

(1) 脳を知る

遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

「長期記憶の形成・消去」および「機能的神経回路形成」の基礎である活動依存的、永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構を明らかにする。

この目的のために「成熟海馬での長期増強、抑圧現象」および「発達期小脳における登上線維シナプスの除去現象」を取り上げ、これらのシナプスの永続的变化に関与する遺伝子群を同定し、それらが、どのようなシグナル系や接着タンパク質・足場タンパク質・細胞骨格タンパク質などを介して、シナプスの構造や機能を変化させているのかをシナプスレベルで明らかにする。また遺伝子改変動物を作製し、脳スライスによる機能的解析と個体レベルでの行動解析を行なうことにより、その機能的意義を検証する。

これにより、活動依存的、永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構と意義について統合的に理解することをめざす。

2. 研究内容及び目標

1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究

(1) 海馬での後期 LTP に伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究（三菱化学生命科学研究所）

海馬の後期 LTP に伴い発現誘導される遺伝子を網羅的に探索し、それらの中の未知の遺伝子の構造を明らかにする。また、LTP 誘導後の遺伝子発現の空間的、時間的变化、および遺伝子産物の局在分布や、シナプス強化に伴う局在変化を解析するとともに、遺伝子産物の機能を明らかにする。選択的シナプス強化に関連が深い遺伝子についてノックアウトマウスを作成し、後期 LTP や記憶、学習行動への影響を調べる。

(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究（三菱化学生命科学研究所）

ラット小脳の発達に伴い発現が制御される遺伝子を網羅的に探索する。これらの遺伝子が海馬の後期 LTP に伴い発現が制御されるか否かを調べ、発達期のシナプス形成と成熟期のシナプス強化の分子機構の共通性を探る。また、小脳の P15 に特異的に発現するものは、計画 2. (1) の候補遺伝子として解析する。

(3) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究（京都大学大学院医学系研究科）

成体ラットと幼若ラットとの脊髄随節置換を行い、運動

系・知覚系伝導路の神経機能回復例、失敗例、および正常コントロールの間でディファレンシャルディスプレイやサブトラクショナルクロニングを行い、神経再生依存的に発現する遺伝子を同定する。得られた遺伝子と海馬での長期増強との関連をノザンプロット、in situ hybridization で調べる。

(4) シナプスタグの分子の実体解明に関する研究（三菱化学生命科学研究所）

海馬 LTP 系を用いて、Ves1-1S タンパク質が「synaptic tag 仮説」から予想される細胞内局在を示すかどうかを検査するとともに、synaptic tag を設定する閾値や synaptic tag の持続時間などを調べる。また、Ves1-1S のノックアウトマウスを作製し、初期 LTP および後期 LTP が変化するかどうかを検査する。これらと平行して、単一ニューロン内における Ves1-1S タンパク質のシナプス選択的な分配機構を解析する系を確立する。この系を用いて薬理学的手法により Ves1-1S タンパク質のシナプス特異的局在に関与するシグナル伝達系を解析するとともに、シナプスタグの分子実体を明らかにする。

2. シナプスの選択的除去機構に関する研究

(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関わる遺伝子に関する研究（金沢大学医学部）

登上線維シナプス除去がおこる時期（臨界期、P15-18）に選択的に発現する遺伝子を網羅的に探索する。次に選択的除去が起こらない種々のノックアウトマウスでは発現が見られないものを選び出し、候補遺伝子の絞り込みを計る。同定された候補遺伝子が、登上線維シナプス除去に関与するかを調べるため、これらのアンチセンス DNA を合成し、発達期マウス小脳に持続的に与えて分子の機能を阻害したままマウスを成長させ、登上線維シナプス機能を電気生理学的に解析する。cDNA クローニングを行い全分子構造を明らかにし、その遺伝子や遺伝子産物の発現の時間的、空間的变化を調べる。また免疫電顕組織化学法で、シナプスでの局在を明らかにする。候補遺伝子について、遺伝子操作マウスを作製し、それらの表現型を解析する。

(2) 細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究（金沢大学医学部）

登上線維シナプスにおける細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパクの局在と発現時期を調べ、登上線維シナプス除去の分子基盤を解明する。また遺伝子操作マウスが作成された分子に関して、電気生理学的解析を行い、生理機能への役割を明らかにする。

3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究

(1) CA1 LTPにおける代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究 (神戸大学医学部)

海馬におけるシナプス選択的な強化機構に代謝型グルタミン酸受容体がどのように寄与するかを主に電気生理学的手法により明らかにする。具体的には、強化されるべきシナプスがマークされる際に代謝型グルタミン酸受容体の活性化が必要かどうかを確かめるため、薬理的にNMDA受容体を遮断しておいて代謝型受容体を単独で活性化させた場合のLTP発現の選択性を検討する。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究 (研究実施機関 神戸大学医学部)

他サブグループが解析を進める機能蛋白は代謝型グルタミン酸受容体により制御される可能性が高い。これらの蛋白の機能を阻害する薬物によりシナプス強化がどのように影響されるかを検討し、それぞれの機能蛋白の役割を明らかにする。また、これらの機能分子のノックアウトマウスあるいは代謝型グルタミン酸受容体シグナル系のノックアウトマウスを用いて電気生理学的解析を行い、シナプス強化にかかわるシグナル系の全容を明らかにする。

(3) 細胞接着分子のCA1 LTPにおける役割に関する研究 (神戸大学医学部)

これまでの研究から、細胞接着分子が海馬でのシナプス伝達の可塑性に関与することが明らかとなっているが、これをさらに発展させシナプス強化がどのような分子機構で発現し安定するかを単一シナプスレベルで明らかにする。

4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去の分子機構に関する研究

(1) シナプスの強化、除去における細胞接着因子と足場蛋白質に関する研究 (東京医科歯科大学)

各発達段階の小脳や海馬スライスを用いて、特定の入力を受けたシナプスにおいて、細胞接着因子と足場蛋白質の結合が変化するか明らかにする。PSD-95/SAP90とS-SCAMに代表される足場蛋白質と相互作用する細胞接着因子を探索する。

(2) シナプスの強化、除去における細胞膜表面タンパク質のエンドサイトーシスと足場タンパク質に関する研究 (東京医科歯科大学)

足場蛋白質自身のエンドサイトーシスの動態、並びに受容体や細胞接着分子のエンドサイトーシスの制御への関与を明らかにする。海馬スライスに足場蛋白質の変異体を過剰発現させることによって、細胞膜表面上に分布する受容体や接着因子の数に変化が生じLTPの誘導が阻害されるかを検討する。

(3) シナプスの強化、除去における細胞骨格の制御と足場タンパク質に関する研究 (東京医科歯科大学)

足場蛋白質と細胞骨格のシナプスにおける相互作用をを

検討し、シナプスの強化・除去との相関を明らかにする。足場蛋白質の変異体を導入することによって、その細胞骨格の変化に修飾が起こるかを検討する。

(4) シナプスの強化、排除と足場蛋白質のチロシンリン酸化に関する研究 (東京医科歯科大学)

各発生段階の小脳において、S-SCAMのリン酸化状態に変化が生じるかを明らかにする。各発生段階の小脳の構成蛋白質を二次元電気泳動により展開して、リン酸化状態が顕著に変化する蛋白質スポットを質量分析により解析し、シナプスの強化、排除に伴ってチロシンリン酸化される蛋白質を網羅的に見いだす。

5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究

(1) シナプス強化、除去におけるアクチン結合PDZタンパク質に関する研究 (京都大学大学院医学系科)

海馬CA3領域でのLTPやLTDに伴うシナプス微細形態変化と足場タンパク質(Afadin, Neurabin, Catenin等)の局在変化をレーザー顕微鏡による多重免疫染色と免疫電顕で分析する。また培養海馬神経細胞や海馬スライス培養にGFPと足場タンパク質の融合タンパク質やアクチン結合ドメインを欠失させた改変遺伝子を発現させ、シナプス活動に伴う局在変化を調べる。また登上線維の除去が見られないmGluR, PLC β 4, Gq, PKC γ などのノックアウトマウスで足場タンパク質の発現、局在がどのように変化しているかを免疫組織化学的に明らかにする。

(2) Rhoシグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究 (京都大学大学院医学系科)

Rhoの標的タンパク質であるRho-キナーゼやMBS等の細胞内局在を発生段階のラットの神経組織や培養神経細胞、海馬、小脳などで電子顕微鏡レベルで明らかにする。またLTPやLTDの成立に伴い、それらのタンパク質の局在がどのように変化するかを調べる。さらにRho-キナーゼやMBSの過剰発現や特異的機能阻害によって突起伸長やシナプス強化、除去への影響を調べる。神経突起、成長円錐画分からアフィニティーカラム法や免疫沈降法を用いてRho-キナーゼやMBSと結合するタンパク質を探索し、その分子構造を明らかにすると共に突起伸長やシナプス機能への役割を明らかにする。

(3) 神経突起伸長におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析 (京都大学大学院医学系科)

シナプス小胞開口分泌関連タンパク質であるVAMP2, SNAP25, Syntaxin, Synaptotagmin遺伝子やその変異体を初代培養神経細胞や株化された培養神経細胞に導入し、神経突起の伸長や成長円錐の形成への影響を調べることでこれらのタンパク質の機能および機能領域を明らかにする。さらにgreen fluorescent protein (GFP)と融合させたシナプス小胞開口分泌関連タンパク質を作成し、培養神経細胞に導入することで、細胞が生きたままの状態GFP

融合VAMP2, SNAP25, Syntaxin や Synaptotagmin の経時的な挙動を調べる。

6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究

(1) チャンネルやレセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究 (三菱化学生命科学研究所)

ラット脳やPC12細胞のホモジネートを蔗糖密度勾配法で分離した後、各分画から immunoaffinity 精製法で Ca チャンネルや AMPA レセプターを含む細胞内小胞を単離する。特異的に含まれるタンパク質の部分アミノ酸配列を明らかにし、抗体を作成する。免疫組織化学や免疫電顕によって輸送小胞の細胞内局在を明らかにするほか、シナプスの選択的強化、除去に伴ってその局在が変化するかなどを明らかにする。

(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究 (研究実施機関 三菱化学生命科学研究所)

輸送小胞に特有なタンパク質と GFP との融合タンパクを培養神経細胞やスライス培養に発現させ、神経活動に伴ってその局在がどの様に変化するかを調べる。様々な阻害剤や、膜透過性のキレーターを作用させ、膜への組み込みやその制御に関わるシグナル系を明らかにする。また輸送小胞が細胞骨格タンパク質や足場タンパク質と結合するか否かも調べる。

3. 年次計画

本プロジェクトでは、「長期記憶の形成・消去」および「機能的神経回路形成」の基礎である活動依存的、永続的かつ入力特異的なシナプス強化および除去の機構を明らかにすることを目標とする。

第Ⅰ期ではシナプスレベルでの解明を目指し、シナプス強化・除去に関わる遺伝子群の全容、遺伝子産物の特定のシナプスへの選択的輸送機構、シナプス強化・除去に伴うシナプス機能分子やシナプス構造の変化、これらを統御する細胞内シグナル伝達系などを明らかにする。

第Ⅱ期ではこれらの成果を個体レベルにまで展開し、記憶形成や消去の分子基盤を明らかにすることをめざす。

4. 平成12年度における実施内容と達成目標

1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究

(1) 海馬での後期 LTP に伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究

海馬の後期 LTP に伴い発現誘導される遺伝子の網羅的スクリーニングを完了し、それらの中の未知の遺伝子に関して構造を明らかにする。

(2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究

ラット小脳の発達に伴い発現が制御される遺伝子を網羅的に探索し、それらの遺伝子の時間的発現パターンを明らかにする。

かにする。

(3) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究

幼若ラットの脊髄随節置換を行い、運動系・知覚系伝導路の神経機能回復例、失敗例、および正常コントロールの間でディファレンシャルディスプレイやサブトラクションクローニングを行い、神経再生依存的に発現する遺伝子を同定する。

(4) シナプスタグの分子の実体解明に関する研究

海馬LTP系を用いて、Ves1-1S タンパク質が「synaptic tag 仮説」から予想される細胞内局在を示すかどうかを検討し、この仮説の妥当性を明らかにする。また、単一ニューロン内における Ves1-1S タンパク質のシナプス選択的な分配機構を解析する系を確立するために、海馬初代培養ニューロンへの遺伝子導入系を確立する。

2. シナプスの選択的除去機構に関する研究

(1) 新たな候補遺伝子の網羅的探索

登上線維シナプスの選択的除去に関与する遺伝子は、臨界期のみの特異的にプルキンエ細胞に発現し、mGluR, PLC β 4, Gq, PKC γ などのノックアウトマウスで発現しないことが期待される。多重支配の残るP8の小脳、臨界期(P15-18)の小脳、およびすでに発達が終了した成熟マウス的小脳とを用いて differential display を行ない、臨界期の小脳に特異的に発現してくる遺伝子を網羅的に探索する。続いて、得られた候補遺伝子のうち上記のノックアウトマウスで発現しないものを選び出す。さらに、in situ hybridizationにより、候補遺伝子がプルキンエ細胞に発現することを確かめる。これらは、井ノ口の協力のもとで行なう。

(2) 候補遺伝子の機能解析

同定された候補遺伝子が、登上線維シナプス除去に関与するかを調べるため、これらのアンチセンス DNA を合成し、遺伝子の機能をブロックした状態で登上線維シナプス除去および形成に対する影響を調べる。また、小脳のシナプス伝達やカルシウムシグナリングなどの生理機能に対する影響も調べる。

3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究

(1) CA1 LTPにおける代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究

マウス海馬スライスを用いて、代謝型グルタミン酸受容体を活性化させた際にシナプス選択的にマーク(いわゆるシナプスタグ)がつくかどうかを電気生理学的に検討する。具体的には、高頻度刺激を与えたシナプスに選択的に新たな蛋白が輸送されるかどうかを調べる。2つの独立した入力を刺激し、NMDA受容体阻害剤存在下に一方の入力にのみ代謝型グルタミン酸受容体を活性化できる程度の強いコンディショニング刺激を与える。その後直ちにNMDA受容体阻害剤を洗い流し、もう一方の入力に後期LTPを発

現させたときに、第一の入力にも後期 LTP が発現するかどうかを確かめる。

(2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究

各種機能蛋白の遺伝子ノックアウトマウスを定法により作製する。これらのマウス作製には1-2年の期間を要すると思われるので初年度から実験を開始する。これと並行して、それぞれの蛋白の機能を阻害する薬物のLTPに対する効果を電気生理学的に解析する。

(3) 細胞接着分子の CA1 LTP における役割に関する研究

細胞接着分子であるカドヘリンあるいはテレンセファリンの遺伝子ノックアウトマウスから海馬スライスを作製し、ホールセル記録法により興奮性シナプス電流を記録する。電気刺激により誘発される興奮性シナプス電流を正常動物と比較し、キネティックなどに差があるかどうかを検討し、正常シナプス伝達における細胞接着分子の役割を明らかにする。

4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去の分子機構に関する研究

PSD-95/SAP90 ないしは S-SCAM とカドヘリンの相互作用を神経細胞及びモデル系としての非神経細胞の両者において検討し、カドヘリンの裏打ち構造に関する足場蛋白質を解明する。また、足場蛋白質の変異体を過剰発現させ細胞膜蛋白質のエンドサイトーシスに異常が生じるか明らかにする。足場蛋白質のチロシンリン酸化に関しては、試験管内での解析と合わせて、各種発生段階の小脳をもちいてチロシンリン酸化状態に変化が認められるかを検討し、足場蛋白質のチロシンリン酸化の生理的意義を明らかにする。S-SCAM のノックアウトマウス のホモ接合体を作成してマクロスコピックなレベルでの表現型を解析し、S-SCAM が、PSD-95/SAP90 とは異なる機能を担っているかを明らかにする。

5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究

(1) シナプス強化、除去におけるアクチン結合性 PDZ タンパク質に関わる研究

ラット小脳発生における足場タンパク質 (Afadin, Neurabin, Catenin 等) の脳内局在を解析し、シナプス除

去に伴う変化を検索する。海馬 CA3 領域での LTP や LTD に伴うシナプス微細形態変化との局在変化をレーザー顕微鏡による多重免疫染色と免疫電顕で分析する。

(2) Rho シグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究

Rho の標的タンパク質である Rho-キナーゼや MBS 等の細胞内局在を発生段階のラットの神経組織や培養神経細胞、海馬、小脳などで電子顕微鏡レベルで明らかにする。また LTP や LTD の成立に伴い、それらのタンパク質の局在がどのように変化するかを調べる。

(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析

green fluorescent protein (GFP) と融合させたシナプス小胞開口分泌関連タンパク質を作成し、培養神経細胞に導入することで、細胞が生きたままの状態での GFP 融合 VAMP2, SNAP25, Syntaxin や Synaptotagmin の経時的な挙動を調べる。

6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究

(1) チャンネルやレセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究

ラット脳や PC12 細胞のホモジネートを蔗糖密度勾配法で分離した後、各分画から immunoaffinity 精製法で Ca チャンネルや AMPA 受容体を含む細胞内小胞を単離する。特異的に含まれるタンパク質の部分アミノ酸配列を明らかにし、抗体を作成する。免疫組織化学や免疫電顕によって輸送小胞の細胞内局在を明らかにするほか、シナプスの選択的強化、除去に伴ってその局在が変化するかなどを明らかにする。

(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究

輸送小胞に特有なタンパク質と GFP との融合タンパク質を培養神経細胞やスライス培養に発現させ、神経活動に伴ってその局在がどのように変化するかを調べる。様々な阻害剤や、膜透過性のキレーターを作用させ、膜への組み込みやその制御に関わるシグナル系を明らかにする。また輸送小胞が細胞骨格タンパク質や足場タンパク質と結合するか否かも調べる。

II 平成12年度における実施体制

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
1. シナプス形成、強化に伴う遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置に関する研究 (1) 海馬での後期 LTP に伴い発現する遺伝子の網羅的解析と機能に関する研究 (2) 小脳の発達期に発現制御される遺伝子に関する研究 (3) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究 (4) シナプスタグの分子実体解明に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所 (株)三菱化学生命科学研究所 京都大学大学院医学系研究科 (株)三菱化学生命科学研究所	井ノ口 馨 井ノ口 馨 溝 口 明 井ノ口 馨
2. シナプスの選択的除去機構に関する研究 (1) 登上線維シナプスの選択的除去に関わる遺伝子に関する研究 (2) 細胞骨格、足場タンパク質、シナプスタグ分子、開口放出関連タンパク等の登上線維シナプス除去への関与に関する研究	金沢大学医学部 金沢大学医学部	橋 本 浩 一 橋 本 浩 一
3. シナプス選択的強化に伴う代謝型グルタミン酸受容体シグナル系の役割に関する研究 (1) CA1 LTP における代謝型グルタミン酸受容体の役割に関する研究 (2) 代謝型グルタミン酸受容体の標的分子に関する研究 (3) 細胞接着分子の CA1 LTP における役割に関する研究	神戸大学医学部 神戸大学医学部 神戸大学医学部	真 鍋 俊 也 真 鍋 俊 也 真 鍋 俊 也
4. 細胞接着分子と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去の分子機構に関する研究 (1) シナプスの強化、除去における細胞接着因子と足場タンパク質に関する研究 (2) シナプスの強化、除去における細胞膜表面タンパク質のエンドサイトーシスと足場タンパク質に関する研究 (3) シナプスの強化、除去における細胞骨格の制御と足場タンパク質に関する研究 (4) シナプスの強化、排除と足場タンパク質のチロシンリン酸化に関する研究	東京医科歯科大学 東京医科歯科大学 東京医科歯科大学 東京医科歯科大学	畑 裕 畑 裕 畑 裕 畑 裕
5. 細胞骨格と結合する足場タンパク質を介したシナプス強化、除去機構に関する研究 (1) シナプス強化、除去におけるアクチン結合性 PDZ タンパク質に関する研究	京都大学大学院医学系研究科	溝 口 明

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
(2) Rho シグナル系を介したシナプス構造および機能制御に関する研究	京都大学大学院医学系研究科	溝 口 明
(3) 神経突起伸展におけるシナプス小胞開口分泌関連タンパク質の機能解析	京都大学大学院医学系研究科	溝 口 明
6. シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構に関する研究		
(1) チャンネル, レセプターの細胞膜への組み込みに関わる輸送小胞の単離に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	高 橋 正 身
(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究	(株)三菱化学生命科学研究所	高 橋 正 身
7. 研究管理	金沢大学医学部	狩 野 方 伸

Ⅲ リエゾン会議

委 員	所 属
○狩 野 方 伸	金沢大学 医学部生理学第二講座教授
井ノ口 馨	(株)三菱化学生命科学研究所 プロジェクトリーダー
高 橋 正 身	(株)三菱化学生命科学研究所 プロジェクトセンター長
橋 本 浩 一	金沢大学 医学部助手
畑 裕	東京医科歯科大学 医学部教授
真 鍋 俊 也	神戸大学 医学部教授
溝 口 明	京都大学 大学院医学系研究科助教授

(注：○は研究管理統括者)