

「脳を知る」

平成11年度採択研究代表者

## 八尾 寛

(東北大学大学院医学系研究科 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

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だが、その誘導・発現・維持のメカニズムの詳細は不明である。シナプス前終末の構造的な変化を伴わない機能的可塑性と構造的可塑性の2つの要素から成り立つのか？各々のシナプスの伝達効率が亢進するのか、それとも伝達物質放出能を持たないシナプス(muteシナプス)が新たに賦活化されるのだろうか？機能的可塑性がどの開口放出素過程の修飾により引き起こされるのか、そのとき、シナプス前終末においてどのような生化学反応が引き起こされているのか？タンパク質リン酸化が関与しているならば、それが可塑性を説明するのか？数多くの未解決の問題がある。本研究においては、海馬苔状線維シナプス前終末、培養海馬ニューロンシナプス、PC12細胞などをモデルシステムとして、シナプス前終末可塑性の誘導・発現・維持のメカニズムを素過程・分子レベルで解明することを目的とする。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。

平成11年度の研究で、細胞内Ca<sup>2+</sup>をレポートするGFP誘導リコンビナントプローブを改良した。また、ウィルスを用いたトランスフェクション法によりGFP誘導リコンビナントプローブをシナプス前終末に導入する目的で、マウス海馬スライス培養系と海馬歯状回顆粒細胞培養系を立ち上げた。現在、GAD67遺伝子にGFPをノックインしたマウスの作製に取りかかっている。これにより、GABAニューロンを特異的にラベルすることを試みる。海馬歯状回ニューロンオートプスを用いて、cAMP-PKA系活性化により促進される開口放出素過程を同定した。発達期ラット小脳においてシナプス前性ニューロンからの伝達がニコチン性アセチルコリン受容体依存的に促進されるメカニズムを解析した。PC12細胞においては、PKA依存的に伝達物質放出が促進される。PKAがrabphilin-3AのSer234をリン酸化することを明らかにしたが、rabphilin-3Aを発現しないサブクローン細胞においてもPKA依存的に伝達物質放出の促進が認められた。

ウィルスを用いたトランスフェクションシステムのセットアップは平成11年度に終了した。細胞内Ca<sup>2+</sup>をレポートするGFP誘導リコンビナントプローブを組み込んだウィルスを歯状回顆粒細胞にトランスフェクションし、シナプス前終末に発現させる計画にとりかかっている。この経験をふまえて、微小環境pHの5から7.4の変化にダイナミックに応答する改変GFPを開発し、これをシナプトタグミンのN-末にリンクさせたプローブを作製し、トランスフェクション法により苔状線維シナプス前終末シナプス小胞に発現させる計画にとりかかる。シナプス小胞内pHを蛍光測定することにより、開口放出を定量化するのだが、これに必要なマルチフォトン顕微鏡システムの立ち上げは、平成11年度に終了した。さらに機能プローブを組み込んだトランスジェニック動物やノックイン動物の作製を試みる。シナプス前終末内Ca<sup>2+</sup>と開口放出を単一シナプスレベルで測定することにより、cAMP-PKA系活性化に対する応答のヘテロ性を解析するとともに、muteシナプス仮説を検証する。muteシナプスの賦活化が認められたならば、これを顕微鏡下に固定し、rabphilin-3Aの抗リン酸化部位抗体と反応させる。muteシナプスの賦活化に並行して、rabphilin-3Aのリン酸化が認められるかを検討する。

## 2. 研究実施内容

### 新世代機能プローブおよびその導入法の開発

Ca<sup>2+</sup>指示薬yellow cameleonを更に改善するとともに、一波長励起一波長測光型のCa<sup>2+</sup>指示薬yellow pericamを新たに開発した。これを用いて、HeLa細胞に於けるCa<sup>2+</sup>振動を長時間測定できるようになった。より長波長の光を使って観察できるCa<sup>2+</sup>指示薬を開発する目的で、Red Fluorescent Protein (RFP)の蛍光特性の解析、および改変RFPの作製に着手している。改変RFPをプレート上のコロニー毎に調べるプレートイメージアナライザーを、Sencys CCDカメラを使って構築した。機能プローブをウィルス-トランスフェクション法により海馬苔状線維シナプス前終末に発現させる目的で、マウス海馬のスライス培養系と海馬歯状回顆粒細胞の培養系を立ち上げた。生後2～4日目の新生ラットから海馬歯状回を分離し、分散培養した。培養作成1週間後にCalbindin-28Kに対する抗体を用いて培養細胞を免疫染色したところ、約半数の神経細胞はCalbindin陽性であることが確認でき、歯状回由来の顆粒細胞と考えられた。

### 機能プローブを組み込んだ遺伝子改変動物の作製

抑制性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、グルタミン酸脱炭酸酵素遺伝子(GAD67)遺伝子とGreen fluorescent protein (GFP)を利用してGABAニューロンを可視化できる遺伝子改変マウスを作成する。GAD67遺伝子にGFP遺伝子をノックインしたコンストラクトを作成し、ES細胞に導入した後、G418を加えた培地で86個のESクローンを選択した。相同組み

換えによるGAD67遺伝子にGFPノックインしたESクローンを得るためにPCR法とSouthern法によりスクリーニングした結果、86個の中から2個のESクローンを同定した。これらのクローンをマウス8細胞期胚に注入することにより、キメラマウスを1匹得た。今後は、交配することによりGAD67遺伝子GFPノックインマウスを作成し、in vivoでGABAニューロンの可視化を可能にする。

#### 海馬苔状線維シナプス前終末可塑性の分子メカニズムの解析

中枢シナプス可塑性の分子基盤を明らかにする目的で、海馬苔状線維シナプスからの伝達物質放出がC-キナーゼ(PKC)により増強されるメカニズムを素過程レベルで解析した。マウス海馬をスライスし、歯状回顆粒細胞層で電気刺激を行い、シナプス応答をCA3透明層からフィールド記録した。歯状回顆粒細胞層にCa<sup>2+</sup>感受性色素fura dextranを注入し、苔状線維終末内Ca<sup>2+</sup>をCA3透明層において記録した。フォルボルエステルはPKC依存的にフィールドEPSPを増強したが、終末内Ca<sup>2+</sup>濃度の活動電位依存性上昇を同時に促進した。しかし、フィールドEPSPの増強の大きさは、Ca<sup>2+</sup>流入の促進だけでは説明できなかった。Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプとE-Sカップリングの強さに多様性がある可能性を検討したが、Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプに対するPKCの作用に差異が認められなかった。ゆえに、PKCがCa<sup>2+</sup>流入以外の開口放出機序を促進していることが示唆された。今後の研究展開の基盤として、Ca<sup>2+</sup>チャネルサブタイプそれぞれのE-Sカップリングの大きさを定量化する。

#### muteシナプス仮説の検証

中枢シナプスにおいて、神経伝達物質放出の増強の見られるタイプのシナプス可塑性に関して、各放出サイトにおける放出確率が増加したのか、あるいは即時放出可能な小胞数が増加したのか、または放出サイト数が増加したのかを明らかにすることを目的とした。ラット歯状回ニューロンのオ-タプスを作製し、ホールセルパッチクランプ法によりEPSCを測定し、cAMP-PKAの賦活化がCa感受性やペアパルス修飾に及ぼす効果を定量的に解析した。また、FM1-43, FM4-64を用いて、アクティブな放出サイトを可視化し、放出サイトに対するcAMP-PKA賦活化の効果を解析した。さらに固定後、シナプトファイシンを免疫細胞化学的に可視化し、活性放出サイトと比較解析した。歯状回神経細胞オ-タプスにおけるcAMP-PKA賦活化によるシナプス開口放出の増強は、放出確率の増強ではなく、易放出性小胞プ-ルの増加、あるいは放出サイト数の増加によっていると、モデルを用いた解析から推論された。放出サイト数の増加はFM蛍光色素を用いた実験から証明された。シナプス小胞は存在していても不活性なmuteプレシナプスが多く見られたが、cAMP-PKA系活性化による放出サイト数の増加は、これらのmuteシナプスの賦活化によっている可能性が高いと推論された。

### シナプス前終末機能のタンパク質リン酸化による制御

シナプス前部からの神経伝達物質の放出は、様々なキナーゼを介したタンパク質リン酸化によって制御されている。この制御機構を明らかにすることは、シナプス可塑性、ひいては記憶の基礎過程を分子レベルで明らかにしていく上で極めて重要であると考えられるが、その詳細は未だに明らかにはされていない。我々はこの問題を明らかにするため、神経伝達物質放出制御に直接関わるリン酸化基質を同定し、リン酸化部位を特定することを試みた。平成11年度は、ラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞を用いてcAMPによる神経伝達物質の放出制御機構の解析を行った。PC12細胞におけるcAMP-PKA賦活化は、Ca<sup>2+</sup>誘発性ドーパミンおよびアセチルコリン放出を促進した。33Piによるメタボリックラベルと、抗シナプスタンパク質抗体を用いた免疫沈降法によってリン酸化基質を検索したところ、シナプトタグミン、DOC2、SNARE、SNAP、cspなどにはcAMPによる有意なリン酸化の亢進は見られなかったが、rabphilin-3Aが顕著にリン酸化されることが明らかとなった。PKAによるリン酸化のコンセンサス配列に合致したSer234を含むリン酸化ペプチドを抗原として抗リン酸化抗体を作成し、イムノプロット解析、蛍光抗体染色を行った結果、PKA賦活化によって細胞内でrabphilin-3AのSer234がリン酸化されることが確認された。しかしながらcAMP依存的な神経伝達物質放出の促進は、rabphilin-3Aを発現していないPC12細胞のサブクローンでも見られ、PKAによる制御にはrabphilin-3Aは必須ではないことが明らかとなった。

### ニコチン性受容体による中枢神経シナプス前性制御機構の解析

小脳内ニコチン性受容体をモデルに、チャンネル直結型受容体がシナプス前性の神経伝達の修飾や成熟の制御を行っている可能性を検証することを目的とする。新生ラット小脳スライスを作製し、皮質層内のブルキンエ細胞よりwhole-cell電位固定化に自発性シナプス電流を測定した。Lucifer-yellowを電極内液に添加し記録細胞の形態を解析した。低濃度のAChまたはニコチン性アゴニストを急速灌流投与すると、生後5日-10日の小脳切片ではmEPSC, mIPSCともに出現頻度が顕著に促進された。この促進作用は、ニコチン性受容体の発現によるもので、脳の成熟とともに促進作用は弱くなり16日令以降ではほぼ消失した。シナプス前性ニューロンにシナプス形成期に機能するニコチン性受容体を介した伝達の促進が示唆された。

### 3. 主な研究成果の発表（論文発表）

Endo, K., Yawo, H.  $\mu$ -Opioid receptor inhibits N-type Ca<sup>2+</sup> channels in the calyx presynaptic terminal of the embryonic chick ciliary ganglion. *J Physiol (Lond)* 524:769-781, 2000.