

氏 名	野口 潤		
学位（専攻分野）	博士（理学）		
学位記番号	総研大甲第 882 号		
学位授与の日付	平成 17 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	Spine-neck geometry determines NMDA receptor - dependent Ca ²⁺ signaling in dendrites		
論文審査員	主 査	教授	重本 隆一
		教授	河西 春郎
		教授	川口 泰雄
		教授	曾我部 正博（名古屋大学）

NMDA receptors mediate increases in the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) of neurons that lead to bidirectional regulation of synaptic plasticity, which supports self-organization of neuronal networks in the central nervous system. Synaptic functions and plasticities have been proposed to be dependent on synaptic structure. With the use of two-photon photolysis of caged glutamate, Matsuzaki *et al.* previously showed that spine-head volume is an important determinant of the expression of AMPA receptors. The same approach was recently applied to induce NMDA receptor (NMDAR)-dependent long-term plasticity at visually selected single spines; this plasticity was dependent on spine-head volume and was induced more efficiently in smaller spines than in larger ones.

However, the dependence of NMDAR-mediated Ca^{2+} signaling on spine structure has not been clarified, given that selective stimulation of single presynaptic fibers that innervate identified spines has been difficult to achieve electrically because of the spread of the electric current. The role of diverse spine-neck structures in the regulation of neuronal signaling is also unclear.

In this study, we combined two-photon photolysis of a caged glutamate with two-photon Ca^{2+} imaging and whole-cell patch-clamp recording, to monitor the activation of NMDARs in neurons with a high spatial resolution. In acute hippocampal slices, we imaged CA1 pyramidal neurons clamped in the whole-cell mode with a solution containing the low-affinity Ca^{2+} indicator OregonGreen-BAPTA-5N (OGB-5N, 500 μM) and the Ca^{2+} -insensitive dye Alexa Fluor 594 (40 μM). To monitor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the spine head and at the base of the spine simultaneously, we performed line scanning along the axis of the spine after stimulation. Since OGB-5N has a low affinity for Ca^{2+} (dissociation constant, 32 μM) and its Ca^{2+} binding ratio (κ) is <15.6 , it affects the intrinsic Ca^{2+} buffers of neurons only minimally, and therefore would be expected to have the least effect on the spatiotemporal pattern of Ca^{2+} signaling.

The NMDAR blocker APV eliminated both the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) and the whole-cell current induced by photolysis of MNI-glutamate, indicating that the response was mediated by NMDARs. The full-width-at-half-maximal (FWHM) resolution of NMDAR-mediated current (I_{NMDA}) estimated was $\sim 1.4 \mu\text{m}$, consistent with the prediction made from the established slow gating of NMDARs. Increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were often undetectable ($0.5 \pm 0.5 \mu\text{M}$, mean \pm SD) when uncaging was effected at arbitrary points along the dendritic shaft at a distance of $>2 \mu\text{m}$ from a neighboring spine, indicating that NMDARs were present in relatively small numbers on the dendritic shaft compared with the spine head.

We analyzed the data from 213 spines (17 dendrites from different animals), and found that the amplitude of I_{NMDA} positively correlated with spine-head volume (V_H). A substantial I_{NMDA} was detected even in small spines, in contrast to AMPAR-mediated currents. This observation was confirmed by the fact that a marked $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ was detected in the head of most small spines. This indicates that small spines nearly correspond to post-synaptic “silent synapses,” which express significant NMDARs but little AMPARs. Moreover, we found that $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ of spine head tended to be largest in spines with a small V_H , with the mean value (\bar{r}) of correlation coefficients being -0.50 for the four dendrites.

We found that neck Ca^{2+} conductance (g_N) was highly related to V_H : g_N was small ($<2 \mu\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) when the spine-head volume was $<0.1 \mu\text{m}^3$, but it increased markedly in spines with head volumes of $>0.1 \mu\text{m}^3$. A double logarithmic plot revealed that g_N was roughly proportional to the second power of V_H . The head-neck relation was

confirmed by values of g_N (g_N^*) which estimated from morphology of the spine necks. We found that the values of g_N were well correlated with those of g_N^* , especially for spines on the same dendrite. We found that g_N^* also depended on the second power of V_H , and that this relation was due to the correlation of V_H with both neck diameter and neck length.

We think that g_N (spine neck geometry) has much effect on NMDAR-mediated Ca^{2+} signaling, because we found that another Ca^{2+} clearance mechanisms of spine heads, Ca^{2+} pumps (g_H), played minor role in determining the V_H dependence of $\Delta[Ca^{2+}]_i$. Thus, $\Delta[Ca^{2+}]_i$ was larger and more confined within a head of smaller spines, mainly because they tend to have thin and/or long necks (smaller g_N) which prevent outflow of Ca^{2+} into dendritic shafts. In contrast, $\Delta[Ca^{2+}]_i$ was smaller but spread into dendritic shafts from larger spines because of their thick and/or short necks (larger g_N).

We conclude that spine-neck geometry is key determinant of spine Ca^{2+} signaling, allowing small spines to be the preferential sites for isolated induction of long-term potentiation.

論文審査結果の要旨

カルシウムシグナルは、神経細胞の回路網の形成やシナプスの可塑性に重要な役割をはたすことが知られている。大脳皮質の興奮性の入力のほとんどは樹状突起のスパイン(棘突起)に接続するのでスパインにおけるカルシウムシグナルのダイナミクスは、神経科学の多くの分野において関心のある問題である。一方、スパインの形態は非常に多様性に富んでおり、その形態の多様性が機能とどのように関係するかについてこれまで長い間議論されてきた。

本研究では、樹状突起スパインの形態とその機能、特にカルシウムシグナルの制御との関係を探求する目的で2光子レーザー顕微鏡を用いた測定を行った。まず、ケイジドグルタミン酸の2光子アンケイジングと低親和性カルシウム感受性色素による2光子蛍光イメージングおよびホールセルパッチクランプ法を組み合わせることにより、スパインにグルタミン酸を投与した際の細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇と興奮性シナプス後電流(EPSC)を同時測定する方法を開発した。この方法を用いて、急性海馬スライス標本 CA1 錐体細胞において、スパイン頭部とその基部の樹状突起における NMDA 型グルタミン酸受容体依存的なカルシウムシグナルと EPSC の同時測定をさまざまな形態のスパインで系統的に行った。その結果、NMDA 受容体の発現はスパイン頭部体積に正に相関した。また、頭部体積の小さなスパインは機能的な AMPA 受容体の発現はほとんどないが NMDA 受容体は比較的多く発現していた。これにより頭部体積の小さなスパインは「サイレントシナプス」の概念にほぼ合致した。スパイン頭部のピーク $[Ca^{2+}]_i$ (c_H) は頭部体積とおよそ逆相関し、スパイン基部のシャフト部分の $[Ca^{2+}]_i$ (c_D) は頭部体積と正に相関した。また、 c_H と c_D から Ca^{2+} に対するスパインネックのコンダクタンス(g_N)を推定することにより、 g_N は樹状突起内の各スパイン間で大きな差があることがわかった。スパインネックの蛍光画像からスパインネックの直径と長さを推定することにより g_N を求めることも行ない、カルシウム濃度からの推定値と概略対応することを確認した。さらに g_N はスパイン頭部体積の約2乗に相関すること、つまりスパインネックの形態は急峻な頭部体積依存性があることがわかった。このことより、スパイン頭部からのネックを介する Ca^{2+} の拡散は、頭部体積の大きいスパインでは g_N が大きいため大きく、頭部体積の小さいスパインでは小さいことが示された。このため、特に頭部体積の小さなスパインの頭部においては $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が大きく、また、シャフトへの拡散は小さくなる傾向があるので、小さなスパインは独立して可塑性を起しやすいたことが示唆された。以前の報告ではケイジドグルタミン酸のアンケイジによる形態可塑性の誘発実験において、頭部体積が小さいスパインで高率に可塑性が誘発されることが示されていたが、頭部体積が $0.1 \mu m^3$ よりも大きいにもかかわらず形態可塑性を誘発した4個のスパインのうち全てが $g_N < 1$ のネックの細いスパインであった。これらのことから、ネック形態はシナプス可塑性に関連する可能性が実際に示された。

以上の研究は独自に開発した細胞内カルシウム濃度と EPSC の同時測定法により、非常に困難な課題に対して挑戦し、新たな知見を得たものである。また出願者の粘り強い努力と集中力、および科学的背景知識と測定法への深い理論的理解に基づいてなされたものである。その結果は、 Ca^{2+} に対するスパインネックのコンダクタンスの重要性を確立するものであり、スパインの独立可変性やシナプスの可塑性発現に対する理解を大いに深めるものであると考えられる。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。