

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分  
平成29年2月27日現在

大脳の記憶シナプスや回路の2光子顕微鏡と新規光プローブとを用いた研究  
Study of cerebral synapses and circuits  
using two-photon microscopy and novel optoprobes

課題番号：26221001

河西 春郎 (KASAI HARUO)

東京大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

大脳の興奮性回路を形成するスパインシナプスの動態は、記憶、知覚、情動などの認知過程の基礎をなし、精神疾患の原因となる。我々は、様々なシナプス光標識法を開拓して、記憶・学習シナプスや更に回路の標識を可能とする技術開発をする。また、記憶シナプスの光操作により、行動を改変し記憶回路と行動の関係を操作的に調べる道を拓く。

研究分野：神経科学

キーワード：記憶、シナプス、2光子顕微鏡、光プローブ

1. 研究開始当初の背景

我々は、2光子励起をケイジドグルタミン酸に初めて適用し、大脳皮質錐体細胞の樹状突起の単一スパインシナプスを刺激する方法を確立した (*Nature Neurosci.* 2001)。スパインシナプスとは錐体細胞においてグルタミン酸作働性の作るシナプスで、樹状突起スパイン（棘突起）をシナプス後部構造に持ち、著しい多型性を有し、精神神経疾患ではその形態・密度異常が起きる。我々の研究から、スパインの形態と機能の強い連関があり (*Neuron* 2005)、長期増強はスパイン個別的に起きスパイン頭部増大を伴う (*Nature* 2004)。この形態変化の基盤にはアクチン再構築があり (*Neuron* 2008)、長期記憶形成には更に蛋白質合成に依存的な頭部増大がある (*Science* 2008)。一方、頭部収縮は GABA が促進し、側方に広がり競合的選別を起こし、スパインの増大収縮は通常の細胞運動の様にコフィリンりん酸化・脱りん酸化のバランスで起き、細胞内  $Ca^{2+}$  が見事に二つの過程を競合させている (*Nature Neurosci.* 2013)。こうして、我々はスパインシナプスの増大と収縮・除去の両方の現象を自ら発見しそれらの分子基盤も明らかにした。大脳スパインの機能にはその形態・運動が重要であるとする。我々の考え方は現在では広く受け入れられ、教科書にも引用されている。

2. 研究の目的

そこで、我々は、これまでにわかってきたスパインの特徴を利用して、個体において頭部増大に関係したスパインを標識し、光で除去する蛋白性で遺伝子導入可能な記憶シナ

プス光プローブ（記憶光プローブ）の作成に取り組んでいる。本研究はこのプローブを完成させ、改良し応用を進めことを基軸とし、大脳の記憶回路をシナプスレベルで可視化し操作する新しい研究を開拓する。

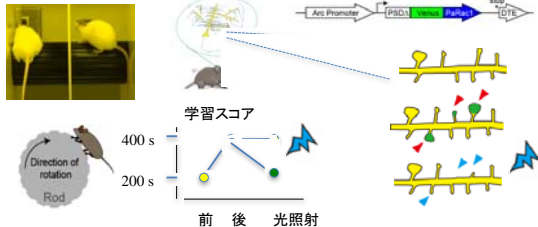
一方、シナプス前部の記憶への関与を調べる技術を開発してきた。まず、我々は、2光子励起法を生かして開口放出の新しい定量的解析法を分泌細胞において確立した (*Nature Cell Biol.* 2001; *Science* 2002; *EMBO J.* 2006)。更に蛍光分子の FRET を利用して、SNARE 分子が会合する過程を初めて報告し (*Cell Metabolism* 2010; *Diabetes* 2013)、神経終末において機能的な FRET プローブを作ること成功した。そこで、本研究ではこのプローブを応用して、シナプス前部の記憶への関与を調べるための技術を確立する。

3. 研究の方法

当研究室は2光子顕微鏡による光刺激法を開発し、スパインの動的特性や分子基盤を世界に先んじて解明してきた。この成果に基づき記憶関連スパインを標識し、その後改変する技術：記憶シナプス光プローブ（記憶光プローブ）の開発に成功しつつある。本研究では、このプローブやシナプス前部の機能を反映する光プローブなどの確立・改良・応用を進め、スパインシナプスの認知機能への関与を可視化や操作的手法で明らかにする。こうして、学習記憶・精神疾患に関わる神経回路の理解をシナプス前部、後部（スパイン）、そして両者の相互作用まで踏み込んだ統合的な戦略により飛躍的に推し進める。

#### 4. これまでの成果

1) 光遺伝学や我々の記憶光プローブ (シナプス光遺伝学) によって、学習に関連したスパインを標識した後に、標識されたスパインを消去することにより、その記憶を消去する実験については (図)、タスクに選択的な消去を達成したこと、また、選択的標識の機構を明らかにした。即ち、1) シナプス活動による局所的蛋白質合成の誘導、2) 合成蛋白



の増大シナプス特異的な取り込み、そして、3) 余剰の合成蛋白質のユビキチンプロテアソームによる除去による非特異的標識の抑制の3つの機構による。これらの結果を得たことにより、本研究課題は世界で初めてシナプス機能と動物行動を操作的に結びつける仕事と認められ、本課題の大きな目標を達成した(文献2)。

2) 記憶神経回路は特に大脳皮質で興味深い、線条体の様に条件付け学習の中核の脳領域も興味があり複数の脳領域でのシナプスの標識を本研究では提案していた。このために、まず、線条体シナプス形態可塑性の特徴づけを進めて来た。線条体の主細胞の中型有棘細胞にも立派なスパインがあるが、この形態可塑性については一切解明されていなかった。この神経細胞にはドーパミン入力があり、これが条件付け学習に関係すると言われて来たが、このドーパミン作用が条件付け学習の報酬時間枠と対応する様な作用枠を持っているか不明だった。今回、スパインを2光子グルタミン酸アンケイジングで刺激してドーパミン軸索を光遺伝学ですること、スパインの頭部増大が起きるが、それに対するドーパミンの作用時間枠はグルタミン酸の刺激後1-2秒の短い時間に局限しており、その様な時間枠はアデニレートシクラーゼのCa<sup>2+</sup>による増強効果が持続している間にD1受容体によってGsが刺激されることが必要であることがわかった(文献1)。

3) シナプス前部の機能はその大きさとは単純に対応せず、機能状態の読み取りが困難である。我々は、シナプス前部の開口放出に関わる3つ組みのSNARE分子に着目して、その複合化状態をFRET 蛍光寿命イメージングで可視化することにより、シナプス前終末の機能状態を可視化する技術の開発を進めた結果、シナプスでは3つのSNARE蛋白質が高率に複合化しており、その複合化がスパインとの接着面に鋭く起きていることを定

量化することに成功した。スパインが大きい程、SNARE複合化の量が多く、活性帯の大きさがスパインと対応していることを表すと考えられた。面白いことに、同様なシグナルは分泌細胞(ベータ細胞)にはなく、SNAREの複合化はカルシウム上昇の後で起きることが観察された。この様に、シナプスのSNARE分子の複合化の様子は、シナプスの機能状態の良い指標となることを明らかにした(文献3)。

#### 5. 今後の計画

これまでの研究を進展させ、神経回路の標識や、シナプス前部後部の力学的機能修飾について調査を進める。

#### 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

平成28年度日本医師会医学賞

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.
2. Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M. and Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature*, 525:333-338.
3. Takahashi, N., Sawada, W., Noguchi, J., Watanabe, S., Ucar, H., Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Ohno, M., Tokumaru, H. & Kasai, H. (2015). Two-photon fluorescence lifetime imaging of primed SNARE complexes in presynaptic terminals and beta cells. *Nature Communications* 6:8531.
4. Nagaoka, A., Takehara, A., Hayashi-Takagi, A., Shirai, F., Ishii, K., Noguchi, J., Ichiki, K. & Kasai, H. (2016) Abnormal intrinsic dynamics of dendritic spines in a fragile X syndrome mouse model in vivo. *Scientific Reports* 6: 26651.
5. Noguchi, J., Hayama, T., Watanabe, S., Ucar, H., Yagishita, S., Takahashi, N. & Kasai, H. (2016) State-dependent diffusion of actin-depolymerizing factor/cofilin underlies the enlargement and shrinkage of dendritic spines. *Scientific Reports* 6: 32897.

ホームページ等

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