

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名「細胞膜上機能分子の動態と神経伝達調節メカニズム」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名

研究代表者 重本 隆一（自然科学研究機構・生理学研究所 教授）

主たる研究代表者

久保 義弘（自然科学研究機構・生理学研究所 教授）

岡部 繁男（東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科 教授）

3. 研究内容及び成果：

3 - 1. 中枢シナプスにおける AMPA 受容体の分布

細胞膜上の分子の機能を可視下に解析する手法として、この研究グループはこれまで定量的凍結切断レプリカ免疫標識法 (SDS-freeze fracture replica labeling; SDS-FRL) を用いてきた。これは、1995 年に共同研究者、故藤本教授が開発した手法で、切断後のレプリカを SDS によって軽く処理して残存している膜タンパクに免疫染色を適用する方法である。研究代表者のグループは抗体による検出感度を改良し、膜分子の 2 次元分布を観察することを可能とした。また、本グループが改良した、定量的 SDS-FRL 法により、単一シナプスにおける、グルタミン酸レセプター密度を測定することが可能となった。レプリカ標識により、成熟ラットの小脳 AMPA 型受容体の局在を検討した結果、climbing fiber と Purkinje cell 間のシナプスにおける受容体の密度は高く、比較的、均一で、平均、 $1,500 \sim 2,000 / \mu\text{m}^2$ であった。これに対し、平行線維と Purkinje cell 間のシナプスでは受容体密度は平均 $400 / \mu\text{m}^2$ と低く、シナプスにより密度の偏差が大きかった ($0 \sim 900 / \mu\text{m}^2$)。同一のシナプス後細胞においても、グルタミン酸受容体密度はシナプス前線維のタイプにより異なり、また、同一シナプス前線維由来の線維によって形成されるシナプスでも、シナプス後ニューロンのタイプ (例えば、Purkinje cell と interneuron) により受容体密度は異なっていた。

海馬 CA1 ニューロンには NMDA レセプターは存在するが、AMPA レセプターを欠如する、いわゆる、非機能的な silent synapses が見られるといわれている。Silent synapses の存在を系統的に検討したが、AMPA にラベルされない、いわゆる silent synapses を検出することはできなかった。ただし、シナプスの AMPA レセプターの密度変動が大きく、シナプスあたり、100 個以上の AMPA レセプターが見いだされる場合、あるいは、10 個以下しか存在しないシナプスは見られた。この観察において、AMPA と NMDA レセプターの分布の相違も検討したが、その結果、CA1 領域では、NMDA レセプターは主としてシナプスに存在し、AMPA レセプターはシナプス領域にも、シナプス外領域にも広く分布していた。

3 - 2. CAZ proteins (Cast & Bassoon)

Cytomatrix at presynaptic active zone (CAZ) proteins はシナプス前ニューロンの active zones に伝達物質の放出に必要な分子を集合させる蛋白で、active zones の marker となる。したがって、たとえば、CAST と種々の Ca^{2+} チャネル蛋白を double label すれば、active zones に分布する Ca^{2+} チャネルのタイプを同定することが可能となる。これまでの、予備実験では、P/Q タイプ Ca^{2+} チャネルは active zones に分布し、N タイプチャネルは active zones 以外の部位に分布する結果が得られている。しかし、CAZ proteins の研究を今後、どのように進めるのかは必ずしも明確ではない。

3 - 3. 小脳運動学習における AMPA 受容体の動態

用いた小脳運動学習は水平性機性眼球運動 (Horizontal optokinetic response: HOKR) の適応学習で、これには short-term (1 日) と long-term (5 日間) の記憶に依存する学習がある。この両者は異なった機構に依存するが、いずれにも LTD (long-term depression) が関与することが明らかになった。LTD はシナプス後機構に基づき、AMPA 受容体の感受性の変化によると考えられている。これが、シナプスの数の減少によるのか、シナプスの大きさの変化によるか、AMPA 受

容体の密度の減少によるかを検討した結果、1 時間の学習による、short-term の記憶は AMPA 受容体の密度の減少によることが明らかになった。これに対して、5 日間の long-term の学習ではシナプスの数が有意に減少していた。Long-term 記憶に依存する学習は training を 5 日間以上延長しても、学習効果にそれ以上の変化は見られなかった。また、長期記憶は約 2 週間の学習停止によって減弱した。

3 - 4 . 海馬 NMDA 受容体局在の左右差

この研究は九州大学の伊藤功助教授のグループと共同で実施したものである。海馬の CA3 錐体細胞は Schaffer collateral を形成して同側の CA1 に投射し、反対側からの入力 commissural fiber を形成して CA1 に投射する。反対側からの入力線維は海馬の交連線維を介するから、交連を慢性的に切断して変性させれば、海馬の回路網は単純になる。そのような標本を用いて、伊藤功助教授のグループはその回路網に左右差が存在することを発見した。その後、伊藤・重本グループの共同研究によりこの左右差が NMDA2B サブユニットの非対称なシナプス分布に起因していることが明らかになった。錐体細胞のシナプスにおける左右差は見られたが、介在ニューロンにおいて検討すると、シナプスの左右差は認められなかった。したがって、シナプスの左右差の特徴は錐体細胞に特異的であると結論される。

ニューロン回路網の左右差がどのような機構によって形成されるのかは明らかでない。この問題に関して、生体形成において左右差を示す mutant mouse では神経回路網においても左右差が見られるかを検討するために、内臓逆位 mutant mouse を実験に用いた。しかし、この mutant では、海馬における神経回路網の左右差は見られなかった。その神経回路網は正常動物とは異なっていたが、左右差現象との関連において、その回路網の変化を解釈するのは容易でなかった。

4 . 事後評価結果

研究代表者は細胞の機能分子の動態を多岐にわたって解析し、生体における意義を巧みに見だしてきている。基本的なアプローチは分子レベルにおける形態観察であるが、いずれの研究においても、解析がきわめて定量的で、定量的比較によって新たな概念を引き出すことに成功しているといえる。典型的な例は小脳と海馬のシナプスにおける AMPA レセプター密度の解析で、異なったシナプスのタイプを AMPA レセプターの密度によって特徴付ける試みはこれまでに見られなかった解析法であろう。これらの解析の成功は、機能分子の動態を信頼度の高い高解像度手法によって観察する strategy を樹立していることに基づいている。

研究代表者は定量的形態観察の手法の開発において優れた成果を挙げているだけでなく、研究の story 発展においても多才な展開を示している。九州大学の伊藤功助教授との海馬の神経回路網の左右差に関する共同研究における興味ある進展は、この両グループに特徴的な研究能力を巧みに組み合わせた結果といえる。研究代表者らは、この海馬における神経回路網の左右差の解析に基づいて、内臓逆位の mutant mouse の神経系の左右差の特徴の検討も実施した。この結果では、神経系の左右差に寄与する特徴は見られなかった。

したがって、内臓の左右差と中枢神経系の左右差を決定する因子は異なっている可能性が考えられるが、いずれにしても、研究目標に関連する問題をできる限り多角的に検討する態度は高く評価される。

4 - 1 . 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

研究代表者は細胞の機能分子の動態を多岐にわたって解析し、生体における意義を巧みに見だしてきている。基本的なアプローチは分子レベルにおける形態観察であるが、いずれの研究においても、解析がきわめて定量的で、定量的比較によって新たな概念を引き出すことに成功しているといえる。典型的な例は小脳と海馬のシナプスにおける AMPA レセプター密度の解析で、異なったシナプスのタイプを AMPA レセプターの密度によって特徴付ける試みはこれまでに見られなかった解析法であろう。これらの解析の成功は、機能分子の動態を信頼度の高い高解像度手法に

よって観察する strategy を樹立していることに基づいている。

研究代表者は定量的形態観察の手法の開発において優れた成果を挙げているだけでなく、研究の story 発展においても多才な展開を示している。九州大学の伊藤助教授との海馬の神経回路網の左右差に関する共同研究における興味ある進展は、この両グループに特徴的な研究能力を巧みに組み合わせた結果といえる。研究代表者らは、この海馬における神経回路網の左右差の解析に基づいて、内臓逆位の mutant mouse の神経系の左右差の特徴の検討も実施した。この結果では、神経系の左右差に寄与する特徴は見られなかった。

したがって、内臓の左右差と中枢神経系の左右差を決定する因子は異なっている可能性が考えられるが、いずれにしても、研究目標に関連する問題をできる限り多角的に検討する態度は高く評価される。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究グループは神経細胞膜上の機能分子の動態の定量的解析に基づいて新規の生体機能の探索を目標としてきた。その目的のために、分子レベルでの形態、機能の相関性を追及する手法を開発し、多くの originality の高い成果を挙げてきた。さらに、シナプス機構の解析においては、AMPA 受容体密度を測定し、その機能を電気生理学的に定量した。また、海馬神経回路における左右差の問題を取り上げ、九州大学のグループとの共同研究において、この左右差がグルタミン酸受容体の NMDA ϵ 2 サブユニットの分布における左右差に起因していることを明らかにした。これらの研究成果はこの分野における重要な情報を提供しただけでなく、神経科学の分野に新たな概念を導入したと言える。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

なし