

「脳を知る」

平成9年度採択研究代表者

小澤 澁司

(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、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。平成13年度の研究成果の概要は以下の通りである。1) シンドビスウイルスベクターを用いて、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットを新規に海馬ニューロンに発現させ、細胞機能、シナプス伝達特性を変換し、これらの変換がシナプス可塑性、個体レベルでの学習行動に与える影響を解析した。2) 小脳の可塑性シナプスとして、興奮性シナプスにおける長期抑圧と抑制性シナプスにおける脱分極依存性増強を中心にして、それらの発現・維持の分子・細胞機序を詳細に解明した。また、これらのシナプス可塑性の個体レベルでの運動制御における役割について、重要な知見を得た。3) AMPA 型グルタミン酸受容体のニューロン、グリアにおける生理学および病態生理学的意義について、また、NMDA 型グルタミン酸受容体の代謝動態、代謝調節型グルタミン酸受容体の中枢シナプスにおける機能的意義についての知見を加えた。

### 2. 研究実施内容

1) シンドビスウイルスベクターを用いたカルシウム透過性 AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの強制発現による海馬ニューロンの細胞機能、シナプス伝達特性の変換と、これらの変換がシナプス可塑性、個体レベルでの学習行動に与える影響

#### a. 長期増強と学習行動の変化

AMPA 受容体を Ca<sup>2+</sup> 非透過型から Ca<sup>2+</sup>透過型に変換するために、Ca<sup>2+</sup> 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、この RNA 遺伝子をシンドビスウイルスベクターに組み込み、脳定位装置を使って成熟ラット海馬に注入し、CA1 ニューロン、歯状回顆粒細胞に Ca<sup>2+</sup> 透過性 AMPA 受容

体を強制発現させた。感染を受けた CA1 ニューロン、歯状回顆粒細胞において、それぞれシャプラー側枝および貫通線維のテタヌス刺激による長期増強が低閾値で起こるとともに、NMDA 受容体に依存せず、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体を介して流入する Ca<sup>2+</sup>によって長期増強を発生させることが可能になった。

次に、両側海馬 CA1 野または歯状回に組換えウイルスを *in vivo* 注入したラットで、感染2日後からモリス水迷路課題を3日間課したところ、CA1 野に Ca<sup>2+</sup> 透過性 AMPA 受容体を発現させた場合には、特に学習2日目において課題成績が統制群よりもよく、CA1 における長期増強の空間学習への重要性が示唆された。一方、歯状回に発現させた群は逆に統制群よりも悪い水迷路課題成績を示し、学習1日目ならびに学習終了時のプローブテストにおける低下が顕著であった。以上の結果から、CA1 シナプスと歯状回シナプスは、シナプス応答の長期増強誘導に関しては類似の機構を有するが、Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体発現の空間学習課題遂行への影響という点で、両領野間に機能差の存在することが示された。

#### b. AMPA 受容体サブユニットタンパク質の CA3 ニューロン内での動態の解析

タンパク発現のレポーターとなる myc tag および GFP の cDNA を種々のグルタミン酸受容体サブユニットの N 末端の細胞外部位に挿入し、これらの融合タンパクをシンドビスウイルスベクターを用いて任意のニューロンに発現させて、新規に生成されたグルタミン酸受容体サブユニットのニューロン内での動態を追跡することが可能になった。平成 13 年度は、myc-GFP-GluR2Q 融合タンパクをシンドビスウイルスベクターにより、ラット海馬切片培養標本の CA3 ニューロンに強制発現させ、この新規に合成されたサブユニットタンパクの苔状線維シナプス下膜への移行を観察した。この移行は受容体タンパクの合成後、きわめて短時間で行われることがわかった。また、GFP 蛍光を観察する限りでは、融合タンパクは細胞内にほぼ均一に発現していたが、myc tag 動態のイメージング法による形態学的解析により、新規受容体が苔状線維シナプスのシナプス後部の CA3 ニューロン棘状瘤に高密度で発現し、これに対応して、苔状線維刺激に対するシナプス電流応答が Ca<sup>2+</sup>透過性 AMPA 受容体の活性化によるものとなることが明らかにされた。

また、感染 CA3 ニューロンの苔状線維シナプスでは、CA1 シナプと異なり、長期増強には全く変化が見られず、長期増強の発現機構、Ca<sup>2+</sup> 流入による AMPA 受容体サブユニットの trafficking の機構が両シナプスの間で全く異なることが明らかにされた。

### 2) 小脳シナプスにおける可塑性の発現・維持の分子・細胞機序の解明と個体レベルでの運動制御における役割に関する研究

#### a. 長期抑圧におけるイオンチャネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの役割

$\delta 2$  サブユニットは、小脳プルキンエ細胞で特異的に発現しており、長期抑圧発現に必要であることを以前報告した。 $\delta 2$  サブユニットがどのように長期抑圧関わるかを明らかにする目的で、 $\delta 2$  サブユニット欠損プルキンエ細胞に、 $\delta 2$  サブユニットまたはその変異体を発現させた上で、長期抑圧発現の有無を調べる実験を行った。 $\delta 2$  サブユニットを  $\delta 2$  サブユニット欠損プルキンエ細胞で発現させると長期抑圧が起こるようになったが、 $\delta 2$  サブユニットの細胞内 C 末端を他のイオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニットである GluR2 の C 末端に置換した分子を発

現させても長期抑圧が起こらないことを平成12年度に示した。平成13年度は、 $\delta 2$ サブユニットの細胞内C末端をさらに分割して、各領域を欠損させたり置換した変異分子を作製し、それらを $\delta 2$ サブユニット欠損プルキンエ細胞に発現させて長期抑圧が起こるか否かを調べた。その結果、細胞内C末端の細胞膜近傍の約20アミノ酸が長期抑圧発現に重要であることが判明した。またこの内の8アミノ酸が $\delta 2$ サブユニットの細胞膜上への局在に関与していることも明らかになった。

#### b. 長期抑圧後期相へのカルシニューリンの関与

長期抑圧には、1日以上持続して新たな mRNA・タンパク質合成に依存する後期相が存在する。平成12年度の研究で、カルシニューリンの活性酸素による不活性化が長期抑圧後期相を誘導することが示唆された。カルシニューリン阻害により長期抑圧後期相様の現象が起こり、それは長期抑圧後期相と同様に mRNA 合成および CaM キナーゼ依存性であった。また長期抑圧後期相とカルシニューリン阻害による抑圧は互いに他を起こらなくした。したがって、両者は共通の機構をもつと考えられる。さらに、核内で活性型カルシニューリンを強制発現させると、長期抑圧後期相は起こらなくなった。また、活性酸素は神経活動により細胞内で増加してカルシニューリンを抑制するが、活性酸素をトラップする分子でその量を減少させると、長期抑圧後期相は起こらなくなった。これらの結果は、活性酸素がカルシニューリン活性を抑制することにより長期抑圧後期相が引き起こされることを示唆している。

#### c. 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と時間経過

小脳シナプスの可塑性として長期抑圧の他に、抑制性介在神経細胞・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 GABA(A)受容体応答の増加によって起こり、30 分以上持続する。脱分極時に GABA を投与すると、シナプス伝達および GABA(A)受容体応答の増強が抑えられることを以前発見した。これまで、この可塑性制御の分子機構を解析して、GABA による GABA(B)受容体の活性化が Gi/o 蛋白質を介して細胞内 cAMP 濃度を低下させることにより Aキナーゼ活性を抑えて GABA(A)応答増強を抑制すること、Aキナーゼ活性低下はカルシニューリンによる DARPP-32 分子の脱リン酸化を促すことによりプロテインフォスファターゼ 1 (PP1) の DARPP-32 による抑制を解き放ち、PP1 はカルモジュリン依存性キナーゼ II を抑制することにより GABA(A)応答の脱分極依存性増強を抑えることを明らかにした。平成 13 年度 に行った GABA(A)応答の脱分極依存性増強についての研究により、1) 脱分極依存性増強は、1 日以上 2 日未満持続すること、またそれは mRNA 合成に依存せず 10 時間程度しか続かない初期相と mRNA 合成に依存して 24 時間以上持続する後期相に分けられること、2) 代謝調節型グルタミン酸受容体の mGluR1 活性が cAMP を介して脱分極依存性増強に影響を及ぼすこと、3) 細胞接着にかかわるインテグリンおよびカルシウム依存性蛋白質分解酵素のカルパインも脱分極依存性増強誘導にかかわることを明らかにした。

#### d. 小脳による運動制御機構の解析

イオンチャネル型グルタミン酸受容体サブユニット  $\delta 2$  欠損ミュータントマウス ( $\delta 2$  マウス) お

よび  $\delta 2$  サブユニットに点突然変異が生じたためにプルキンエ細胞が死滅するラーチャーマウス (Lc マウス) の運動制御能力を比較検討した。回転する棒上にマウスがどのくらいの時間留まっていられるかを調べるロタロッドテスト、自発性および反射性眼球運動の計測を行った。平成 13 年度の研究により、意外なことに、 $\delta 2$  マウスの方がプルキンエ細胞を欠失して形態的にはっきりとした小脳萎縮を示す Lc マウスよりも明らかに運動制御能力が劣っていることが判明した。さらに  $\delta 2$  マウスでみられる不随意運動の一部が  $\delta 2$  マウス小脳の部分切除により消失し、その運動制御異常が改善されることも分かった。これらの結果は、長期抑圧等のシナプス制御に欠陥のある  $\delta 2$  欠損マウスでは、小脳プルキンエ細胞が運動制御に悪影響を及ぼすような異常なシグナルを出力していることを示唆する。

### 3) AMPA、NMDA 型グルタミン酸受容体及び代謝調節型受容体の機能等に関する新しい知見

#### a. グリア細胞における $Ca^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の機能と病態生理

平成 12 年度に、小脳ベルクマングリアで、アデノウイルスベクターによる GluR2 サブユニットの強制発現により、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体を  $Ca^{2+}$  非透過性受容体に変換することにより、グリア突起の退縮が起こり、興奮性シナプスで放出されるグルタミン酸の除去が遅れ、EPSC の持続時間が延長することを明らかにした。平成 13 年度は、グリア突起上のグルタミン酸トランスポーターの機能解析を行い、グリアとシナプスの機能連関についての知見を深めた。

また、ヒト脳腫瘍細胞 (glioblastoma、oligodendroglioma) の多数の症例で、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体が発現していることを確認し、この受容体が、細胞増殖、突起伸展、細胞移動を制御する上で、重要な役割を果たすことを確定した。また、 $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体を流入する適量の  $Ca^{2+}$  が、Akt (protein kinase B) のリン酸化を介してアポトーシスを抑制し細胞増殖をもたらすことを支持する所見が得られた。

#### b. カルシウム透過型 AMPA 受容体とカルシウム結合蛋白の機能連関

ラット大脳皮質の培養神経細胞において、AMPA 刺激により、特異的に calbindinD28k の局在が樹状突起、細胞体から、核に変化すること、この calbindinD28k の核への局在変化と転写因子 CREB のリン酸化の程度が相関することを見出した。さらに、カルシウム透過型 AMPA 受容体を PC12 細胞に発現させ CREB のリン酸化の程度を測定したところ、calbindinD28k を共発現させた場合、CREB のリン酸化の程度が増加した。これに対して YFP を融合し核移行を阻害した YFP-calbindinD28k では、その程度が小さかった。このことは、AMPA 受容体の活性化から遺伝子発現までの経路に calbindinD28k の核移行が関与することを示唆している。

#### c. NMDA 受容体の機能発現の制御機構

PC12 細胞では、NR1 タンパクはきわめて微量が検出されるのみである。しかし、これを強制発現させなくても、NR2A または NR2B を単独に強制発現させるだけで、機能的 NMDA 受容体を十分発現させることができた。また、NR2A または NR2B の強制発現は、NR1 mRNA の発現には影響せず、NR1 タンパク質の量を顕著に増大させることがわかった。このことは、NR2A または NR2B は、転写後メカニズムによって、NR1 タンパク質の産生または維持に促進的に作用することを示唆した。さらに、小脳プルキンエ細胞にシンドビスウイルスにより NR2B を発現させると、内

因性の NR1 タンパクと hetero-oligomer を形成し、機能的 NMDA 受容体となり、シナプス応答に関与するようになることを明らかにした。

d. III 型代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR7a) の分布と機能

大脳基底核の出力細胞である淡蒼球外節の GABA 作動性細胞に入力する線状体からの GABA 作動性細胞の軸索終末には III 型代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR 7a) が高密度に存在しており、こうした受容体を持つ軸索終末は、低閾値型カルシウム電流によりバースト発火を示す淡蒼球 GABA 作動性細胞の周囲を選択的に取り囲んでいた。淡蒼球の GABA 作動性細胞は視床下核細胞を抑制しているが、視床下核細胞から興奮性入力を受けており、相互結合の関係にある。また、淡蒼球の GABA 細胞自体が線状体の GABA 作動性細胞からの抑制を受け、視床下核細胞に対して脱抑制を行い、運動のプログラミング等に関連して重要な働きをすると考えられている。従って、線状体 GABA 作動性細胞の抑制性シナプス伝達が III 型代謝調節型グルタミン酸受容体の活性化によりシナプス前性に阻害され、バースト発火を示す淡蒼球 GABA 作動性細胞の脱抑制を阻害することになり、結果として、視床下核細胞の興奮性が抑制される negative feedback としてシナプス前抑制が機能することが示唆された。

### 3. 研究実施体制

(1) 小澤グループ(群馬大学医学部・第二生理学教室)

1) 研究者名

小澤 滯司(群馬大学医学部・第二生理学教室、教授)

2) 研究項目

- a. ウイルスベクターを用いた外来遺伝子の導入によるニューロン、シナプス機能の変換
- b. 外来遺伝子の導入による海馬シナプスの長期増強の発現機序に関する研究
- c. グリアにおける  $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体の機能的、病態生理学的意義の解明

(2) 岡戸グループ(東京都神経科学総合研究所・分子神経科学研究部門)

1) 研究者名

岡戸 晴生(東京都神経科学総合研究所・分子神経科学研究部門、副参事研究員)

三輪 昭子(東京都神経科学総合研究所・分子神経科学研究部門、研究員)

近藤 真啓(東京都神経科学総合研究所・分子神経科学研究部門、流動研究員)

2) 研究項目

- a. ウイルスベクターの開発と組換えアデノウイルスの作製
- b.  $Ca^{2+}$  透過性 AMPA 受容体とカルシウム結合タンパクの機能連関に関する研究

(3) 岡田グループ(東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子神経科学)

1) 研究者名

岡田 隆(東京医科歯科大学難治疾患研究所・分子神経科学)

2) 研究項目

- a. 海馬シナプス可塑性と空間学習に関する行動生理学的研究

(4) 平野グループ(京都大学理学研究科・生物物理学)

1) 研究者名

平野 丈夫(京都大学理学研究科・生物物理、教授)

2) 研究項目

- a. 小脳シナプスの可塑性の発現、維持、調節の分子機構の解析
- b. 脳神経回路網の動的特性の解析
- c. 運動調節、運動学習において小脳シナプスが果たす役割の個体レベルでの解析

(5) 姜グループ(北海道医療大学歯学部・生理学)

1) 研究者名

姜 英男(北海道医療大学歯学部・生理学、教授)

2) 研究項目

- a. 中枢シナプスにおける代謝調節型グルタミン酸受容体の分布と機能的意義の解明

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

小澤グループ

- Iino, M., Goto, K., Kakegawa, W., Okado, H., Sudo, M., Ishiuchi, S., Miwa, A., Takayasu, Y., Saito, I., Tsuzuki, K. and Ozawa, S.: Glia-synapse interaction through  $Ca^{2+}$ -permeable AMPA receptors in Bergmann glia. *Science*, 292, 926-929 (2001)
- Tsuzuki, K., Lambolez, B., Rossier, J. and Ozawa, S.: Absolute quantification of AMPA receptor subunit mRNAs in single hippocampal neurons. *J. Neurochem.*, 77, 1650-1659 (2001)
- Ozawa, S.: Responses: Glial processes are glued to synapses via  $Ca^{2+}$ -permeable glutamate receptors. *Trends Neurosci.*, 25, 7 (2002)
- 小澤 滯司: 中枢神経系のグルタミン酸受容体、脳と神経 53, 605-615 (2002)

岡戸グループ

- Yamashita, S., Mita, S., Arima, T., Maeda, Y., Kimura, E., Murakami, T., Okado, H. and Uchino, M.: Bcl-2 expression by retrograde transport of adenoviral vectors with Cre-loxP recombination system in motor neurons of mutant SOD1 transgenic mice. *Gene Therapy*, 8, 977-986 (2001)
- Miwa, H., Shibata, M., Okado, H. and Hirano, S.: Tracing axons in the peripheral nerve using LacZ gene recombinant adenovirus and its application to regeneration of the peripheral nerve. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 60, 671-675 (2001)
- Aoki, T., Setsu, T., Okado, H., Mikoshiba, K., Watanabe, Y. and Terashima, T.: Callosal commissural neurons of Dab1 deficient mutant mouse, yotari. *Neurosci. Res.*, 41, 13-23 (2001)

- Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H.: Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. J. Neurosci., 21, 6105-6114 (2001)
- Okabe, S., Urushido, T., Konno, D., Okado, H. and Sobue, K.: Rapid redistribution of the postsynaptic density protein PSD-Zip45 (Homer 1c) and its differential regulation by NMDA receptors and calcium channels. J. Neurosci., 21, 9561-9571 (2001)

平野グループ

- Yamasaki, T., Kawaji, K., Ono, K., Bito, H., Hirano, T., Osumi, N. and Kengaku, M. :Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. Development, 128, 3133-3144 (2001)

姜グループ

- Takada, M., Kang, Y. and Imanishi, M. :Immunohistochemical localization of voltage-gated calcium channels in substantia nigra dopamine neurons. Eur. J. Neurosci., 13, 757-762(2001)
- Aoyagi, T., Terada, N., Kang, Y., Kaneko, T. and Fukai, T. :A bursting mechanism of chattering neurons based on Ca<sup>2+</sup>-dependent cationic currents. Neurocomputing 38-40, 93-98(2001)

- (2) 特許出願  
なし