

「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

脳の可塑的变化に伴って、シナプス前終末にどのような形態および機能レベルの変化が引き起こされ、それがどのように制御されているかを研究し、ニューロンが新生され回路に組み込まれる過程、動物の空間学習にともない、海馬において新たな神経回路が形成されること、シナプス前終末がカルシウムチャネルの構成においてヘテロであることなどを明らかにした。シナプス前終末からの開口放出を計測する目的で、VAMP-pHluorinを部位特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製した。また、神経細胞における樹状突起形成の分子機構の研究を進展させるとともに、グリア細胞と神経細胞の接着に注目し、グリア細胞と接着した神経細胞を経時的に観察しながら、シナプス形成を指標に神経細胞の成熟の解析を行った結果、神経細胞が完全に成熟するには液性因子のみでは不十分で接着が必要であること、また、局所的な接着によって神経細胞内にプロテインキナーゼCの活性化が伝播し、神経細胞全体でシナプス形成が促進されることが確認された。リン酸化を介したシナプス前性機構を明らかにするため、PKCによるSNAP-25のリン酸化部位の変異マウスを作成し、顕著な行動異常をみとめた。細胞質で合成されたシナプス前タンパク質の、軸索への選択的配送機構を明らかにするため、コンプレキシンの選択的配送に必須なドメインと蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させたトランスジェニックマウスを作成した。シナプス後膜における受容体の発現制御機構にVAMPが関与していることを明らかにした。また、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) を用いてGABA性介在ニューロンの機能解析を行った。シナプス可塑性における重要な因子の一つのCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) 遺伝子ノックインマウスを作成した。

本研究の成果として、開口放出の機能プローブを発現するマウス、リン酸化を介する情報伝達カスケードを変異させたマウス、軸索の選択的配送機能を可視化したマウスなどの有用な遺伝子改変動物が数多く作製された。これらの動物を駆使した研究の展開が期待される。また、シナプス前終末のみならず、樹状突起やグリアとの相互作用も明らかにされてきた。ネットワークのダイナミクスを分子レベルで解明する新しい大きな研究の流れが

作られつつある。

## 2. 研究実施内容

### 中核チーム

【目的】脳の可塑的变化に伴って、シナプス前終末にどのような形態および機能レベルの変化が引き起こされ、それがどのように制御されているかを明らかにする。形態レベルの研究では、海馬においてニューロンが新生し、活動する回路に組み込まれていく可能性を検証するとともに、動物の空間学習にともなって、海馬に新たな回路が形成される可能性を検証する。また、樹状突起形態形成の分子機構を解明する。機能レベルの研究では、海馬苔状線維シナプス前終末における $Ca^{2+}$ チャンネルサブタイプの発現比率がどのように調節されているかを検討する。また、海馬のシナプス前終末における開口放出を工学的に定量化する手法を開発する。

【方法】(1) レトロウィルスベクターにより海馬スライス培養システムにおける新生細胞をEGFPラベルし、ニューロン新生から回路への組み込みを追跡した。(2) マウスにモリス水迷路学習を課し、空間学習成立群およびコントロール群について海馬苔状線維の形態をTimm染色法と画像解析法で定量化し、比較した。(3) Rasスーパーファミリーに属する低分子量GTP蛋白質ADPリボシル化因子(ARF)のアイソフォームの一つのARF6は、細胞膜のリサイクリングや細胞骨格の制御に関わっている。ARF6のGDP/GTP交換型活性化因子のEFA6 (exchange factor for ARF6) に着目して、放射性及び非放射性in situ ハイブリダイゼーション法によるEFA6Aの成熟期および発達過程における海馬での発現局在、ノーザンブロット解析によるEFA6Aの発達過程における海馬での発現解析、初代海馬神経培養細胞へのEFA6A変異遺伝子導入による樹状突起形成への影響などについて検証した。(4) カルシウム感受性蛍光デキストラン法により、単一海馬苔状線維終末から活動電位にともなう $Sr^{2+}$ 流入を光学的に計測した。(5) VAMP-pHluorin融合タンパク遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製し、Cre/loxP遺伝子組み替え法により、部位特異的に発現させた。

【結果】(1) EGFPラベルされた新生ニューロンが歯状回顆粒細胞において、1-4週間にわたり増殖しつづけることを観察した。4週間後に固定して、免疫学的に形質を同定したところ、成熟または未熟なニューロンに分化したものがそれぞれ、約4分の1ずつあった。残りは、グリアや未分化細胞の形質を示した。ニューロンに分化したものは、顆粒細胞層に分布し、樹状突起や軸索などの形態が認められた。したがって、顆粒細胞の作る神経回路に組み込まれていることが示唆される。(2) モリス水迷路空間学習の成立したマウスにおいては、海馬苔状線維の投射領域の拡大が認められた。また、オリエンス層への新たな投射が確認された。海馬の中核側頭葉軸について連続切片を作製し、中核側においてのみ投射領域の拡大が認められた。(3) EFA6A mRNAは、海馬錐体神経細胞層及び歯状回顆粒細胞層に非常に豊富に発現していることが明らかになった。さらに特筆すべきことに、海馬神経細胞の樹状突起の存在する層にお

いても発現シグナルが観察され、樹状突起におけるEFA6A mRNAの局在が示唆された。EFA6A mRNAは、神経細胞体のみならず樹状突起においても局在することが明確となった。また、EFA6A mRNAは、生後1〜2週齢の海馬において著明に発現の増加が観察され、樹状突起へのmRNAの局在は、1週齢の海馬ですでに観察された。不活性型EFA6A (E246K)を過剰発現させることにより、海馬神経細胞の樹状突起が過剰に誘導されることを認めた。(4) 苔状線維の巨大シナプス前終末におけるN-およびR-タイプカルシウムチャネルの相対発現頻度のばらつきが有意に大きいことを明らかにした。しかし、P/Q-タイプの発現頻度には大きなばらつきは認められなかった。単一軸索上の隣り合う2つに巨大シナプス前終末を比較し、N-タイプおよびR-タイプの分布に偏りが認められないことを見出した。(5) VAMP-pHluorin loxPマウスをCAG-Creマウスと交配したものでは、脳のほぼ全領域においてVAMP-pHluorinの発現は、シナプス前終末の分布とほぼ一致し、神経細胞体の領域には認められなかった。CAMKIIa-Creマウスと交配したものでは、海馬苔状線維終末に局限した発現が認められた。本Cre/loxPシステムを用いて、VAMP-pHluorinを特定のニューロン群のシナプス前終末に局限して発現されることがわかった。

#### 新世代プローブ開発チーム

【目的】神経細胞が未熟な状態から分化・成熟し、シナプス形成する過程において、アストロサイトが神経細胞の細胞膜上に接着してシナプス形成を促進する「接着因子」については、あまり踏み込んだ研究がされていない。細胞の形態や機能をイメージする技術を開発しており、それらを駆使して神経-アストロサイトの相互作用（接着）の解析を行った。

【研究手法と成果】ラット海馬に由来する未分化な神経細胞を個別に培養し、アストロサイトの接着効果を解析するためのシステムを構築した。すなわち、寒天でコートしたカバーガラスの上に、ポリリジンとコラーゲンから成る、細胞の足場を島状に形成した。さらに、ディッシュ（培養皿）の辺縁部にアストロサイトを培養し、培養液はアストロサイトが分泌する液性因子によって飽和する状態を作り出した。播種する（ふりかける）神経細胞の数を調節すると、一個の島の上に一個の神経細胞を生育させることが可能である。これにより液性因子（+）と接着因子（-）の状態が得られる。一方、神経細胞にアストロサイトを振りかけて接着させたまま培養すると、液性因子（+）・接着因子（+）の状態にすることが可能である。これら2つの状態間の神経のシナプス形成を比較して、神経細胞の成熟におけるグリア細胞の液性因子と接着因子の役割について解析を行った。その結果、アストロサイトの接着を受けた神経細胞では、細胞全体でシナプス形成の著しい促進（液性因子（+）・接着因子（-）と比較して5〜6倍）が起こることが確認された。すなわち、シナプスが十分に形成されるためには、アストロサイト由来の液性因子のみでは不十分でアストロサイト由来の接着因子が必要であることが示された。その接着には、神経細胞の側のインテグリンが関

与することが判明した。また、アストロサイトが神経細胞と局所的に接着することを見出し、局所的な接着から神経細胞全体に広がるシナプス形成現象の裏に潜む分子メカニズムを探ったところ、不飽和脂肪酸によって活性化されるプロテインキナーゼCが必要かつ十分に働いていることが証明された。

【展望】神経細胞は、周りの神経細胞と特異的なシナプスを形成し、コミュニケーションを行って初めて「一人前（成熟した）」とされる。再生医療の領域では、神経幹細胞を移植して脳神経系の疾病を治療することが計画されているが、「導入された未分化な神経細胞において、いかにシナプス形成を誘導して成熟させるか」が重要である。アストロサイトの接着による効果、および接着によって起こる細胞内のシグナル伝達機構に関する今回の研究成果は、今後の脳治療研究に基礎的な指針を与えるものとして期待される。

#### 分子解析チーム

**PKCによる神経伝達物質放出制御機構**：SNAP-25のリン酸化部位のSer<sup>187</sup>をAlaに置換したノックインマウスの遺伝的バックグラウンドの純化を進めるため、ヘテロ個体とB6とのバッククロスをさらに進めた。Open fieldでの行動を24時間観察すると、ホモ個体は昼間の間は殆ど探索行動を示さなかったが夜間はWild typeと同じくらい活発に活動した。ホモ個体は非常にフリーズしやすい特異な表現系を示した。さらに音刺激に対する感受性がWildより高まっていたが、より強い電気刺激を与えないと鳴き声を上げないという我慢強い性質も併せ持っていた。以上の結果からSNAP-25のS187のリン酸化は情動に関係した神経回路の機能制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

**神経伝達物質放出におけるホスファチジルイノシトールの役割**：神経伝達物質放出へのPIP2スポットの役割をさらに明らかにするため、昨年度に引き続きPC12細胞を用いPIP2スポットの数と神経伝達物質放出能との相関を調べた。脱分極刺激を加えてしばらくすると神経伝達物質放出能は低下していったが、それに伴いPIP2スポットの数も減少した。PC12細胞にPIP5キナーゼを発現させると細胞膜上のPIP2スポット数が増加し、神経伝達物質放出能も増加した。神経伝達物質放出能の増加の割合は、脱分極刺激の強さを変化させてもほぼ同じであった。以上の結果からドックした分泌小胞上にPIP2クラスターが形成されることが分泌能の獲得（プライミング）であると考えられた。

**シナプス前部への選択的タンパク質輸送機構**：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が実際の脳でも軸索への選択的配送シグナルとして働くかを明らかにするため、EGFPを融合させたコアドメインのトランスジェニックマウスを作成した。PCRによってゲノム解析をした結果、複数のトランスジェニックマウスが得られたことを確認した。

### 機能解析チーム

【目的】小脳プルキンエ細胞ー平行線維(PF)シナプスにおいて、シナプス後膜におけるAMPA受容体の発現制御にVAMPが関与しているという従来の研究を発展させ、運動学習の基礎にあるPFシナプスの長期抑圧(LTD)とAMPA受容体の構成性トラフフィッキングの関係について検討する。

【方法および結果】ラット小脳のスライス標本を用い、ホールセルパッチクランプ法によってプルキンエ細胞よりシナプス電流を記録し、平行線維(PF)刺激によるEPSCの振幅変化を解析した。VAMPの特異的阻害剤、破傷風毒素(TeTX)をホールセル記録用ガラスピペットを通して細胞内に投与したところ、PF-EPSCの振幅は徐々に減少し、約20分で定常になった(はじめの約60%の振幅)。これはTeTXがVAMPを阻害したため、構成性エクソサイトーシスによるAMPA受容体のPFシナプス膜への挿入が阻害され、一方、構成性エンドサイトーシスによるAMPA受容体の内在化は持続したため、PF-EPSCの振幅が徐々に小さくなったものと考えられた。エンドサイトーシスはGTPaseであるダイナミンを必要としている。ダイナミン阻害ペプチドの細胞内投与により、構成性エンドサイトーシスを阻害すると、PF-EPSC振幅は、約15分で140%に増大した。また、非加水分解型のGTP $\gamma$ Sを1型代謝型グルタミン酸受容体阻害剤と同時に投与することによっても同程度のPF-EPSCの振幅増大が見られた。この増大はTeTXの同時投与により完全に阻害された。これらのことからPFシナプスにおけるAMPA受容体の表面発現量の調節は構成性のエクソサイトーシスとエンドサイトーシスの平衡によって規定されていることが強く示唆された。また、構成性エンドサイトーシスがPKCの活性化を必要とするか否かを以下に検討した。PKCの阻害剤を細胞内投与したところ、TeTXによるPF-EPSCの減少、すなわち構成性エンドサイトーシスによるAMPA受容体の内在化を強く抑えた。このことから、PKCが構成性トラフフィッキングに関与していることが示された。さらにPKCの活性化は、通常 conditions で構成性エンドサイトーシスを起こすのに充分であることが示された。PKCの阻害によるLTD阻害は、構成性エンドサイトーシスによるAMPA受容体の内在化を抑えている可能性が強く示唆された。細胞内Caイオン濃度の上昇、AMPA受容体の活性化が構成性エンドサイトーシスに必要かどうか検討し、LTDと構成性エンドサイトーシスの関係を、今後さらに検討する。さらにMAPキナーゼ、細胞骨格系、蛋白質分解系の構成性エンドサイトーシスへの関与を調べ、LTD誘導、発現におけるエクソ/エンドサイトーシスによる受容体活性調節のメカニズムを明らかにする。

### 遺伝子改変動物チーム

【目的】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)の解析を行った。また、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII・(CaMKII $\cdot$ )遺伝子ノックインマウスを作成した。

【方法】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、ノルアドレナリン(NA)による修飾作用について解析した。

【結論】(1) **GAD67-GFPマウスの解析**：RS型GABAニューロンでは、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。NAのRS型GABAニューロンに対する興奮性作用は、1) Na<sup>+</sup>依存性非選択性カチオンチャネルの活性化、2) 静止電位で活性化されているK<sup>+</sup>コンダクタンスの抑制という二つの異なるメカニズムを介していることが示唆された。(2) **不活性型カルモジュリンキナーゼIIノックインマウスの作成とそれを用いた脳機能の解析**：CaMKII  $\alpha$ のキナーゼ活性の低下とそれによる基質蛋白のリン酸化の低下に直接起因した脳機能の変化を観察する目的で、CaMKIIの前脳での主要なサブユニットである $\alpha$  (CaMKII  $\alpha$ ) を不活性型に置換したノックイン型遺伝子改変マウスを遺伝子標的法で作成した。マウスの遺伝子レベルでの相同組み換え、導入した点変位の存在をPCR法とsequence法で確認した。さらに、マウス前脳において、CaMKII  $\alpha$  蛋白が発現しているにもかかわらず、CaMKIIキナーゼ活性が顕著に低下していることを確認した。今後、CaMKIIのプロテインキナーゼ活性に直接関連した脳機能の解明を進める。

### 3. 研究実施体制

#### 中核チーム

- ① 研究分担グループ長：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可塑性の解析

#### 新世代プローブ開発チーム

- ① 研究分担グループ長：宮脇 敦史  
(理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム、チームリーダー)
- ② 研究項目：神経細胞-グリア細胞間の相互作用の可視化、免疫組織学的解析ならびに培養技術の開発

#### 分子解析チーム

- ① 研究分担グループ長：高橋 正身（北里大学医学部 代謝・蛋白学、教授）
- ② 研究項目：PKCによる神経伝達物質放出制御機構  
神経伝達物質放出におけるホスファチジルイノシトールの役割  
シナプス前部への選択的タンパク質輸送機構

#### 機能解析チーム

- ① 研究分担グループ長：山口 和彦  
(理化学研究所 脳科学総合研究センター 記憶学習機構研究チーム、副チームリーダー)

② 研究項目：Exo/endocytosisの制御によるシナプス機能の可塑的調節機構の解明

遺伝子改変動物チーム

① 研究分担グループ長：柳川 右千夫

(岡崎国立研究機構 生理学研究所 神経化学部門、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) 論文発表

- Hideki Nishimura, Hiroyuki Sakagami, Akiyoshi Uezu, Kohji Fukunaga, Makoto Watanabe and Hisatake Kondo  
Cloning, characterization and expression of two alternatively splicing isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I $\gamma$  in the rat brain  
Journal of Neurochemistry 85, 1216-1227 (2003)
- Hiroyuki Sakagami, Shigetsune Matsuya, Hideki Nishimura, Ryoji Suzuki and Hisatake Kondo  
Somatodendritic localization of the mRNA for EFA6A, a guanine nucleotide exchange protein for ARF6, in rat hippocampus and its involvement in dendritic formation  
European Journal of Neuroscience 19, 863-870 (2004)
- Hiroshi Hama, Chikako Hara, Kazuhiko Yamaguchi, and Atsushi Miyawaki  
PKC Signaling Mediates Global Enhancement of Excitatory Synaptogenesis in Neurons Triggered by Local Contact with Astrocytes  
Neuron 41, 405-415 (2004)
- Hideaki Mizuno, Tapas Kumar Mal, Kit I. Tong, Ryoko Ando, Toshiaki Furuta, Mitsuhiko Ikura, and Atsushi Miyawaki  
Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein.  
Molecular Cell. 12, 1051-1058 (2003)
- Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai, and Hideaki Mizuno  
Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering  
Current Opinion in Chemical Biology 7, 557-562 (2003)
- Atsushi Miyawaki  
Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes  
Current Opinion in Neurobiology 13, 591-596 (2003)
- Toshiaki Endo, Yuchio Yanagawa, Kunihiro Obata, Tadashi Isa

Characteristics of GABAergic neurons in the superficial superior colliculus  
in mice

Neuroscience Letters 346:81-84 (2003)

- Takashi Kobayashi, Satoe Ebihara, Kenji Ishii, Takayasu Kobayashi,  
Michiharu

Nishijima, Shunro Endo, Akira Takaku, Hiroyuki Sakagami, Hisatake Kondo,  
Fumi

Tashiro, Jun-ichi Miyazaki, Kunihiro Obata, Shinri Tamura, Yuchio Yanagawa  
Structural and functional characterization of mouse glutamate decarboxylase  
67 gene

promoter

Biochimica et Biophysica Acta 1628:156-168 (2003)

- Nobuaki Tamamaki, Yuchio Yanagawa, Ryohei Tomioka, Jun-ichi Miyazaki,  
Kunihiro Obata and Takeshi Kaneko

Green Fluorescent Protein Expression and Colocalization with Calretinin,  
Parvalbumin, and Somatostatin in the GAD67-GFP Knock-In Mouse

The Journal of Comparative Neurology 467:60-79 (2003)

- Tsuyoshi Shimura, Uno Watanabe, Yuchio Yanagawa, Takashi Yamamoto

Altered taste function in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamate  
decarboxylase.

Neuroscience Letters, 356, 171-174 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件 (CREST研究期間累積件数：3件)