の丸い形や大きさが維持される。頭部の大きさは、このアクチン重合能によって動的に決まっており、シナプス結合の強さは、この力によって確保されているらしい。頭部の基底部には安定なアクチン繊維がある。このプールの大きさはスパイン頭部体積の二乗に比例し、頭部の安定性が増す基盤となっていると考えられる。更に、頭部増大の際には、新たな安定なアクチン繊維が生成され、この繊維により頭部は増大する。記憶獲得に必須である、カルモジュリンキナー

ぜ II はこの繊維をクロスリンクし、安定化する働きがあり、これにより、この繊維は頭部内に留まり、記憶の安定化に関与する。即ち、スパインシナプスとは、極めて力学的なシナプスであり、その運動と機能が結びついた特殊なシナプスであることがわかった。
(文献 12)

(2) 蛋白質合成依存的なスパイン頭部増大
長期記憶の獲得には、蛋白質合成が必要であることが知られており、その分子細胞機構の解明がこの分野の焦点となっている。予想に反して、我々の見出した形態変化は蛋白質合成に依存性がなかった。ところが、スパインの刺激とその錐体細胞の活動電位を同期させる同期発火 刺激を与えたところ、特に漸増的な頭部増大が誘発され、それが蛋白質合成に強く依存することを見出しました。更に、同期発火刺激は脳由来神経成長因子 (BDNF) 分泌の適刺激であり、これにより頭部増大が蛋白質合成依存的に変わることを見出した。この研究は蛋白質合成に依存する固有のシナプスの形態 変化が存在することを示したもので、スパインは長期記憶の蓄積部位として適格であることを示します。同期発火とは、神経回路が能率よく情報を処理しているときに起きる現象です。今後、同期発火、栄養因子の分泌、スパインの構造変化などの関係についてより詳細な解明が進むと、脳機能や心の理解が進むことが期待される。(文献 10)

(3) 大脳スパインシナプス長期動態の原理
大脳のシナプスは学習や経験により機能や大きさを変える。スライス培養条件でスパインの形態変化を統計的に解析して、スパイン動態の全体像を理解することを可能にする研究を進めた。今回、我々は学習刺激がなくてもシナプスは長期的には揺らぎを示すことを見出した。この揺らぎの発見により、大脳シナプスの統計的な性質の理解が初めて可能となり、この揺らぎは我々の記憶の持続や忘却、適応性や創造力など多くの精神現象と関係することが示唆された。(文献 9)



(4) 2光子励起可能なケイジドGABA試薬の開発

我々は2001年に2光子励起可能なケイジドグルタミン酸試薬の合成に成功し、これにより単一グルタミン酸作動性シナプスを刺激することが可能となり、その利用が広まり、多くの知見が明らかになった。一方、我々は抑制性の伝達物質の2光子励起にも同時に挑戦していたが、長らくこれには成功しなかった。これは、GABAの誘導体を合成するとGABA受容体の阻害剤になりやすいためであった。この為、様々の誘導体を試行錯誤で試み、calboxy-di-nitroindoliny-GABAが阻害作用が比較的少なく、水溶性が高く、2光子吸収を示すことを見出した。これを用いて、錐体細胞のGABA受容体の機能地図を調べると、グルタミン酸受容体とは異なり、ほとんど単一スパインへの局在は見られず、細胞体や近位の樹状突起に主として広がって分布していることが明らかになった。これは、概略予想されていたことであったが、機能分布として捉えられたのは始めてであった。また、錐体細胞の軸索においてもその機能発現があった。これは、抑制性のchandelier細胞が軸索に投射することに対応する(文献4)。

このGABA受容体の機能を明らかにするには、グルタミン酸と同時に使用可能で、興奮と抑制の統合を見る必要がある。この目的で、我々は更に長波長で2光子励起可能なGABA試薬の開発にも取り組んでいた。この結果、N-decarboxymethyl-aminocoumarin (N-DCAC)-GABAを合成し、これが使用可能であることを見出した。この目的を達する為には、もう一つの困難を克服する必要があった。それは、グルタミン酸誘導体ですら、GABA受容体阻害剤になりやすい点である。我々は、2007年に開発した新規ケイジドグルタミン酸(CDNI-glutamate)がこの目的の為に有効であることを見出した。即ち、2光子吸収が高いため、GABA受容体を阻害しない濃度で、グルタミン酸受容体を刺激できた。こうして、励起波長の異なる2光子励起によって、二種類のケイジド試薬を投与した状態で、2種類の受容体を選択的に刺激することに始めて成功した。こうして、2光子励起によるグルタミン酸受容体の活性化で誘発した活動電位を2光子励起によるGABA受容体の活性化で抑制することに成功した。これまで、空間的に分布する興奮性シナプスと抑制シナプスを自由に刺激することができなかったため、興奮抑制の統合過程は実験的には調べられなかった。この神経シグナルの基本過程を今後調査可能となった(文献3)。

(5) 2光子顕微鏡による開口放出定量的測定法 (TEPIQ 法) の確立

カルシウム依存性開口放出は神経・分泌細胞の機能の基本であるが、その分子細胞機構の解明は難航を極めている。関係する分子がわかってきても事態は改善されていない。その理由の一つは、開口放出過程は基本的に多数の分子や細胞構造を巻き込む形態過程であり、そのサブミクロンからナノの形態過程を直接的動的に観測する手法が乏しいことによる。我々はこの様な状況の打開に向けて2光子励起法の運用を試みている。本年度は2光子励起法の同時多重染色性を利用した、開口放出小胞直径のナノメートル測定法を開発し、TEPIQ (Two-photon Extracellular Polar-tracer Imaging-based Quantification) 法と命名した。この方法によって、直径が 55 nm, 90 nm, 220 nm, 350 nm の小胞の大きさを推定し、これらが電子顕微鏡的な大きさとほぼ対応することを確かめた (文献 17)。

また、同様な方法を副腎髄質細胞に適用した結果、驚いたことに、この細胞においても外分泌腺細胞の様に逐次開口放出が盛んに起きており、更に、開口放出後に小胞内のゲルが膨潤することにより、形成された複合型小胞が丸く膨れ上がり、空胞様の構造を形成し、より強く細胞内部の小胞の開口放出を誘発する現象が見出され、vacuolar sequential exocytosis と命名した (文献 18)。この際、最初は細胞膜に局在していた SNARE 分子 SNAP25 はこの逐次開口放出で速やかに、小胞膜に側方拡散することを GFP 標識した SNAP25 で確認した。この SNAP25 がないと逐次開口放出は起きない。これらの知見は、内部の小胞では刺激が入ってから SNARE 複合化が起き、開口放出が起きることを示唆している。これら一連の結果や考察を総説にまとめた (文献 6)。また、SNAP25 の複合化状態をモニターする FRET プローブを作成し、膵臓β細胞において複合化過程を観察すると、複合化している領域としていない領域が存在し、複合化していない領域からは、開口放出に先行して、FRET シグナルの上昇が観察された。こうして、ベータ細胞の様な分泌細胞においては、SNARE 複合化は刺激以前に起きておらず、刺激後に複合化が起きることにより、開口放出が誘発されることが示された (文献 1)。

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 37 件)

「すべて査読あり」

1. Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Noguchi, J., Ohno, M. & Kasai, H. (2010). SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis. *Cell Metabolism*, In press. (掲載確定)
2. Obi, N., Momotake, A., Kanemoto, Y., Matsuzaki, M., Kasai, H. & Arai, T. (2010). 1-Acyl-5-methoxy-8-nitro-1,2-dihydroquinoline: A biologically useful photolabile precursor of carboxylic acids. *Tetrahedron letters*, 51:1642-1657.
3. Kantevari, S.*, Matsuzaki, M.*, Kanemoto, Y., Kasai, H.^{CA} & Ellis-Davies, G.C.R.^{CA} (2010). Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA. *Nature Methods* 7:123-125. (* Equal contribution. ^{CA}Corresponding authors.)
4. Matsuzaki, M., Hayama, T., Kasai, H. & Ellis-Davies, G.C.R. (2010). Two photon uncaging of γ -aminobutyric acid probes on neurons in intact brain tissue. *Nature Chemical Biology* 6: 255-257.
5. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci*, 33:121-129.
6. Kasai, H., Hatakeyama, H., Ohno, M. & Takahashi, N. (2010). Exocytosis in islet beta-cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 654:303-336.
7. Morita, S., Yasumatsu, N., Noguchi, J. & Kasai, H. (2009). Generation, elimination and weight fluctuations of synapses in the cerebral cortex. *Communicative and Integrative Biology*, 2:1-4.
8. Hira, R., Honkura, N., Noguchi, J., Maruyama, Y., Augustine, G.J., Kasai, H., & Matsuzaki, M. (2009). Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *J. Neurosci. Methods*, 179. 258-263.
9. Yasumatsu, N., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Noguchi, J. & Kasai, H. (2008). Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J. Neurosci.* 28: 13592-13608.
10. Tanaka, J., Horiike, Y., Matsuzaki, M., Miyazaki, T., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2008). Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319:1683-1687.
11. Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2008). Three-dimensional

- mapping of unitary synaptic connections by two-photon macro photolysis of caged glutamate. *J. Neurophysiol.* 99:1535-1544.
12. Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57:719-729.
 13. Takahashi, N. & Kasai, H. (2007). Exocytic process analyzed with two-photon excitation imaging in endocrine pancreas. *Endocrine J.* 54:337-347.
 14. Hatakeyama, H., Takahashi, N., Kishimoto, T., Nemoto, T., & Kasai, H. (2007). Two cAMP-dependent pathways differentially regulate large-dense core and small vesicles in mouse beta cells. *J. Physiol. (Lond.)* 582:1087-1098.
 15. Ellis-Davies, G.C.R., Matsuzaki, M., Paukert, M., Kasai, H. & Bergles, D.E. (2007). CDNI-Glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and 2-photon photolysis in brain slices. *J. Neurosci.*, 27:6601-6604.
 16. Wang, H.*, Peca, J.*, Matsuzaki, M.*, Matsuzaki, K., Noguchi, J., Qiu, L., Wang, D., Zhang, F., Boyden, E., Deisseroth, K., Kasai, H., Hall, W.C., Feng, G. & Augustine, G.J. (2007) Activation and high-speed mapping of brain circuitry using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice. *PNAS*, 104:8143-8148.
 17. Kasai, H., Kishimoto, T. Nemoto, T. Hatakeyama, H, Liu, T-T. & Takahashi, N. (2006). Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis and determination of their spatial organization. *Adv. Drug Delivery Rev.* , 58, 850-877.
 18. Kishimoto, T., Kimura, R., Liu, T.-T., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. (2006). Vacuolar sequential exocytosis of large dense-core vesicles in adrenal medulla. *EMBO J.* 25, 673-682.
 19. Hatakeyama, H., Kishimoto, T., Nemoto, T., Kasai, H. & Takahashi, N. (2006). Rapid glucose sensing by protein kinase A for insulin exocytosis in mouse pancreatic islets. *J. Physiol. (Lond.)*, 570, 271-282.
 20. Liu, T.-T., Kishimoto, T., Hatakeyama, H., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. (2005). Exocytosis and endocytosis of small vesicle in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J. Physiol. (Lond.)* 568, 917-929.
 21. Kishimoto, T., Liu, T.-T., Hatakeyama, H., Nemoto, T., Takahashi, N. & Kasai, H. (2005). Sequential compound exocytosis of large dense-core vesicles in PC12 cells studied with TEPIQ (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification) analysis. *J. Physiol. (Lond.)* 568, 905-915.
 22. Kasai, H., Hatakeyama, H., Kishimoto, T., Liu, T.-T., Nemoto, T. & Takahashi, N. (2005). A new quantitative (two-photon extracellular polar-tracer imaging-based quantification (TEPIQ)) analysis for diameters of exocytic vesicles and its application to pancreatic islets. *J. Physiol. (Lond.)* 568, 891-903.
 23. Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca^{2+} signaling in dendrites. *Neuron* 46, 609-622.
 24. Hayakawa, Y., Nemoto, T., Iino, M. & Kasai, H. (2005). Rapid Ca^{2+} -dependent increase in oxygen consumption by mitochondria in single mammalian central neurons. *Cell Calcium* 37, 359-370.
 25. Oshima, A., Kojima, T., Dejima, K., Hisa, I., Kasai, H. & Nemoto, T. (2005). Two-photon microscopic analysis of acetylcholine-induced mucus secretion in guinea pig nasal glands. *Cell Calcium* 37, 349-357.
 26. Tanaka, J., Matsuzaki, M., Tarusawa, E., Momiyama, A., Molnar, E., Kasai, H. & Shigemoto, R. (2005). Number and Density of AMPA Receptors in Single Synapses in Immature Cerebellum. *J. Neurosci.* 25, 799-807.
 27. Kasai, H., Matsuzaki, M. & Ellis-Davies, G.C.R. (2004). Two-photon uncaging microscopy. In "Imaging in Neuroscience and Development," CSH Lab. Press.
 28. Nemoto, T., Kojima, T., Oshima, A., Bito, H. & Kasai, H. (2004). Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. *J. Biol. Chem.* 279, 37544-37550.
 29. Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R. & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- [学会発表] (計 101 件)
1. H. Kasai (2009.9.9) Two-photon uncaging in vitro and in vivo. EMBO Practival course in

- “Two-photon imaging of brain cell dynamics”
(Zurich, Swiss)
2. H. Kasai (2009.6.23) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of dendritic spines. Neurotrophic Factor Gordon Research Conference (Rhode Island, USA)
 3. H. Kasai (2009.5.15) Patch-clamp, imaging and photostimulation. Third Neurizons Conference (Goettingen, Germany)
 4. H. Kasai (2008.6.22) Two-photon imaging, uncaging and photoactivation of dendritic spines. Jacques Monod Conference “Investigating brain function using light” (Roscoff, France).
 5. H. Kasai (2008.5.23) Imaging of exocytosis and endocytosis with two-photon microscope. International Meeting on Exocytosis (Ljubljana, Slovenia)
 6. H. Kasai (2008.4.21) Principles of long-term dynamics of dendritic spines. Neuroscience Workshop in NUS (Singapore)
 7. H. Kasai (2008.2.26) Actin-based plasticity of dendritic spines. US-Japan Workshop (Asilomar, USA)
 8. H. Kasai (2006.7.24) Structure dependence of plasticity in dendritic spines. Gordon Research Conference on Synaptic transmission. New London (USA).
 9. H. Kasai (2005.9.13) Stability and plasticity of dendritic spines. Gordon Research Conference on Excitatory Amino Acids. Ausoir (France).
 10. H. Kasai (2005.4.21) Dendritic spine structures critical for spine functions and plasticity. Cold Spring Harbor Symposium on Learning and Memory. Cold Spring Harbor (NY, USA).
 11. H. Kasai (2004.6.23) Two-photon excitation imaging of exocytosis and endocytosis. Gordon Research Conference on Cell Biology of the Neuron. New London (NH, USA).

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 走査型顕微鏡及び標本画像取得方法

発明者: 河西春郎、松崎政紀、服部敏征、松川康成、上野牧男、中田竜男
 権利者: 河西春郎、松崎政紀、オリンパス株式会社
 種類: 特願
 番号: 2007-285938

出願年月日: 平成 19 年 11 月 2 日
 国内外の別: 国内

2. 名称: 脂質膜小胞のサイズ決定方法、脂質膜小胞の存否の判定方法

発明者: 岸本拓哉、河西春郎
 権利者: 科学技術振興機構
 種類: 特願
 番号: 2005-107593
 出願年月日: 平成 17 年 7 月 7 日
 国内外の別: 国内

[その他]
 ホームページ
<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp/>

新聞発表

1. 2004 年 8 月 18 日 (木) 朝刊 朝日新聞
 2008 年 3 月 5 日 (水) 朝刊 日刊工業新聞
 「長期記憶の獲得時 たんぱく合成で接合部徐々に増大」
2. 2008 年 3 月 6 日 (水) 朝刊 日経産業新聞
 「たんぱく質が記憶促進」
3. 2008 年 3 月 14 日 (金) 科学新聞 「大脳神経細胞の形態変化 2 光子励起顕微鏡を使って」
4. 2008 年 3 月 24 日 (金) 日経産業新聞 「記憶形成 神経細胞の変形関与」
5. 2008 年 3 月 31 日 (月) 高知新聞 「脳の記憶素子に迫る 東大教授ら実験」
6. 2008 年 4 月 2 日 (水) 福井新聞 「脳の記憶素子に迫る 東大教授ら実験」
7. 2008 年 12 月 17 日 (木) 日経産業新聞 「脳神経の先端ゆらゆら」
8. 2008 年 12 月 21 日 (木) 毎日新聞 「シナプス: 自然に「揺らぐ」」
9. 2009 年 1 月 11 日 (日) 読売新聞 「脳神経細胞 学習以外でも「ゆらぎ」」
10. 2009 年 2 月 13 日 (金) 科学新聞 シナプス 自然的ゆらぎ

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
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
- (2) 研究分担者
 なし
- (3) 連携研究者
 なし