

## 論文の内容の要旨

論文目録 **Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor  
expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons**

和訳 海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起スパイン形態と  
AMPA 型グルタミン酸受容体の機能的発現

指導教官 宮下 保司 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 8 年 4 月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 松崎 政紀

樹状突起上のスパインは、中枢神経細胞における興奮性シナプス結合の主たる部位である。その機能を担う分子として特に、スパインに集積している AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) は、シナプス前終末から放出されたグルタミン酸と結合し速いシナプス後電位を生じさせる、シナプス伝達効率の決定因子であり、記憶の獲得・保持に中心的な役割を担っている。生化学的研究からシナプス後肥大部における AMPAR は細胞骨格系にも関わる様々な分子機構によって制御され、膜への輸送やリン酸化が起こることが明らかになっている。一方、Cajal によるスパインの発見以来、多くの形態学的知見

から、スパインが多様な形態を持ったメタボリックに独立した機能素子として作用すると主張されてきた。しかし、スパインの構造は小さく、樹状突起上に密集しているために、従来の電気生理学的手法（イオントフォーシス）・光学的手法（ケイジド試薬）を用いては、単一スパインでの AMPAR の機能を系統的に調べることは困難であり、機能と形態の関連性を直接的に検証することができなかった。

そこで我々は、単一スパインレベルでの形態および AMPAR の機能を体系的に調べることを目的として、2光子励起法によるケイジドグルタミン酸の活性化と蛍光イメージングを組み合わせた方法論を構築した。720nm の波長を持つ超短パルスレーザーを顕微鏡に導入し、対物レンズ後の標本面での任意の一点にレーザーを回折限界（x 軸 0.29  $\mu\text{m}$ 、z 軸 0.89  $\mu\text{m}$ ）まで集光できる光学系を構築した。また、2光子励起法を適用できるケイジドグルタミン酸はこれまで報告されていなかったため、2光子吸収断面積が大きく、フォトリシスの速い、水溶液中で安定な、新規のケイジドグルタミン酸、1-[S-(4-Amino-4-carboxybutanoyl)]-4-methoxy-7-nitroindoline (MNI グルタミン酸)、をケイジド試薬合成の専門家である共同研究者の Graham C.R. Ellis-Davies (MCP Hahnemann University, Philadelphia, USA) と共同開発した。

ホールセルクランプしたラット培養海馬細胞の樹状突起近傍で MNI グルタミン酸を2光子励起法によって 50  $\mu\text{s}$  の間だけ活性化させると、シナプス前終末からグルタミン酸が放出されて起こる mEPSC の時間経過とほぼ同一である、AMPAR による電流反応を誘起することができた。その反応の空間解像度は水平方向で 0.45  $\mu\text{m}$ 、垂直方向で 1.1  $\mu\text{m}$  であった。この実験結果は理論的に推定される2光子励起法による MNI グルタミン酸の活性化で引き起こされる AMPAR 反応の時間的・空間的解像度に一致する。この方法を用いて樹状突起上での機能的な AMPAR の2次元空間分布を調べると、AMPAR は樹状突起に沿ってクラスター状に散在し、その分布は FM1-43 によって染色されたシナプス前終末と良く一致した。従って、2光子励起法によって、シナプス前終末のシナプス

小胞からの開口放出という生理的現象に極めて近いグルタミン酸の放出を、3次元的な任意の一点で人工的に作り出すことが可能となった。

この方法論をラット海馬の急性スライス標本に適用し、ホールセルクランプしたCA1錐体細胞の樹状突起に沿って3次元的にグルタミン酸感受性のマッピングを行った。近隣（距離10 $\mu\text{m}$ 以内）の個々のスパインを比較するとグルタミン酸感受性には大きな相違（CV = 0.45  $\pm$  0.11、9細胞）が見られた。グルタミン酸感受性はスパインの体積に強く相関し（相関係数0.80  $\pm$  0.07、9細胞）、キノコ型の大きな頭部を持つスパインでは強く、細いスパインや細長いフィロポディアでは反応がないか、弱い反応しか得られなかった。この結果はいわゆる「サイレントシナプス」が後者の形態をもったスパインである可能性を示唆している。多くのスパインでは、その頭部の一部に強いAMPAの反応が見られ、AMPAがシナプス後肥大部に局在するという電子顕微鏡による報告とよく一致した。一方、グルタミン酸感受性及び形態（体積）の空間的な自己相関を求めると、距離にして1 $\mu\text{m}$ 以下の隣接したスパイン間においても両者共に相関が無かった。最後に、キノコ型スパインにおいて非定常状態ノイズ解析を行い、機能的なAMPAの数は単一スパインあたり最大で約150個（46-147個、 $n = 8$ ）存在することを明らかにした。これらの結果から、スパインの形態と機能的AMPAの発現は強く相関しており、その機能的発現量は高いダイナミックレンジを持ちながら、単一スパインレベルで独立に調節されていることが示された。

我々は、樹状突起スパインの形態と機能に密接な相関関係があることを単一シナプスレベルで初めて立証した。我々の開発した2光子励起活性化法は、高速で再現性良く、3次元的な任意の空間部位において、シナプス前終末からのグルタミン酸放出を光学的に模倣することを可能にした。この方法論は今後、神経細胞のみならず他の多くの細胞におけるサブミクロンレベルでの化学・分子シグナル伝達のダイナミクスを明らかにする手段として、極めて有用であると思われる。