

機関番号：63904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2007～2010

課題番号：19680020

研究課題名(和文) 2光子励起ケイジド GABA 活性化法による単一抑制性シナプス機能・構造の包括的研究

研究課題名(英文) Study of the function and structure of single inhibitory synapses revealed by two-photon uncaging of GABA

研究代表者

松崎 政紀(MATSUZAKI MASANORI)

基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門・教授

研究者番号：50353438

研究成果の概要(和文)：ケイジド GABA である CDNI-GABA の 2 光子励起活性化法によって、シナプス前終末からの GABA 放出による GABA 受容体シナプス電流とほぼ同じキネティクスをもつ GABA 受容体電流を得ることができ、その空間解像度は光軸に対しておよそ 2  $\mu\text{m}$  であった。これを用いて、GABA 受容体の 3 次元機能マッピングを行い、細胞体付近および細胞体近傍の樹状突起の膜上に沿って GABA 受容体のホットスポットが点在していること、GABA 受容体のホットスポットがグルタミン酸受容体のホットスポットと異なること、軸索起始部においても機能的 GABA 受容体が存在することを明らかにした。また別のケイジド GABA である DCAC-GABA とケイジドグルタミン酸 CDNI-Glu とを併用する方法を開発した。この方法によって細胞体に存在する抑制性シナプスをケイジド GABA による 2 光子励起法で刺激し過分極を誘発させると、ケイジドグルタミン酸を多数のシナプスで 2 光子刺激して誘発された大きな脱分極の細胞体への伝播を抑えて活動電位誘発を阻害できることを再現よく繰り返すことが出来るようになった。

研究成果の概要(英文)：We have synthesized a photosensitive CDNI derivative of GABA. Two-photon excitation of CDNI-GABA produced rapid activation of GABAergic currents in neurons in brain slices with an axial resolution of approximately 2  $\mu\text{m}$  and enabled high-resolution functional mapping of GABA-A receptors. In addition, we developed another caged GABA, DCAC-GABA, which, when combined with an appropriate caged glutamate, allows bimodal control of neuronal membrane potential with subcellular resolution using optically independent two-photon uncaging of each neurotransmitter. We used two-color, two-photon uncaging to fire and block action potentials from rat hippocampal CA 1 neurons in brain slices with 720-nm and 830-nm light, respectively. Our method should be generalizable to other chemical messenger pairs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
総計	19,400,000	5,820,000	25,220,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：ニューロン・シナプス機能

### 1. 研究開始当初の背景

大脳神経細胞シナプスには興奮性シナプスと抑制性シナプスがあり、これらのバランスの取れた活動が安定した脳機能にとって必須である。本研究ではこれまで世界に先駆けて、大脳皮質錐体細胞の同定したシナプスを、ケイジドグルタミン酸の2光子励起によって刺激する技術を開発し（2光子励起グルタミン酸活性化法）、単一興奮性シナプスの構造・機能連関、単一シナプス構造・機能可塑性を明らかにしてきた。一方、抑制性シナプスの機能は興奮性シナプス電位変化の伝播を複雑な形態をもつ神経細胞において抑制すること、多数の積算されたシナプス入力伝播を細胞体近傍で、また活動電位の発生を軸索起始部で抑制することである。この作用様式を調べるためには、個々の抑制性シナプスの分布を調べ、刺激することが必要であるが、これまで報告されていた抑制性シナプス伝達物質 GABA のケイジド化合物はすべて、2光子励起によって活性化できず、単一抑制性シナプス後部の機能を調べることができなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、2光子励起 GABA 活性化法を新たに開発し、これをラット大脳の興奮性細胞に適用し、単一シナプスレベルでの機能的 GABA 受容体の細胞全体にわたるマッピングを行い、単一抑制性シナプス後部の機能・形態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

新規のケイジド GABA である

CDNI-GABA、DCAC-GABA をラット海馬スライス標本に投与した。海馬 CA1 錐体細胞にホールセル記録を行い、その形態を2光子蛍光イメージングで同定した。その記録細胞の細胞体や樹状突起において系統的に2光子励起法を行い、そのときに誘導されるシナプス電流を計測した。ケイジドグルタミン酸と併用するために、ケイジドグルタミン酸2光子励起用レーザー、ケイジド GABA 2光子励起用レーザー、形態蛍光観察のための2光子励起用レーザーの3本のレーザーが導入する顕微鏡を開発し、これらのレーザーを自由に組み合わせてイメージングと刺激が出来るようにした。

### 4. 研究成果

(1) CDNI-GABA の2光子励起活性化法によって、シナプス前終末からの GABA 放出によ

るシナプス後部 GABA 受容体電流とほぼ同じキネティクスをもつ GABA 受容体電流を得ることができ、その空間解像度は光軸に対してはおよそ  $2 \mu\text{m}$  であった。これを用いて、GABA 受容体の3次元機能マッピングを行った。その結果、細胞体付近、および細胞体近傍の樹状突起の膜上に沿って、GABA 受容体のホットスポットが点在していること、それらのホットスポットは安定してその部位に存在することをマイクロメートル精度の高解像度で明らかにした。ケイジド GABA の2光子励起法によるマッピングとケイジドグルタミン酸の2光子励起法マッピングを交互に行うことで、GABA 受容体のホットスポットが、グルタミン酸受容体のホットスポットと異なることを見出した（図1）。また、活動電位の生成部位である軸索起始部において機能的 GABA 受容体が非一様に存在することを初めて明らかにした。

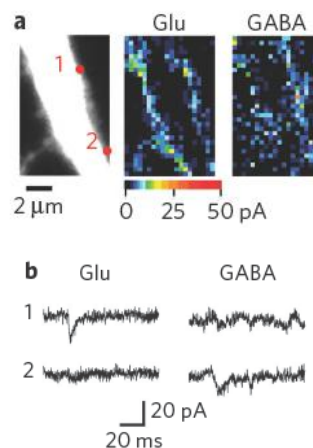


図1 a) 樹状突起におけるグルタミン酸受容体と GABA 受容体のマッピング。電流値の大きさを擬似カラー表示してある。b) a) の点 1, 2 におけるシナプス電流。(文献②)

(2) もうひとつの DCAC-GABA は、活性化反応が遅いため生理的なシナプス後部 GABA 電流よりもキネティクスが遅いが、830nm の励起波長でも励起できることを見出した。これとこの研究期間中に新たに開発したケイジドグルタミン酸、CDNI-Glu が混合した溶液をスライス標本に投与し、異なった波長（720nm, 830nm）のレーザーによってグルタミン酸受容体と GABA 受容体を別々に刺激できることがわかった。そこでこれら二つの分子をほぼ同時に別々に刺激できる、新しい2光子顕微鏡を構築した。これを用いて、細胞体に存在する抑制性シナプスをケイジド GABA による2光子励起法で刺激し過分極を起こすと、ケイジドグルタミン酸を多数の樹状突起シナプスで刺激して誘発された大きな脱分極の細胞体への伝播を抑えて、活動電位誘発を再現性よく阻害することが出

来た (図 2)。

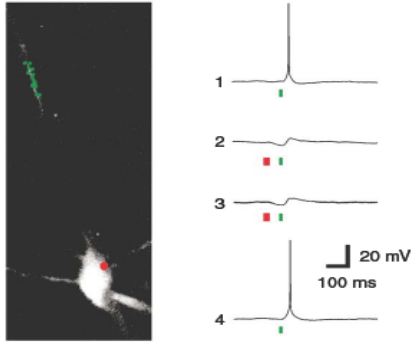


図 2 左図の緑の複数箇所を 2 光子励起グルタミン酸活性化法を連続して行うと右図 1 にあるように活動電位が発生する。この刺激の直前に細胞体の赤の 1 箇所を 2 光子励起 GABA 活性化法を行うと右図 2, 3 にあるように活動電位の誘発が抑制された。(文献 ③)

(3) さらにこれらの方法を発展させることで、樹状突起枝ごとの興奮性伝播を抑制性シナプス入力で抑制できること、樹状突起枝分岐地点での抑制性シナプス入力により大きな興奮性伝播抑制能力を持つこと、抑制性シナプス入力は近傍で起こったシナプス長期増強に影響を与えることなどが明らかになってきた。

これらの成果は 40 年以上前から理論的に想定されてきたが実証されてこなかった、単一細胞内における興奮性・抑制性シナプス信号の統合問題のほぼすべてに関して系統的实验の下での検証が可能になったことを意味している。さらに興奮性・抑制性シナプス信号が同期しているときのシナプス可塑性がどのようになるか、という新しいシナプス可塑性研究の局面を拓くことが出来た。世界的に見てもケイジド GABA の 2 光子励起法、さらにこれとケイジドグルタミン酸の同時 2 光子励起法の開発は追隨を許しておらず、最先端の成果として発表することが出来た。

#### 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 11 件)

(#corresponding author, \*equal contribution)

① #Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C.R., Kanemoto Y. and Kasai H. Simultaneous two-photon activation of presynaptic cells and calcium imaging in postsynaptic dendritic spines. *Neural Systems & Circuits* 1: 2, 2011. 査読有

② #Matsuzaki M., Hayama T., Kasai H. and #Ellis-Davies G.C.R. Two-photon uncaging of

$\gamma$ -aminobutyric acid in intact brain tissue. *Nature Chemical Biology* 6, 255-257, 2010. 査読有

③ \*Kantevari S., \*Matsuzaki M., Kanemoto Y., Kasai H. and Ellis-Davies G.C.R. Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA. *Nature Methods* 7, 123-125, 2010. 査読有

④ Hira R., Honkura N., Noguchi J., Maruyama Y., Augustine G.J., Kasai H. and #Matsuzaki M. Transcranial optogenetic stimulation for functional mapping of the motor cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 179, 258-263, 2009. 査読有

⑤ Yasumatsu N., Matsuzaki M., Miyazaki T., Noguchi J. and Kasai H. Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *Journal of Neuroscience* 28, 13592-13608, 2008. 査読有

⑥ Honkura N., Matsuzaki M., Noguchi J., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719-729, 2008. 査読有

⑦ Tanaka J., Horiike Y., Matsuzaki M., Miyazaki T., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. Protein-synthesis and neurotrophin dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319, 1683-1687, 2008. 査読有

⑧ #Matsuzaki M., Ellis-Davies G.C.R. and Kasai H. High-resolution mapping of synaptic connections by two-photon macro photolysis of caged glutamate. *Journal of Neurophysiology* 99, 1535-1544, 2008. 査読有

⑨ Ellis-Davies G.C.R., Matsuzaki M., Paukert M., Kasai H. and Bergles D.E.

4-carboxymethoxy-5,7-dinitroindolyl-glu: an improved caged glutamate for expeditious ultraviolet and 2-photon photolysis in brain slices. *Journal of Neuroscience* 27, 6601-6604, 2007. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① Matsuzaki M. Imaging and optical manipulation of neural activity in the brain. 第 88 回日本生理学会大会(Yokohama, 2011.3.28)

② Matsuzaki M. Neural function revealed by new methods of chemical biology and optogenetics. 第 84 回日本薬理学会年会(Yokohama, 2011.3.23)

③ Matsuzaki M. Optical methods for revealing the synaptic function and structure in the local circuit. 第 33 回日本神経科学大会(Kobe, 2010.9.3)

④ Matsuzaki M. Optical methods for revealing the synaptic function and structure in the local circuit. The fourth international neural microcircuitry conference (Okinawa, 2010.7.25)

⑤ Matsuzaki M. Optical stimulation of synapses and neurons. 第 47 回日本生物物理学会年会

(Tokushima, 2009.11.1)

〔図書〕 (計 1 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/circuits/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 政紀 (MATSUZAKI MASANORI )

基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門・  
教授

研究者番号 : 50353438