

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「学習・記憶のシナプス前性メカニズムの解明」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 八尾 寛（東北大学大学院生命科学研究科 教授）

主たる共同研究者

宮脇 敦史（理化学研究所脳科学研究センター チームリーダー）

高橋 正身（北里大学医学部 教授）

山口 和彦（理化学研究所脳科学研究センター 副チームリーダー）

柳川 右千夫（群馬大学大学院医学系研究科 教授）

3. 研究内容及び成果：

3 - 1. プロテインキナーゼ A によるシナプス形成の促進

Morris の water maze によりマウスに空間学習訓練を1日に3回、5日間実施させると、目標への到達時間は有意に短縮する。マウスの海馬 CA3 に投射する苔状線維の終末を観察すると、空間学習を経験したマウスではコントロールマウスと比較して苔状線維の密度が有意に増大し、また苔状線維が錐体細胞上に形成するシナプスの数も有意に増加した。苔状線維 - 錐体細胞シナプスにおける LTP (long-term potentiation) は cAMP の上昇によるプロテインキナーゼ A (PKA) の活性化に起因するとされている。マウス海馬の急性スライス標本における苔状線維は2時間の放置において形態の変化は見られないが、cAMP を増大させると30分後には新たなシナプス形成(シナプス様膨大部)が観察された。この変化は PKA inhibitor (KT5720) の投与によりブロックされた。したがって、新たなシナプス形成には PKA が必要であると仮定される。

3 - 2. 海馬スライス培養におけるニューロンの新生

スライス培養下における海馬の歯状回に enhanced green fluorescent protein (EGFP) を組み込んだ retrovirus vector を感染させると、EGFP にラベルされた細胞は分裂増殖し、そのあるものは神経細胞様の形態を示す。事実、これらの細胞の核は神経細胞のマーカーである NeuN 陽性であったから、神経細胞と考えられる。分裂増殖した細胞の大多数はグリアまたは未分化の細胞であったが、約 25% は神経細胞であった。

3 - 3. 苔状線維の多様性

海馬歯状回の顆粒細胞の軸索(苔状線維; mossy fiber, MF) は、CA3 錐体細胞に投射して興奮性シナプスを形成する。このように形成される個々の mossy fiber-CA3 シナプスの機能、あるいは性質がほぼ均一か否かを検討するために、単一MF 終末端におけるCa²⁺ チャネルのタイプを比較した。この目的のために、Ca²⁺ - 非感受性蛍光デキストランとCa²⁺ - 感受性蛍光デキストランを同一のMF終末端に取り込ませ、前者によって神経終末端を同定し、後者によって流入するCa²⁺を計測した。ただし、この計測においては、流入Ca²⁺の代わりに、Sr²⁺を用いた。Ca²⁺チャネルにはN、L、P/Q、R の4種のサブタイプが存在し、これらはそれぞれの選択的ブロッカーにより同定できることをMF終末端で確認した。異なったMF 終末端でも、同一の4種のCa²⁺チャネルサブタイプが同様な分布比率で発現しているかを検討したが、その分布密度は神経終末端により著しく異なることが明らかになった。さらに、同一のMF によって形成されるシナプス終末端のCa²⁺チャネルサブタイプを比較すると、隣接する異なったシナプスにおいても、遠隔の異なったシナプスにおいても同程度のCa²⁺チャネルサブタイプのばらつきが見られた。したがって、顆粒神経細胞終末端に発現しているCa²⁺チャネルのタイプは顆粒細胞によって規定されるのではなく、また、そのシナプス後のCA3 錐体細胞に依存するのでもなく、終末端ごとに独立的に異なっていると結論される。最近、異なったタイプ(たとえば、Lタイプ、あるいはRタイプなど)のCa²⁺チャネルに対する抗体による免疫染色を用いて、終末端に含まれるCa²⁺チャネル分布の比較も可能となった。その結果、特に、Nタイプ、RタイプCa²⁺チャネルの分布に大きなばらつきの存在することが明らかになった。

3 - 4 . シナプス小胞の開口放出

神経終末端のシナプス小胞の内部は proton pump により pH 5.6 に維持されている。開口放出にさいしては小胞膜と形質膜が融合して、小胞内部の pH は細胞外 pH (7.4) と等しくなる。したがって、小胞内に pH - 感受性の蛍光物質を発現させれば、小胞内 pH の変化を蛍光強度の変化として記録することができる。これを目的として用いたのが、VAMP-pHluorin 法である。これは、pH 感受性 GFP 誘導体(pHluorin)をシナプス小胞蛋白の一つ、VAMP (synaptobrevin)の C 末に結合させたもので (VAMP-pHluorin)、これを小胞に発現させると、小胞内 pH 変化は蛍光強度の変化として記録される。VAMP-pHluorin を海馬の苔状線維終末に発現させるのは容易ではないが、VAMP-pHluorin を海馬シナプス前終末端に特異的に発現する transgenic mouse を作製することによりこの問題は解決した。神経刺激を与えると、神経終末端の蛍光強度が一過性に増大する。しかし、proton pump の阻害剤である bafilomycin を投与して、刺激すると、蛍光強度は増大するが、その減弱が見られない。したがって、神経刺激による蛍光強度の上昇相は開口放出(exocytosis)を反映し、それに続く下降相は endocytosis 後の小胞内の reacidification を反映していると考えられる。このようにして、単一神経終末端におけるシナプス小胞の変化を記録することが可能となった。VAMP-2 はシナプス小胞だけでなく多種の小胞に発現しているので、VAMP-pHluorin は多くの vesicle traffic の解析に使用することが可能である。

3 - 5 . BDNF の開口放出

宮脇チームは蛍光タンパクを基盤として多種の機能プローブの開発を試みた。その一つの Venus は蛍光強度が高く、また、pH5 - 8 において、その変動が少ない。Pre-pro BDNF cDNA に Venus を結合したコンストラクトを作製して、海馬ニューロンに発現させ、BDNF の開口放出を測定することを試みた。

海馬の苔状線維にはBDNFが大量に発現していることが知られているが、苔状線維終末からの BDNF の開口放出はまだ証明されていない。BDNF-Venus コンストラクトを含んだシンドピスウイルスをマウスの海馬歯状回に注入すると、数日後に、苔状線維終末にその発現が見られた。この線維に頻回刺激を与えると、終末の蛍光強度の減少が観察され、この減少がBDNFの開口放出を反映していると推測された。事実、この蛍光強度の減少は細胞外の Ca^{2+} に依存し、また、この変化は開口放出の阻害剤、N-ethylmaleimide によってブロックされた。

4 . 事後評価結果

神経終末端に存在する Ca^{2+} チャネルタイプの同定は野心的な project であり、また、容易でない解析である。それにも拘らず、できることはすべて実施した点は高く評価される。アドバイザーからは、この最終段階に到達するまでのpilot studyに長時間を費やしすぎたという批判もあったが、今回の綿密な開口放出の解析には心底から敬意を表したい。困難な研究であるのに、その結果は期待したほど exciting ではなかったのは残念であるが、それは致し方のないことである。

この研究提案の実施になぜ、これだけの長時間を必要としたのかも十分に理解できない。この研究が提案された時点では、研究代表者も、また、たぶん研究総括もふくめてアドバイザーのメンバーもその研究提案がこれほど困難な project とは推測できていなかったのであろう。いずれにしても、昨年度までの研究結果と比較して、この最後の1年の成果は飛躍的に多彩であったといえる。

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

神経終末端に存在する Ca^{2+} チャネルタイプの同定は野心的な project であり、また、容易でない解析である。それにも拘らず、できることはすべて実施した点は高く評価される。アドバイザーからは、この最終段階に到達するまでのpilot studyに長時間を費やしすぎたという批判もあったが、今回の綿密な開口放出の解析には心底から敬意を表したい。困難な研究であるのに、その結果は期待したほど exciting ではなかったのは残念であるが、それは致し方のないことである。この研究提案の実施になぜ、これだけの長時間を必要としたのかも十分に理解できない。この研究が提

案された時点では、研究代表者も、また、たぶん研究総括もふくめてアドバイザーのメンバーもその研究提案がこれほど困難な project とは推測できていなかったのであろう。いずれにしても、昨年度までの研究結果と比較して、この最後の1年の成果は飛躍的に多彩であったといえる。

4 - 2 . 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究は、ラット海馬CA3 錐体細胞上にシナプスを形成する苔状線維 (mossy fiber, MF) 終末端における Ca^{2+} チャネルを解析した。その結果、各終末端に存在する Ca^{2+} チャネルのタイプの分布は異なっていることが明らかになった。MF は海馬歯状回の顆粒細胞の軸索であるが、顆粒細胞終末端に発現する Ca^{2+} チャネルのタイプは顆粒細胞によって規定されるのではなく、終末ごとに独立的に異なっていることが明らかになった。研究代表者は、さらに、VAMP-pHluorin法により、苔状線維終末端における開口放出を蛍光強度の変化として記録することに成功した。本研究は野心的であるが、困難なプロジェクトである。綿密な計画に基づいて、このプロジェクトを成功させた努力は高く評価される。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

なし