

遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明

(H12～14年、第Ⅰ期)

平成14年度予算額: 240百万円(194百万円)

研究管理統括者: 狩野方伸 研究体制: 金沢大学、他5機関

<研究の概要・目標>

1 何を目指しているのか

脳における長期記憶の形成・消去の現象は、シナプスという機能的接続部位が活動依存的、入力依存的に柔軟に変化することに由来している。この活動依存的なシナプスの改変機構を遺伝子、分子、細胞レベルでの解明を目指す。

(第Ⅰ期の目標)

- ・小脳、海馬におけるシナプス改変機構に関する遺伝子の同定、及び構造変化に関与する分子の同定

(第Ⅱ期の目標)

- ・シナプスの強化・除去を遺伝子操作等により制御する

2 何を研究しているのか

成熟海馬および発達期小脳を対象とし、これらシナプスの永続的变化に関与する遺伝子群の同定、シグナル系の解明、構造変化の分子実体の解明から研究を進めている。

3 何が新しいのか

- ・シナプス改変機構を明らかにする際に有用な独自の分子ツールを有する。

<研究進展・成果がもたらす利点>

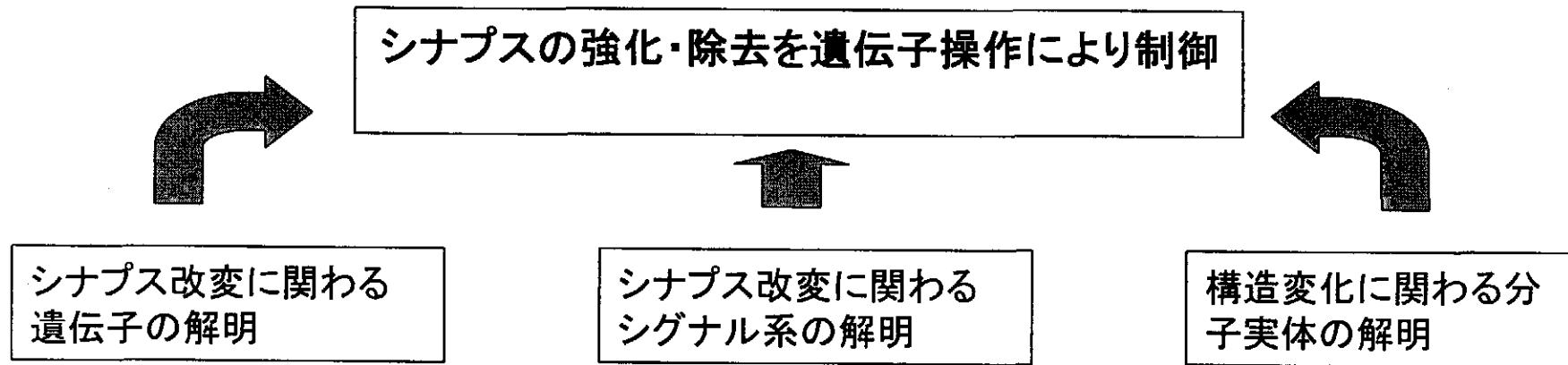
1 世界の水準との関係

本研究に参加する研究者は、全員がシナプス機能の解明において世界の第一線で活躍しており、選択的シナプス改変機構を明らかにしうる多様な分子ツールを独自に開発しているとともに、その機構を解析する実験系を確立している。

2 波及効果

シナプスを遺伝子により制御することにより、遺伝子レベルでの記憶の解明、さらには、全く新しいコンセプトに基づく老人性痴呆やアルツハイマー病等の脳機能改善薬の創製や、治療法の開発につながる。

選択的シナプス強化・除去の遺伝子制御に関する研究



三菱生命研
小脳、海馬でのシナプス改変に関わる遺伝子探索

金沢大
小脳でのシナプス改変に関わるシグナル系の解析

神戸大
海馬でのシナプス改変に関わるシグナル系の解析

東京医科歯科大
細胞接着分子と結合する足場タンパクを介したシナプス強化、除去の構造変化解析

三重大
細胞骨格と結合する足場タンパクを介したシナプス強化、除去の構造変化解明

北里大学
シナプス強化、除去におけるシナップス膜における構造変化解析

**第Ⅰ期研究における所用経費
「遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明の研究」**

(単位:千円)

研究項目	担当機関等	研究担当者	所用経費
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	㈱三菱化学生命科学研究所	井ノ口 篤	206,031
(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) 遺伝子産物の選択的配置に関する研究			
2. シナプスの選択的除去機構に関する研究	金沢大学医学部	橋本 浩一	51,458
(1) 登上線維シナプスの選択的除去に関す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stag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			
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	神戸大学大学院医学系研究科	真鍋 俊也	41,072
(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			
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	東京医科歯科大学	畠 裕	80,674
(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			
(2) 人為的遺伝子発現操作による、シナプスの強化、除去における足場タンパク質の役割解明に関する研究			
(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) シナプスと細胞核に局在する分子が、シナプスの強化、除去において果たす役割に関する研究			
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	三重大学医学部	溝口 明	76,010
(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			
(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			
(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			
(4) 神経再生に伴い発現する遺伝子に関する研究			
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	北里大学医学部	高橋 正身	157,640
(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			
(2) 輸送小胞の機能調節機構の解明に関する研究			
7. 研究推進	金沢大学医学部	狩野 方伸	1,102
合 計			613,987

成果の概要

課題名（研究代表者）：遺伝子制御による選択的シナップス強化・除去機構の解明（狩野方伸）

【研究成果の概要】

（1）シナップス形成、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

井ノロリエゾングループは海馬の後期 LTP に伴い発現誘導される遺伝子を探索し 17 種の遺伝子を単離すると共に、全ての cDNA 構造を明らかにした。シナップスの選択的除去に関わる遺伝子に関しては橋本リエゾンのグループと協力し、レーザーマイクロダイセクションシステムを用いて発達期のマウス小脳プルキンエ細胞のみから RNA を調製する方法を確立し、シナップス後細胞で働く遺伝子の候補を 23 個単離した。その中の発現変化の大きい 5 つについては cDNA の部分構造を解析し、2 つがチューブリン細胞骨格の重合制御因子であるスタスミンと N-acetyl transferase であり、残りの 3 つが未知の遺伝子であることを明らかにした。シナップス前細胞で働く遺伝子に関しては溝口リエゾングループと協力し、下オリーブ核で発達期依存的に発現変化する 92 種類の候補遺伝子の部分 cDNA 構造を明らかにした。それら遺伝子の中で、後期 LTP に伴い発現することを明らかにしたアクチビンが、海馬 LTP の長期間の持続に必須であること、アクチビンシグナル系の変異マウスは記憶の獲得は正常であるが、記憶の保持に欠損があることも明らかにした。さらにシナップスの選択的除去におけるスタスミンの役割を明らかにするため、スタスミン遺伝子の機能改変マウスを作成した。

井ノロリエゾングループは *In vivo* の海馬歯状回 LTP 系を用い、神経細胞には細胞体で合成した Vesl-1S タンパク質を入力シナップス選択的に配置させる機構が存在すること、Vesl-1S タンパク質の細胞内局在が「synaptic tag 仮説」により部分的に説明可能であることを示した。シナップス強化に伴う遺伝子産物の選択的配置機構をさらに詳しく調べるために、GFP タグを付した Vesl-1S を初代培養ニューロンに導入し、経時的に Vesl-1S タンパク質の局在変化が観察できる系を開発すると共に、真鍋リエゾングループと共に vesl-1S 遺伝子のノックアウトマウスの作成を進め、キメラマウスを得ることに成功した。また後期 LTP に伴い発現誘導されることを見いだしたシナプトポーディン遺伝子がコードする SPDН タンパク質が、LTP に伴い細胞体で合成された後、ポストシナップス部位に選択的に輸送されることを見いだし、Vesl-1S に加えて SPDН が選択的シナップス強化の分子機構の解明のためのツールとなることを明らかにした。

（2）シナップスの選択的除去機構に関する研究

橋本リエゾングループは井ノロリエゾンのグループと協力し、マウス小脳プルキンエ細胞のみから RNA を調製する方法を確立し、過剰登上線維除去の臨界期に発現が変化する遺伝子群、およびノックアウトすると除去過程が阻害されることが判明している γ 型プロテインキナーゼ C (PKC γ) の制御下にある遺伝子群の探索を行った。その結果 23 の候補遺伝子を単離し、これをさらに 5 つの遺伝子に絞り込み、その中にスタスミン、N-acetyl transferase など既知の遺伝子と、未同定の遺伝子が含まれていることを明らかにした。

さらに橋本リエゾングループはプルキンエ細胞に存在し、過剰登上線維の除去過程に重要な働きをする代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) の活性化により内因性カンナビノイド (マリファナ類似物質) が産生され、これがプルキンエ細胞から逆行性に登上線維シナップス前終末に作用し、シナップス伝達を調節する新たな機構が存在することを明らかにした。また、登上線維の除去過程に異常がみられることが報告されているグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) ノックアウトマウスの解析をおこない、GluR $\delta 2$ の除去過程における機能的意義を明らかにした。

登上線維の除去過程における足場タンパク質の関与を明らかにするため、GluR $\delta 2$ と相互作用する PSD-93 と Delphilin のノックアウトマウスの解析を行い、小脳の形態、シナップス伝達及び登上線維-プルキンエ細胞シナップスの生後発達については特に異常は認められないと明らかにした。また AMPA 受容体のシナップス局在化に関わる足場タンパク質 Stargazin に遺伝子異常がみられる Stargazer マウスを解析し、登上線維、平行線維の興奮性シナップス後電流 (EPSC) が正常に比べて大幅に減少していることを明らかにした。さらに mGluR1 と相互作用する Vesl-1s の役割を明らかにするため、井ノロリエゾンのグループと協力し、Vesl-1s をプルキンエ細胞特異的に強制過剰発現させたマウスを作成し、その解析に着手した。

（3）シナッ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

真鍋リエゾングループはシナップス後細胞の mGluR の活性化により、それ以降に起こるシナップス可塑性に変化（メタ可塑性）が生じることを明らかにし、シナップス後細胞に発現するグループ I の mGluR である mGluR1 と mGluR5 のいずれもが欠損するマウスを用いてさらに詳しい解析を進めている。また mGluR の重要な標的分子である NMDA 受容体 NR2B (GluRe2) のチロシンリン酸化部位を同定し、このリン酸化が、生後発達とともに増加し、LTP の発現に伴って増加すること、H-Ras がチロシンリン酸化の抑制性の調節分

子であることなどを明らかにした。NR2B サブユニットと NR2A サブユニットの生後の発現時期や細胞内相互作用の違いが、シナプス伝達と可塑性にどのような役割を果たすかを検討するため、両サブユニットを置換したマウスを作製している。さらにシナプスタグ仮説への mGluR の関与を調べるため、海馬スライス標本において独立な二つの入力のシナプス可塑性における相互作用の検討を行った。

一方、ムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) に関してはシナプス伝達とシナプス可塑性の調節機構を明らかにしたほか、橋本リエゾンのグループと協力し、海馬でのカンナビノイドによるシナプス前抑制における mAChR の役割をノックアウトマウスを用いて解析している。さらにカイニン酸受容体によるシナプス前修飾機構の存在や、シナプス選択性に重要なグルタミン酸トランスポーターGLT-1 や 3型アノジン受容体が欠損したマウスでの LTP の障害機構などを明らかにした。

足場タンパク質に関しては、NMDA 受容体と相互作用をする S-SCAM のノックアウトマウスの解析を畠リエゾンのグループと、mGluR と相互作用する vesl-1S を欠損するマウスの作製を井ノ口リエゾンのグループと協力して行っている。細胞接着分子に関しては NCAM などの細胞接着分子の細胞外ドメインに付加される HNK-1 の合成酵素や、Cadherin11、Telencephalin などのノックアウトマウスを用い、LTP や行動解析を行い、細胞接着分子が高次脳機能に重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに細胞接着分子である Nectin のシナプスにおける役割の解析を、溝口リエゾンのグループと共同して進めている。

(4) 細胞接着分子と結合する足場蛋白質を介するシナプス強化、除去の分子機構に関する研究

畠リエゾンのグループは、NMDA受容体と接着分子ニューロリギンの足場タンパク質であるS-SCAMのシナプス局在機構を解析した。その結果、S-SCAMが β カテニンとの相互作用を介してシナプスに局在決定されることや β カテニンの分解がS-SCAMによって促進される可能性を見いだした。さらに上皮細胞で発現する S-SCAMのアイソフォームである MAGI-1も β カテニンと相互作用するが、極性が成熟すると β カテニンと離れてカドヘリン以外の接着分子と相互作用することを明らかにした。これらの結果は S-SCAMがNMDA受容体をニューロリギンのみならず、カドヘリンにも連結する機能を担っており、その結合様式がシナプス活動に依存して変化する可能性を示している。この可能性の是非を探ると共に、選択的シナプス強化・除去におけるS-SCAMの役割を探るため、S-SCAM遺伝子の改変マウスの解析を溝口リエゾン・真鍋リエゾンのグループと共同して進めている。

BEGAINは、NMDA受容体やニューロリギンの足場タンパク質であるPSD-95のグアニル酸キナーゼ領域に結合する。畠リエゾンのグループは、BEGAINがシナプスのみならず細胞核にも局在すること、BEGAINのシナプス局在はPSD-95との相互作用に依存しているが、PSD-95のシナプス局在とは異なりシナプス活動に依存していることなどを明らかにし、BEGAINがシナプス活動に応じて局在を変え、シナプスと細胞核とつなぐ分子として機能する可能性を示した。MAGUINは、PSD-95・S-SCAMに結合し、Rafを介してMAPキナーゼ系に関与する可能性が想定されている足場タンパク質である。GKAP/SAPAP/DAPは、BEGAINと同じくPSD-95のグアニル酸キナーゼ領域に結合する分子で細胞骨格へのアダプターとして機能していると考えられている。畠リエゾンのグループは、MAGUINのシナプス局在が分子中央部分のPH領域を介して起こり、シナプス局在はシナプス活動やPSD-95・S-SCAMとの相互作用にも依存しないこと、GKAP/SAPAP/DAPのシナプス局在が分子内のN末端領域に依存し、PSD-95・S-SCAMとの相互作用やシナプス活動に依存しないこと、S-SCAMやBEGAINに比べるとシナプスでの動きが遅いことなどを明らかにした。

(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

溝口リエゾンのグループは井ノ口リエゾンのグループと協力し、登上線維—プルキンエ細胞間シナプスの除去に関する可能性のある、下オリーブ核で発達時期依存性に発現する遺伝子の候補を92種類検出した。

溝口リエゾンのグループは登上線維シナプスの選択的除去過程を、電子顕微鏡を用いて詳細に解析し、P5では、従来報告のない網の目状構造が小脳白質から顆粒層通過中の途上線維に認められ、その後、プルキンエ細胞直下で2~3回の枝分かれを形成していることを見いだした。また、P8~12では、各プルキンエ細胞には、太い1~2本の登上線維と細い 2~3本の登上線維がコンタクトしており、線維の太さに強弱を示唆する区別化が生じているほか、多くのループ構造も見いだした。この様な観察から、登上線維形態は、従来考えられていたよりもはるかに高度な形態変化をとげることが明らかとなった。また登上線維—プルキンエ細胞間の Axosomatic synapse で GluR1 の除去がシナプス除去に先行することも明らかにした。

溝口リエゾンのグループは海馬において、新規アクチン結合 PDZ 領域含有タンパク質である Afadin と Nectin が細胞接着因子機構として働くことを見出した。Nectin は、1型、2型、3型のファミリーをなすが、海馬 Mossy fiber-CA3 錐体細胞樹状突起間シナプスでは、Nectin1 型がプレシナプス側に、Nectin3 型がポストシナプス側に左右非対称に局在することを見いだした。また Nectin1 型の機能阻害によって、シナプス形成位置やサイズが変化することや、N-cadherin の変異体の導入によって海馬シナプスのスパインが正常より細長くなることも見出し、細胞接着分子機構がシナプス形成を制御することを世界で初めて実証し

た。さらにシナプス制御に関するシグナル系の解析も行い、Rho がスパインに局在することや、プロスタグランジン D2 が D2 受容体を介して、VLPO 核の活性化を引き起こし、プロスタノイドが神経活動のモジュレーターとして働く可能性なども明らかにした。

(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

高橋リエゾンのグループはシナプス強化に伴い、シナプス膜への AMPA レセプターの組み込みに関する輸送小胞を単離するため、ラット脳のホモジネートを細胞分画遠心法と Iodixanol を用いた密度勾配超遠心法で分画し、タンパク組成の異なる 5 種類の GluR2 含有小胞を分離した。各分画から AMPA レセプターの輸送小胞を精製するため、効率よい免疫沈降能を持つ GuR2、GluR1、NSF を作成し、磁気ビーズを用いた GluR 含有小胞のアフィニティー精製法を確立した。さらに大量精製に用いるモノクローナル抗体を作成し、GluR 含有小胞のプロテオーム解析のための大量精製を進めている。分離した小胞画分をイムノプロット解析した結果、これまで小胞体での輸送に関与していると考えられていた Calnexin が GluR2 含有小胞に含まれていることを明らかにした。

高橋リエゾンのグループは GluR 輸送小胞によるシナプス膜への GluR 組み込み機構や、シグナル伝達による制御機構を明らかにするため、培養海馬神経細胞を用い EGFP や pH 感受性 GFP を利用した小胞動態のリアルタイム解析系を確立した。このアッセイ系を用いることにより、シナプス機能に関する細胞内小胞の局在が PKC を介したリン酸化によって制御されていることを明らかにした。シナプス膜への GluR の組み込みにおける Calnexin の役割を明らかにするため、特異抗体を作成し 培養海馬神経細胞を用いて共焦点顕微鏡による解析を行った。その結果 Calnexin と GluR2 の局在が細胞質内で一致しているばかりでなく、Calnexin は細胞膜にも存在し GluR2 レセプターの一部と共存していることを見いだした。この結果はシナプス膜での Calnexin の局在を調べることにより、現在全く手がかりの得られていないシナプスでの GluR の組み込み部位を明らかにすることが出来る可能性を示しており、免疫電顕解析を開始した。Calnexin/GluR 含有小胞の細胞膜への組み込み制御機構を明らかにするため、培養海馬神経細胞を用いた解析を行い、細胞表面への Calnexin の移行が、NMDA レセプターの活動依存的に変化することを見いだした。

研究成果公表等の状況

課題名（研究代表者）：遺伝子制御による選択的シナプス強化・除去機構の解明（狩野方伸）

【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	0 件	33 件	106 件	139 件
国外	61 件 (11 件)	5 件	15 件	81 件 (11 件)
合計	61 件 (11 件)	38 件	121 件	220 件 (11 件)

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載のこと)

【特許出願等】 3 件 (国内 3 件、国外 0 件)

【受賞等】 1 件 (国内 1 件、国外 0 件)

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテ-71 遺伝子発現と遺伝子産物の選択的配置	サブテ-72 シナプスの選択的除去機構	サブテ-73 シナプス強化と代謝型グルタミン酸受容体	サブテ-74 細胞接着分子と足場蛋白質	サブテ-75 細胞骨格と足場蛋白質	サブテ-76 シナプス膜機能タンパク質の組み込み機構	合計
Cell	29.219						1	1
Science	23.329		1					1
Neuron	14.153		2			1		3
J. Cell. Biol.	12.915					1		1
P.N.A.S. (USA)	10.896					2	1	3
Hum. Mol. Genet.	9.318	1						1
Mol. Psychiatry	8.927						1	1
J. Neurosci.	8.178		3	2	2			7
Mol. Biol. Cell.	7.700					1		1
J. Biol. Chem.	7.258			2		1	3	6
Oncogene	6.737				1			1
EMBO Rep.	6.046					1		1

Mol. Cell. Neurosci.	5.446				2				2
J. Neurochem.	4.834	2						1	3
J. Biomol. NMR	4.636	1				1			1
J. Cell. Physiol.	4.285					1			1
Invest Ophthalmol. Vis. Sci.	4.172						1		1
Eur. J. Neurosci.	3.919	1	1	2	1	1	1	1	7
J. Comp. Neurol.	3.515						1		1
Neuroscience	3.219	1					1	1	3
BBA (Mol. Cell Res.)	3.000							1	1
主要雑誌小計 (Impact Factor)		6 (30.760)	7 (80.088)	8 (49.602)	5 (31.297)	11 (84.689)	10 (85.788)		47 (362.224)
発表論文合計 (Impact Factor)		9 (38.014)	10 (86.843)	9 (51.739)	5 (31.297)	14 (90.878)	14 (95.660)		61 (394.431)