

氏 名 本蔵 直樹

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 970 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Action organizations in single dendritic spines studies with
two-photon photoactivation

論文審査委員 主 査 教授 重本 隆一
教授 岡田 泰伸
教授 鍋倉 淳一
教授 曾我部 正博(名古屋大学)
教授 河西 春郎 (東京大学)

論文内容の要旨

2 光子励起光標識法を用いた単一スパインのアクチン繊維構築の解析

脳の学習・記憶の素過程はシナプスの伝達効率の変化（シナプス可塑性）にあると考えられている。シナプス可塑性の代表例である長期増強(LTP)は興奮性シナプスの伝達効率が増加する現象である。大脳皮質においては、興奮性シナプスの多くは樹状突起のスパインに形成される。スパインは丸い頭と細長い首を持つ突起構造であり、その構造は非常に多様である。近年、スパイン頭部構造の大きさに依存して、機能的なグルタミン酸受容体の発現量が決まること、長期増強に際してはスパインの頭部の増大が起きること、またこの構造可塑性がスパイン初期形態に依存することが示されている。このスパインにはアクチン繊維(F-actin)が多く存在するが、他の細胞骨格タンパク質である微小管や中間系フィラメントは存在せず、F-actin が主要な細胞骨格と考えられている。

F-actin は絶えずプラス端において単量体アクチン(G-actin)を重合し、マイナス端で脱重合を繰り返し全体としてプラス端からマイナス端へと F-actin に流れを生じさせている。この現象はアクチンのトレッドミリングと呼ばれ、これより発生する力を利用して細胞形態を変化させることができる。また、スパインに存在する F-actin の回転速度は、時定数にして1分以内であることが単離分散培養系で示されている。これらの知見より、スパインに存在する F-actin は動的であり、その力を用いてスパインの形態変化を導くと大雑把に考えられてきた。しかし、これまでの研究では単一スパイン内での F-actin の構築、即ちその配列や動態、は未知であった。そこで彼は GFP の改変タンパク質 PA-GFP を用いて、単一スパインの F-actin の動態観察を試みた。この蛍光タンパク質は、紫外光照射により蛍光波長が紫外領域から可視領域へとシフトする特長を有しており、光活性化された分子の蛍光情報だけを抽出することが出来る。そこで PA-GFP と β -actin を融合した DNA を作製し、その DNA を組み込んだプラスミドを海馬スライス培養細胞に遺伝子銃で導入し、CA1 錐体細胞の単一スパインに存在するアクチン分子の動態を、2光子励起顕微鏡を用いて蛍光観察した。また、PAGFP-actin の光活性化にも2光子励起光活性化法を用いることで、光活性化領域の解像が単一スパイン以下となった。

まず、光活性化前の PAGFP-actin の蛍光像よりスパインと樹状突起の全アクチン分子の濃度比が分かり、その比はおおよそ 1:6 (樹状突起:スパイン)であった。次に、2光子励起光活性化法を用いてアクチン分子の構成を調べたところ、拡散速度の違いから G-actin(ミリ秒のオーダー)と F-actin(分のオーダー)は明確に区別でき、その比率を求めることができた。その結果、樹状突起本幹では、G-actin:F-actin の比率が 71:29 であるのに対し、スパインでは 12:88 であり、これは樹状突起本幹のアクチン総量を 100 とすると、72:528 と表わされる。こうして、スパインには F-actin が濃縮していることが定量的に示された。また、G-actin はスパインと樹状突起本幹で非常に近い値をとるこ

とが明らかとなった。これは G-actin はスパインのネックを速く拡散し、スパインと樹状突起本幹で平衡に達していることを示している。この速い拡散のために、2光子励起光活性化を行った1秒後に観察される蛍光像は、F-actin のみを反映していることがわかった。

この方法論を用いてスパインの F-actin の性質を詳細に調べたところ、蛍光強度減衰の時間経過より F-actin には動的小よび安定的な性質を持つ2種類のプールが存在することが分かった。その減衰の時定数は 1.2 分および 17 分であった。また、安定的な F-actin プールはスパインのネック付近の基底部に存在し、動的なプールはそれ以外の領域に存在していた。安定的な F-actin プールはスパイン体積に比例してその存在比率が増し、その存在量はスパイン体積の 2 乗に比例した。こうして、大きなスパインの F-actin は小さいスパインのそれより全体として安定であることがわかった。

一方、動的な F-actin はスパイン先端部から基底部に向けてトレッドミリングしており、その流れる速さは 0.2-1.2 $\mu\text{m}/\text{分}$ 、またその流れの長さは 0.2-0.7 μm であった。この際、スパイン体積が大きいほど流れは速く、かつ長さも長いことがわかった。これは大きなスパイン程、F-actin は大きな力でスパインを膨張させていること、即ち、スパイン体積はアクチン重合の速さで決まることを示唆した。実際、スライス標本にアクチン重合阻害剤である Latrunculin A を投与したところ、スパイン頭部体積は数分以内に収縮することが明らかとなった。

この様に、彼はサブスパインレベルのアクチン繊維の構築を初めて明らかにした。動的 F-actin プールはスパイン頭部形態をよく説明した。一方、安定的プールは、スパインのネック形態及びスパインの形態安定性に関係することが示唆された。

脳の学習・記憶の素過程と考えられているシナプス可塑性のうち長期増強は興奮性シナプスの伝達効率が持続的に増加する現象である。大脳皮質においては、興奮性シナプスの多くは樹状突起のスパインに形成される。スパインの構造は非常に多様であり、頭部構造の大きさと機能的なグルタミン酸受容体の発現量が相関することや長期増強の際にスパインの頭部の増大が起きることが示されている。このスパインにはアクチン繊維(F-actin)が多く存在し、F-actin が主要な細胞骨格と考えられている。F-actin は絶えずプラス端において重合、マイナス端で脱重合しており、これより発生する力を利用して細胞形態を変化させることができる。また、スパインに存在する F-actin の回転速度は、時定数にして1分以内であることが単離分散培養系で示されている。しかし、これまでの研究では単一スパイン内での F-actin の構築や動態は未知であった。本研究では紫外光照射により蛍光波長が紫外領域から可視領域へとシフトする PA-GFP で標識した β -actin を用いて、単一スパインの F-actin の動態を解析した。この蛍光タンパク質を海馬スライス培養細胞に発現させ、CA1 錐体細胞の単一スパインに存在するアクチン分子の動態を、2光子励起顕微鏡を用いて蛍光観察し、PAGFP-actin の光活性化にも2光子励起光活性化法を用いることで、光活性化領域の解像を単一スパイン以下とすることに成功した。

光活性化前の PAGFP-actin の蛍光像より求めた樹状突起とスパインの全アクチン分子の濃度比はおおよそ1:6であった。2光子励起光活性化法を用いてアクチン分子の動態を調べたところ、拡散速度の違いから G-actin と F-actin は明確に区別でき、その比率を求めることができた。その結果、樹状突起本幹では、G-actin : F-actin の比率が 71 : 29 であるのに対し、スパインでは 12 : 88 であり、これは樹状突起本幹のアクチン総量を100とすると、72 : 528 と表わされた。こうして、スパインには F-actin が濃縮していることが定量的に示された。また、G-actin はスパインのネックを速く拡散し、2光子励起光活性化を行った1秒後に観察される蛍光像は、F-actin のみを反映していることがわかった。また、蛍光強度減衰の時間経過より F-actin には動的小よび安定的な性質を持つ2種類のプールが存在することが明らかになり、その減衰の時定数は1.2分および17分であった。また、安定的な F-actin プールはスパインのネック付近の基底部に存在し、その存在量はスパイン体積の2乗に比例した。これより、大きなスパインの F-actin は小さいスパインのそれより全体として安定であることがわかった。一方、動的小な F-actin はスパイン先端部から基底部に向けて流れており、その速さは0.2-1.2 $\mu\text{m}/\text{分}$ 、またその流れの長さは0.2-0.7 μm であった。この流れは、スパイン体積が大きいほど速かつ長さも長いことがわかった。これは大きなスパイン程、F-actin は大きな力でスパインを膨張させていること、即ち、スパイン体積はアクチン重合の速さで決まることを示唆した。実際、スライス標本にアクチン重合阻害剤である Latrunculin A を投与したところ、スパイン頭部体積は数分以内に収縮することが明らかとなった。

以上の結果はサブスパインレベルのアクチン繊維の構築を初めて明らかにし、動的小な F-actin プールと安定的な F-actin プールがスパイン頭部形態を決めていることを示唆したものであり、大変重要でありかつ興味深い。従って委員会は全員一致で本論文が博士の学位論文として相応しいものであると判定した。