

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：特別推進研究

研究期間：2009～2014

課題番号：21000009

研究課題名（和文） 大脳棘シナプスと開口放出の2光子顕微鏡による研究

研究課題名（英文） Cerebral spine synapses and exocytosis studied with two-photon 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

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）： 430,900,000 円

研究成果の概要（和文）：我々のグループは既に大脳スパインシナプスの形態変化（可塑性）が興奮性伝達物質（グルタミン酸）で起き、学習記憶の素過程であることを明らかにしているが、今回は、形態可塑性に対する抑制性伝達物質(GABA)やモノアミン(dopamine)の効果を解明した。また、開口放出を起こす蛋白質 SNAREs の存在様式や動態を2光子蛍光寿命法で測定することに成功し、シナプス研究に新しい道を拓こうとしている。

研究成果の概要（英文）：We had already found that spine synapses undergo structural plasticity by glutamate, but we have further revealed the actions of GABA and dopamine on the structural plasticity of dendritic spines, which likely underlies animal behaviors. We also established a new way to image static and dynamic states of SNARE proteins for exocytosis in neuron and secretory cells using 2pFRET/FLIM, which will pave the way for comprehensive understanding of neuronal memory circuits. .

研究分野：生理学、神経科学

キーワード：シナプス、学習記憶、顕微鏡、グルタミン酸、分泌

## 1. 研究開始当初の背景

我々は**光刺激法**を中心として2光子顕微鏡の新しい応用を開拓し、大脳シナプスが形態可塑性を示すことを発見し、世界をリードして来た。2光子顕微鏡は、生きた組織内部の観察を可能とする唯一の顕微鏡法である。他の顕微鏡法は分子レベルの観察はより容易だが、組織内には適用できない。従って、生きた組織や個体の分子細胞レベルの可視化解析には更なる2光子顕微鏡の応用技術の発展が不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では以下に述べる新規手法の開拓により、大脳シナプス・開口放出の研究を世界的に一層推進することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) これまで用いてきた2光子グルタミン酸アンケイジ法に加えて、青いレーザーによりGABA アンケイジングを行ったり、チャンネルロ

ドプシンを発現したドーパミン細胞を刺激することを組み合わせて、スパイン形態可塑性に対する神経伝達物質の作用を調べた。

(2) また、成熟個体動物の脳を2光子イメージングすることにより、スパイン形態可塑性が覚醒動物で起きている様子や、スパインの揺らぎが長期間にわたっておきていることを野生株だけでなく、精神疾患モデル動物で調べた。

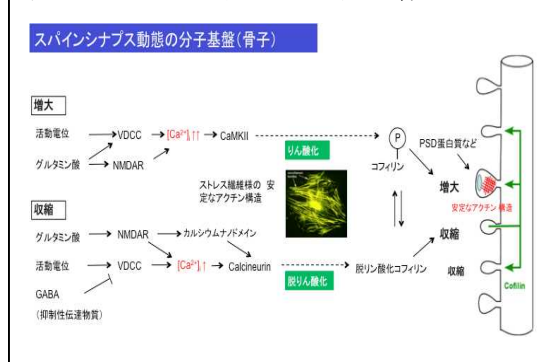
(3) シナプス前終末の機能はシナプス後部スパインのように形態で読みだすことができないので遅れてきた。2光子蛍光寿命イメージングはスパインには適用されているので、これを用いてシナプス前終末機能や分泌細胞の機能を読みだすプローブや解析手法の開発を行った。

## 4. 研究成果

(1) スパイン収縮はグルタミン酸刺激とシナプス後細胞のスパイクを組み合わせただけでは容易に誘発されなかったが、この刺激とほぼ同時にGABAをアンケイジングによ

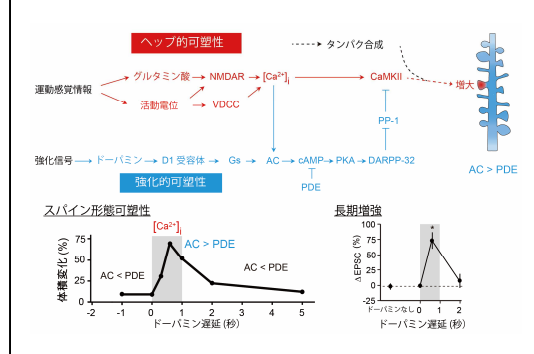
て与えると収縮や更に除去が強烈に誘発され、その収縮は周囲に広がること became 明らかになった。この際、GABA を与える代わりにグルタミン酸のアンケイジングを弱くすると収縮は起きない。また、収縮は GABA なしでも Ca 緩衝薬 EGTA を細胞内投与すると誘発されたが、より速い Ca 緩衝薬 BAPTA を投与すると誘発されなかった。このことから、収縮にはグルタミン酸受容体の作る細胞内 Ca ドメインが必要だが、平均 Ca 濃度上昇は一定範囲に抑えられていることが必要であることがわかった。また、収縮が側方に広がるのは収縮を起こす蛋白が脱りん酸化 cofilin で、これが側方拡散することによる。一方、増大はより強い Ca 上昇により、cofilin がりん酸化して起きるが、この際にはりん酸化タンパク質群が凝集するためか増大は広がらない。増大・収縮は同一のタンパク質のりん酸化・脱りん酸化でおきるので競合的であり、隣接するシナプスの競合的選別を起こすと考えられた (文献 1, 2, 4)。

図1 スパイン形態可塑性の骨子



(2) ドーパミンは脳内報酬物質と考えられているが、なぜ、報酬としての作用を持つかわからない。大脳基底核の線条体 (側坐核) 細胞は皮質錐体細胞と同様に興奮性シナプスはスパインにできる。また、ドーパミンの線条体への入力強く報酬作用を担っていると考えられている。我々は、グルタミン酸刺激を2光子アンケイジングで、ドーパミン刺激をチャンネルロドプシンで与えることにより、ドーパミンがグルタミン酸入力にやや遅れて2秒以内に与えられた時のみ頭部増大を起こすことを見出した (図2)。この鋭い時間枠は動物行動で見られる報酬の時間枠と相似であり、Pavlov による条件反射以来100年来不明であった報酬時間枠の神経基盤を明らかにしたことになる。この鋭い時間枠はドーパミン D1 受容体がアデニルシクラーゼを刺激する際に事前に Ca 上昇がある方が有利であることや、線条体細胞の樹状突起が細く cAMP を分解するホスホジエステラーゼ

図2 ドーパミン作用の時間枠



の活性が不可避免的に高くなることなどによること became 明らかになった。この様なスパインの機構をドーパミンが使うことにより報酬信号となっていると考えられた。脳内報酬機構の障害は統合失調症、うつ病や依存症などの精神病と密接に関係するので、精神疾患の理解に新しい緒をつかんだ (文献 5)。

(3) 成熟個体動物の大脳新皮質においてスパイン頭部増大が起きる条件を見出し、学習のイメージングが可能とした。一方、スパインの生成消滅を1日置きに、しかも、阻害剤を局所還流することを可能にした動物で1週間にわたって観察した。その結果、神経細胞内 Ca 上昇を完全に阻害した条件でも生成消滅は活発に置けるといふ内因性のダイナミクスをスパインは持ち、これが自閉症モデル動物 (FMR1 KO mice) で亢進していること、また、この病的内因性ダイナミクスを阻害する薬物が存在することを明らかにした (論文投稿中)。自閉症スペクトラム障害 (ASD) は病的内因性ダイナミクスにより、神経回路の形成が損なわれていることによる可能性がある。

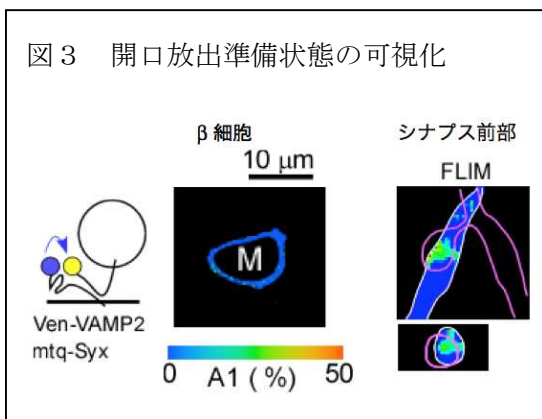
更に、スパイン頭部増大がタンパク質合成依存的に起きること、また、形態可塑性には Rac1 が関与していることを利用して、学習記憶に関与したスパインを標識し、更に、学習後に光照射することで標識されたスパインを収縮・消去させ記憶への関与を操作的に調べるプローブの開発に成功した (論文投稿中)。この技術の延長上に記憶神経回路を標識することを試みていきたい。

(4) シナプス前終末や分泌細胞の開口放出はその分子過程の可視化定量化が進んでおらず、色々な仮説が検証されずに放置されていたり、機能状態を開口放出起こさずに知る手立てがなかったり、生理機能の理解の妨げとなってきた。開口放出を起こすエンジンは SNARE 蛋白と呼ばれる細胞膜や小胞膜に大量に存在する3つの蛋白である。我々は、まず、単一分泌顆粒の開口放出が観察可能な腭膜

のインスリン分泌β細胞において、開口放出に先行するタンパク質の複合化によるシグナルや、開口放出の起きやすさとSNAREの初期状態の関係を分子内 FRET プローブを用いて明らかにした (文献 3)。

このプローブを神経に適用した所、非常に強いシグナルが得られたので、この理由を明らかにし利用するために、圧倒的に定量性の高いデータが得られる分子間 FRET プローブを開発し蛍光寿命による測定に進んだ。3つの蛋白質があるので、状態を割り出すために4通りのプローブを作成し解析を進めた結果、SNARE 蛋白質の複合化状態を読みだす定量化手法の開発に成功した。これによると、神経のシナプス前終末では特にアクティブゾーンの周囲では高率に3量体形成が既に起きており、その数を推定することもできた。一方、β細胞や神経でも軸索部分では3量体形成は全くなく、分泌準備状態がSNAREの複合化状態として可視化されることがわかった。スパインのシナプス前終末では、3量体の量とスパインの大きさ、即ち、アクティブゾーンの大きさはよく対応し、また、3量体の量は放出確率とよく相関した (論文投稿中)。

更に、神経シナプス前終末ではSNAREが特殊な複合化をしていることが明らかとなっており、これによりサブミリ秒の開口放出が可能となっていることが示唆されており、現在、その解明を進めている。いずれにせよ、この新しい手法で、これまで不明だった開口放出機能の読み出しについて、様々な研究可能性が開かれてくると考えられる。



## 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 23 件)

① Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S. & Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine action on the structural plasticity of dendritic spines.

*Science*, 345:1616-1620.

DOI:10.1126/science.1255514

② Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C.R., Hayashi, A., Takahashi, N., Matsuzaki, M. & Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local  $Ca^{2+}$  signaling.

*Nature Neurosci.* 16:1409-1416.

DOI:10.1038/nn.3496

③ Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Noguchi, J., Ohno, M. & Kasai, H. (2010). SNARE conformational changes that prepare vesicles for exocytosis. *Cell Metabolism* 12, 19-29.

DOI:10.1016/j.cmet.2010.05.013

④ Kantevari, S., Matsuzaki, M., Kanemoto, Y., Kasai, H.<sup>CA</sup> & Ellis-Davies, G.C.R.<sup>CA</sup> (2010). Two-color, two-photon uncaging of glutamate and GABA.

*Nature Methods* 7, 123-125.

DOI: 10.1038/nmeth.1413

⑤ Matsuzaki, M., Hayama, T., Kasai, H. & Ellis-Davies, G.C.R. (2010). Two photon uncaging of  $\gamma$ -aminobutyric acid probes on neurons in intact brain tissue. *Nature Chemical Biology* 6, 255-257.

DOI: 10.1038/nchembio.321

[学会発表] (計 94 件)

① H. Kasai (2013.7.19). Structural plasticity of spine synapses in vitro and in vivo, Current trends and future directions of synaptic plasticity research, US/Japan joint workshop (Seattle, USA).

② Haruo Kasai, Tatsuya Hayama, Jun Noguchi, Satoshi Watanabe (2012.6.30).

Synaptic competition in the dendritic spines.

Jacques-Monod Symposium in "Imaging neuronal functions: from molecules to circuits," (Roscoff, France).

③ Haruo Kasai (2010.3.23) In vivo two-photon uncaging in the adult brain. Janelia Conference on Structural Plasticity in the Mammalian Brain (Dulles, VA, USA).

④ Haruo Kasai (2009.12.10) Plasticity and maintenance of dendritic spines. Distinguished International Lecture Series, Duke University (Durham, USA).

⑤ Haruo Kasai (2009.6.23) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of dendritic spines. Neurotrophic Factor Gordon Research Conference (Rhode Island, USA).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：シナプス増強を可視化するプローブ

発明者：林 (高木) 朗子、河西春郎

権利者：東京大学

番号：2014-120841

出願年月日：平成 26 年 6 月 11 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bm2.m.u-tokyo.ac.jp>

## 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 ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

松崎 政紀 (MATSUZAKI, Masanori)

基礎生物学研究所・教授

研究者番号：50353438

高橋 倫子 (TAKAHASHI, Noriko)

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60332178

野口 潤 (NOGICHI, Jun)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40421367

渡邊 恵 (WATANABE, Satoshi)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80302610