「脳を知る」
平成９年度採択研究代表者

小澤　瀞司

（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．研究実施の概要

本研究の目的は、中枢神経系のニューロン、グリアに広範に存在する多種類のグルタミン酸受容体が、可塑性変化を中心とする中枢シナプスの機能発現、神経回路網での情報処理、個体レベルでの行動制御など脳機能全般に果たす役割を明らかにすることである。実験では、脳の各部位のニューロン、グリアを対象として、ウイルスベクターによるグルタミン酸受容体遺伝子の導入、標的遺伝子破壊法などの遺伝子工学技術を用いて、グルタミン酸受容体を人工的に操作することにより、ニューロンとグリアの機能に変動を加えて、それらが中枢神経回路網での情報伝達、シナプス可塑性、個体レベルでの脳の制御機能、脳の病態に与える影響を解析する。現在までの研究成果は以下の通りである。１）ウイルスベクターを用いて、種々のグルタミン酸受容体サブユニットを新規に効率よくニューロン、グリアに発現させ、これらの細胞機能、シナプス伝達特性を変換し得ることを明らかにした。２）グルタミン酸受容体およびGABA受容体が関与する小脳の種々のシナプスの可塑性変化の発現機構を部分的に解明するとともに、最も顕著な可塑性変化である長期抑圧の個体レベルでの役割を解析するために、マウス眼球運動計測システムを確立し、健常型野生マウスにおける基礎データを取得した。３）イオンチャネル型および代謝調節型グルタミン酸受容体の重要な基礎的特性のいくつかを明らかにした。今後はこれらの研究をさらに発展させることにより、グルタミン酸受容体が脳機能の発現に果たす役割の全貌を明らかにしていく。

２．研究実施内容

１）ウイルスベクターによる外来遺伝子のニューロン、グリアへの導入

ａ．シンドビス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によるニューロン、シナプスの機能の変換

平成10年度は、海馬単層培養標本を対象に、外来遺伝子のニューロンへの導入とシナプス機能の変換にアデノウイルスベクターを用いて研究を行った。しかしその後、アデノウイルスはグリアに対して極めて親和性が高く、脳切片、個体レベルの脳へアデノウイルスベクターを注入した場合、大部分はニューロ

ンを取り囲むグリアに吸収されることが判明した。そこで、11年度からベクターとして、ニューロンに対して圧倒的に高い親和性をもつシンドビスウイルスベクターを用いることにした。実験では、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、シンドビスウイルスベクターを用いて、ラット海馬切片培養標本のCA1ニューロンに強制発現させた。ウイルス感染ニューロンの興奮性シナプス反応はCa^{2+}透過性AMPA受容体応答の特徴を示し、テタヌス刺激による長期増強が、NMDA受容体に依存せず、Ca^{2+}透過性AMPA受容体を介して流入するCa^{2+}によって起こるようになった。従って、シンドビスウイルスベクターを用いる遺伝子導入法により、可塑性変化を含むシナプスの伝達特性を変換できることが明らかになった。

b．アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるグリアの機能の変換

アデノウイルスベクターはグリアに対して極めて高い親和性をもち、小脳皮質に注入した場合、選択的にベルクマングリアにのみ外来遺伝子の発現が可能であることが明らかになった。小脳のベルクマングリアでは、AMPA受容体のうち、GluR1とGluR4のみが発現しており、GluR2サブユニットの発現が欠落している。従って、Ca^{2+}透過性AMPA受容体のみが形成されている。グリアにおけるCa^{2+}透過性AMPA受容体の機能的意義を明らかにするため、GluR2 cDNAを組み込んだ組換えアデノウイルスを作製して、ラット小脳皮質に注入し、GluR2を強制発現させ、Ca^{2+}透過性AMPA受容体をCa^{2+}非透過性AMPA受容体に変換した。正常状態では、平行線維、登上線維とプルキンエ細胞の樹状突起棘間で形成されるグルタミン酸性シナプスはグリアの突起により完全に包囲されているが、この操作により、グリアの突起が退縮し、グリアのグルタミン酸トランスポーターによるシナプス間隙からのグルタミン酸の清掃が著しく遅れることが明らかになった。また、培養ベルクマングリアを対象とした実験でも、Ca^{2+}透過性AMPA受容体をCa^{2+}非透過性受容体に変換すると、突起は退縮することが明らかになった。以上の研究から、グリアのCa^{2+}透過性AMPA受容体が、グリアの突起の形態形成に関与することが結論された。

2）小脳シナプスの可塑性に関する分子生物学および生理学的研究

a．長期抑圧におけるイオノチャネル型グルタミン酸受容体δ2サブユニットの役割

イオンチャネル型グルタミン酸受容体δ2サブユニットが長期抑圧に関わることは、以前報告していたが、そのメカニズムは不明である。この点を明かにする目的で、δ2サブユニット欠損ミュータントマウスのプルキンエ細胞にδ2サブユニットまたはその変異体をアデノウイルスを用いて発現させた上で、長

期抑圧発現の有無を調べる実験を行っている。これまでにδ2サブユニットをノックアウトマウスのプルキンエ細胞に戻すと、長期抑圧が起せるようになるというデータを得た。今後は、δ2サブユニットの変異体を発現させる実験により、δ2サブユニットの長期抑圧に関わるドメインを同定していく。

b．プルキンエ細胞における抑制性シナプス伝達増強の制御機構

小脳皮質のシナプス可塑性として長期抑圧の他に、抑制性介在ニューロン・プルキンエ細胞間のシナプスでみられるGABA性シナプス伝達の脱分極による増強現象が知られている。この増強はプルキンエ細胞のGABAに対する感受性の増加によって起り、30分以上持続する。平成10年度、脱分極時にGABAを投与すると、シナプス伝達およびGABA応答の増強が抑えられること、この可塑性の調節が$GABA_B$受容体を介することをつきとめた。11年度は、この可塑性抑制機構により、GABA応答増強が細胞部位特異的に制御されることを示した。また$GABA_B$活性化がGi蛋白を介し細胞内cAMP濃度を低下させることによりAキナーゼの活性を抑えてGABA応答増強を抑制することを示唆する結果を得た。

c．マウスの眼球運動解析

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（vestibulo-ocular reflex: VOR）と視運動性眼球運動（optokinetic response: OKR）がある。これらの運動は、入出力を定量的に評価できる単純な反射運動である。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、その適応的変化には小脳の長期抑圧が関与している。またOKRについても、持続的な周囲の回転によりそのゲインが増加するという適応現象が知られている。平成10年度までに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ためにマウスの眼球運動計測システムを作製した。11年度はこのシステムを用い、野性型マウスについて、さまざまな条件下でVORとOKRの動特性を系統的に計測するとともに、視覚刺激を組み合わせVORとOKRの相互作用を調べた。またVORおよびOKRの適応的変化を起し、VOR・OKRの動特性を適応前後で詳細に解析した。その結果、OKRは遅い頭部回転に対してよくはたらき、VORは速い頭部回転に対する視野のブレを効率よく補正し、両者は相補的にはたらいていることが明かになった。

3）イオンチャネル型および代謝調節型グルタミン酸受容体の特性、機能に関する研究

a．AMPA受容体サブユニットGluR2の選択的スプライシングが受容体の脱感作

の時間経過と脱感作の程度を制御しており、シナプス応答のkineticsに影響する可能性を示した。

ｂ．代謝調節型グルタミン酸受容体mGluR1aは、従来知られていたGq蛋白の活性化だけでなく、Gs蛋白にも直接作用することを明らかにした。従って、mGluR1aに対する細胞外Ca^{2+}の恒常的刺激により、Gs系の基礎活性が高められていることになる。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○Yamada, N., Sudo, M., Okado, H., Iino, M., Tsuzuki, K., Miwa, A. and Ozawa, S.: Expression of recombinant NMDA receptors in hippocampal neurons by adenoviral-mediated gene transfer. Mol. Brain Res., 68, 169-180 (1999)

○Nakagawa, T., Iino, M., Sekiguchi, M., Wada, K. and Ozawa, S. : Potentiating effects of 4-[2-(phenylsulfonylamino) ethylthio]-2,6-difluoro-phenoxyacetamide (PEPA) on excitatory synaptic transmission in dentate granule cells. Neurosci. Res., 35, 217-223 (1999)

○Kamiya, H. and Ozawa, S.: Kainate receptor-mediated presynaptic inhibition at the mouse hippocampal mossy fibre synapse. J. Physiol. (Lond.), 523, 653-665 (2000)

○Koike, M., Tsukada, S., Tsuzuki, K., Kijima, H. and Ozawa, S. : Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing. J. Neurosci., 20, 2166-2174 (2000)

○Tamatani, M., Yong Ho, C., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T. and Tohyama, M. : Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkB activation in primary hippocampal neurons. J. Biol. Chem., 274, 8531-8538 (1999)

○Okabe, S., Kim, H-D., Miwa, A., Kuriu, T. and Okado, H. : Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity., Nature Neurosci., 2, 804-811 (1999)

○Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H. : Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. J. Neurosci., 19, 7781-7792 (1999)

○Yoshida, K., Iwamoto, Y., Chimoto, S. and Shimazu, H.: Saccade-related inhibitory input to pontine omnidpause neurons: an intracellular study in alert cats. J. Neurophysiol., 82, 1198-1208 (1999)

○Kawasaki, H., Fujii, H., Gotoh, Y., Morooka, T., Shimohama, S., Nishida, E. and Hirano, T. : Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long-term depression. J. Biol. Cem., 274, 13498-13502 (1999)

○Murashima, M. and Hirano, T.: Entire course and distinct phases of day-lasting depression of mEPSC amplitudes in cultured Purkinje neurons. J. Neurosci., 19, 7317-7325 (1999)

○Yamakawa, Y. and Hirano, T.: Contribution of mGluR1 to the basal activity of a mouse cerebellar Purkinje neuron. Neurosci. Lett., 277, 103-106 (1999)

○Saitoh, O., Kubo, Y., Odagiri, M., Ichikawa, M., Yamagata, K. and Sekine, T. : RGS7 and 8 differentially accelerate G protein-mediated modulation of K+ currents. J. Biol. Chem., 274, 9899-9904 (1999)

○Okada T., Kang, Y. and Ohmori, H. : Li+ and muscarine cooperatively enhance the cationic tail current in rat cortical pyramidal cells. Eur. J. Neurosci., 11, 2397-2402 (1999)

○Kang, Y. and Futami, T.: Arrhythmic firing in dopamine neurons of rat substantia nigra evoked by activation of subthalamic neurons. J. Neurophysiol., 82, 1632-1637 (1999)

○Inoue, T., Itoh, S., Kobayashi, M., Kang, Y., Matsuo, R., Wakisaka, S. and Morimoto, T. : Serotonergic modulation of the hyperpolarizing spike afterpotential in rat jaw closing motoneurons by protein kinases A and C. J. Neurophysiol., 82, 626-637 (1999)