

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21650073

研究課題名（和文）

ガラス面上に形成したシナプス前膜および後膜における一分子動態解析

研究課題名（英文）

Single molecule analyses around the synaptic membrane formed on glass

研究代表者

平野 丈夫（HIRANO TOMOO）

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50181178

研究成果の概要（和文）：

神経細胞間で情報伝達を行うシナプスの細胞膜をガラス面上に形成させ、そこでの受容体分子動態を全反射蛍光顕微鏡により高分解能で観察することに成功した。そして、記憶の基盤現象である神経活動依存性のシナプス伝達効率増強が起こる際のグルタミン酸受容体動態を記録・解析して、異なるサブタイプの受容体が別の経路でシナプスの情報受容部位に集積することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Information transmission between neurons takes place at synapses. Here, we have succeeded to form postsynaptic membrane directly on the glass and to observe the movement of receptor molecules with high spatial and temporal resolution using total internal reflection fluorescent microscopy. We have demonstrated that different subtypes of glutamate receptor accumulate at the postsynaptic membrane through distinct routes during long-term potentiation, which is the neuronal activity dependent enhancement of synaptic transmission and has been regarded as a basis of learning and memory.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 0 | 1,600,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 0 | 700,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,200,000 | 270,000 | 3,470,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス、グルタミン酸受容体、全反射顕微鏡、長期増強、細胞培養

1. 研究開始当初の背景

神経細胞間では、シナプス前終末からはグルタミン酸等の神経伝達物質が開口放出され、それがシナプス後部の受容体と結合するこ

とで、情報伝達が行われる。この情報伝達の効率は神経活動依存的に変化し、そうしたシナプス可塑性は学習・記憶の基盤現象と位置づけられている。シナプス可塑性発現に際し

では、シナプス後部の受容体数の増減・シナプス前部からの伝達物質放出確率の変化等が起こるが、その詳細は明らかになっていない。シナプス機能および可塑性の分子メカニズムを理解するためには、シナプス前部および後部でのタンパク質分子の挙動に関する情報が重要である。近年、シナプス前膜上に存在するタンパク質であるニューレキシンがシナプス後膜上のニューロリジンとの結合を介してシナプスを形成し (Craig & Kang, 2007, *Curr Opin Neurobiol*)、さらにニューレキシンでコートしたビーズがシナプス後部形成を引き起こせることが報告された (Graf et al., 2004, *Cell*)。こうした結果は、人口物に付着させたニューレキシンがシナプス後部構造形成を誘導できることを示している。私はこれらの論文を読み、カバーガラスをコートしたニューレキシンが、シナプス後部構造をガラス面に形成するのを誘導できるのではないかと考えた。それができれば、全反射蛍光顕微鏡を使用することにより、高解像度、高シグナル・ノイズ比でシナプス後膜上の受容体等の挙動を1分子レベルで観察することが、可能になると考えた (Trache & Meininger, 2008, *Curr Protoc Microbiol*)。

2. 研究の目的

ガラス面上に哺乳類中枢神経細胞のシナプス後膜またはシナプス前膜を直接形成させる。そして、蛍光標識したシナプス関連タンパク質を神経細胞で発現させ、それらのシナプス膜内外での挙動を、全反射蛍光顕微鏡を用いて、高シグナル・ノイズ比および高時空間分解能で記録・解析できる実験系を確立する。そして、学習・記憶の基盤となっている、神経細胞活動依存的なシナプスにおける持続的伝達効率変化である可塑性に際して、受容体分子等がガラス面上に形成したシナプス膜内外で、どのように変化するのか、またそれがどのようなメカニズムによるのかを、明らかにする。以上が、本研究の目的であった。

3. 研究の方法

ガラス面をアビジン・ビオチン結合および抗原・抗体反応を利用して、ニューレキシンでコートし、その上にラット海馬の神経細胞を培養した (図1)。また、神経細胞に中性 pH で緑色蛍光を発する SEP タンパク質を融合した AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットを発現させた。SEP は細胞内小胞では、低 pH のために蛍光を発せず、受容体が細胞膜上にあるときに限って蛍光を発する。またシナプス後膜領域は、PSD95 分子に赤色の RFP 蛍光

タンパク質を融合した分子の局在により同定し、SEP 蛍光を全反射蛍光顕微鏡で観察した。

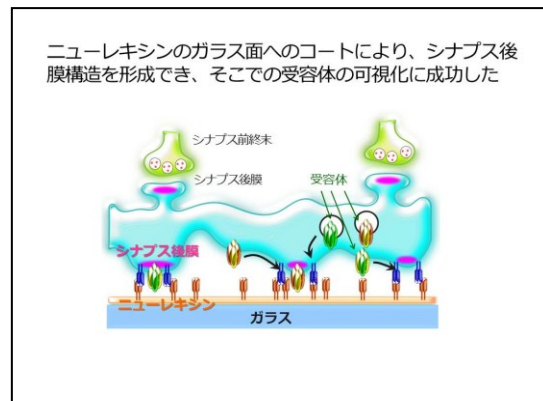


図1 ガラス面上のシナプス後膜

培養海馬神経細胞に長期増強を引き起こせる電場刺激を与え、シナプス後膜内外での AMPA 受容体の増減を、全反射蛍光顕微鏡を用いて記録・解析した。全反射顕微鏡を用いることにより、ガラス面直上の蛍光のみを観察することが可能となり (図2)、蛍光標識した AMPA 受容体を高シグナル・ノイズ比で観察できた。また、蛍光の持続的観察により、AMPA 受容体の細胞内から細胞膜へのエキソサイトシスと細胞膜上の側方移動も記録した。さらに、ガラス面をシナプス後部に局在するタンパク質であるニューロリジンでコートして、その上に海馬神経細胞を培養して、シナプス前膜をガラス面上に形成させることも試みた。

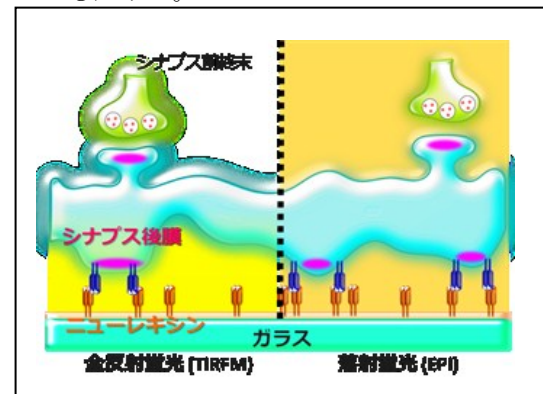


図2 全反射顕微鏡によるガラス直上の蛍光の観察。黄色 (左図) またはオレンジ色 (右図) は励起光を示す。全反射蛍光観察では、励起光はガラス面の直上にしか届かない。

4. 研究成果

ガラス面上に海馬神経細胞のシナプス後膜を形成でき、その内外において SEP で蛍光標識した AMPA 受容体サブユニット GluA1, GluA2, GluA3 を全反射蛍光顕微鏡によって観

察できた。そして、電場刺激を加えて、GluA1-3 の蛍光輝度変化を記録した。その結果、GluA1-GluA3 が異なるタイミングでシナプス後膜において増加することが分かった (図 3)。GluA1, GluA2, GluA3 の順番で増加した。

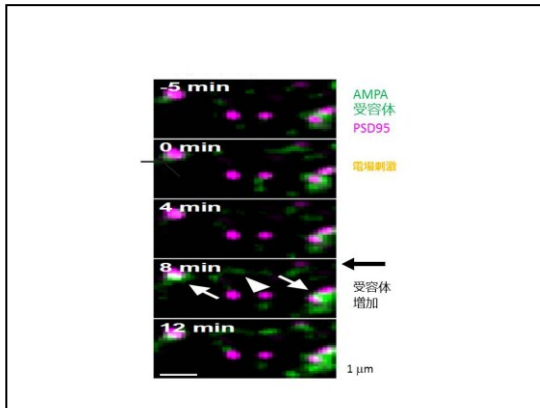


図 3 電場刺激による GluA2 のシナプス後膜での増加

次に、連続して全反射蛍光像を記録する実験を行い、GluA1-3 の細胞内から細胞膜へのエキソサイトーシス (図 4A) および細胞膜上での側方移動 (図 4B) を記録・解析した。その結果、GluA1 のみがシナプス後膜近傍に、電場刺激直後にエキソサイトーシスされることがわかった。一方、GluA2, GluA3 のエキソサイトーシスは、シナプス後膜以外でのみ観察された。また、GluA2 のエキソサイトーシス頻度は電場刺激の数分後に増加し、GluA3 のエキソサイトーシス頻度は電場刺激 20 分後に増加した。

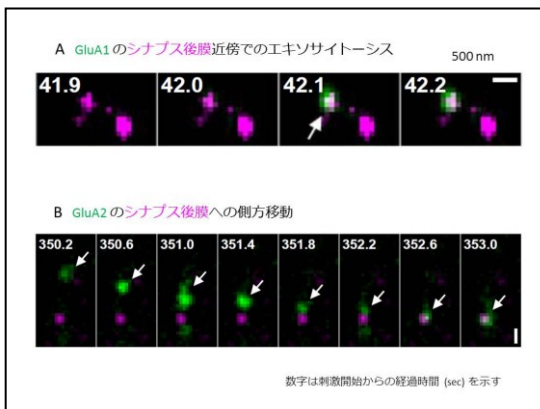


図 4 GluA1 のシナプス後膜近傍へのエキソサイトーシス (A) と GluA2 のシナプス後膜への側方移動 (B)

さらに、GluA1 と GluA2、または GluA2 と GluA3 を共発現して電場刺激を加えて、その後のエキソサイトーシス頻度を計測する実験も行った。こうした実験により得られた結果から、海馬長期増強に際しては、以下のような AMPA

型グルタミン酸受容体の変化が起こると推定した (図 5)

長期増強発現誘導直後に、まず GluA1 のホモ 4 量体の AMPA 受容体のシナプス後膜近傍へのエキソサイトーシスが起る。その後、GluA1 と GluA2 のヘテロ 4 量体型 AMPA 受容体がシナプス後膜外へエキソサイトーシスされ、それが細胞膜上を側方移動して、シナプス後膜に集積する。さらに刺激後 20 分くらいしてから、GluA2 と GluA3 からなるヘテロ 4 量体型 AMPA 受容体がシナプス後膜外へエキソサイトーシスされ、側方移動によりシナプス後膜に集積する。

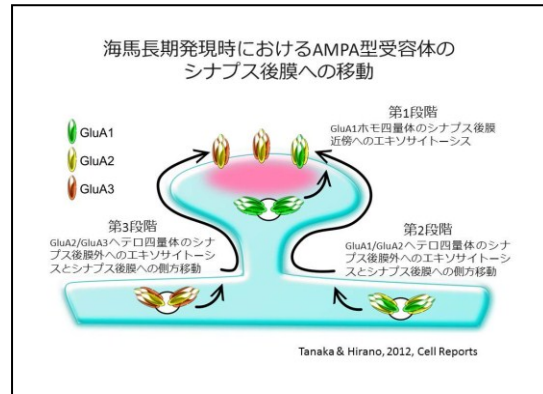


図 5 長期増強発現時の各サブタイプの AMPA 受容体の動態

以上説明してきたように、今回の研究により、シナプス後膜をガラス面上に直接形成させることに成功し、その内外で蛍光標識した 3 種類の AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの挙動を記録することができた。そして、長期増強誘導刺激により引き起こされる、各サブタイプの AMPA 受容体サブユニットの増減と、エキソサイトーシスおよび側方移動を解析した。その結果、異なるサブユニット構成の AMPA 受容体が、長期増強発現に際して異なるタイミングで別の場所でエキソサイトーシスされ、シナプス後膜に集積することが判明した。

また、ガラス面をニューロリジンでコートして、その上に海馬神経細胞を培養し、シナプス前終末をガラス面上に形成させる実験も行った。ニューロリジンコートには成功しているが、シナプス前終末のガラス面上での形成は確認できていない。

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 7 件)

1, Tanaka H & Hirano T (2012) Visualization of subunit-specific delivery of glutamate

receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. Cell Reports 1, 291-298. (査読有)
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.004

2, Miyawaki H & Hirano T (2011) Different correlations among physiological and morphological properties at single glutamatergic synapses in the rat hippocampus and the cerebellum. Synapse 65, 412-423. (査読有)
DOI: 10.1002/syn.20860

3, Muguruma K, Nishiyama A, Ono, Y, Miyawaki H, Mizuhara E, Hori S, Kakizuka A, Obata K, Yanagawa Y, Hirano T & Sasai, Y. (2010) Ontogeny-recapitulating generation and tissue integration of ES cell-derived Purkinje cells. Nature Neurosci. 13, 1171-1180. (査読有)
DOI: 10.1038/nn.2638

4, Kuroyanagi T & Hirano T (2010) Flap loop of GluD2 binds to Cbln1 and induces presynaptic differentiation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 398, 537-541. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.06.114

5, Mizuno, H., Hirano, T. and Tagawa, Y. (2010) Pre- and postsynaptic neuronal activity supports the axon development of callosal projection neurons during different postnatal periods in the mouse cerebral cortex. Eur. J. Neurosci. 31, 410-424. (査読有)
DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.07070.x

6, Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamiyo S, Fujii H, Mano T, Blaaser F, Chatila T, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H & Bito H (2009) Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase cascade. J. Neurosci. 29, 13720-13729. (査読有)
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3018-09.2009

7, Kitagawa Y, Hirano T & Kawaguchi S (2009) Prediction and validation of a mechanism to control the threshold for inhibitory synaptic plasticity. Mol. Systems. Biol. 5, 280, 1-16. (査読有)
DOI: 10.1038/msb.2009.39

[学会発表] (計 4件)

1, Tanaka H & Hirano T (2011.11.16) Subunit-specific translocation of AMPA receptors to post-synaptic membrane during hippocampal LTP. Neuroscience 2011, Washington Convention Center(米国)

2, Tanaka H & Hirano T (2011. 9. 17) Subunit-specific translocation of AMPA receptors during hippocampal LTP. 第34回日本神経科学大会, パシフィコ横浜

3, Tanaka H & Hirano T (2010.9.3) Real-time imaging of glutamate receptor movement around postsynaptic membrane. 第33回日本神経科学大会, 神戸コンベンションセンター

4, Hirano T (2009.9.16) Roles of glutamate receptor delta family in synapse formation. Symposium "Novel aspects of the function of ionotropic & metabotropic glutamate receptors" 第32回日本神経科学大会, 名古屋国際会議場

[その他]

研究室のホームページ

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

本研究成果については、京都大学でプレスリリースを行った。プレスリリースに関する情報は下記ホームページに掲載された。

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2011/120323_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 丈夫 (HIRANO TOMOO)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50181178

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()