

# フェムトリター微小領域であるシナプスにおけるアクチン動態計測

東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻  
尾藤 晴彦

## 1. はじめに

脳高次機能と呼ばれる意識、情動、記憶、意欲、注意などの機能は、容積にして1 フェムトリター以下の微小領域であるシナプス前終末やシナプス後肥厚部における化学反応とイオンの流れに支配されている。この微小領域に最も多く存在するタンパク質がアクチンである。また、いくつかの遺伝性の精神遅滞や精神疾患では、アクチン細胞骨格制御不全によるシナプス形態や膜タンパク輸送の異常が示されている。そこで本研究では、新規アクチン動態計測法を開発することにより、アクチン制御がフェムトリター微小領域であるシナプスの形態安定性やダイナミズムをどのように制御しているかという点を徹底的に解明する。本研究は、脳疾患の病態解明にとって最も重要な、シナプス内フェムト領域の新たな情報伝達学を開拓する端緒になるとともに、シナプス細胞骨格制御不全機構の解読により新たな創薬標的が明らかにされることが期待される。

## 2. 方法

マウス・ラット脳より大脳皮質および海馬を取り出し、まず分散初代培養培養システムにおいて、以下のような新たな原理・手法を取り入れたアクチン動態イメージング法を確立する。

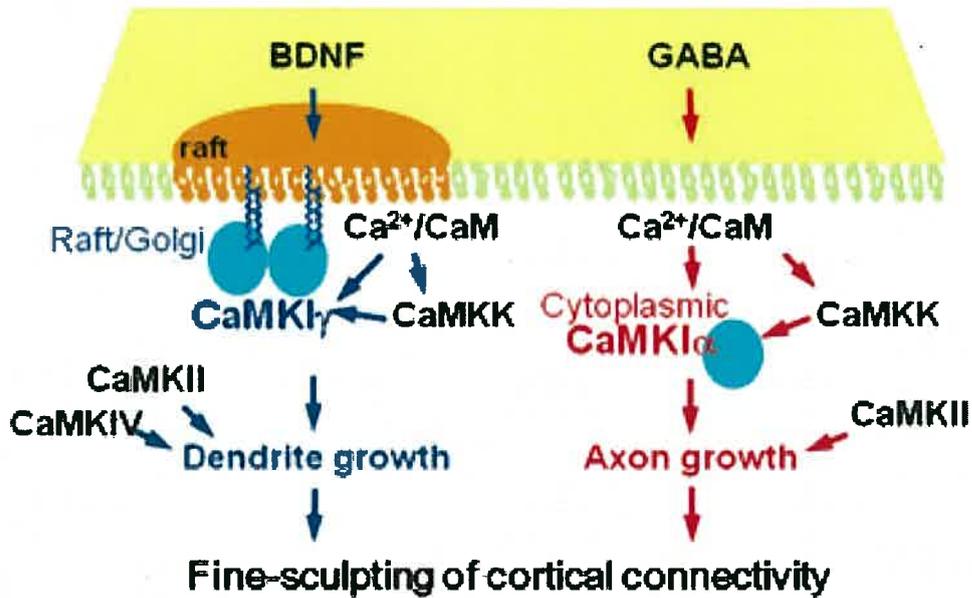
- 1) 単一シナプスを選択的に刺激可能なUVグルタミン酸光融解法
- 2) 単一シナプス刺激によるシナプスカルシウム応答と細胞内シグナルの2重FRET計測

また、このような手法を用いて、カルシウム依存性シグナル伝達分子の役割について探索を進める。

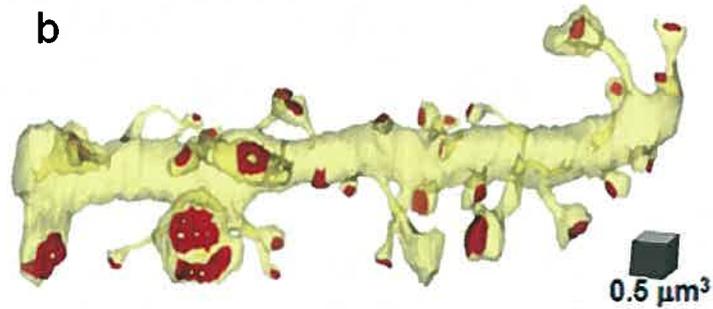
## 3. 結果

神経細胞における長期蛍光イメージングの最大の問題点は、①光照射による毒性をいかに避けるか、ということと②数多くのデータ点をいかに取得するか、という相反する要求のトレードオフである。そこで、正常な突起形成を阻害せずに、多視野・同一視野内多点・長時間・自動観察を行うノウハウを樹立した。この手法を用い、CaMキナーゼファミリー遺伝子の各種アイソフォームのRNA干渉法に基づくアクチン等表現型解析を行い、いくつかの興味深い変化を明らかにした

(Takemoto-Kimura et al. Eur. J. Neurosci., 2010; 投稿準備中)。



引き続き、樹状突起スパイン上にある単一シナプスを、MNI-GluのUV光融解により0.5Hz程度から20 Hzの周波数域で活性化させる技術を確認し、femtoリッター微小領域であるシナプス (Bito, Nature Chem. Biol. 2010) 内におけるアクチン動態の可視化・定量を試みた (投稿準備中)。さらに、単一シナプス刺激によるシナプスカルシウム応答と細胞内シグナルの2重FRET計測を実施し、アクチン動態を規定するカルシウム依存性酵素の活性化制御機構を明らかにした (投稿中)。



Estimating the number of molecules in a standard spine (0.16 fL)

At 1  $\mu\text{M}$ ,

$$1 \times 10^{-6} \text{ (mol/L)} \times 0.16 \times 10^{-15} \text{ (L)} \times 6.02 \times 10^{23} = 1 \times 10^2 \text{ molecules}$$

At 10 nM,

$$10 \times 10^{-9} \text{ (mol/L)} \times 0.16 \times 10^{-15} \text{ (L)} \times 6.02 \times 10^{23} = 1 \text{ molecule}$$

#### 4. 考察

発育時における脳神経回路網の発達異常が、精神・認知・神経の障害をもたらす根本原因の一つであると最近考えられてきている。またいったん正常な発育を遂げた場合でも、正常の加齢とともに、脳神経回路網の機能的異常が蓄積し、脳高次機能（意識、情動、記憶、意欲、注意など）の機能障害が高い確率で襲ってくる。このことから、神経回路形成ならびにシナプス機能の根本原理としてのアクチン動態とその制御機構を解明することによってこそ、脳高次機能を守り、育み、活かす知恵が生まれると予見される。

#### 5. 発表論文、参考文献

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, **Bito H**. Ca<sup>2+</sup> signaling coordinates the formation and the morphological maturation of neuronal circuits and synapses: an essential role for excitation-morphogenesis coupling via CaM kinases. *Eur. J. Neurosci.* 32: 224–230, 2010.

**Bito H**. The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Chem. Biol.* 6: 560-563, 2010.