

「脳を知る」
平成10年度採択研究代表者

津本 忠治

(大阪大学大学院医学系研究科、教授)

「回路網形成における神経活動の関与メカニズム」

1. 研究実施の概要

複雑な脳内神経回路網が一個の受精卵からできあがるプロセスは、1) 発生初期から中期にかけて遺伝情報によって発現する分子に基づいて形成されるプロセスと、2) 中期から後期の外部からの入力や神経細胞自身の活動によって修正あるいは精緻化されるプロセスに分けられる。本研究は、後者のプロセス、つまり神経活動依存性プロセスに焦点を当てそのメカニズム解明を目指している。

この後者のプロセスは入力操作が比較的容易なことから視覚系で多くの研究がなされてきた。例えば、仔ネコの片眼を一時的に遮蔽すると大脳皮質視覚野ニューロンがその眼に対する反応性を消失することや視覚野のコラム構造も変化することが報告された。また、このような変化には、入力によって伝達効率が良くなったり悪くなったりするシナプス長期増強や長期抑圧が関与しているという仮説が提唱され、さらに、そのような変化の物質メカニズムとして神経栄養因子の関与が示唆された。本研究はこのような視覚野の可塑性に関する仮説や示唆を検証し、ひいては発達脳神経回路の神経活動依存的変化のメカニズムを解明しようとするものである。

これまでの研究成果として1) 仔ネコの視覚野において、脳由来神経栄養因子(BDNF)は眼優位コラムを拡大する作用があること、及びその作用は発達期にみられるが、成熟ネコ視覚野では見られないことを発見した。また、2) BDNFはシナプス伝達を急速に増強すること、この作用はシナプス前からの伝達物質放出増加作用によること、及び神経細胞の成熟につれてそのような作用は消失すること、を見出した。さらに、3) BDNFは発達脳において未熟なシナプス前部に働き、連続入力によって伝達物質の放出が減ることを防ぐ作用を示すことも発見した。

平成12年度はこれらの知見に加えて、以下の成果を得た。1) BDNF 遺伝子と蛍光蛋白質遺伝子の連結遺伝子を神経細胞の核内に直接注入する方法によってBDNFの動態を顕微鏡下で観察した、その結果、BDNFは神経活動に応じてシナプス前から後細胞へ移動することを発見した。また、2) BDNFのシナプス伝達増強作用の持続時間を明らかにするため、in vivo ラット標本において外側膝状体刺激に

対する視覚野の誘発反応を24時間にわたって記録し、BDNF の作用を調べた。その結果、その作用は投与直後から約 8 時間ほど持続するが約16時間で元にもどることを見出した。3) シナプス伝達増強という急性作用と視覚野眼優位コラム拡大という慢性作用の関係を明らかにするために、培養神経細胞に対する BDNF の慢性投与の効果調べた。その結果、シナプス増強がシナプス前終末の拡大やシナプス数の増加といった長期的な変化に移行することを示唆する知見を得た。

今後は、BDNF ノックアウトマウスの使用に加えて、核内注入法によって蛍光蛋白質標識神経栄養因子の動態を解析する方法を確立したことから、本研究をさらに進展させ得るものと期待している。

2. 研究実施内容

- 1) BDNF の動きを目で見えるようにするため、BDNF 遺伝子に緑色蛍光蛋白質 (Green Fluorescence Protein, GFP) 遺伝子を連結させた遺伝子を挿入したプラスミッドを微小ガラス管からラット大脳皮質視覚野の培養神経細胞の核内に顕微鏡観察下に注入した。その結果、1 から 2 日で蛍光蛋白質で標識された BDNF が神経細胞内に発現し、軸索突起内を終末のシナプス前部に向かって移動することが観察された。また、この突起に接続しているシナプス後部のニューロンに移動することも見出された。さらに、この細胞間移動は神経細胞の活動を薬で抑えると無くなり、刺激すると増加することから神経細胞の電気活動に依存することも明らかとなった。また、この移動が BDNF に特有かどうかを明らかにするため赤色蛍光蛋白質を発現する遺伝子を同時に核内に注入し動きを調べたところ BDNF だけが他の神経細胞に移行することが認められた。すなわち、BDNF は神経細胞の電気活動とともにシナプス後の神経細胞に移ることが示された。
- 2) BDNF の急性シナプス伝達増強作用がどの程度持続するかを *in vivo* 標本で調べた。麻酔したラットの外側膝状体に設置した刺激電極から電気刺激を与え、各刺激に対する大脳皮質視覚野の誘発電位を24時間にわたって記録した。記録が安定になった時点で記録電極に貼り付けた微小チューブから BDNF を20分間皮質視覚野に投与しその影響を観察した。その結果、グルタミン酸受容体を介すると思われる皮質の反応は徐々に増大し約 4 時間で最大値に達した。この増大は約 8 時間持続したが、その後は徐々に減弱し約16時間で投与前の水準に復した。このような BDNF のシナプス反応増大作用は生後13 - 24日の幼若ラットで見られたが、成熟ラットでは見られなかった。次に、この幼若ラットにおける反応増大がどのような機序で起きるのかを調べるため、受容体チロシンキナーゼの阻害薬 K252a を BDNF 投与と同時に、20分後、140分後にそれぞれ投与した。その結果、同時、20分後投与の場合は BDNF の作用を阻止したが、140分後では阻止しなかった。この結果は、BDNF によるシナプス伝達増強作用は20分くらいまでは受

容体チロシンキナーゼの活性を必要とするが、それ後はチロシンキナーゼより下流のシグナル伝達機構に活性が移行していることを示すと考えられた。

3) BDNF のシナプス伝達に対する急性作用と視覚野眼優位コラムに対する慢性作用の関係を明らかにするために、無血清培養神経細胞に対する BDNF の慢性投与の効果調べた。そのため、対にした孤立培養神経細胞の一方に BDNF を 8 - 12 日間投与し、投与しないコントロールの細胞との比較を行った。その結果、BDNF 投与群では、グルタミン酸受容体を介するシナプス反応の増大が認められた。この増大は NMDA 受容体を介する反応の方が AMPA 受容体を介する反応より顕著であった。この結果は、BDNF の慢性作用の部位がシナプス後部にもあることを示すと考えられた。また、活動依存的にシナプス前部に取り込まれる蛍光色素 (FM1-43) を使う方法によって活動的なシナプスを計測したところ、BDNF の慢性投与は活動的シナプス数を増加させることを見出した。これらの結果は、シナプス抑圧の阻止やシナプス増強の誘発という BDNF の急性作用がシナプスの数の増加や拡大といった長期的な形態変化に移行することを示唆するものと考えられた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Kohara, K., Kitamura, A., Morishima, M. and Tsumoto, T. (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science*, 291, 2419-2423.

Katoh-Semba, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., Ichisaka, S., Hata, Y., Tsumoto, T., Iwai, M., Mikoshiba, K. and Kato, K. (2001) Induction of brain-derived neurotrophic factor by convulsant drugs in the rat brain: Involvement of voltage-dependent calcium channels. *J. Neurochem.*, 77, 71-83.

Kojima, M., Takei, N., Numakawa, T., Ishikawa, Y., Suzuki, S., Matsumoto, T., Katoh-Semba, R., Nawa, H. and Hatanaka, H. (2001) Biological characterization and optical imaging of brain-derived neurotrophic factor-green fluorescent protein suggest an activity-dependent local release of brain-derived neurotrophic factor in neurites of cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, 64, 1-10.