

「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 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 の発色団形成効率を飛躍的に高めた。その改良 GFP を用いて、より早く明るい蛍光観察が可能になることを証明した。新規カルモデューリン結合モジュールを利用して、カルシウム指示蛋白質 *cameleon* のシグナルのダイナミックレンジを拡張した。
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)を用いて同定された抑制性介在ニューロンの形態・機能解析をおこなった。
3. シナプス前終末の可塑性 VAMP-pHluorin 融合タンパク遺伝子を組み込んだシンドビスウィルスを作製し、ラット海馬ニューロンに発現させた。また、単一苔状線維終末から活動電位にともなう Ca^{2+} 流入を測定し、シナプス前終末に 4 種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプを同定した。
4. mute synapse 仮説の検証 海馬培養神経細胞オータプスの系で、セロトニンは RRP を変えず、放出確率を低下させることによりエクソサイトーシスを低下させた。蛍光色素 FM1-43 を用いたエクソサイトーシス解析から、cAMP-PKA カスケードを賦活化すると放出サイト数が増加した。
5. MF-LTP にともなう蛋白質リン酸化、蛋白質発現の解析 PKC による神経伝達物質放出促進の機構を明らかにするため、PC12 細胞の分泌小胞を EGFP を用いて蛍光標識し、局在変化を共焦点顕微鏡で定量解析した。その結果、PKC によるリン酸化によって分泌小胞が開口放出を行う場である細胞膜にリクルートされ、放出機能が亢進すると結論された。開口放出の制御タンパク質のシナプス前部への選択的輸送機構を明らかにするため、タグを付加した *Complexin* を培

養海馬神経細胞に発現させ、その局在分布を共焦点顕微鏡で解析した。

2. 研究実施内容

中核チーム

VAMP-pHluorin 融合タンパク遺伝子を組み込んだシンドビスウィルスを作製し、脳定位固定下に感染させることにより、ラット海馬ニューロンに発現させた。塩化アンモニウム処理により蛍光強度が増大すること、高 K^+ 処理により蛍光強度が増大することから、シナプス小胞内の pH が測定されていることが示唆された。

海馬苔状線維終末から活動電位にともなう Ca^{2+} 流入を測定し、シナプス前終末に N, P/Q, L, Cav2.3 を含む R の 4 種類の Ca^{2+} チャンネルサブタイプを同定した。N タイプと P/Q タイプが早い伝達物質放出と強く関連しているのに対し、Cav2.3 を含む R タイプは速い伝達物質放出と関連していなかった。

成熟ラット海馬由来の神経幹細胞 PZ5 cell をレトロウイルスにて GFP 標識し、ラット海馬培養スライス歯状回顆粒細胞層に移植したところ、どのタイプにも分化しなかった。継代培養により分化能を失った可能性があるため、ラット胎仔由来の神経幹細胞 (neurosphere) を分離し、GFP 標識しラット海馬培養スライスに移植する予定である。同時に、ラット海馬培養スライスに NMDA 処理にてニューロン死を引き起こし、PI 染色にてニューロン死を確認した後、そこに GFP 標識した neurosphere を移植し、海馬培養スライス上での分化・生存の過程を経時的に観察する計画である。これと並行して、海馬培養スライスには神経幹細胞があるので、歯状回顆粒細胞に分化している可能性を検討した。海馬培養スライスに BrdU を取り込ませたところ、BrdU を核に取り込んだニューロンが顆粒細胞に見出された。これが新生したニューロンか否かを検討中である。

新世代プローブ開発チーム

GFP の発色団形成にかかわる反応の中で最も重要と思われる酸化反応に注目し、46 番目のフェニルアラニンをロイシンに置換すると、その発色団形成反応が、ほ乳類細胞の最適培養条件である $37^{\circ}C$ で飛躍的に促進されることが分かった。さらに、タンパク質のフォールディングの効率を高めるアミノ酸置換も導入し、明るい改変 GFP (Venus) を作製した。Venus を組み込んだ Ca^{2+} 指示薬カメレオンを用いると、調製したばかりの脳のスライスで、遺伝子導入後数時間以内にカルシウムイメージングが可能になることが証明された。また、PC12 における分泌顆粒を Venus で蛍光ラベルしたところ、ほぼ 100% の分泌顆粒が正確に、これまでに比べて 10 倍以上の明るさでラベルされていることが確認できた。この結果、脱分極や細胞刺激によって起こる顆粒分泌の素過程を、実時間で観察することが可能になった。また、細胞からの分泌量を培養液に放出される蛍光で定量することもできるようになった。

カルモデュリン依存性キナーゼキナーゼがカルモデュリンに結合する部分のペプチドとカルモデュリンとの複合体の構造解析から、新しい結合様式が明らかになった。カルモデュリンに対して N 末 \rightarrow C 末の向きが従来のものと比べて逆転することがわかった。この結合様式を利用して新規 Ca^{2+} 指示薬 cameleon, YC6.1 を作製した。従来の cameleon と比べて donor, acceptor の相対的位置関

係が大幅に変わることにより、Ca²⁺依存的 FRET 量の変化を大きく拡大させることができた。

分子解析チーム

PKC による神経伝達物質放出促進の機構を明らかにするため、PC12 細胞の分泌小胞を EGFP を用いて蛍光標識し、ホルボールエステルを作用させた際の局在変化を共焦点顕微鏡で定量解析した。カテコールアミンを含む大型の有芯小胞の標識にはモノアミントランスポーター、アセチルコリンを含む小型のシナプス様小胞の標識にはアセチルコリントランスポーターのそれぞれN末端に EGFP を融合させたタンパク質を発現させて行った。PMA 未処理の状態ではどちらの分泌小胞も細胞質全体にほぼ一様に分布していたが、PMA を作用させると細胞膜付近に集積した。PKC によるリン酸化によって分泌小胞が開口放出を行う場である細胞膜にリクルートされ、放出機能が亢進すると結論された。

PKC による神経伝達物質放出の促進に SNAP-25 が関与しているか否かを明らかにするため、PKC によるリン酸化部位である Ser187 を Ala に変異させたノックインマウスを作成した。ホモ個体の多くが出生後 21~25 日の間に死亡したことから、リン酸化部位の変異によって何らかの重大な機能障害が起きている可能性が考えられた。今後は PKC による神経伝達物質放出促進機構がどのような変化を受けているかを、培養した小脳顆粒細胞や副腎髄質細胞を用いて解析していく予定である。

チロシンリン酸化による神経伝達物質放出の抑制的な制御機構の全容を明らかにするため、本年度はチロシンホスファターゼの関与について調べた。PC12 細胞にチロシンホスファターゼの阻害剤により Ca²⁺誘発性の神経伝達物質放出が抑制された。PC12 細胞では Src キナーゼが恒常的に活性化され、神経伝達物質放出に抑制的に作用していると結論された。

開口放出の制御タンパク質のシナプス前部への選択的輸送機構を明らかにするため、タグを付加した Complexin を培養海馬神経細胞に発現させ、その局在分布を共焦点顕微鏡で解析した。その結果 Complexin の発現量はデンドライトでは細胞体から遠ざかるに従い減少するのに対し、軸索では減少しないことから、軸索を通してシナプス前部に選択的に輸送する機構があることが示唆された。様々な Complexin のデリーションミュータントを発現させ、その分布を比較することによって、軸索への選択輸送に必須なドメインをほぼ特定した。

機能解析チーム

海馬培養神経細胞オータプスの系に反復刺激を適用することにより素過程の新たな定量解析を試みた。①反復刺激(40Hz)によりオータプスの興奮性シナプス電流(EPSC)は漸減し定常値に達する。この間の総放出量(各 EPSC 振幅ピーク値の総和)を即時放出可能プール量(RRP)の目安とし、初めの EPSC 振幅ピーク値を RRP で割った値を放出確率として解析した。セロトニン RRP を変えず、放出確率を低下させることによりオータプスからのエクソサイトーシスを低下させた。② Rab3 GEP 遺伝子ノックアウト動物より海馬神経細胞をマイクロアイランド培養し、オータプスを作らせ、反復刺激による解析等を行なったところ、RRP は野生型と差はなく、放出確率が有意に低下していた。Ca 感受性の解析などから、プライミングの過程に異常があることが強く示唆された。

海馬歯状回神経細胞を培養しオータプスを形成させ、蛍光色素 FM1-43 による解析を行なった。

cAMP-PKA カスケードの賦活化により、放出サイト数が増加した。蛍光画像解析の結果、常時シナプス小胞の集積の見られるサイトのうち約半数はサイレントであることを明らかにした。

エクソ/エンドサイトーシスは受容体機能の調節にも重要な働きをしていると考えられるが実態は不明である。小脳皮質スライス標本を用いて、プルキニエ細胞よりEPSCをホールセルクランプ記録した。テタヌス毒素の細胞内投与により平行線維 EPSC 振幅は減少したことから、constitutive exocytosis が Glu 受容体の活性調節に関与していることが解った。プルキニエ細胞平行線維シナプスの Glu 受容体活性は常時 constitutive な exocytosis と endocytosis のバランスによることが示唆された。

遺伝子改変動物チーム

GAD67 遺伝子 GFP ノックインマウスの脳から扁桃体を含む冠状断スライスを作成し、蛍光下に同定した扁桃体外側核(LA)及び基底外側核(BLA)の GFP 陽性細胞からホールセル記録を行い、電気生理学的特性とモノアミン(5-HT、ノルアドレナリン(NA))による修飾作用について解析した。

LA の GFP 陽性細胞は、細胞体長径が 15-18 μ m 程度の中型の細胞からなり、細胞内通電に対する発火パターンから、Fast-spiking (FS) 細胞 (平均 150Hz 程度のスパイク頻度)と Low-threshold-spiking (LTS) 細胞 (平均 100Hz 程度のスパイク発射)に分類された。これに対して、BLA には FS 細胞、LTS 細胞に加えて、細胞体長径が 25 μ m 以上と大型で、脱分極性通電に対して Regular-spiking (RS)パターンを呈する RS 細胞が認められた。静止膜電位付近で電流固定すると、5-HT は上記 3 種の GABA 作動性細胞をすべて脱分極させ、スパイク頻度を 10 倍以上に増加した。これに対して、NA は LTS 細胞、RS 細胞のスパイク頻度は増したが、FS 細胞では数 mV の脱分極は生じたが、スパイク頻度の増加は認めなかった。以上の結果より、扁桃体 LA 及び BLA には異なる特性を持つ GABA ニューロンが存在し、モノアミンは GABA 作動性細胞の興奮性を高めることで、神経核内の興奮性を抑制するが、その感受性には差異が存在すると結論した。

3. 研究実施体制

(1) 中核チーム(東北大学大学院生命科学研究科)

① 研究分担グループ長名

八尾 寛 (教授)

② 研究項目

機能プローブのシナプス前終末への導入と開口放出素過程の解析

(2) 新世代プローブ開発チーム(理化学研究所脳科学総合研究センター)

① 研究分担グループ長名

宮脇敦史 (チームリーダー)

② 研究項目

GFP をベースにした新しいバイオイメーキング技術開発に関する研究

- (3) 分子解析チーム(北里大学)
- ① 研究分担グループ長名
高橋 正身 (教授)
 - ② 研究項目
開口放出関連タンパクの機能とリン酸化の役割の解析
- (4) 機能解析チーム(理化学研究所脳科学総合研究センター)
- ① 研究分担グループ長名
山口 和彦 (副チームリーダー)
 - ② 研究項目
機能プローブによる mute synapse 賦活化機構の解析
- (5) 遺伝子改変動物チーム(岡崎国立共同研究機構生理学研究所)
- ① 研究分担グループ長名
柳川 右千夫 (助教授)
 - ② 研究項目
脳機能解明を目的とした遺伝子改変動物作成に関する研究

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Takeharu Nagai, Keiji Iyata, Eun Sun Park, Mie Kubota, Katsuhiko Mikoshiba and Atsushi Miyawaki. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* 20, 87-90 (2002).
- Kevin Truong, Asako Sawano, Hideaki Mizuno, Hiroshi Hama, Kit I Tong, Tapas Kumar Mal, Atsushi Miyawaki and Mitsuhiko Ikura. FRET-based *in vivo* Ca²⁺ imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nature Structural Biology* 8, 1069 - 1073 (2001).
- Asako Sawano, Hiroshi Hama, Naoaki Saito, and Atsushi Miyawaki
Multi-color imaging of Ca²⁺ and protein kinase C signals using novel epi-fluorescence microscopy. *Biophysical Journal* 82, 1076-1085 (2002).
- Aoyagi, K. and Takahashi, M. (2001)
Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhances Ca²⁺-dependent neurotransmitter release from PC12 cells and cultured cerebellar granule cells without affecting intracellular Ca²⁺ mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 646-651.
- Ohnishi, H., Yamamori, S., Ono, K., Aoyagi, K., Kondo, S., and Takahashi, M. (2001)
Src family tyrosine kinase inhibits neurotransmitter release from neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10930-10935.
- Kawakami, M., Sekiguchi, M., Sato, K., Kozaki, S., and Takahashi, M. (2001) Erythropoietin Receptor Mediated Inhibition of Exocytotic Glutamate Release Confers Neuroprotection

during Chemical Ischemia. *J. Biol. Chem.* 276, 39469–39475.

- Nishiki, T., Nihonmatsu, I., Tshara, Y., Kawasaki, M., Sekiguchi, M., Sato, K., Mizoguchi, A., and Takahashi, M. (2001)

Distribution of soluble N-ethylmaleimide fusion protein attachment proteins (SNAPs) in the rat nervous system. *Neuroscience* 107, 363–371.

- Shoji-Kasai, Y., Itakura, M., Kataoka, M., Yamamori, S., and Takahashi, M. (2002)

Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur. J. Neurosci.* 15:8, 1390–1394

- Kohara K, Ogura A, Akagawa K, Yamaguchi K. (2001)

Increase in number of functional release sites by cyclic AMP-dependent protein kinase in cultured neurons isolated from hippocampal dentate gyrus. *Neurosci.Res.* 41:79–88.

(2) 特許出願

国内1件