

「脳を知る」

平成11年度採択研究代表者

## 八尾 寛

(東北大学大学院生命科学研究科・医学系研究科、教授)

### 「学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明」

#### 1. 研究実施の概要

##### 研究のねらい

学習・記憶や回路形成のメカニズムとしてシナプス前終末の可塑性が普遍的に重要であるが、その誘導・発現・維持のメカニズムの詳細についての数多くの未解決の問題がある。シナプス前終末の微小性、ヘテロ性、生化学的複雑性などに由来する困難を、GFP 誘導体リコンビナントプローブ、新しいプローブ導入法などの新しい生理学的研究法を開発することによってブレイクスルーする。

##### これまでの研究の概要、成果、今後の見通し

1. 新世代機能プローブおよびその導入法の開発：GFP の  $\beta$ -can 構造にカルモデュリンとその標的ペプチドを組み込み、 $Ca^{2+}$  濃度に従って蛍光特性を変える GFP "pericam" を創り出した。Red cameleon を作成し、pH 変化の影響の少ない  $Ca^{2+}$  イメージングに適することを示した。
2. 機能プローブを組み込んだ遺伝子改変動物の作製：GABA ニューロンを可視化できる遺伝子改変マウス (GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウス) を作成した。
3. MF-LTP の誘導・発現・維持にかかわる分子メカニズムの解析：ラット海馬スライス培養系を立ち上げるとともに、EGFP を組み込んだシンドビスウィルスを作製した。また、苔状線維終末から活動電位にともなう  $Ca^{2+}$  濃度上昇を測定し、苔状線維終末からの伝達物質放出を持続的に増強する PKC の作用メカニズムを解析した。
4. mute synapse 仮説の検証：歯状回神経細胞オータプスにおいて、多くのシナプス小胞集積サイトが活動電位による刺激では放出の生じないサイレントサイトである事がわかった。
5. MF-LTP にともなう蛋白質リン酸化、蛋白質発現の解析：ラット海馬神経細胞に pHluorin-VAMP-2 融合タンパク質を発現させると、グルタミン酸刺激によって神経突起上のバリコシティー様の構造で蛍光強度の上昇が引き起こされた。また、PC12 細胞を用いて、PKC, PI3 キナーゼ、チロシンキナーゼカスケー

ド等による伝達物質放出制御メカニズムを解析した。

## 2. 研究実施内容

### 中核チーム

ラット海馬スライス培養系を立ち上げ、propidium iodide を用いた核染色法により細胞層の構築が保存されていることを、 $Zn^{2+}$  と選択的に結合して蛍光を増強する TSQ を用いて苔状線維投射が保存されていることを確認した。歯状回顆粒細胞に効率良く目的の機能プローブを導入させるために、ニューロン特異的に感染する事が報告されているシンドビスウィルスを用いた。EGFP 発現ウィルスを含んだ培養液をガラス管ピペットに充填して、海馬スライス培養の歯状回顆粒細胞層に、顕微鏡直視下に圧注入した。この結果、位置及び形態から歯状回顆粒細胞と考えられるニューロンが EGFP によりラベルされた。それらの軸索の走行は苔状線維のそれと一致した。しかし、軸索の中には、本来の苔状線維の走行と異なるものも認められた。

マウス海馬苔状線維シナプス前終末に先端径100 $\mu$ m のピペットに  $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素 fura dextran を充填し、歯状回顆粒細胞層に挿入することにより、苔状線維とその終末をラベルした。導入した数個のシナプス前終末を含む領域からフォトマルチプライヤーにより蛍光強度を測定し、活動電位にともなう  $Ca^{2+}$  濃度上昇を測定した。シナプス前終末の  $Ca^{2+}$  チャネル多様性を  $Ca^{2+}$  チャネル特異的なトキシンによる感受性で調べたところ、P/Q タイプ特異的な  $\omega$ -agatoxin IVA により活動電位依存性  $Ca^{2+}$  濃度上昇の約30%が抑制された。PKC の伝達物質放出増強作用を解析し、活動電位にともなう  $Ca^{2+}$  流入と小胞 - 形質膜融合の両方が促進されることを明らかにした。

### 新世代プローブ開発チーム

GFP の  $\beta$ -can 構造にメスを入れたものに、 $Ca^{2+}$  センサーとしてのカルモデュリンとその標的ペプチドを組み込み、 $Ca^{2+}$  濃度に従って蛍光特性を変える GFP "pericam" のバリエーションを増やし、個々についても明るさなどの向上を図った。

オワンクラゲ GFP の mutant の一つであるサファイアをドナー、六放サンゴから得られた RFP をアクセプターにすると非常に効率のよい FRET が実現できることを見出した。このペアの利点の一つとして、サファイア、RFP とともに pH に対して全く抵抗性をもつことがあげられる。従って両者を組み込んで作製された Red cameleon は、pH 変化が激しく起こる神経細胞での  $Ca^{2+}$  イメージングに適することが示された。

プレート上の、GFP, RFP を発現する多数のコロニーの蛍光の特性を一度に解析するシステムとして、一度にプラスミド上のあらゆる箇所で、ランダム変異を

含めた変異導入ができる遺伝子工学的手法を開発した。この手法を利用して GFP の試験管内進化を試みたところ、新しい色の蛍光蛋白質（CGFP）の遺伝子が得られた。CGFP は CFP と GFP の中間の色を呈し、pH に対して著しい抵抗性を示すことがわかった。

#### 分子解析チーム

PC12 細胞に NGF や IGF-1 を短時間作用させると PI3 キナーゼが活性化され、脱分極およびイオノマイシン誘発性の神経伝達物質放出が促進され、これらの促進作用はいずれも PI3 キナーゼの阻害剤でほぼ完全に抑制された。ところが NGF による促進は MAP キナーゼの阻害剤でも顕著に抑制されたが、IGF-1 による促進はほとんど影響を受けなかった。GFP と PKB の PH ドメインの融合タンパク質を発現した PC12 細胞を用い、PI3 キナーゼが活性化される細胞内局在部位を調べたところ、NGF では細胞膜で活性化が起こるのに対し IGF-1 では細胞質で活性化されることが明らかとなった。以上のことから NGF によって TrkA レセプターが活性化されると、細胞膜で PI3 キナーゼが活性化され、MAP キナーゼ依存的に神経伝達物質の放出が促進されるのに対し、IGF-1 レセプターの活性化では細胞内膜系で活性化された PI3 キナーゼによって MAP キナーゼ非依存的に神経伝達物質の放出促進が起こされると結論された。

PKA や PKC を初めとする様々なタンパク質リン酸化酵素が、神経伝達物質放出を促進的に制御していることが明らかにされてきているが、抑制的に作用する制御系は明らかにされていなかった。PC12 細胞に Src ファミリーキナーゼを阻害剤する genistein や PP2 を作用させると Ca<sup>2+</sup> 依存的なドーパミン放出が促進されたが、阻害活性を持たない genistin や PP3 では促進は見られなかった。PC12 細胞に恒常的活性化型 v-Src を一過的に発現させると伝達物質放出は抑制されたが、キナーゼ活性を失った変異型では抑制は起こらなかった。PC12 細胞に PP2 を作用させると、パキシリンや Pyk2 のチロシンリン酸化が抑制され、F-アクチンの動態や細胞形態に大きな変化が観察された。すなわち、Src キナーゼは細胞骨格系のダイナミクスを変化させることにより、PC12 細胞や中枢神経細胞からの神経伝達物質放出を抑制的に制御していると結論した。

PC12 細胞や培養小脳顆粒細胞にエリスロポエチン（EPO）レセプターのアゴニストである EPO や EMP1 を短時間作用させると、JAK2 が活性化され、Ca<sup>2+</sup> 依存的な神経伝達物質放出が抑制された。培養小脳顆粒細胞や海馬神経細胞の虚血により誘導されるグルタミン酸開口放出が EPO レセプターを活性化により抑制され、海馬 CA1 領域の神経細胞死が抑制された。

#### 機能解析チーム

培養した歯状回神経細胞オ - タプスを活動電位によって刺激し、放出サイトを

FM1-43 等の蛍光色素で可視化、定量すると、cAMP-PKA カスケ - ドの活性化により、放出サイト数が約30 - 40%、増加することを見出した。その後、細胞を固定し、シナプス小胞のマーカであるシナプトファイシンに対する抗体を用いて免疫細胞化学的に染めてみると、シナプトファイシン免疫陽性なサイト数は FM 1-43 陽性サイト数の 2 倍ある事がわかった。全てのシナプトファイシン集積サイトを100とすると、はじめから functional であったサイトは35程度、cAMP-PKA カスケ - ドの活性化によって silent か functional に転換したものの15と言った比率であった

ペアドパルス比の Ca 依存性からモデルを用い、放出確率を推定すると、cAMP-PKA カスケ - ドの活性化によっては放出量は増加するが、放出確率はあまり変化しないことから、易放出性プール (RRP) または放出サイト数の増加を推定していた。40 - 50Hz の反復刺激により、誘発性 EPSC が漸次減少し、10数発の刺激の後、誘発性成分が消失する現象から RRP を理論的に推定できないかを検討した。

#### 遺伝子改変動物チーム

遺伝子改変マウスを作成・解析することによりシナプス前終末における機能とその分子基盤を明らかにすることを目的としている。グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子 (GAD67遺伝子) に GFP 遺伝子をノックインしたコンストラクトを作成し、ES 細胞に導入することにより、相同組み換えによる GAD67 遺伝子 GFP ノックインした ES クローンを得た。これらのクローンを用いてキメラマウスを作成し、野生型マウスとの交配により GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウスを樹立した。GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウスについては脳組織標本を作成し、GFP の自家蛍光の観察、抗 GFP 抗体と抗 GAD67 抗体を用いた免疫組織化学の検討を行った。その結果、GAD67 陽性細胞に特異的に GFP の蛍光が観察された。さらに脳扁桃体 GFP 陽性細胞についてホールセルパッチクランプ法を用いた電気生理学解析で GABA ニューロンに特徴的な高頻度の活動電位を記録した。したがって、この遺伝子改変マウスが GABA ニューロンの機能解析に有用であると結論した。

#### 3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Honda I, Kamiya H, Yawo H (2000) Re-evaluation of phorbol ester-induced potentiation of transmitter release from mossy fibre terminals of the mouse hippocampus. *J Physiol* 529( 3 ): 763-776.

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13; 98( 6 ): 3197-202.

Sawano A, Miyawaki A. Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 2000 Aug 15 ; 28( 16 ): E78.

Iwasaki, S., Kataoka, M., Sekiguchi, M., Shimazaki, Y., Sato, K., and Takahashi, M. ( 2000 ) Two distinct mechanisms underlie the stimulation of neurotransmitter release by phorbol esters in clonal rat pheochromocytoma PC12 cells. *J. Biochem.* 128, 407-414.

Kawakami M, Iwasaki S, Sato K, Takahashi M ( 2000 ) Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 293-297.

山口和彦、平田快洋、金子貢巳. シナプス開口放出における SNARE 蛋白質の機能. *脳の科学*、23 : 297-306 ( 2001 )

Makinae, K., Kobayashi, T., Kobayashi, T., Sinkawa, H., Sakagami, H., Kondo, H., Tashiro, F., Miyazaki, J., Obata, K., Tamura, S., and Yanagawa, Y. ( 2000 ) Structure of the Mouse Glutamate Decarboxylase 65 Gene and its Promoter : Preferential Expression of its Promoter in the GABAergic Neurons of the Transgenic mice *J. Neurochem.* 75, 1429-1437.