

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書

2020年 4月 15日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 理 学 研 究 科

職 名 助 教

氏 名 田 中 洋 光

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	認知症最初期の病態モデルを用いた責任因子の同定検証			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) Tanaka et al., Alzheimer's & Dementia TRCI, 2019; Tanaka, Medical Science Digest, 2019 田中洋光、平野丈夫「全反射顕微鏡を用いたAMPA型グルタミン酸受容体の動態イメージング」、 口頭発表、生理研研究会、2019年10月			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		設備備品費	143,879	
		消耗品費	108,258	
		旅費	295,880	
その他(論文掲載費)		241,230		
残額(5月中に執行見込)	210,753			
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 貴財団からご支援頂いたことにより、従来の研究を継続することができ、その成果を基に新たな研究費も獲得できました。心より深く感謝いたしております。			

## 成果の概要 / 田中洋光

### 研究内容

アルツハイマー病の発症前から起こる認知機能低下の1つに、記憶・学習障害がある。これは脳内の海馬という部位に蓄積した42残基の病原性アミロイドベータ (amyloid beta: A $\beta$ ) が、何らかの作用でシナプスにおける神経情報伝達の機能を障害すると考えられている。しかしながら、その分子機構は未だ十分に明らかにされていない。従来の実験系では、A $\beta$  が毒性作用を及ぼす候補分子である神経伝達物質受容体の動態を、リアルタイムでモニターし、その動態異常化を定量的に把握できていなかった。

そこで本研究では、A $\beta$  存在下での受容体動態の変化を可視化し、アルツハイマー病の早期病態を解明することを目的とした。そして、研究代表者が最近独自に構築した可視化実験系の利点を活用して、シナプス内外における受容体動態を、従来よりも高シグナルノイズ比、高時空間分解能でライブイメージングした。

### 研究成果

様々な性状があるA $\beta$ の中でも、比較的毒性の高い可溶性A $\beta$ 重合体 (A $\beta$ オリゴマー) を調製して、記憶・学習の細胞基盤と考えられているシナプス可塑性への毒性作用を調べた。シナプス可塑性は、神経活動の頻度に応じて情報伝達効率が変化する現象で、その代表例である海馬の長期増強現象 (LTP: long-term potentiation) に着目した。LTPは、高頻度の神経活動を与えると情報伝達効率が持続的に亢進する現象で、シナプス後膜におけるAMPA型グルタミン酸受容体 (AMPA受容体) の数が増加する。

まず、主に4量体を含むA $\beta$ オリゴマーを初代培養したラットの海馬神経細胞に投与した。すると、シナプス後膜の裏打ちタンパク質 PSD95 (postsynaptic density 95) のクラスター集積度合いが減弱する、かつシナプス後膜の構造 (スパイン) の密度が減少することを免疫染色法により明らかにした。次に、細胞膜表面発現時にのみ緑色蛍光を発する SEP (super-ecliptic pHluorin) で標識したAMPA受容体の構成サブユニット GluA1 または GluA2 を神経細胞に遺伝子発現させ、LTPを誘導する電場刺激を加えた。A $\beta$ 投与下ではLTP誘導刺激後、蛍光標識したGluA1の輝度は増加しなかった一方、GluA2の輝度はやや増加した。また、各サブユニットのエキソサイトーシスもイメージングした。解析の結果、刺激直後にシナプス後膜またはシナプス外においてGluA1を含むAMPA受容体のエキソサイトーシス頻度が抑制され、GluA2を含むAMPA受容体や一部のGluA1/GluA2ヘテロマーのエキソサイトーシス頻度は抑制されないことを明らかにした。そして、刺激を与えない定常状態におけるエキソサイトーシス頻度も調べた。その結果、A $\beta$ オリゴマーによってシナプス外におけるGluA1を含むAMPA受容体のエキソ

サイトローシスは、定常状態においても有意に減少していることを明らかにした。

以上の実験結果をまとめると、LTP 発現時においてシナプス後膜では GluA1 ホモマーのエキソサイトローシスが、シナプス外では GluA1/GluA2 ヘテロマーのエキソサイトローシスが、A $\beta$  オリゴマーによって阻害されると示唆された。これにより、LTP 発現の抑制メカニズムの一端が明らかとなり、アルツハイマー病の早期病態解明が進んだ。なお本研究の成果は、下記の論文 (①②) またはセミナー (③④⑤) にて発表した。

- ① Hiromitsu Tanaka, Daiki Sakaguchi, Tomoo Hirano, “Amyloid- $\beta$  oligomers suppress subunit-specific glutamate receptor increase during LTP”, *Alzheimer's & Dementia: TRCI*, vol5, p797-808, 2019
- ② 田中洋光「全反射顕微鏡を用いたシナプス関連分子の動態イメージング法の確立」、*Medical Science Digest*, vol45, p430-433, 2019
- ③ Hiromitsu Tanaka, “Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Neuroscience”, The Francis Crick Institute seminar, 2020 Mar
- ④ 田中洋光、平野丈夫、「全反射顕微鏡を用いた AMPA 型グルタミン酸受容体の動態イメージング」、生理研研究会、2019 年 10 月
- ⑤ 田中洋光、「シナプス小胞の開口放出及び再構築過程の可視化」、第 4 回脳と心の研究会、2019 年 8 月

## 今後の見通し

貴財団より本研究をご支援頂いたことにより、シナプス前終末におけるシナプス小胞膜タンパク質の動態可視化にも成功した。また、これらのシナプス機能素子を超解像度でイメージングする基礎技術の確立へも見通しが立てた。今後、本研究を土台としてより幅広く研究展開し、記憶・学習が成立する基礎過程の解明、及びシナプス病変に起因する神経疾患の病態解明に貢献して参りたい。