

シナプス伝達可塑性の誘導調節の分子メカニズム

神戸大学医学部

真鍋俊也

「シナプス伝達可塑性の誘導調節の分子メカニズム」

1. 研究の背景と目的

(1) 中枢神経系の海馬は記憶や学習の成立に重要な役割を果たすが、海馬でのシナプス可塑性はその細胞レベルでの基礎過程であろうと考えられている。海馬 CA1 領域でのシナプス伝達の長期増強(long-term potentiation: LTP)の誘導には、シナプス後細胞の NMDA 受容体の活性化が必須であり、この受容体チャネルを介してシナプス後細胞に流入するカルシウム・イオンが細胞内生化学過程を活性化することにより LTP が発現することが知られている。中枢神経系での可塑的な変化は、一般的には幼若な動物ほど起こりやすいとされているが、これがどのような分子機構によって引き起こされているかについてはいまだ明らかではない。研究代表者らは、成熟マウスにおいて H-Ras が海馬に豊富に存在するとともに、NMDA 受容体のチロシンリン酸化が H-Ras に制御され、NMDA 受容体活性が調節されていることを明らかにした。さらに、この調節により、LTP の誘導が制御されているという予備実験の結果を得ている。つまり、正常動物では、H-Ras が NMDA 受容体のチロシンリン酸化を抑え、LTP のような可塑的变化を抑制していると考えられる。本研究計画では、可塑性の生後発達にこの H-Ras による調節機構が関与する可能性を検討する。

H-Ras は細胞増殖や分化など動物の発生・発達段階で活性化されることが知られているが、本研究では、中枢神経系の発達に伴って NMDA 受容体機能が H-Ras を介して遺伝子レベルで調節されることにより可塑性の誘導が制御されている可能性を検討する。また、この調節を担う細胞内生化学過程の同定も試みる。これにより、記憶形成の分子メカニズムを明らかにすると同時に、記憶能力の生後発達の遺伝子レベルでの調節機構の解明を目指す。本研究は、これまで現象論的に記述されてきた NMDA 受容体の生後発達過程における活性調節の分子機構を明らかにしようという点に最大の特色がある。これまでは、NMDA 受容体を直接修飾するであろう最終のステップが中心に調べられてきたが、本研究では、より上流の遺伝子レベルでの調節機構を解明しようとする点にも特色がある。H-Ras が細胞の分裂や分化あるいは発癌に関与するという報告はこれまでに数多くあったが、本研究計画では、成熟動物の神経系における H-Ras の機能を検討するという、世界的にもまったく類のない独創的な研究を展開する予定である。所期の目的が達成されれば、記憶・学習の細胞内機構が遺伝子レベルで明らかにされ、さらには発達段階での学習能力の成立過程の分子機構が解明されることが期待される。

(2) 海馬 CA1 領域の LTP 誘導には、NMDA 受容体を介して流入するカルシウム・イオンが重要な役割を果たすが、流入したカルシウム・イオンのみで LTP が十分な誘導できるかどうかは不明である。つまり、NMDA 受容体を介して流入したカルシウム・イオンが引き金となって、小胞体などの細胞内ストアーに蓄えられているカルシウム・イオンが放出される、いわゆる calcium-induced calcium release (CICR) が LTP 誘導・発現に関与しているかどうかについては、未だに議論のあるところである。CICR を媒介するおもなチャネルとしてリアノジン受容体 (RyR) が知られているが、LTP 誘導機構にこの RyR がどのように関与するかを、海馬で最も多く発現する 3 型リアノジン受容体 (RyR3) のノックアウトマウスを用いて検討する。

(3) 海馬における興奮性シナプス伝達は、グルタミン酸が神経伝達物質と

して働いているが、シナプスでの伝達が効率よく行われるためには、シナプス間隙でのグルタミン酸濃度をすばやく下げて適当な濃度に調節する機構が必要である。そのような調節に大きく寄与する分子として、グリア細胞に存在するグルタミン酸トランスポーターの GLT-1 がある。これまでに、GLT-1 を欠損するマウスでは、海馬 CA1 領域でのシナプス間隙のグルタミン酸濃度が正常よりも高くなっており、生後数週でてんかん発作を起こして死亡するマウスが出ることを報告している。シナプス可塑性の誘導・発現にグルタミン酸トランスポーターがどのように関わるかについては、未だにその詳細は不明である。GLT-1 のシナプス可塑性における役割を明らかにするために、GLT-1 欠損マウスを用いて電気生理学的な解析を行う。

2．研究方法・研究内容

研究方法:マウスより海馬を摘出し、スライサーを用いて海馬スライス(厚さ400ミクロン)を作製した。通常の細胞外電位記録法あるいはホールセルパッチクランプ法により、シナプス電位あるいはシナプス電流を記録した。また、生化学的解析は定法に従い、ウエスタンブロットなどを行った。

(1-1) H-Ras 欠損マウスより得られた海馬スライスを用いて、AMPA 受容体シナプス応答および NMDA 受容体シナプス応答を記録した。また、海馬 CA1 領域での LTP を野生型と変異型間で比較・検討した。さらに、NMDA 受容体のサブユニット (NR1 (ζ 1)、NR2A (ϵ 1)、NR2B (ϵ 2)) の生化学的解析を行った。ノックアウトマウスは東京大学・医科学研究所の勝木元也教授(現・基礎生物学研究所所長)、饗場篤助教授(現・神戸大学大学院医学系研究科教授)のグループより提供を受けた。

(1-2) NMDA 受容体のチロシンリン酸化のシナプス機能における役割を解析するため、NMDA 受容体サブユニットのチロシンリン酸化部位を決定し、その部位のリン酸化されたチロシンを特異的に認識する抗体を作製した。また、このリン酸化が LTP により調節を受けるかどうかを、スライス標本を用いて電気生理学的および生化学的に検討した。本研究は、東京大学・医科学研究所の山本雅教授のグループとの共同研究である。

(2) RyR3 欠損マウスより得られた海馬スライスを用いて、AMPA 受容体シナプス応答および NMDA 受容体シナプス応答を記録した。また、海馬 CA1 領域での LTP と短期増強、およびシナプス前性の短期可塑性を野生型と変異型間で比較・検討した。さらに、海馬の構造学的解析、グルタミン酸受容体の分布の形態学的および生化学的解析を行った。ノックアウトマウスは久留米大学の竹島浩教授より提供を受けた。また、解剖学的解析は、北海道大学の渡辺雅彦教授のグループとの共同研究である。

(3) GLT-1 欠損マウスより得られた海馬スライスを用いて、海馬 CA1 領域の LTP を細胞外電位記録法により解析した。また、GLT-1 欠損が正常シナプス伝達に及ぼす影響について、CA1 錐体細胞からのホールセル記録により検討した。具体的には、AMPA 受容体シナプス応答と NMDA 受容体シナプス応答を薬理学的方法により単離し、それぞれの振幅と時間経過を測定した。ノックアウトマウスは東京医科歯科大学の田中光一教授より提供を受けた。

3．研究成果

(1-1) 海馬 CA1 領域における LTP が、H-Ras 欠損マウスでは野生型の約2倍に増大していることがわかった。高頻度刺激を与えた際の NMDA 受

容体依存性の脱分極の程度が変異型マウスで有意に大きく、NMDA 受容体活性の亢進が示唆された。CA1 錐体細胞からホールセル記録法により記録した AMPA 受容体シナプス応答に対する NMDA 受容体シナプス応答の比が変異型マウスで有意に大きかった。さらに、細胞外電位記録法でそれぞれの入出力関係を検討したところ、変異型マウスにおいて NMDA 受容体シナプス応答が絶対的に増大していることが明らかとなった。したがって、変異型マウスでの LTP の増大は、NMDA 受容体活性が亢進した結果、高頻度刺激の際のシナプス後細胞へのカルシウム・イオンの流入が増加したことによるものと考えられた。実際、高頻度刺激を繰り返し与えて得られた LTP の飽和レベルは、野生型マウスと変異型マウス間で差がなく、LTP の発現ではなく、誘導機構に差があるものと考えられた。

NMDA 受容体のチャネル活性は、受容体のチロシンリン酸化により調節されることが知られているが、リン酸化チロシン認識抗体を用いて NMDA 受容体サブユニットのチロシンリン酸化のレベルを測定したところ、変異型マウスの NR2A、NR2B サブユニットが野生型よりも強くリン酸化されていることがわかった。したがって、H-Ras は、正常動物においては、NMDA 受容体のチロシンリン酸化を抑制する方向の作用を有し、これにより NMDA 受容体活性さらにはシナプス可塑性の誘導を抑制的に調節していると結論された。現在は、このリン酸化が生後発達でどのように変化するか、LTP の誘導がどのように相関するか、などシナプス可塑性の生後発達に H-Ras がどのように関与するかについてさらに検討を加えている。

(1 - 2) 試験管内でペプチドマッピング法を用いて、チロシンリン酸化酵素 Fyn によりリン酸化される NR2B サブユニットの部位を同定した。細胞内でもリン酸化される部位として、チロシン 1 2 5 2、チロシン 1 3 3 6、チロシン 1 4 7 2 を同定したが、その中でもチロシン 1 4 7 2 が最も強くリン酸化されることがわかった。リン酸化されたチロシン 1 4 7 2 のみを認識する抗体を作製し、マウス終脳での NR2B のチロシンリン酸化を測定したところ、一部がリン酸化されていることがわかった。しかし、*fyn* 欠損マウスでは、このリン酸化がほぼ消失していたことから、Fyn が正常動物での NR2B チロシンリン酸化に大きく寄与していることが明らかとなった。また、チロシン 1 4 7 2 のリン酸化の生後発達を検討したところ、生後 1 週ではわずかにリン酸化されているにとどまるが、生後 2 週以降に急激にその程度が増加する。ちょうどこの時期に海馬 CA1 領域での LTP が誘導されやすくなるが、このリン酸化の増加が関与している可能性がある。さらに、成熟マウスの海馬スライスで、高頻度刺激により LTP を誘導してから 60 分後にチロシン 1 4 7 2 のリン酸化を測定したところ、対照のスライスに比べて、リン酸化の程度が 1.5 倍程度に増加していた。高頻度刺激直後では、この増加は観察されないことから、LTP の発現にこのリン酸化の増加が関与している可能性がある。また、いわゆるメタ可塑性 (metaplasticity) にこのリン酸化が直接的に関与している可能性もあり、この点については今後検討していく予定である。

(2) RyR3 欠損マウスでは、海馬 CA1 領域での正常シナプス伝達の AMPA 受容体シナプス応答の入出力関係が野生型マウスに比べ減少している、つまり同じ強度の刺激に対する AMPA 受容体シナプス応答が小さいことが明らかとなった。一方、NMDA 受容体シナプス応答については差が見られなかったことから、RyR3 を介する細胞内でのカルシウム・イオンの放出が通常のシナプス伝達を修飾していることがわかった。免疫組織学的および生化学

的な検討から、AMPA 受容体の発現量や分布などには変化が観察されなかったため、AMPA 受容体シナプス応答の入出力関係の変化は、すでにシナプス部に存在している AMPA 受容体の機能が変化したために起こったと考えられた。また、100Hz、1s の高頻度刺激により誘導される海馬 CA1 領域での LTP が変異型マウスで減弱していることが明らかとなったが、より短いコンディショニング (100Hz、100ms) により誘導される短期増強は、両遺伝子型間で差が見られなかった(図 1)。したがって、海馬 CA1 領域の LTP が十分誘導されるためには、RyR3 を介した細胞内でのカルシウム・イオンの放出が必要であるが、この機構が活性化されるためには、ある程度強い NMDA 受容体の活性化が必要であると結論できる。一方、シナプス前性の短期可塑性には、両遺伝子型間でまったく差が認められなかったことから、これらの AMPA 受容体機能調節は、シナプス後細胞で媒介されていると考えられた。これらの研究成果は、Molecular and Cellular Neuroscience で印刷中である (Shimuta et al., Mol. Cell. Neurosci., 2001)。

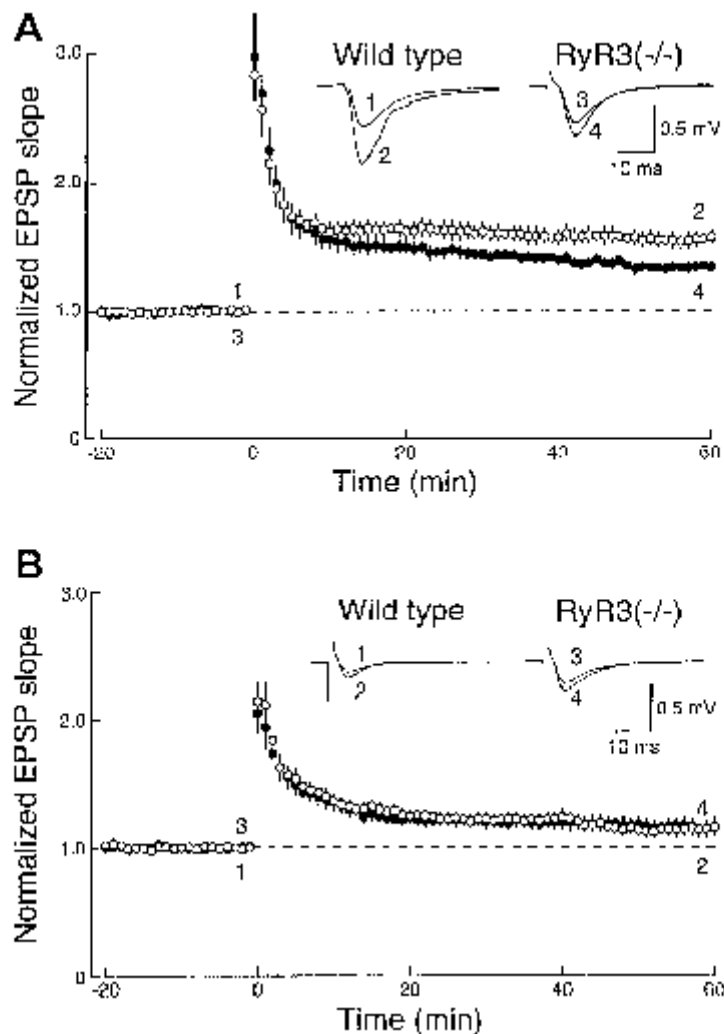


図 1 RyR3 ノックアウトマウスの海馬 CA1 領域における LTP (A) と短期増強 (B)

(3) GLT-1 欠損マウスでは、海馬 CA1 領域での LTP がほとんど誘導できない程度まで障害されていた。正常シナプス伝達を検討したところ、NMDA 受容体応答が選択的に著明に増大しており、これが LTP 障害の原因である可能性が示唆されたため、NMDA 受容体応答を半減させる程度の D-APV を投与しながら高頻度刺激を与えると、野生型マウスとほぼ同程度の LTP が誘導された。したがって、変異型マウスで観察された LTP の障害は、高頻度刺激時に放出されたグルタミン酸が高濃度でシナプス間隙に残存するため、NMDA 受容体が過度に活性化され LTP の誘導機構に何らかの異常が起こったためにもたらされたものと考えられる。この機構に関しては、今後検討していく予定である。また、1Hz の低頻度刺激を持続して与えると、その際に見られる AMPA 受容体シナプス応答の短期増強が変異型マウスでより大きいこともわかり、この現象の発現機構についてもさらに検討する予定である。これらの成果については、現在、論文を改訂中である(Katagiri et al., revised)。

4 . 生活や産業への貢献および波及効果

NMDA 受容体の H-Ras による活性調節の研究成果は、海馬でのシナプス可塑性の誘導調節さらには記憶形成の制御に直接関係するものであり、Ras による NMDA 受容体機能調節の生後発達の機構解明は、ヒトにおける記憶能力の生後発達の分子機構の解明とより効果的な教育・学習の方法開発へとつながる可能性がある。また、本研究の全般的な成果は、基礎医学としての記憶研究に寄与できるだけでなく、アルツハイマー病に代表されるような記憶障害を呈する疾病の原因解明、治療法の開発、予防などに寄与できる可能性もある。さらに、神経毒性の防御に役立つことが明らかとなっている GLT-1 の欠損マウスを用いて、グルタミン酸濃度調節機構の異常によりシナプス伝達と可塑性に障害がもたらされること、さらには、この障害が低濃度の NMDA 受容体アンタゴニストにより防ぐことができることを明らかにしたが、これらの成果は、てんかんや脳外傷における神経障害を抑制するための基礎データを臨床医学に提供できるという意義を有するものである。