

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

小澤 滯司

(群馬大学医学部 教授)

「シナプス可塑性の分子機構と脳の制御機能」

1. 研究の概要

本研究の目的は、1) ウイルスベクターを用いて、多種類のグルタミン酸受容体の遺伝子を中枢神経系に導入する方法を開発し、脳機能の研究に応用すること、2) 小脳、海馬など脳の各部位におけるシナプス機能の分子生物学的、生理学的研究を進めることにより、シナプス可塑性の分子・細胞機序を解明するとともに、シナプス機能と脳の行動制御機能との関連を明らかにすることである。現在までの主な成果として、1) ウイルスベクターを用いて、海馬ニューロンに種々のグルタミン酸受容体サブユニット遺伝子を外来性に導入し、短期間のうちにシナプスの伝達特性を変化させること、2) 運動学習の基礎となる小脳シナプスの長期抑圧には、持続期間が数時間の初期相と約2日間の後期相があり、後者のみが新しい蛋白質の合成に依存することを示した。以上の成果は、初代培養標本を用いた実験系で得られたものなので、今後はこれらの知見に基づき、分子・細胞レベルでのシナプス機能と個体レベルでの脳の制御機能との関連を明らかにしていきたい。

2. 研究実施内容

本グループの研究目標は、1) アデノウイルスベクターを用いて、多種類のグルタミン酸受容体の遺伝子を中枢神経系に導入する方法を開発し、脳機能研究に応用すること、および、2) 小脳、海馬など中枢神経系の各部位におけるシナプス機能の分子生物学的、生理学的研究を進めることにより、シナプス可塑性の分子・細胞機序を解明するとともに、シナプス機能と脳の行動制御機能との関連を明らかにすることである。現在までの研究成果は以下の通りである。

アデノウイルスベクターを用いたグルタミン酸受容体遺伝子の導入法の開発

1) グルタミン酸受容体遺伝子の導入によるシナプス伝達機能の変換

この研究では、脳機能を外来性遺伝子の導入により調節する方法を開発することを目指して、種々の変異グルタミン酸受容体遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し、これらの外来遺伝子の発現が興奮性シナプスの伝達機能に与える影響を調べた。

a) Ca^{2+} 透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体のシナプス下膜への発現

まず AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) を Ca^{2+} 非透過型から Ca^{2+} 透過型に変換するために、 Ca^{2+} 透過性を決定するサブユニットである GluR2 の Q (グルタミン) / R (アルギニン) 部位を R から Q に置換した点変異体 (GluR2Q) を作製し、アデノウイルスベクターに組み込むことを試みた。実験では、Cre 組換え酵素を利用して目的遺伝子の発現制御を行うために、Cre 組換え酵素発現アデノウイルス (AxCANCre) と GluR2Q 発現用アデノウイルス (AxCALNLGluR2Q) を作製した。AxCALNLGluR2Q には CAG プロモーター、loxP 配列、stuffer 遺伝子、poly A シグナル、第二の loxP 配列、GluR2Q cDNA、第二の poly A シグナルを組み込んだ。AxCANCre と AxCALNL GluR2Q を実験対象となる細胞に共感染させると、Cre 組換え酵素により loxP 配列に挟まれた stuffer 遺伝子と poly A シグナルの部分が切り落とされ、CAG プロモーターによる GluR2Q の発現が可能となる。PC12 細胞をこれらの組換えウイルスで共感染させたところ、ほぼ全ての細胞で、強い内向き整流特性と高い Ca^{2+} 透過性をもつ AMPA 受容体を発現させることができた。次いでこの組換えアデノウイルスをラット培養海馬ニューロンに感染させたところ、本来 Ca^{2+} 透過性をもたない AMPA 受容体のみを発現する錐体ニューロンに、高効率に Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を発現させることができた。また、大部分の興奮性シナプスで早い時間経過を示す興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current ; EPSC) が外来遺伝子によって新しく生成された Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の活動によって担われるようになることがわかった。これらの研究成果は、中枢ニューロンで外来性遺伝子導入によりイオンチャネル型受容体の機能発現に成功し、かつこの方法によりシナプス機能を人工的に制御できることを初めて明かにした点で重要である。

b) 変異 NMDA 型グルタミン酸受容体のシナプス下膜への発現

AMPA 受容体と同様に、NMDA 受容体をアデノウイルスにより、外来性に培養海馬ニューロンに導入し、シナプス機能を変換することを試みた。このために、NMDA 受容体サブユニットの、NR1、NR1 の変異体である NR1(N598R)、NR2B の cDNA を組み込んだ 3 種類の組換えアデノウイルスを作製した。PC12 細胞にこれらを感染させ、NR1/NR2B、NR1(N598R)/NR2B 受容体の機能発現を確認することができた。NR1(N598R)/NR2B 受容体では予想通り、 Mg^{2+} ブロック、 Ca^{2+} 透過性はともに消失していた。次に、NR1(N598R) と NR2B の組換えアデノウイルスを培養海馬ニューロンに感染させたところ、NMDA 受容体の Mg^{2+} 感受性と Ca^{2+} 透過性が低下した。また、EPSC の NMDA 受容体成分の Mg^{2+} 感受性も著しく低下した。従って、アデノウイルスにより導入された NR1(N598R)/NR2B 受容体がシナプス後ニューロンに発現し、シナプス伝達に関与することが結論された。この

ことは、NMDA 受容体を介するシナプス伝達の特性も、外来性遺伝子導入により変換させうることを示している。

小脳シナプスに関する分子生物学および生理学的研究

1) 小脳長期抑圧の分子機構

小脳の平行線維・プルキンエ細胞間シナプスは平行線維、登上線維の同時高頻度刺激により長期抑圧される。この可塑性変化は運動学習の細胞機構と考えられている。我々は、この長期抑圧の発現機序について、mGluR1 代謝調節型グルタミン酸受容体、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット、IP3 の関与を示してきた。この発現機序について、さらに以下の2点で研究が進展した。

a) 長期抑圧発現への MAP キナーゼの関与

C キナーゼの下流ではたらく可能性のある MAP キナーゼの長期抑圧への関与を検討した。MAP キナーゼカスケードの阻害剤である PD98059 および MAP キナーゼ機能を阻害する中和抗体は、長期抑圧の発現を阻害した。また、長期抑圧を引き起こす際に用いるグルタミン酸投与と脱分極刺激の組み合わせにより MAP キナーゼが活性化されることも確認した。これらの結果は、MAP キナーゼが長期抑圧発現に関与していることを示唆する。また、MAP キナーゼが mGluR1 の情報伝達経路を調節していることを示すデータを得た。

b) 長期抑圧の全経過

これまでの長期抑圧の解析は、技術的な困難さのために、長くとも2時間程度までであった。我々は培養下で、数日にわたって長期抑圧を解析する方法を開発した。その方法は、シナプス伝達の単位であるシナプス小胞1個によりシナプス後細胞で引き起こされる mEPSC (miniature excitatory postsynaptic current) を、長期抑圧発現の前後で測定するという方法である。これまでは、長期抑圧を引き起こした細胞からの連続記録を行っていたため、記録時間が限られたが、我々は長期抑圧を引き起こした後、細胞を再び培養下に戻すことにより、長期間の測定を可能にした。この方法により、長期抑圧には数時間で元のレベルに戻る初期相と、約2日で元のレベルに戻る後期相があることが明らかになった。初期相は弱い刺激でも引き起こせ、mRNA・蛋白質合成に依存しないが、後期相は強い刺激で始めて引き起こされ、mRNA・蛋白質合成に依存していることが明らかになった。さらに長期抑圧後期相の発現・維持に必要な mRNA・蛋白質合成の時期を調べ、mRNA 合成は条件刺激後1時間以内に終了しているが、長期抑圧の維持に必要な蛋白質合成は12-20時間持続していることが明らかになった。

2) 小脳皮質での情報伝達の時空間パターンの解析

小脳切片標本に光学的計測法を適用し、小脳皮質内での興奮伝播の時空間パターンを解析し、以下のような成果を得た。

- a) 白質刺激によって、顆粒層では持続時間の長い脱分極が、分子層では持続時間の短い脱分極が生じる。GABA_A 受容体の阻害剤であるピキュキュリンを投与すると、分子層では大きな遅い脱分極成分が観察されるようになり、また興奮する領域が大幅に増加する。一方顆粒層では、脱分極応答の大きさが増加する。抑制性シナプスは、分子層では強力な側抑制を行い、顆粒層では脱分極の大きさを制御する役割を担っていると考えられる。
- b) 顆粒細胞で発現している NMDA 受容体の小脳皮質内での情報伝達における役割を、NMDA 受容体 NR2A and/or NR2C サブユニット欠損ミュータントマウスを用いて解析し、これらの NMDA 受容体が顆粒細胞層の脱分極の遅い成分に関与し、また入力が繰り返し入ってきた時の時間的加重に関わることを明らかにした。
- c) 顆粒層での抑制を担うゴルジ細胞のみを選択的に欠失させたトランスジェニックマウスを用いた解析を行い、ゴルジ細胞欠失により顆粒層における抑制が消失することを確認した。またゴルジ細胞の欠失により、顆粒細胞層の NMDA 受容体応答が減少するという調節がなされることも見出した。ゴルジ細胞の欠失により、一過性強度および持続性弱度の運動失調が起ることも判明した。

3) 前庭動眼反射 と視運動性眼球運動 の適応的変化の解析

頭部回転時の視野のブレを補正する反射として二つの眼球運動、すなわち前庭動眼反射 (VOR) と視運動性眼球運動 (OKR) がある。VOR は動物に回転を加えた時に、眼球が頭部と逆方向に動く、前庭器官を受容体とする反射で、動物を回転台に固定し、台を回転することにより引き起こせる。OKR は、動物の周囲の景色が動いた時に、眼球がそれと同方向に動く視覚系を介した反応で、動物を縦縞模様等で囲い、その模様を回転することにより引き起こせる。上記の2つの運動は、入出力を定量的に評価できる単純な運動である。また、VOR を引き起こすために動物を回転させる際に、頭部回転と同時に周囲の模様も回転すると、それに応じて VOR の大きさが適応的に変化する現象が知られており、その適応性変化には小脳の長期抑圧が関与していると考えられている。我々は長期抑圧を発現しないミュータント等の使用が可能なマウスで、眼球運動を計測するシステムを作ることに大きな意義があると考え、マウスの眼球運動計測システムを作製し、以下の実験を行った。

- a) 野性型マウスを用いて、VOR、OKR をさまざまな条件下で計測し、マウスの VOR および OKR の動特性を求めた。前庭刺激と視覚刺激を組み合わせ、VOR と OKR の相互作用を調べた。その結果、野性型マウスの VOR と OKR は適応的変化を示すことを確認した。
- b) 小脳のプルキンエ細胞を欠失したミュータントであるラーチャーマウス、および小脳のプルキンエ細胞で特異的に発現し長期抑圧の発現に関与することが知られているイオノトロピックグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットを欠失させたミュータ

ントマウスで、眼球運動の解析を行った。小脳に疾患のある上記2種類のミュータントマウスでは、VORとOKRの適応的变化が起らないことが明らかになった。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○ Kamiya, H. and Ozawa, S.: Kainate receptor-mediated inhibition of presynaptic Ca^{2+} influx and EPSP in area CA1 of the rat hippocampus, *J. Physiol. (Lond.)*, 509, 833-845 (1998)

○ Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A., Kanegae, Y., Saito, I. and Ozawa, S.: Postsynaptic expression of Ca^{2+} -permeable AMPA-type glutamate receptor channels by viral-mediated gene transfer, *Mol. Brain Res.*, 65, 176-185 (1999)

他 10 件