

「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ークスルーする。

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 (1) 刺激を受け止めた受容体からのシグナルが、時空間的に細胞内でどのように拡がるかをバイオイメージング技術を用いて解析し、細胞膜上の受容体の密度、および活性化された受容体を取り込んで刺激をクリアする能力が、“シグナルが刺激部位に留まるか、細胞全体に広がるか”を決める重要な要素となっていることを明らかにした。(2) 紫外光照射によって緑から赤に色に変換する新しい蛍光蛋白質の遺伝子をヒュサンゴからクローニングし、光を使って細胞をマーキングする技術を開発した。
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) を改良し、GFP発現を効率化するとともに、このマウスを用いて、扁桃体の抑制性介在ニューロンを同定し、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手配してマウス脳に感染させ、海馬苔状線維終末に発現させた。その結果、苔状線維電気刺激に応答する開口放出をリアルタイムに測定した。また、単一苔状線維終末から活動電位にともなう Sr^{2+} 流入を測定し、シナプス前終末に存在する4種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプの分布が終末ごとに異なっていることを見出した。
4. シナプス前終末の可塑的調節機構の素過程解析 海馬培養神経細胞オータプスの系で、シナプス小胞の輸送に関与していると考えられる低分子量GTP結合蛋白質、Rab3A

を活性化する蛋白質、Rab3GEPの遺伝子ノックアウト動物において、シナプスからの神経伝達物質の放出量は著しく低下していた。しかし即時放出可能プールの大きさに差は無かった。放出確率は著しく低下していたが、ノックアウト群と対照群の間でCa²⁺依存性に大きな差は見られなかった。従ってRab3GEPはドッキング以降、Ca²⁺依存性膜融合過程以前の放出準備状態に関与し、準備状態を進行させていると結論された。

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、SNAP-25のリン酸化部位のSerをAlaに置換したノックインマウスを作成した。ホモ個体においては脳の構築に異常は認められなかったが、いくつかの行動に異常が認められた。したがって、PKCによるSNAP-25のリン酸化は脳の機能に重要な役割を果たしており、特に情動に関わる神経活動の制御に関わっている可能性が示唆された。また、Ca²⁺、カルパイン依存的にSNAP-25が切断されることを見出した。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、Complexinのコアドメインと結合するタンパクを検索した。

2. 研究実施内容

中核チーム

エピソード記憶を形成する過程において、海馬苔状線維シナプスが”denoting”あるいは”teaching”機能をもっている主要な回路であることが示唆されている。苔状線維シナプスが機能的にヘテロであることと歯状回顆粒細胞の新生がこの回路の可塑性を高めている可能性を以下のように検討した。(1) 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、脳定位固定下に海馬歯状回顆粒細胞に感染させることにより、苔状線維終末に特異的に発現させた。海馬電気刺激により、開口放出にともなう蛍光の変化を定量的に計測した。個々のシナプス前終末における開口放出確率がヘテロであるかを検討中である。(2) 単一海馬苔状線維終末から活動電位にともなうSr²⁺流入を測定し、シナプス前終末にN, P/Q, L, Rの4種類のCa²⁺チャネルサブタイプを同定した。Ca²⁺チャネルサブタイプの発現比率が個々の終末により異なることを見出した。苔状線維終末のこのような機能的ヘテロさが回路の可塑性にどのように影響するかを検討している。(3) ラット海馬培養スライスに神経幹細胞があり、歯状回顆粒細胞に分化している可能性を検討した。海馬スライス培養に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。また、EGFP遺伝子を組み込んだレトロウィルスを海馬培養スライスに感染させたところ、歯状回顆粒細胞層においてニューロンに分化することが認められた。

新世代プローブ開発チーム

チロシンリン酸化のシグナル伝達は、上皮増殖因子 (EGF) の投与によって引き起こすことができる。このシグナル伝達をリアルタイムで可視化するために、細胞膜直下で起こるチロシンリン酸化シグナルを可視化する蛍光プローブ (Picchu-X) と、Rasタンパク質の活性化を可視化する蛍光プローブ (Raichu-Ras) を細胞内に導入した。通常のCOS細胞で実験を行ったところ、局所的EGF刺激に対して、細胞質膜直下で起こるチロ

シンリン酸化シグナルも、R a s タンパク質の活性化も刺激部位に留まる様子が観察された。一方、C O S 細胞にE G F 受容体を強制的に過剰発現させて、細胞膜上のE G F 受容体密度を上げると、どちらの現象とも刺激後、速やかに細胞全体にわたって伝播することが分かった。以上の結果から、E G F 刺激によって起こる細胞内チロシンリン酸化シグナルの伝播は、細胞膜上のE G F 受容体の密度に依存することが示唆される。

ヒュサngoから蛍光蛋白質“カエデ”をクローニングしたところ、U V 光によって波長が変換する特性(photoconversion)を有し、光によるマーキング技術として利用できることをみいだした。軸索や樹状突起が互いに絡み合う高密度神経培養の系において、まず全体の神経細胞にカエデを発現させて緑色にラベルし、次にpinpointのU V 光パルスで、ある特定の神経細胞の細胞体を照射したところ、突起先端まで赤くマーキングされるのが観察された。その細胞に絡みついていた隣の神経細胞は緑のまま、両神経細胞間での接着部位を明瞭に可視化することができた。

分子解析チーム

リン酸化を介した神経伝達物質放出の制御は、記憶や学習の基盤であるシナプス可塑性の重要な機構の一つと考えられている。我々は神経伝達物質の放出に必須なSNAREタンパク質の一つであるSNAP-25のSer¹⁸⁷がPKCによってリン酸化されることを明らかにし、このリン酸化の役割を明らかにするためリン酸化部位のSerをAlaに置換したノックインマウスを作成し、その解析を進めた。(1) 野生型およびホモ個体の脳の凍結切片を作成し、ニッスル染色により脳の構築を比較した。その結果全体的な脳の構築に有意な異常は認められなかった。(2) 野生型、ヘテロ、ホモ個体の行動解析をおこなった。Open fieldでのGeneral activityテストおよびLight-dark preference テストにおいて、ホモ個体に行動異常が認められた。したがって、PKCによるSNAP-25のリン酸化は脳の機能に重要な役割を果たしており、特に情動に関わる神経活動の制御に関わっている可能性が示唆された。

カルパインを介した神経伝達物質放出の制御機構について検討した。培養した小脳顆粒細胞や大脳皮質神経細胞をイオノマイシン処理すると、処理後5~15分でSNAP-25の量が減少し抗SNAP-25抗体で認識される20kDaフラグメントが出現した。この変化は外液のCa²⁺に依存的で、NMDA処理によっても引き起こされた。20kDaフラグメントはSNAP-25のC末部分を認識する抗体や57-81残基部分を認識する抗体とは反応するが、N末部分を認識する抗体とは反応しないことから、パルミチル化によって細胞膜に結合しているCys-richドメインのN末側で切断が起こっていると考えられた。生後の様々な週齢のラット脳のイムノブロット解析を行った結果、20kDaフラグメントはラット脳内でも認められるが、その量はシナプス形成が盛んな生後2週付近で最大となり、成体脳では減少することが明らかとなった。培養小脳顆粒細胞をCalpain inhibitor IVやCalpeptinなどのカルパイン阻害剤で前処理しておく。Ca²⁺依存的なSNAP-25の切断は完全に抑制され、Ca²⁺依存的なグルタミン酸放出の促進が引き起こされた。これらの結果はCalpainが特に発達期のシナプスにおいてシナプス前性機能を抑制的に制御していることを示唆している。

神経伝達物質放出におけるPIP2の役割を明らかにするため、ラット副腎髄質細胞腫由

来の株化細胞であるPC12細胞を用い、細胞膜上のPIP2の局在を調べた。超音波破碎法により細胞質面を露出させたPC12細胞の細胞膜シートを、抗PIP2抗体、抗クロモグラニンB抗体、抗VAMP-2抗体、抗シンタキシン抗体などで抗体染色し、それらの局在を定量的に比較した。その結果細胞膜上に結合した分泌小胞の約50%がシンタキシンスポットと、約30%がPIP2スポットと共存することが明らかとなった。これらのことから(1)細胞膜への分泌小胞のドッキングにはSNAREタンパク質以外のタンパク質が関与している、(2)ドッキングした後にドッキング部位にPIP2が集積することが示唆された。

神経伝達物質放出の制御タンパク質であるComplexin IIの軸索への選択的配送に不可欠なコアドメインに結合するタンパク質を同定するため、Complexin IIの全長、あるいはコアドメインとGSTとの融合タンパク質を作製した。可溶化したラット脳のタンパク質を用いて結合タンパク質を検索した結果、全長およびコアドメインの双方に結合するタンパク質の候補を特定した。コアドメインにはComplexinと結合するSNAREタンパク質の結合は見られないことから、これらの結合は特異的なものであることが考えられた。Complexinのシナプス前部への選択的配送の生物学的意義の解明に用いるトランスジェニックマウスを作製するために、CAMKIIプロモーター制御下でコアドメインと蛍光蛋白質、Venusとの融合蛋白質を発現するベクターを構築した。

機能解析チーム

開口放出関連蛋白質の機能の詳細が解明されるために、神経伝達物質放出の機能的素過程を生理学的に定量することを目的とした。培養海馬ニューロンオータプスより、興奮性シナプス後電流 (EPSC) を計測した。シナプス小胞のうち、シナプス前末端の細胞膜近傍に繋ぎ止められているもの (ドッキング)、すなわち即時放出可能プールの定量には①0.5M蔗糖溶液により生じるEPSC電流の積算値 (移動電荷量)、②40Hz、1秒間の刺激により枯渇するまでのEPSC振幅の積算値、の両者を比較しながら用いた。Ca²⁺依存性の放出確率は1回刺激に対するEPSCの移動電荷量もしくはEPSC振幅を①もしくは②の方法で求めた即時放出可能プールの大きさを割った値として求めた。

シナプス小胞の輸送に関与していると考えられる低分子量GTP結合蛋白質、Rab3Aを活性化する蛋白質、Rab3GEPの遺伝子ノックアウト動物に関して上記の解析を試みたところ、シナプスからの神経伝達物質の放出量は著しく低下していた。しかし①および②の方法で計測した即時放出可能プールの大きさに差は無かった。放出確率は著しく低下していたが、ノックアウト群と対照群の間でCa²⁺依存性に大きな差は見られなかった。従ってRab3GEPはドッキング以降、Ca²⁺依存性膜融合過程以前の放出準備状態に関与し、準備状態を進行させていると結論された。今回用いた解析方法は、神経伝達物質放出の素過程を定量化し、蛋白質分子の機能を理解する上で大変有用であることがわかった。

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。本研究では、グルタミン酸脱炭酸酵素67 (GAD67) 遺伝子にGreen fluorescent protein (GFP) をノックインした遺伝子改変マウス

(GAD67-GFPマウス)の解析と改良を行った。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及び基底外側核のGFP陽性細胞からホールセル記録を行い、ノルアドレナリン(NA)による修飾作用について解析した。GABAニューロンの中で、Regular-spikingパターンを呈するRS細胞では、NAを投与すると全例で、脱分極とその後の持続性スパイク発射が生じた。また、RS細胞からの電位固定記録でNAによる内向き電流が観察され、この電流はprazosinで抑制された。さらに、外液Ca²⁺の除去あるいはCd²⁺の投与、外液Na⁺濃度を下げることにより、NAによる内向き電流は抑制された。以上の結果より、NAのRS細胞に対する興奮性作用はα1アドレナリン作動性受容体を介してカルシウム感受性を示す非選択的カチオンチャネルを活性化すると結論した。

GAD67-GFPマウスには、ES細胞でのスクリーニングのためにloxPで挟まれたネオマイシン耐性遺伝子(PGK-neo)が挿入されている。Cre recombinaseが導入されているトランスジェニックマウスとGAD67-GFPマウスとを交配して、GAD67-GFPマウスからPGK-neo遺伝子を削除したマウス(GAD67-GFP(Δneo)マウス)を作成した。抗GFP抗体を用いたWestern法と免疫組織化学法で解析した結果、GAD67-GFP(Δneo)マウスはGAD67-GFPマウスよりGFPの発現が高いことを観察した。

3. 研究実施体制

I. 中核チーム

- ① 研究分担グループ長名：八尾 寛 (東北大学大学院生命科学研究科、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

II. 新世代プローブ開発チーム

- ① 研究分担グループ長名：宮脇敦史 (理化学研究所脳科学総合研究センター、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ジング技術開発に関する研究

III. 分子解析チーム

- ① 研究分担グループ長名：高橋 正身 (北里大学医学部代謝・蛋白質学、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

IV. 機能解析チーム

- ① 研究分担グループ長名：山口 和彦 (理化学研究所脳科学総合研究センター、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

V. 遺伝子改変動物チーム

- ① 研究分担グループ長名：柳川 右千夫 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所、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. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- Asako Sawano, Shuichi Takayama, Michiyuki Matsuda, and Atsushi Miyawaki
Lateral Propagation of EGF Signaling after Local Stimulation Is Dependent on Receptor Density
Developmental Cell 3, 245-257 (2002)
- Ryoko Ando, Hiroshi Hama, Miki Yamamoto-Hino, Hideaki Mizuno and Atsushi Miyawaki
An optical marker based on the UV-induced green-to red photoconversion of a fluorescent Protein
Proceeding of National Academy of Sciences USA 99, 12651-12656 (2002)
- Shoji-Kasai Y, Itakura M, Kataoka M, Yamamori S, Takahashi M.
Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells
Eur J Neurosci 15, 1390-1394 (2002).
- Amino, S., Itakura, M., Ohnishi, H., Tsujimura, J., Koizumi, S., Takei, N., and Takahashi, M.
Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca²⁺-responsible secretory vesicles through activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase
J. Biochem. 131, 887 - 894 (2002).
- Koga T, Kozaki S, Takahashi M
Exocytotic release of alanine from cultured cerebellar neurons
Brain Res, 952, 282-289 (2002).
- Takahashi M, Ohnishi H
Negative regulation of exocytosis at the nerve terminal
Mol Psychiatry 7, 536-537 (2002).
- Yamaguchi K., Tanaka M., Mizoguchi A., Hirata Y., Ishizaki H., Kaneko K., Miyoshi J. and Takai Y.
A GDP/GTP exchange protein for the Rab3 small G protein family up-regulates a postdocking step of synaptic exocytosis in central synapses.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 14536-14541 (2002)
- Ebihara S, Obata K & Yanagawa Y
Mouse vesicular GABA transporter gene: genomic organization, transcriptional regulation and chromosomal localization
Mol. Brain Res. 110, 126-139 (2003)

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数： 0 件（研究期間累積件数： 1 件）