

「脳を知る」
平成9年度採択研究代表者

小澤 滯司

(群馬大学医学部 教授)

「シナプス可塑性の分子機構と脳の制御機能」

1. 研究実施の概要

本研究の目的は、中枢神経系のニューロン、グリアに広範に存在する多種類のグルタミン酸受容体が、可塑性変化を中心とする中枢シナプスの機能発現、神経回路網での情報処理、個体レベルでの行動制御など脳機能全般に果たす役割を明らかにすることである。実験では、脳の各部位のニューロン、グリアを対象として、ウイルスベクターによるグルタミン酸受容体遺伝子の導入、標的遺伝子破壊法などの遺伝子工学技術を用いて、グルタミン酸受容体を人工的に操作することにより、ニューロンとグリアの機能に変動を加え、それらが中枢神経回路網での情報伝達、シナプス可塑性、個体レベルでの脳の制御機能、脳の病態に与える影響を解析する。平成12年度の研究成果の概要は以下の通りである。1)ウイルスベクターを用いて、種々のグルタミン酸受容体サブユニットを新規に効率よくニューロン、グリアに発現させ、細胞機能、シナプス伝達特性を変換し得ることを示した。また、シナプス伝達特性の変換が個体レベルでの学習行動に与える影響を解析した。2)グルタミン酸受容体およびGABA受容体が関与する小脳の種々のシナプスの可塑性変化の発現機構をさらに詳細に解明した。また、最も顕著な可塑性変化である小脳長期抑圧の個体レベルでの役割を解析するために、前年度までに確立したマウス眼球運動計測システムを用いて、長期抑圧を起こせない $\delta 2$ サブユニット欠損ミュータントマウスで、眼球運動、適応制御能力について解析し、異常を検出した。3)イオンチャネル型および代謝調節型グルタミン酸受容体の基礎的特性に関する知見を加えた。

2. 研究実施内容

1) ウイルスベクターによる外来遺伝子のニューロン、グリアへの導入

a. シンドビスウイルスベクターを用いたグルタミン酸受容体遺伝子の導入によるニューロン、シナプス機能の変換とそれによる学習行動の変化の解析

AMPA受容体を Ca^{2+} 非透過型から Ca^{2+} 透過型に変換するために、 Ca^{2+} 透過性を決定するサブユニットであるGluR2のQ(グルタミン)/R(アルギニン)部位をRからQに置換した点変異体(GluR2Q)を作製し、シンドビスウイルスベクターを用いて、ラット海馬切片培養標本のCA1ニューロンに強制発現さ

せた。ウイルス感染ニューロンの興奮性シナプス反応は Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体応答の特徴を示し、テタヌス刺激による長期増強が、より起こしやすくなった。また、NMDA 受容体に依存せず、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を介して流入する Ca^{2+} によって長期増強を発生させることが可能になった。

また、シンドビスウイルスベクターにより、海馬切片標本だけでなく、成熟ラットの海馬ニューロンにも比較的容易に遺伝子導入を行うことが可能になったので、まず、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を、CA1 ニューロンに強制発現させて、空間学習行動への影響を解析する研究を開始した。ラット CA1 野に両側性にシンドビスウイルスベクターを用いて Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を発現させたラットでは、モリス水迷路課題成績の向上がみられた。

b. グルタミン酸受容体サブユニットタンパク質の細胞内動態の解析

タンパク発現のレポーターとなる myc tag、GFP の cDNA をグルタミン酸受容体サブユニットの N 末端の細胞外部位に挿入し、これらの融合タンパクをウイルスベクターを用いて任意のニューロンに発現させて、新規に生成されたグルタミン酸受容体サブユニットのニューロン内での動態を追跡することが可能になった。このような実験を行う目的で、AMPA 受容体サブユニット GluR1、GluR2、カイニン酸受容体サブユニット GluR6、NMDA 受容体サブユニット NR1 の融合タンパク cDNA を作製した。平成12年度は、myc-GFP-GluR2Q 融合タンパクをシンドビスウイルスベクターにより、ラット海馬切片培養標本の CA3 ニューロンに強制発現させ、この新規に合成されたサブユニットタンパクの苔状線維シナプス下膜への移行を観察した。この移行は受容体タンパクの合成後、きわめて短時間で行われることがわかった。また、融合タンパクの動態のイメージング法による形態学的解析とシナプス電流の記録による電気生理学的解析の結果はよく一致した。

c. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入によるグリアの機能の変換

アデノウイルスベクターはグリアに対して極めて強い親和性をもち、小脳皮質に注入した場合、選択的にベルクマングリアにのみ外来遺伝子の発現が可能であることが明らかになった。小脳のベルクマングリアでは、AMPA 受容体のうち、GluR1 と GluR4 のみが発現しており、GluR2 サブユニットの発現が欠落している。従って、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体のみが形成されている。グリアにおける Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体の機能的意義を明らかにするため、GluR2 cDNA を組み込んだ組換えアデノウイルスを作製して、ラット小脳皮質に注入し、GluR2 を強制発現させ、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を Ca^{2+} 非透過性 AMPA 受容体に変換した。正常状態では、平行線維、登上線維とプルキンエ細胞の樹状突起棘間で形成されるグルタミン酸性シナプスはグリアの突起により完全に

包囲されているが、この操作により、グリアの突起が退縮し、グリアのグルタミン酸トランスポーターによるシナプス間隙からのグルタミン酸の清掃が著しく遅れるとともに、一部のプルキンエ細胞が複数の登上線維の支配を受け入れるようになるという意外な事実が判明した。これらの点については、平成11年度にすでに予備的な結果を得ていたが、12年度に多数の実験を繰り返して、結果を確定し、論文にとりまとめた。この論文は Science 誌に掲載されることになった。

また、培養ベルクマングリア、種々のヒト脳腫瘍細胞を対象とした実験でも、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体を Ca^{2+} 非透過性受容体に変換すると、突起は退縮することが明らかになった。以上の研究から、グリアの Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体が、グリアの突起の形態形成に関与することが結論された。

2) 小脳シナプスの可塑性に関する分子生物学および生理学的研究

a. 長期抑圧におけるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットの役割

イオンチャンネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニットが長期抑圧に関わることは以前報告していた。 $\delta 2$ サブユニットがどのように長期抑圧にかかわるかを明かにする目的で、 $\delta 2$ サブユニット欠損ミュータントマウスのプルキンエ細胞に $\delta 2$ サブユニットまたはその変異体を発現させた上で、長期抑圧発現の有無を調べる実験を行った。 $\delta 2$ サブユニットをノックアウトマウスのプルキンエ細胞に戻すと長期抑圧が起せるようになったが、 $\delta 2$ サブユニットの細胞内 C 末端を他のイオンチャンネル型受容体サブユニット GluR1 の C 末端に置き換えた分子を発現させても長期抑圧は起らなかった。したがって、 $\delta 2$ サブユニットの細胞内 C 末端領域が長期抑圧発現に重要と考えた。そこで、 $\delta 2$ サブユニット C 末端の各領域を欠失させた変異体分子を作り、それらを $\delta 2$ サブユニット欠損培養プルキンエ細胞に発現させて長期抑圧が起るか否かを調べる実験を行っている。その過程でこれまで受容体分子のシナプス部位への局在に重要と考えられていた $\delta 2$ の細胞内 C 末端を欠失させても、 $\delta 2$ サブユニットはシナプスが形成されるスパインへ輸送されるという意外な知見を得た。

b. 長期抑圧後期相へのカルシニューリンの関与

これまでに長期抑圧を数日間計測する方法を確立し、長期抑圧には1日以上持続し、新たな mRNA・タンパク質合成に依存する後期相（長長期抑圧）が存在することを示した。平成12年度の研究で、カルシウム・カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害により、長長期抑圧様の現象が起ることが明らかになった。このカルシニューリン阻害による長長期抑圧様現象を起こした後では、長長期抑圧の発現が抑えられた。またカルシニューリ

ン阻害による長長期抑圧様現象も mRNA 合成に依存していた。

c . プルキンエ細胞における抑制性シナプス伝達増強の制御機構

小脳皮質のシナプス可塑性として長期抑圧の他に、抑制性介在ニューロン・プルキンエ細胞間のシナプスでみられる GABA 性シナプス伝達の脱分極による増強現象が知られている。この増強はプルキンエ細胞の GABA に対する感受性の増加によって起り、30分間以上持続する。脱分極時に GABA を投与すると、シナプス伝達および GABA 応答の増強が抑えられること、この可塑性の調節が GABA_B 受容体を介することをつきとめ、さらにこの可塑性抑制機構により GABA 応答増強が細胞部位特異的に制御されることを示していた。平成12年度の研究ではこの可塑性制御の分子機構を解析して、GABA_B 受容体活性化が Gi/o タンパクを介し細胞内 cAMP 濃度を低下させることにより A キナーゼの活性を抑えて、GABA 応答増強を抑制することを示した。さらに A キナーゼの活性低下は、カルシニューリンによる DARPP32 分子の脱リン酸化を促すことによりプロテインフォスファターゼ 1 (PP1) の DARPP32 による抑制を解きはなち、PP1 はカルモジュリン依存性キナーゼ 2 を抑制することにより GABA_A 応答の脱分極依存性増強を抑える、という細胞内情報伝達経路がはたらいっていることを示すデータを得た。

d . マウスの眼球運動解析

頭部回転時の視野のブレを補正する反射として二つの眼球運動、すなわち前庭動眼反射 (VOR) と視運動性眼球運動 (OKR) がある。これらの運動は、入出力を定量的に評価できる単純な反射運動である。動物の頭部回転と同時に周囲の模様も回転すると、それに応じて VOR の大きさが適応的に変化する現象が知られている。また OKR についても、持続的な周囲の回転によりそのゲインが増加するという適応現象が知られていて、これらの適応的变化には小脳の長期抑圧が関与すると考えられている。これまでマウスの眼球運動計測システムを作製し、野性型マウスについてはさまざまな条件下で VOR と OKR の動特性を系統的に計測し、VOR および OKR の適応的变化の解析も行ってきていた。平成12年度は、長期抑圧を起こせないイオンチャネル型グルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット欠損ミュータントマウスで、VOR と OKR を計測するとともに、それらの適応的变化を調べた。このミュータントマウスは適応的变化を示さなかったが、そのほかに VOR と OKR の協調がうまくできないことも明らかになった。野生型マウスでは、VOR と OKR の協調により明所の方が暗所より視野のブレがよりよく補正されたが、 $\delta 2$ サブユニット欠損ミュータントマウスでは暗所の方が明所より視野のブレがよりよく補正されるという奇妙な現象が認められた。

3) イオンチャネル型および代謝調節型グルタミン酸受容体の性質に関する研究

a. NMDA 受容体の機能発現の制御機構について、本来この受容体を発現していない PC12 細胞に、ウイルスベクターを用いて種々のサブユニットを強制発現させることにより調べた。意外にも、NR1 を強制発現させなくても、NR2A または NR2B を単独に強制発現させるだけで、機能的 NMDA 受容体を発現させることができた。また、NR2A または NR2B の強制発現は、NR1 mRNA の発現には影響せず、NR1 タンパク質の量を顕著に増大させることがわかった。このことは、NR2A または NR2B は、転写後メカニズムによって、NR1 タンパク質の産生または維持に促進的に作用することを示唆する。

b. 型代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR7a) の分布と機能について、次の研究を行った。大脳基底核の出力細胞である淡蒼球の GABA 作動性細胞は通常視床細胞を抑制しているが、淡蒼球の GABA 細胞自体が線状体の GABA 作動性細胞からの抑制を受け、視床細胞に脱抑制を行い、運動のプログラミング等に関与した働きをする。これまでの研究により、ラットの淡蒼球細胞は主に、不活性化が急峻な A 電流を示すものと、不活性化が緩徐な A 電流を示し且つ低閾値型のカルシウム電流を示す二つのサブタイプに分類されることを明らかにした。また、mGluR7a の抗体を用いた免疫組織化学的手法により、線状体由来の GABA 作動性細胞の軸索終末は、後者の淡蒼球細胞に対してシナプス結合する場合のみ、豊富な 型代謝調節型グルタミン酸受容体 (mGluR7a) を持つことを明らかにし、標的細胞特異的な mGluR7a 受容体によるシナプス前抑制機構の存在を示唆した。

3. 研究成果の発表 (論文発表)

Ishizaki, H., Miyoshi, J., Kamiya, H., Togawa, A., Tanaka, M., Sasaki, T., Endo, K., Mizoguchi, A., Ozawa, S. and Takai, Y.: Role of Rab GDP dissociation inhibitor a in regulating plasticity of hippocampal neurotransmission. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 11587-11592 (2000)

Tsuzuki, K., Isa, T. and Ozawa, S.: Subunit composition of AMPA receptors expressed by single hippocampal neurons. NeuroReport, 11, 3583-3587 (2000)

Ishiuchi, S., Tsuzuki, K., Yamada, N., Okado, H., Miwa, A., Kuromi, H., Yokoo, H., Nakazato, Y., Sasaki, T. and Ozawa, S.: Extension of glial processes by activation of Ca²⁺-permeable AMPA receptor channels. NeuroReport, 12, 745-748 (2001)

Okada, T., Yamada, N., Kakegawa, W., Tsuzuki, K., Kawamura, M., Nawa, H., Iino, M. and Ozawa, S.: Sindbis viral-mediated expression of Ca²⁺-permeable AMPA receptors at hippocampal CA1 synapses and induction of NMDA receptor-independent long-term potentiation. Eur. J. Neurosci., 13, 1635-1643 (2001)

Kondo, M., Okabe, S., Sumino, R. and Okado, H.: A high GluR1: GluR2 expression ratio is correlated with expression of Ca²⁺-binding proteins in rat forebrain neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 12, 2812-2822(2000)

Kondo, M., Sumino, R. and Okado, H.: Expression of AMPA receptors in rat superior colliculus and effect of orbital enucleation. *Brain Res.*, 883, 238-242 (2000)

Namikawa, K., Honma, M., Abe, K., Takeda, M., Mansur, K., Obata, T., Miwa, A., Okado, H. and Kiyama, H.: Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *J. Neurosci.*, 20, 2875-2886(2000)

Tamatani, M., Mitsuda, N., Matsuzaki, H., Okado, H., Miyake, S., Vitek, M. P., Yamaguchi, A. and Tohyama, M.: A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation : Roles of nuclear factor-kB and Bcl-2. *J. Neurochem.*, 75, 683-693(2000)

Kawaguchi, S. and Hirano, T. Suppression of inhibitory synaptic potentiation by presynaptic activity through postsynaptic GABAB receptors in a Purkinje neuron. *Neuron*, 27, 339-347(2000)

Imamura, Y., Inokawa, H., Ito, A., Kadotani, H., Toyama, K., Noda, S., Nakanishi, S. and Hirano, T.: Roles of GABAergic inhibition and NMDA receptor subunits in the spatio-temporal integration in the cerebellar cortex of mice. *Neurosci. Res.*, 38, 289-301(2000)

Iwashita, M., Kanai, R., Funabiki, K., Matsuda, K. and Hirano, T.: Dynamic properties, interactions and adaptive modifications of vestibulo-ocular reflex and optokinetic response in mice. *Neurosci. Res.*, 39, 299-311(2001)

Okano, H., Hirano, T. and Balaban, E.: Learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 12403-12404(2000)

Takada, M., Kang, Y. and Imanishi, M. : Immunohistochemical localization of voltage-gated calcium channels in substantia nigra dopamine neurons. *Eur. J. Neurosci.*, 13, 757-762(2001)