

## 152. シナプス可塑性のリアルタイムイメージング

松井 秀彰

Key words : シナプス可塑性

宮崎大学 医学部 機能制御学講座  
統合生理学教室

### 緒 言

中枢神経系はニューロンの活動およびニューロン同士の情報伝達効率の制御によってその機能をなす。近年のイメージング技術の進歩で、特に小型の実験動物では、カルシウムイメージング等を用いて神経活動を *in vivo* でリアルタイムにモニターすることが可能であり、我々は実際に中枢神経の機能地図を作成した<sup>1)</sup>。しかしながらニューロン同士の情報伝達効率の変化を、つまりシナプス機能の変化を *in vivo* でとらえることは難しく、生体脳でいつ、どこでシナプス結合の強化や減弱が行われているかは多くの場合不明である。

グルタミン酸受容体は、中枢神経系において主たる興奮性神経伝達物質受容体であり、そのうち AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA-R) は、多くの神経活動に関与している。シナプス可塑性は記憶や学習の根本的なメカニズムであると考えられており、一方でシナプス可塑性の異常が、薬物依存や精神遅滞、統合失調症、鬱病などの様々な疾患と関連する可能性も近年示唆されている。シナプス伝達を強化する、その初期の分子メカニズムとしてシナプス後膜への AMPA-R の挿入によるシナプス後膜の AMPA-R の増加が、注目されている<sup>2)</sup>。

本研究ではシナプス後膜に存在する AMPA-R を特異的に可視化することにより、シナプスの可塑的かつ動的な変化を *in vivo* で観察、解析可能にすることを目的とした。

### 方 法

シナプスの可塑的な変化を半定量的に可視化するために、Postsynaptic densityprotein 95 (PSD95) と AMPA-R の間接的な相互作用を利用する。(図 1)

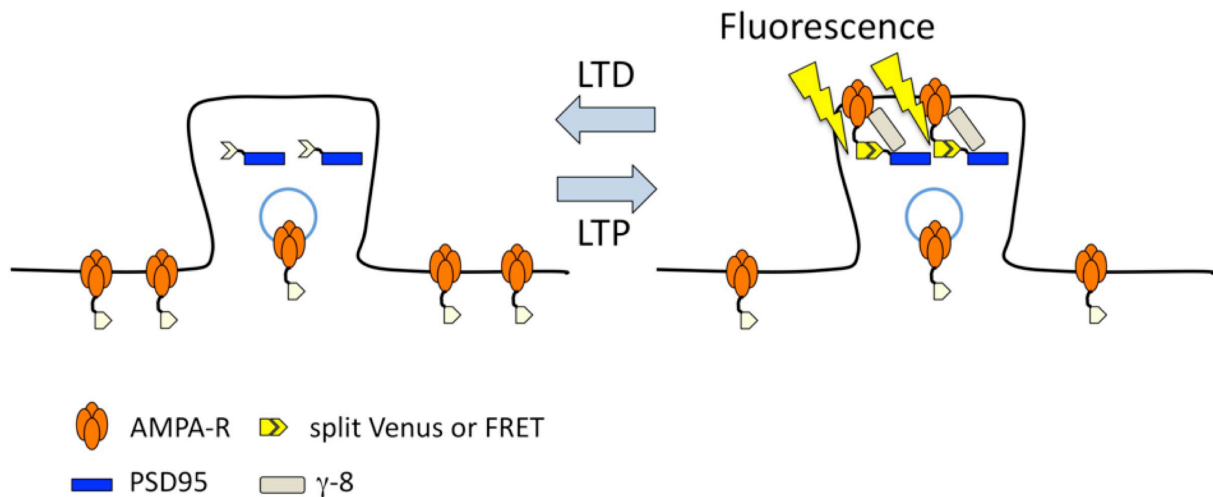


図1. シナプス機能の動的変化の可視化のストラテジー.

シナプス後膜に挿入された AMPA-R の数がシナプス伝達の強度に強く相関する. AMPA-R と PSD95 はシナプス後膜において TARP ( $\gamma$ -8 等) を介して複合体を形成する. その複合体形成を可逆的な split Venus 再構築により, あるいは Förster 半径の大きい FRET により可視化することでシナプス機能のダイナミックな変化をとらえる.

これまで報告されてきた split Venus 再構築のシステムは通常切断部位であれば, Venus の再構築は不可逆であることが多いとされ, *in vivo* で起きているダイナミックなシナプス強度の変化をモニタリングするには適さない. また Fluorescence resonance energy transfer (FRET) は非常に近接した 2 分子の相互作用を見るためのものであり, PSD95 と AMPA-R のような間接的な相互作用を観察する事は一般に難しい.

そこで第一に split Venus の際の切断部位を最適化することで, 可逆的な Venus 再構築を実現できないか試みた. 並行して FRET 効率のよい donor と acceptor の組み合わせを検討することも行った.

## 結果および考察

ラット神経初代培養細胞において, 様々な切断部位による split Venus を GluA1 および PSD95 に付加し, Venus 再構築シグナルを経時的に比較した. その結果, ある特定の Venus 切断断片を利用する場合でのみ, chemical LTP (Long-term potentiation) や chemical LTD (Long-term depression) を鋭敏に反映することが可能である事を見いだした. (図2)

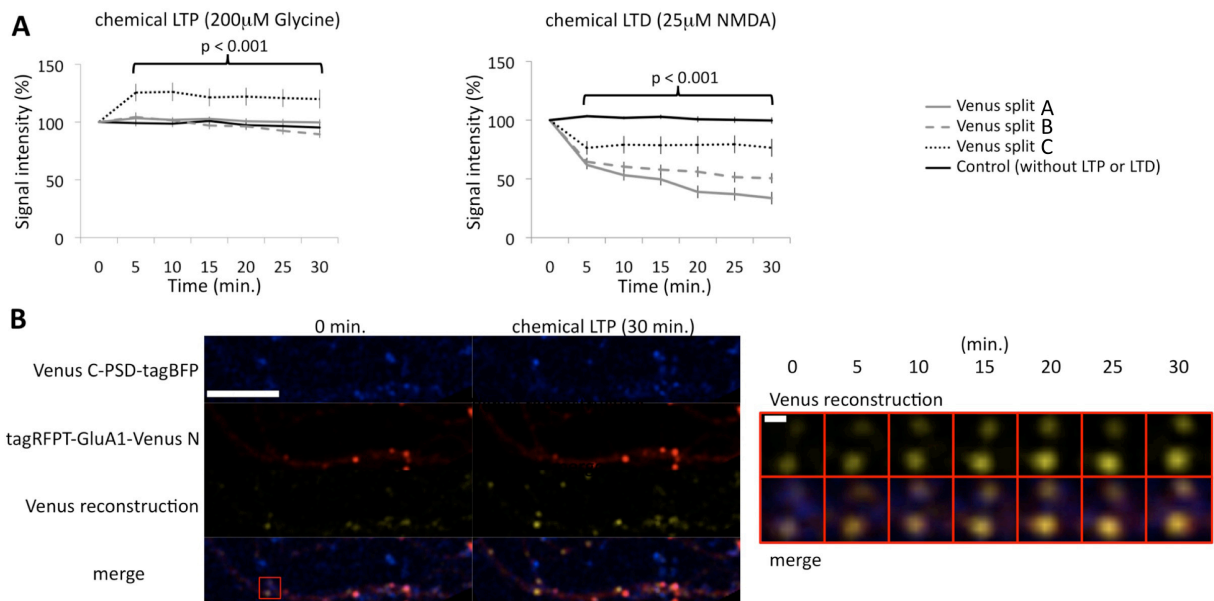


図2. LTP および LTD における split Venus 再構築のシグナル変化。

特定の Venus アミノ酸の間の切断のみが可逆的なシナプス機能の変化を捉える事が出来る。A) 異なる Venus 切断部位における split Venus 再構築の定量評価。B) LTP の例。LTP 誘導刺激 1 ~ 5 分後には Venus 再構築のシグナル上昇が観察される。右図は左図の赤枠内の拡大を示す。Ruler は左から順に 20  $\mu$ m, 2  $\mu$ m。

検索した他の切断部位では、結合が不可逆的なためか Venus 再構築は観察できるものの、特に LTP による Venus 再構築の増加を反映することが困難であった。おそらく培養期間中に Venus 再構築がおき、相対的に不可逆な結合を起し、LTP を惹起する刺激を行った際には既に結合が飽和状態にあったものと思われる。また、この Venus 再構築は、GluA1 の CTD あるいは PSD95 の PDZ ドメインを欠損させた場合、著明に阻害された。TARP  $\gamma$ -8 の delta4 変異体では、複合体形成が阻害されるが、この場合も Venus 再構築のシグナルは減少した。つまり観察された Venus 再構築は、実際の GluA1, PSD95 複合体の形成を反映していると考えられた。一方で FRET として、CFP と YFP の組み合わせ、あるいはより FRET 効率の良い Clover と mRuby の組み合わせを試みたが、いずれも AMPA 受容体と PSD95 の複合体形成を反映することはできなかった。現在はこの Venus 再構築による GEPI (Genetically Encoded Plasticity Indicator) を、マウス海馬スライスおよびゼブラフィッシュに導入し、様々な行動解析や疾患モデルにおけるシナプス強度の変化およびその異常を検討している。

GEPI はシナプス強度を電気生理ではなく画像的に、全中枢神経を対象に *in vivo* リアルタイムで追跡することを可能にする。今後、様々な生理状態や疾患状態におけるシナプス強度の変化やその異常を見いだすことを行っていく。

## 文 献

- 1) Matsui, H., Namikawa, K., Babaryka, A. & Köster, R. : Functional regionalization of the teleost cerebellum analyzed *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111** : 11846-11851, 2014.
- 2) Anggono, V. & Huganir, R. L. : Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **22** : 461-469, 2012.