

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成21年度採択分

平成24年 4月 26 日現在

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 synapse and exocytosis studied with two-photon microscopy**

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



研究の概要: 2光子顕微鏡法は生きた組織内部の観察を可能にする唯一の顕微鏡法である。我々は光刺激法を中心として2光子顕微鏡による新規手法を開拓し、大脳シナプス・開口放出の研究を一層推進する。

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、大脳、神経可塑性、脳機能イメージング、神経内分泌学

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てきた。2光子顕微鏡法は、生きた組織内部の顕微蛍光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

本研究では新規手法の開拓により、大脳シナプス・開口放出の研究を一層推進することを目的とする。

(1) 大脳スパインシナプスの収縮・除去の光刺激による誘発と分子基盤の解明

(2) 個体動物における光によるシナプス可塑性誘発法の開発

(3) 精神障害モデル動物におけるスパイン動態異常の可視化を開発

(4) 自然刺激による覚醒個体動物のスパインシナプスの動態の誘発と可視化

(5) シナプス前終末・開口放出機構の可視化手法の開拓

3. 研究の方法

(1) 生きた脳組織の深部観察のためには、超短パルス光の非線形効果を用いる2光子顕微鏡の利用が不可欠であり、我々は、シナプス動態を観察する工夫を積み重ねる。

(2) シナプスの運動性を調べるためには、個々のシナプスや神経を刺激する際に光を

用いる、光刺激法が威力を発揮する。光刺激法には、神経伝達物質受容体を直接刺激するケイジド試薬、遺伝子導入が可能な種々の蛋白質(PA-GFP, ChR2, PA-smallGs)などが既にあるが、我々もその開発・応用に参加する。これらの手法を用いることにより、最終的には個体脳において大域的なシナプス結合性の改変を行い、それによる動物行動や学習能への影響を調べる方法を構築する。

(3) 覚醒した個体動物における、シナプスの運動を直接観察する実験系を構築し、その時間経過や刺激特異性の観察を行う。

(4) シナプスの速い運動の帰結を明らかにするために、シナプス前終末の機能、即ち、開口放出機能を調べるプローブを開拓する。

(5) 神経細胞の動態が精神疾患モデル動物でどの様に変化するかを調べる。

4. これまでの成果

(1) スパインシナプスの収縮・除去・競合の分子基盤の解明: 単一スパインの収縮を光刺激で誘発することはこれまでできていなかった。我々は、スパイン収縮ではグルタミン酸アンケイジングに加えて抑制性伝達物質 GABA 受容体を刺激することを開発した Glutamate/GABA 2色アンケイジング法(文献4,9)により見出した。この GABA の効果は活動電位から 50 ミリ秒以内、刺激スパインから 20 ミクロン以内でないとは効かず、GABA シナプスの同期入力収縮に必須であった。この収縮(s)は側方に広がり、スパイン増大(e)と競合した(図1)。こうして、GABA 入力はシナプスの競合的選別を促進することが明

らかになった。また拡散性の収縮はアクチン繊維切断蛋白であるコフィリンの活性化と拡散により、一方、スパイン増大はコフィリンの不活性化により、不活性化したコフィリンはストレス繊維様構造を形成した単一スパインに局在しやすいことが明らかとなった。こうして、スパイン形態可塑性の骨格部分が解明された。

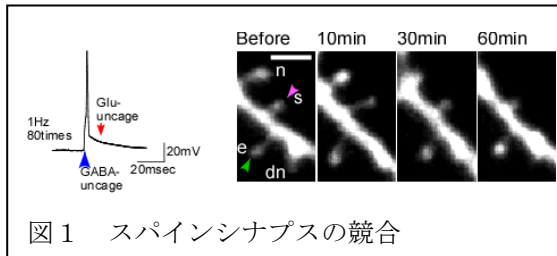


図1 スパインシナプスの競合

(2) PA-Rac プロブを用いて個体動物でシナプスを系統的に改変する技術を確認した。Phototropinを用いてPA-Racのプロモータなどをアレンジすることによって、学習特異的にスパインに PA-Rac を標識し、光刺激でそれらのスパインを除去することが可能となってきた。光操作により新規学習行動を消去できるか検証を進めている。

(3) 統合失調症モデル動物でのスパインの動態異常を明らかにした。カルシニューリン KO 動物の新皮質スパインを観察可能にして、個体で観察し、スパイン分布が大き目にシフトしており、フィロポーディアが少なく、新生したスパインが大きくなり易いことなどが明らかとなった。統合失調症の作業記憶障害や固執傾向と関連づけられるかもしれない。

(4) 覚醒動物のスパイン運動の可視化。覚醒マウスの視覚野頭蓋にガラス窓を付け顕微鏡下に固定して観察し、マウスにディスプレイから視覚刺激を与える時、特定の樹状突起の枝で適刺激に応じて刺激と秒単位で同期したスパイン増大、時に収縮、が起きることが見出された。同様なスパイン運動は視覚刺激を与えても麻酔時には見られない。学習・認知関連のスパイン運動が見出された可能性があり、調査を進めている。

(5) SNARE 分子の FRET/FLIM 画像によるシナプス前部機能解析手法の開発: SNARE 分子に対して GFP 融合蛋白質を作成した結果、シナプス前終末アクティブゾーン(AZ)では SNARE の複合化状態は他の標本に比して著しくよく、刺激により cisSNARE が形成される様子が可視化された。また、SNARE モチーフを2つ持つ SNAP25 は異なる SNARE 複合体を cross-link している domain swapping が示唆された。この特異な分子状態と、速い開口放出の関係の解明を進めていく。遅い分泌をするインスリン分泌細胞においては、刺激前の SNARE 複合化状態は悪く、刺激後に SNARE が

複合化するシグナルが検出された(文献 6)。この様に分泌の速さに応じて SNARE 複合化の初期状態が異なることが示された。

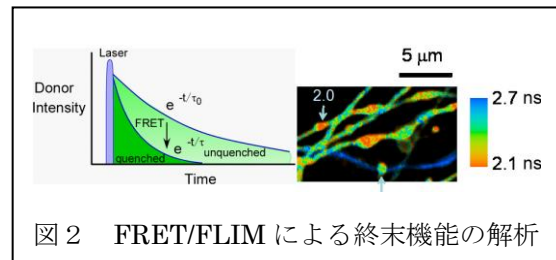


図2 FRET/FLIM による終末機能の解析

5. 今後の計画

これまでの実験結果を更に確固たるものにし、時機を得た論文発表に至るように研究を推進する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(1) 河西春郎、上原賞 (上原記念生命科学財団)、2010

(2) Kasai, H., Hatakeyama, H., Ohno, M. & Takahashi, N. Exocytosis in islet beta-cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 654, 303-336, 2010

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

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

(5) Kasai, H., Hayama, T., Ishikawa, M., Watanabe, S. & Yagishita, S. Learning rules and persistence of dendritic spines. *Eur. J. Neurosci.* 32, 241-249, 2010

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

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

(8) Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G.C.R., Kitamura, K., Kano, M., Matsuzaki, M. & 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, 2320-2329, 2011

(9) Kanemoto, Y., Matsuzaki, M., Morita, S., Hayama, T., Noguchi, J., Senda, N., Momotake, A., Arai, T., and Kasai, H. Spatial distributions of GABA receptors and local inhibition of Ca²⁺ transients studied with GABA uncaging in the dendrites of CA1 pyramidal neurons. *PLoS ONE*, 6, e22652, 2011

ホームページ等

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