

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14817

研究課題名（和文）シナプス可塑性発現時における内在性グルタミン酸受容体の超解像イメージング

研究課題名（英文）Super resolution imaging of glutamate receptors during synaptic plasticity

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シナプスにおける神経情報の伝達効率が変化する現象「シナプス可塑性」の発現機構を解明することを目指して、直径1マイクロメートルにも満たない微小構造であるシナプスを、超解像度かつ独自の実験系でイメージングする技術確立した。そして、その技術を基にシナプス可塑性の代表例である長期増強現象や長期抑圧現象の研究に適用した。その結果、シナプス後膜における神経情報伝達物質受容体の動態がどのように変化して、長期抑圧が発現するのか、または受容体のどのような動態異常が長期増強の発現を抑制するのかを明らかにした。さらに、情報伝達時にシナプス前終末のどこからシナプス小胞が開口放出されるのかも解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス可塑性は記憶・学習の細胞基盤と考えられており、これまで多くの研究がなされてきた。本研究では、研究代表者の独自の実験系と超解像顕微鏡法の組み合わせを実証し、受容体の動態を解析することでシナプス可塑性の発現機構に新たな知見と概念を提供できた。また、シナプス病変時における受容体の動態異常を解析することで、シナプス可塑性の発現抑制機構に関する知見も提供できた。これらの成果より、本研究は記憶・学習が成立する基礎過程の解明、及びシナプス伝達異常に起因する神経疾患の病態解明に貢献した。

研究成果の概要（英文）：In order to elucidate the mechanism of synaptic plasticity, a phenomenon that changes the efficiency of neuronal information transmission at synapses, we have developed a technique for imaging synaptic protein with ultra-high resolution in our original experimental system. We applied it to the study of long-term potentiation and long-term depression, which are representatives of synaptic plasticity. As a result, we showed how neurotransmitter receptors are exocytosed or endocytosed during long-term depression, and what kinds of receptors' abnormal movement suppress the expression of long-term potentiation. We also analyzed the location of release of synaptic vesicles from a presynaptic terminal during synaptic transmission.

研究分野：神経科学

キーワード：グルタミン酸受容体 長期増強 長期抑圧 超解像顕微鏡 全反射顕微鏡 シナプス小胞 アミロイド β シナプス接着分子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

海馬をはじめとする脳内の多くの部位において、シナプスでの情報伝達効率は、刺激に応じて経験依存的に変化することが知られており、この現象はシナプス可塑性と呼ばれる。とりわけ、シナプス応答が持続的に増強する長期増強 (LTP: long-term potentiation) と、持続的に減弱する長期抑圧 (LTD: long-term depression) は、シナプス可塑性の代表例としてこれまで精力的に研究されており、記憶・学習の細胞基盤と考えられている (Bliss & Collingridge, *Nature*, 1993; Ito, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002; Huganir & Nicoll, *Neuron*, 2013)。近年、電子顕微鏡やコンピューターシミュレーション等を用いた先行研究より、必ずしも神経情報伝達物質受容体がシナプス後膜内で一様に分布して、各々同じようにシナプス伝達に寄与しているのではないことが明らかになりつつある (Heine et al., *Science*, 2008; Nair et al., *J. Neurosci.*, 2013)。例えば興奮性シナプス後膜では、その裏打ちタンパク質が密集している直径 40 nm ほどの「ナノドメイン」が存在し、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) はそれらのドメインと結合・解離を繰り返して、情報伝達やその伝達効率の変化に寄与すると考えられている (MacGillavry et al., *Neuron*, 2013)。しかしながら、その実態は未だ不明な点が多く、受容体などのシナプス関連分子を超解像度で直接可視化する新たな方法が求められていた。

2. 研究の目的

これまでの研究より研究代表者は、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) 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独自の可視化実験系を構築してきた (Tanaka & Hirano, *Cell Rep.*, 2012; Tanaka et al., *Nat. Protoc.*, 2014)。そこで本研究では、この系を超解像顕微鏡でも応用できるように発展させ、その新技術を基にシナプス伝達機構、シナプス可塑性発現機構、及びシナプス病変機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 超解像顕微鏡法を用いた系の確立

本研究は、ラットの海馬神経細胞を実験モデルとして、AMPA 受容体などのシナプス機能に関わる分子に着目した。研究代表者は、シナプス後膜の形成を誘導する接着分子 Neurexin をガラス面にコートし、海馬神経細胞を初代培養した。これにより、ガラス面直上にシナプス後膜様構造が形成され、全反射顕微鏡を用いて蛍光標識した受容体を効率良く、安定的に可視化できるようにした。本研究では、この系を応用して従来の解像度を超える SIM (structured illumination microscopy) 法、STORM (stochastic optical reconstruction microscopy) 法、PALM (photoactivated localization microscopy) 法でもシナプス関連分子の局在を可視化できるようにした。

(2) 長期抑圧の発現時における AMPA 型グルタミン酸受容体の動態変化

長期抑圧 (LTD) は、シナプス応答が持続的に減弱する現象であることから、忘却または記憶の更新の分子機構に深く関与すると考えられている。AMPA 受容体は、中枢神経内で速い興奮性シナプス応答を主に担うイオンチャネル共役型グルタミン酸受容体で、この受容体数の減少は LTD の発現要因として挙げられる。成熟した海馬神経細胞では、GluA1-3 のサブユニットからなる四量体 (GluA1 ホモマー、GluA1/2 ヘテロマー、GluA2/3 ヘテロマー) を形成する。本研究では、GluA1 と GluA2 を含む受容体に焦点を当て、LTD 発現に際してどのような動態変化が起こるのかをライブイメージングした。

(3) 単一シナプス小胞の開口放出分布

シナプスにおける神経情報伝達の大きな特徴として、数十から数百 Hz の高頻度な刺激にも対応して行われる点がある。これを実現するためには、シナプス前終末のアクティブゾーンにおい

て効率的にシナプス小胞を開口放出して再取り込みする機構があると考えられている。しかしながら、単一シナプス小胞が開口放出する発生位置分布や、シナプス小胞の構成膜タンパク質の動態は明らかでなかった。本研究では、小胞構成膜タンパク質 Synaptophysin に焦点を当て、シナプス伝達時における開口放出分布を解析した。

(4) アルツハイマー病の最初期におけるグルタミン酸受容体の動態変異

アルツハイマー病は、42 残基のアミロイドベータ ($A\beta$: amyloid beta) の蓄積による老人斑の形成、過剰リン酸化タウタンパク質の蓄積による神経原線維変化、神経変性が順に起こると考えられており、その発症までに約 30 年の長い潜伏期間がある。そのため、神経細胞の脱落がすでに進行している重度のアルツハイマー病患者では、 $A\beta$ ワクチン療法により蓄積型 $A\beta$ を除去しても、明確な神経機能の改善が認められていない。そのため、新たな根本的治療法や発症予防法の開発を目指して、 $A\beta$ が蓄積する前の早期病態解明が求められていた。本研究では、老人斑形成前に既に存在し、蓄積型 $A\beta$ より毒性が高いと考えられている低分子重合体 ($A\beta$ オリゴマー) に着目した。そして、GluA1 と GluA2 を含む AMPA 受容体に焦点を当て、長期増強 (LTP) 発現に際してどのような動態異常が起こるのかをライブイメージングした。

4. 研究成果

(1) 超解像顕微鏡法を用いた系の確立

超解像顕微鏡 (Nikon, N-SIM と N-STORM) を用いて、樹状突起の構造と興奮性シナプス後膜の裏打ちタンパク質である PSD95 (postsynaptic density 95) の局在分布を観察した。また、シナプス後膜様構造を誘導形成して Neuroligin と結合する接着分子 Neuroligin の発現分布を免疫染色して観察した (図 1)。次に、UV 照射で緑色蛍光から赤色蛍光に変換する光活性化蛍光タンパク質 mEos3.2などを AMPA

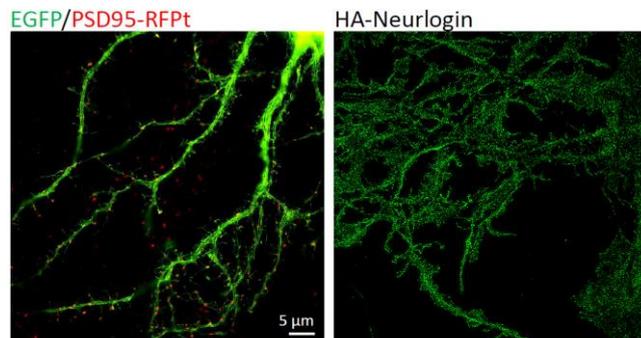


図1. SIM法を用いた超解像度のライブイメージング(左)と染色例(右)。

受容体や PSD95 に標識した。そして、STORM 法や PALM 法を用いて、受容体などの 1 分子動態を高解像で解析して、独自の実験系が超解像顕微鏡にも応用できることを実証した。

(2) 長期抑圧の発現時における AMPA 型グルタミン酸受容体の動態変化

LTD の発現時には、受容体が細胞内に取り込まれる「エンドサイトーシス」の頻度増加によってシナプス後膜における AMPA 受容体の数は減少すると考えられていたが、その動態をライブイメージングした報告は無かった。そこで研究代表者は、pH 感受性 GFP である SEP (super-ecliptic pHluorin) で AMPA 受容体を標識して、細胞外に放出される「エキソサイトーシス」と「エンドサイトーシス」を個別に可視化する独自の実験系を構築した。そして、NMDA (N-methyl-D-aspartate) を海馬神経細胞に投与して化学的に LTD を誘導し、AMPA 受容体のエンドサイトーシスとエキソサイトーシスの頻度変化を解析した。その結果、GluA1 を含む AMPA 受容体のエンドサイトーシスは、LTD 誘導刺激直後にシナプス後膜近傍でクラスリン依存的に増加することが明らかとなった。そして驚くべきことに、GluA1 のエキソサイトーシスも刺激直後に一過的に増加し、その後エンドサイトーシスより顕著に減少することが明らかとなった。これにより LTD の発現が、エンドサイトーシスの増加によってのみ起こるわけではなく、受容体を供給するエキソサイトーシスの減少も大きく寄与すると考えられる。また、GluA2 を含む AMPA 受容体のエンドサイトーシスやエキソサイトーシスは GluA1 ほど有意に増減することはなかったことから、LTD もサブユニット構成特異的な発現機構があるのではないかと考えられる。

(3) 単一シナプス小胞の開口放出分布

Neurexin をコートする場合とは逆に、シナプス前終末の形成を誘導する接着分子 Neurologin をガラス面にコートすることで、ガラス面直上にシナプス前終末様構造を形成させた。免疫染色法を用いて、軸索上に Bassoon、Piccolo、CAST (cytomatrix at the active zone-associated structural protein) 等のアクティブゾーンタンパク質が集積することを確認した。そして、Synaptophysin (Syp) を SEP で蛍光標識した Syp-SEP を細胞に発現させ、電場刺激前後における Syp-SEP の輝度変化を観察した (図 2)。解析の結果、1 回の電場刺激と同期して Syp-SEP の輝度は量子単位で上昇したことから、最小単位の輝度上昇が単一シナプス小胞からの開口放出に相当すると判断できた。そして、Syp-SEP シグナルの拡散係数を算出したところ、 $0.17\text{-}0.19\mu\text{m}^2/\text{sec}$ であったことから、Syp は開口放出後に自由拡散することが明らかとなった。

また、刺激とは同期しない放出 (非同期放出) も観察され、刺激直後に同期した放出はアクティブゾーン内の複数の特定領域で起こる一方、非同期放出はより分散して起こることが明らかとなった。電場刺激によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したことから、同期放出や非同期放出の違いは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが関わる分子機構により生じると考えられる。

(4) アルツハイマー病の最初期におけるグルタミン酸受容体の動態変異

アルツハイマー病の初期症状に、記憶・学習障害がある。これは $\text{A}\beta$ オリゴマーが、何らかの作用で海馬神経細胞のシナプス関連分子に動態異常を及ぼし、LTP の発現を抑制することが一因と考えられている。本研究ではまず、合成 $\text{A}\beta$ を遠心エバポレーターで遠心処理後、 4°C で一晩静置した。そして、この調製した $\text{A}\beta$ が主に 4 mer を含むオリゴマーであることを、ウエスタンブロッティング

法により確認した。次に、海馬神経細胞にこの $\text{A}\beta$ を投与すると、PSD95 のクラスター集積度合いが減弱する、スパイン密度が減少することを免疫染色法により明らかにした (図 3A)。これらの結果より、調製した $\text{A}\beta$ オリゴマーが毒性を有することが確認できた。次に、SEP で蛍光標識した GluA1 または GluA2 が発現した神経細胞に $\text{A}\beta$ を投与した後に、LTP を誘導する電場刺激を加えた。すると、GluA1 の輝度は増加しなかった一方、GluA2 の輝度はやや増加した。また、 $\text{A}\beta$ を投与しないコントロールでは、GluA1、GluA2 共に輝度が増加した。次に、 $\text{A}\beta$ 投与後に GluA1 の輝度が増加しなかった動態要因が、何であるかを明らかにするために、GluA1、GluA2 のエキソサイトーシスを観察した。解析の結果、 $\text{A}\beta$ により刺激直後にシナプス後膜周辺またはシナプス外において GluA1 のエキソサイトーシスが抑制され、GluA2 や一部の GluA1/2 ヘテロ

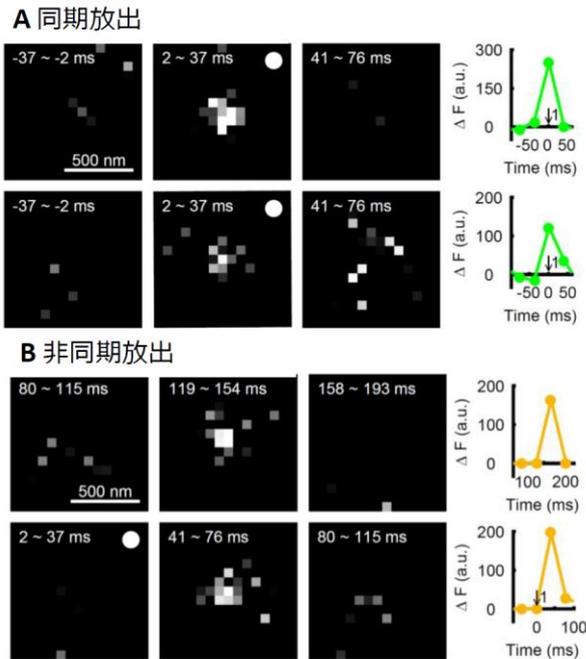


図2. 刺激に応じた単一シナプス小胞の同期放出 (A) と非同期放出 (B) の例。0 ms に電場刺激 (白丸) を細胞に加え、Synaptophysin-SEP の輝度変化を測定した。

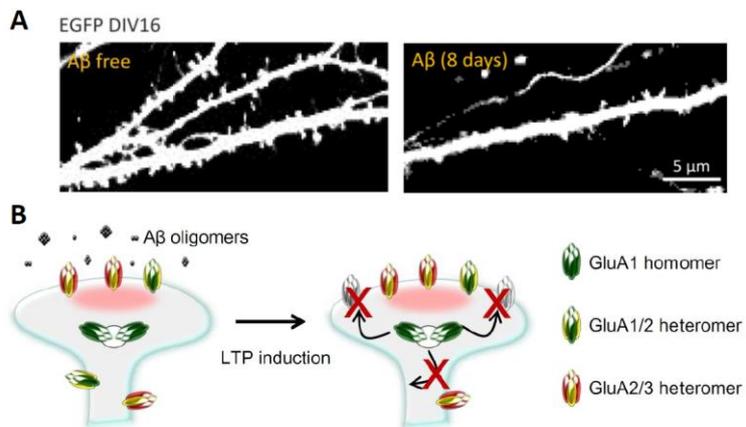


図3. $\text{A}\beta$ オリゴマーによるシナプス毒性 (A) とシナプス病変時における AMPA 受容体の動態異常に関する仮説 (B)。

マーのエキソサイトーシスは抑制されないことが明らかとなった。以上の結果より、LTP 発現時においてシナプス後膜では GluA1 ホモマーのエキソサイトーシスが、シナプス外では GluA1/2 ヘテロマーのエキソサイトーシスが、A β オリゴマーによって阻害されると示唆された (図 3B)。GluA1 は他のサブユニットに比べてカルシウム透過性があることから、LTP を発現するために重要な分子である。何らかの分子機構で A β がエキソサイトーシスを阻害することで、細胞内 Ca²⁺ 濃度の一過的な上昇を抑えている可能性がある。また、A β 投与によって PSD95 が減少したことから、足場タンパク質の局在が弱まり、GluA1 がシナプス後膜に繫留されにくくなった可能性も考えられる。今後はエンドサイトーシスや側方移動といった他の動態も可視化することで、より詳細な GluA1 の動態異常が明らかとなるであろう。また、GluA3 も同様に調べることで、異なるサブユニット構成の AMPA 受容体の動態全体像を把握できると考えられる。

以上をまとめると本研究では、シナプス伝達機構、シナプス可塑性発現機構、及びシナプス病変機構を調べる上で有用な新たなアプローチが示された。この手法の応用性は幅広く、例えばエンドサイトーシスの可視化技術をシナプス前終末に用いることで、シナプス小胞の再取り込みの可視化を実現できるかもしれない。今後、本実験系をより発展させて、超解像度でシナプス関連分子を観るだけでなく操作する新技術の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroshi Tanaka, Daiki Sakaguchi, Tomoo Hirano	4. 巻 5
2. 論文標題 Amyloid- oligomers suppress subunit-specific glutamate receptor increase during LTP	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Alzheimer ' s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions	6. 最初と最後の頁 797-808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.trci.2019.10.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 田中洋光	4. 巻 45
2. 論文標題 全反射顕微鏡を用いたシナプス関連分子の動態イメージング法の確立	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 430-433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shumpei Fujii, Hiromitsu Tanaka, Tomoo Hirano	4. 巻 38
2. 論文標題 Suppression of AMPA Receptor Exocytosis Contributes to Hippocampal LTD	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5523-5537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.3210-17.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Junichiro Funahashi, Hiromitsu Tanaka, Tomoo Hirano	4. 巻 12
2. 論文標題 Visualization of Synchronous or Asynchronous Release of Single Synaptic Vesicle in Active-Zone-Like Membrane Formed on Neuroigin-Coated Glass Surface	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00140. eCollection 2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 田中洋光	4. 巻 53
2. 論文標題 シナプス機能素子の動態イメージング法を用いたシナプス病変及び伝達機構の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Michele Back, Jumpei Ueda, Hiroshi Nambu, Masami Fujita, Akira Yamamoto, Hisao Yoshida, Hiromitsu Tanaka, Mikhail G. Brik, Setsuhisa Tanabe	4. 巻 9
2. 論文標題 Boltzmann Thermometry in Cr ³⁺ Doped Ga ₂ O ₃ Polymorphs: The Structure Matters!	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Advanced Optical Materials	6. 最初と最後の頁 2100033-2100033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adom.202100033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Hiromitsu Tanaka
2. 発表標題 Total internal reflection fluorescence microscopy in neuroscience
3. 学会等名 The Francis Crick Institute seminar
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中洋光、平野丈夫
2. 発表標題 全反射顕微鏡を用いたAMPA型グルタミン酸受容体の動態イメージング
3. 学会等名 生理研研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中洋光
2. 発表標題 シナプス小胞の開口放出及び再構築過程の可視化
3. 学会等名 第4回脳と心の研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中洋光
2. 発表標題 全反射顕微鏡を用いたシナプス前終末とシナプス後膜研究
3. 学会等名 第3回脳と心の研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiromitsu Tanaka, Daiki Sakaguchi, Tomoo Hirano
2. 発表標題 Subunit-specific effects on AMPA-type glutamate receptors caused by amyloid beta oligomers during hippocampal long-term potentiation
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (Society for Neuroscience) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中洋光、坂口大輝、平野丈夫
2. 発表標題 アミロイドベータによるサブユニット特異的なグルタミン酸受容体の動態異常
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中洋光
2. 発表標題 シナプス伝達時におけるシナプス小胞の取り込み形態の統合的把握
3. 学会等名 第5回脳と心の研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属研究室のホームページ http://www.nb.biophys.kyoto-u.ac.jp/main.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------