

1. 研究課題名：2光子励起顕微鏡法を用いたシナプス・開口放出機構の研究

2. 研究期間：平成16年度～平成20年度

3. 研究代表者：河西 春郎（東京大学・大学院医学系研究科・教授）

4. 研究代表者からの報告

(1) 研究課題の目的及び意義

2光子励起断層顕微鏡法は近赤外のフェムト秒レーザーを光源として用い、他の顕微鏡法では観察できないインタクトな組織内部の分子細胞機構の観察を可能としている。更に、我々は2光子励起をケイジドグルタミン酸に適用し、大脳皮質錐体細胞の樹状突起の単一スパイン（シナプス後部構造）を刺激する方法を確立し、スパインの形態と機能に強い相関があることを解明した。また、この2光子励起グルタミン酸法によって、単一スパインレベルで可塑性を誘発することに成功し、シナプス可塑性の基盤に早期から形態変化が伴うこと、及び、長期可塑性はスパインの初期形態に依存することを見出した。このシナプスの形態・安定性・機能の連関は大脳の記憶の分子細胞的実態と考えられる。この仮説を具体的に検証するために、シナプスの形態・安定性・機能連関の定量的解明を進め、シナプスレベルの脳機能解析法を開拓する。一方、開口放出はシナプス前終末のみならず内分泌細胞、血液細胞の主要な機能でありシナプス後部でも重要な役割を果たすと考えられている。我々は、2光子励起法の同時多重染色性を生かした開口放出の新しい網羅的解析法を分泌細胞において確立した。本研究ではこれを発展させ、代表的な分泌細胞の開口放出機構の解明を更に進め、これに基づきシナプスでの開口放出の直接的測定法を開発し、シナプス機能の統合的理解を進める。

(2) 研究の進展状況及び成果の概要

2光子励起法による光化学と2光子蛍光観察を同時に行う二重走査2光子励起顕微鏡を新たに構築し、次の様な進捗及び成果を得ている。

1) 単一スパインの頭部及びネックの形態はそれぞれ、スパインの機能及び可塑性の調節因子であることを明らかにした。2) 単一スパイン内のアクチン繊維動態を可視化し、存在位置や回転率の異なる三つのアクチン繊維があり、それらが力を出しながら動的にスパインの定常的機能、可塑性や安定性を調節している様子を明らかにした。3) 頻回シナプス刺激がシナプス後細胞のスパイクを伴わない長期増強誘発刺激によるスパイン頭部増大は蛋白質合成非依存的であったが、スパイクを伴う場合には蛋白質合成依存的な増大が漸増的に起き、特有のネックの形態変化を伴うことを見出した。この大きな差を説明するシグナル機構を解明した。こうして、蛋白質合成に依存する頭部増大は、依存しない頭部増大を見印 (tag) として、単一スパインレベルで誘発されることを明らかにした。4) スパインの安定性を内因的変動として定量化することに成功し、シナプスの集団的挙動が生まれ、これが記憶現象と類似する性質を持つことを明らかにした。5) 成熟動物個体の新皮質において、2光子ケイジドグルタミン酸法により、形態可塑性を誘発する実験に成功した。6) 開口放出を起こす小胞の大きさをナノメートル精度で測定する新手法 (TEPIQ 法) を開発し、多くの分泌細胞が逐次開口放出を用いていることを明らかにした。7) 開口放出に伴う融合関連分子 (SNAP25) の準備状態を FRET で捉えた。

5. 審査部会における所見

A (現行のまま推進すればよい)

シナプス可塑性の動的構造解析について、シナプス後部のスパイン増大の分子機構をアクチンのダイナミクス、BDNF の役割を含めて2光子励起法によるイメージングで明らかにし、形態と機能の関連解明において新しい所見を得ており順調に進んでいる。これらの観察技術は独自のもので世界のトップクラスである。これらの成果はまだ論文発表されていないが、極めて優れた成果と考えられる。また、切片のみならず in vivo での観察に進んだことは高く評価される。開口制御研究については、今後の発展を期待する。また今後の展開として、シナプス安定化機構の研究を通して統合失調症メカニズムの理解が進むことを期待する。