

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770161

研究課題名 (和文) 二光子励起法を用いた神経細胞スパインの形態可塑性とカルシウム動態の研究

研究課題名 (英文) Morphological plasticity and calcium dynamics in dendritic spines of neurons

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

海馬錐体細胞では、カルシウム依存性にシナプス可塑性と樹状突起スパインの形態可塑性が起きることが知られている。本研究ではケージドグルタミン酸の反復アンケーシングにより単一シナプスで形態可塑性を誘導し、そのときのカルシウム動態と形態可塑性の関係を解析した。その結果、形態可塑性が生じる場合にはスパインにおいて主に NMDA 受容体を介した強いカルシウム上昇生じること、およびスパイン近傍の樹状突起幹にもカルシウムが拡散することが示された。

研究成果の概要 (英文)：

In hippocampal pyramidal neurons, calcium elevation causes plasticity in synaptic transmission and spine morphology. I examined calcium dynamics during induction of plasticity with repeated uncaging of caged glutamate. During stimulation that induced spine enlargement, strong calcium elevation was evoked mainly by influx through NMDA receptors, and part of the calcium in the spine diffused out to the dendritic shaft.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

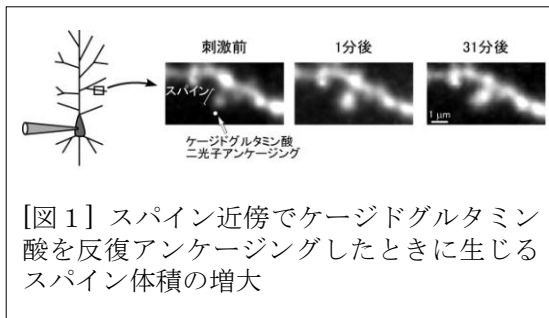
キーワード：脳・神経、イメージング、ケージド化合物、二光子励起

1. 研究開始当初の背景

シナプス可塑性は学習の基本となるメカニズムである。カルシウムは可塑性の成立に特に重要な細胞内因子である。シナプスの長期可塑性は長期増強 (LTP) と長期抑圧 (LTD) に大別され、さらに持続時間やタンパク質合成依存性などに基づいて多くの種類に分けられるが、これには可塑性誘導刺激時のカル

シウム動態の違いが重要な意味を持つと考えられる。

大脳の多くの興奮性シナプスのシナプス後部にはスパインと呼ばれる突起構造がある。スパインと樹状突起幹をつなぐネックは細く、物質の拡散が制限されるため、スパインは独立性の高いコンパートメントを形成している。スパインの形態とスパインにおけるカルシウム動態を解明することは、シナプ



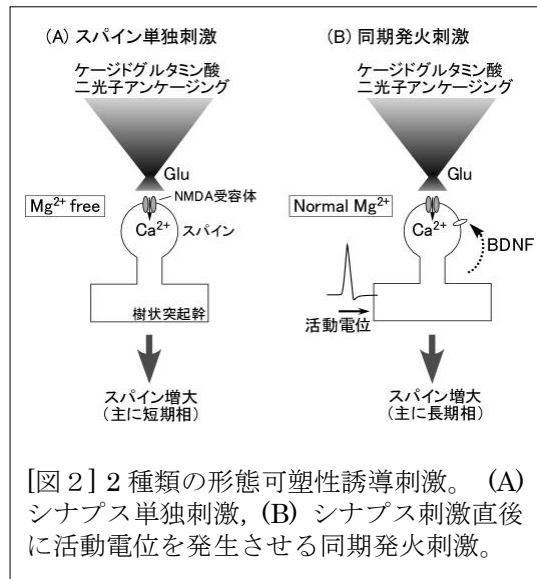
【図1】 スパイン近傍でケージドグルタミン酸を反復アンケーシングしたときに生じるスパイン体積の増大

ス可塑性の研究にとって中心的な課題である。

スパインは直径数百 nm の微小な構造であるが、超短パルスレーザーを用いる二光子励起法により、高解像度の蛍光イメージングが可能になってきた。またケージドグルタミン酸を二光子励起によってスパイン近傍で光分解（アンケーシング）することにより、単一のシナプスを再現性よく刺激することが可能になり、特定のスパインで形態可塑性を誘導できるようになった（図1）。スパインの形態可塑性はシナプス可塑性と高い相関を持っていることから、スパインの形態可塑性はシナプス可塑性の構造的基盤と考えられている。

海馬 CA1 錐体細胞では、次の2種類の刺激条件によりスパイン体積の増大を生じさせることができる（図2）。(1) Mg^{2+} を含まない細胞外液中でのケージドグルタミン酸のアンケーシングの反復（シナプス単独刺激, Matsuzaki et al. *Nature* 429, 761 (2004)), および (2) 通常濃度の Mg^{2+} を含む細胞外液中で、ケージドグルタミン酸のアンケーシングの直後にシナプス後細胞に活動電位を発生させる刺激の反復（同期発火刺激, Tanaka et al. *Science* 319, 1683 (2008))。シナプス単独刺激によるスパイン増大は短期相（5分以内）が比較的大きく、タンパク質合成に依存しないのに対し、同期発火刺激によるスパイン増大は長期相（1時間以上持続）が比較的大きく、脳由来神経栄養因子（BDNF）の分泌とタンパク質合成に依存するという違いがある。これらは形態可塑性の2つの代表的なモデルと考えることができる。

シナプス単独刺激では、刺激されたスパインにほぼ限局したカルシウム上昇が予想されるのに対し、同期発火刺激では、活動電位によって樹状突起でもカルシウム上昇が生じることが予想される。このようなカルシウム動態の違いが、形態可塑性の性質の違いに関連している可能性が予想される。しかしカルシウム動態には小胞体からのカルシウム遊離を含む多くのメカニズムが複合的に関与すると考えられる。また刺激を反復することにより、単発刺激とは異なる動態が生じる可能性もある。したがって、形態可塑性のメ



【図2】 2種類の形態可塑性誘導刺激。(A) シナプス単独刺激、(B) シナプス刺激直後に活動電位を発生させる同期発火刺激。

カニズムを理解するためには、形態可塑性誘導刺激時のカルシウム動態を実際に測定することが不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では可塑性誘導刺激時のスパインと樹状突起幹におけるカルシウム動態をカルシウムイメージングにより解析し、シナプス単独刺激と同期発火刺激の2種類の条件によって誘導される形態可塑性において、どのようなカルシウム動態が関与しているかを明らかにする。さらにケージドカルシウムを用いて局所的にカルシウム上昇を引き起こすことにより、カルシウム動態の役割を検証することも試みる。

3. 研究の方法

(1) ケージドグルタミン酸刺激によるスパイン形態可塑性誘導時のカルシウム動態の解析

ラットの海馬培養スライスにおいて、CA1 錐体細胞にホールセルパッチクランプを行って細胞内に蛍光カルシウム指示薬と形態観察用の蛍光色素 (Alexa Fluor 594) を負荷し、可塑性誘導刺激時のカルシウム動態と、スパイン形態を測定する。細胞外液にケージドグルタミン酸 (MNI-glutamate) を加え、スパイン近傍に刺激用レーザーを反復して照射してアンケーシングを行い、形態可塑性を誘導する。

一般的にカルシウム指示薬はカルシウムをキレートしカルシウム動態を変化させるため、カルシウム指示薬の存在下では形態可

塑性が阻害される可能性がある。そこでまずシナプス単独刺激条件で刺激を行い、カルシウム指示薬の存在下でも形態可塑性を誘導できる条件を探索する。

カルシウム指示薬の存在下で形態可塑性の誘導が可能であることが確認されたら、刺激時のカルシウム指示薬の蛍光画像を取得し、カルシウム濃度のピーク値や分布などについて解析し、形態可塑性との関係を明らかにする。

次に同期発火刺激でも、同様に形態可塑性が生じるかどうか確かめた上で、刺激時のカルシウム動態を解析する。比較のために、シナプス刺激のみ、および活動電位の誘導のみを行ったときのカルシウム動態の解析も行う。

(2) ケージドカルシウムを用いたスパイン形態可塑性の誘導

ケージドカルシウムの二光子アンケーシングを行うことにより、スパインや樹状突起幹において、任意のパターンで局所的にカルシウム上昇を引き起こすことが可能である。そこで可塑性誘導刺激で測定されたカルシウム動態をケージドカルシウムを用いて再現し、形態可塑性を引き起こすことができるか検証する。

4. 研究成果

カルシウム指示薬を負荷した海馬 CA1 錐体細胞において、シナプス単独刺激条件でケージドグルタミン酸をスパイン近傍で反復アンケーシングし、形態可塑性が生じるかどうか検討した。その結果、比較的親和性の高いカルシウム指示薬 (Fluo-5F) を負荷した場合にはスパイン増大が起きにくかったが、親和性の低いカルシウム指示薬 (Oregon Green 488 BAPTA-5N) の負荷時には、無負荷時と同程度にスパイン増大が生じた。これにより、形態可塑性の成立とカルシウム動態の関係付けが可能になった。

シナプス単独刺激時にはスパインで NMDA 受容体を介した強いカルシウム上昇が記録された。カルシウム上昇の程度はスパインによって異なったが、スパイン増大が起きたスパインでは強く、スパイン増大が起きなかったスパインでは弱い傾向が認められた。またスパイン近傍の樹状突起幹でもカルシウム上昇がみられた。これは通常、スパインから数 μm 程度の範囲に局限しており、スパインのカルシウムが、スパインネックを介して拡散した結果と考えられた。

このようなカルシウム動態は、基本的に単発刺激時 (Noguchi et al. 46, 609 (2005)) にみられるものと類似したものであった。こ

のことから刺激の反復による非線形な効果は、通常は限定的であると考えられた。しかし一部の測定においては、樹状突起でさらに広範囲にわたって強いカルシウム上昇が認められることがあった。これはスパインからの単なる拡散では説明できず、小胞体からのカルシウム放出が起きている可能性が考えられた。しかし、このような強いカルシウム上昇が起きる条件の詳細や生理的意義については未解明である。

同期発火刺激では、シナプス単独刺激の場合と同様に、刺激したスパインでカルシウム上昇が最も強かったが、シナプス単独刺激条件の場合と比べるとカルシウムのピーク濃度は低かった。このカルシウム上昇にも NMDA 受容体を介した流入が重要な寄与していると考えられた。また樹状突起幹においては、スパインからの拡散成分に加え、活動電位に依存するカルシウム上昇が広範囲に測定された。

さらにケージドカルシウムを蛍光色素とともに細胞内に負荷し、スパインにおいて、ケージドグルタミン酸刺激と同様のタイムコースでアンケーシングすると、スパイン増大が生じた。このことから、スパインにおけるカルシウム上昇はスパイン増大を引き起こすのに十分であることが示された。そこで次に樹状突起幹におけるカルシウム上昇の役割を解明するために、スパイン近傍の樹状突起幹においてもアンケーシングを行ったが、スパイン形態に顕著な変化はみられなかった。したがって、この刺激条件による樹状突起幹でのカルシウム上昇は、スパインの形態可塑性を引き起こすには不十分であると考えられた。樹状突起幹におけるカルシウム上昇の意義については今後さらに検討する必要がある。

本研究により、スパインの形態可塑性誘導刺激時のカルシウム動態が初めて明らかにされたが、今後はカルシウム上昇が引き起こす下流の分子メカニズムについて解明を進めていく必要がある。

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 3 件)

1. Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. and Kasai, H. In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J. Physiol.* 589: 2447-2457 (2011) 査読有

2. Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watanabe, S., Yagishita, S. and Noguchi, J. Learning rules and persistence of dendritic spines. Eur. J. Neurosci. 32: 241-249 (2010) 査読有

3. Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A. and Noguchi, J. Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci. 33: 121-129 (2010) 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. 河西 春郎, 金本 悠矢, 松崎 政紀, Graham Ellis-Davis, 百武 篤也, 新井 達郎, Klaus Hahn, Yi Wu, 石川 資子, 野口 潤, 葉山 達也, 渡邊 恵, 森田 進 「新しい2光子光刺激法の神経科学への応用」 第32回日本神経科学大会, 2009年09月16日, 名古屋国際会議場, 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし