

研究報告書

「機能的神経回路形成の可視化と誘導」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：山田 麻紀

1. 研究のねらい

本研究では、興奮性神経細胞・樹上突起スパイン(興奮性シナプス後部がある棘状の突起)の中から、可塑的变化を起こしたスパインだけを選択的に可視化できるツールの作成を通して、脳活動が記憶や学習につながるルールの解析を目指しました。

2. 研究成果

主要な研究成果についてはまだ公開する段階にないため、主に「非公開の研究成果」に記載します(本項目末5にも一部記載)。1-4は本研究期間中に論文として発表された成果についての説明です。

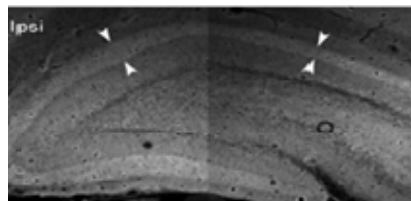
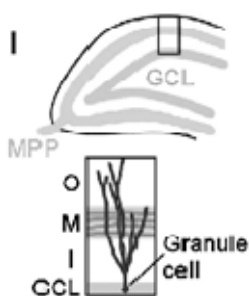
1) 個体の探索活動により可塑的变化を起こしたと考えられるシナプスの率について、スパイン(興奮性シナプス後部がある棘状の突起)の Head size を用いて解析しました。なお、スパイン Head size が神経伝達強度と相関があることはすでにスライスを用いた実験で明らかになっています。スパイン変化は、探索活動 1 時間後に Arc(活動した神経のマーカールとされるタンパク質)発現細胞に選択的に、Head size が大きいものは数%増加する一方で、元々サイズが小さいものでは 10-30%の減少が見られました。この発見は以下の論文に発表し、Must read paper in Faculty of 1000 of Biology (BioMed)にも選ばれました。表題: Experience-Dependent, Rapid Structural Changes in Hippocampal Pyramidal Cell Spines. Kitanishi T., and Yamada M.K., Cereb Cortex. 2009; 19(11): 2572-8.

2) BDNF(脳由来神経栄養因子)は活動依存的に興奮性神経細胞で合成・放出されるタンパク質であり、現在までに多くの役割が解明されてきています。近年、とりわけ、統合失調症や鬱病、発達障害など、多くの疾患との関わりが指摘されています。BDNF には他の類似の Neurotrophin Family 分子との機能的 Redundancy(分子欠損時の代償)が示唆されており、傍証から機能が示唆されている脳部位であっても機能が不明であるケースは多いと考えられます。そこで少量の薬物で Neurotrophin シグナル全てを切り、多量発現 BDNF が少量薬物効果は凌駕して機能するであろうことを利用して、役割を解析する実験系を考案しました。近年、鬱病の治療には歯状回 BDNF が機能するといわれています。歯状回から海馬 CA3 に投射する苔状線維は、生涯新生し続け、新しい回路を形成します。この回路が、既存の情報を担う回路を強化するのか、新しい回路を形成するのか、を理解することは重要であると考えました。そこで培養スライスを用いてこの領域における BDNF の役割を上記の少量薬物投与方法で解析しました。その結果、BDNF は苔状線維の走行に対し束状化を促し、BDNF 発現細胞(活動履歴があり、既存の情報回路を担う状態の細胞と考えられる)とは異なる部位に苔状線維が投射するよう作用していると考えられました。このことは、既存の情報に引き込まれずに全く新しい神経回路ができることがこの領域の BDNF の効果であることを示唆し、鬱病の治療にも新規の神経回路の形成が重要である可

能性を提示します。**表題**: Influence of brain-derived neurotrophic factor on pathfinding of dentate granule cell axons, the hippocampal mossy fibers. Tamura M., and Yamada M.K., Mol Brain. 2009;2(1):2.

3) BDNFを海馬興奮性神経細胞に人工的に発現させる実験において、発現BDNFが、数日後には発現細胞に投射する抑制性神経伝達を強化することを私たちは既に発表しました(Ohba S., and Yamada M.K., Cereb Cortex 2005)。一方、近年、より短い時間でのBDNFの効果についての注目が高まっています。Yuらは神経活動依存に4時間程度の短時間で活動興奮性神経細胞への抑制が強まることを発見し、それがBDNFの効果であることを証明するために、私たちが構築した実験系を使うことを希望したので共同研究を行いました。その結果、神経細胞の活動後4時間での抑制強化もBDNFによるものであり、抑制性終末側に作用する機序が考えられました。本成果は以下のように発表しました。**表題**: Postsynaptic Spiking Homeostatically Induces Cell-autonomous Regulation of Inhibitory Inputs via Retrograde Signaling. Peng ,,, Yamada M.K. and Yu X., **発表先**: Journal of Neuroscience 2010;30: 16220-31.

4) 学習記憶の分子基盤を解析する研究の多くは実験的刺激有無での個体間での比較が主でした。自然な学習により変化する分子の候補を捕らえるためには、できるだけ短時間で記憶ができない状態(loss of function)を作り出して比較する方法がよいと考えました。そこで、脳弓切断という認知症モデルラットでの Differential Screening によって **F-actin capping protein= CapZ** という分子を同定しました。具体的には、片側のみ脳弓切断手術後10日、の海馬(記憶中枢)のタンパク質を各個体の左右海馬(片側が脳弓切断で記憶できない状態と予測)で比較し、二次元電気泳動=2D-DIGEでシグナルが減少しているタンパク質としてCapZをMS解析により同定しました。CapZはF-actin末端をcapし、その固定化や枝分かれを促す分子です。CapZの生体内での発現パターンを詳細に調べますと、海馬CA1の興奮性神経細胞で、CapZは発達している(マッシュルームタイプ)スパインに多いものの、そのなかでも、CapZが検出できるものとできないものが混在していました。近年、F-actinのスパイン(興奮性の後シナプス部)内での増加・固定化は、記憶の素過程といわれるシナプス伝達効率上昇(LTP)と密接に関連している可能性が提唱されていたため、CapZは分子機能上もLTPと関連があると予想しました。そして実際脳内でLTPを起こす刺激を人工的に与えた部位に期待通りCapZが局在することをつきとめました(下図)。この実験からは、CapZは、記憶に伴う長期増強を起こしたスパインに局在するマーカーと期待できます。見方を変えれば、CapZが存在しているスパインは記憶、長期増強



左図:海馬歯状回へのMPPという軸索(左挿絵MPPまたはM部分)のみを強く刺激してLTPを起こさせたラットでのCapZ免疫染色像(右)。LTPを起こした部分に染色強度の高い部分があり(矢頭)、CapZ分子のLTPをおこしたスパインへの集積が考えられる。

の過程に参与している部位であろう、とも言え、他の記憶関連分子の局在解析の核にもなりえます。本研究成果は以下の論文に報告しました。**表題**: Activity-dependent localization in spines of the F-actin capping protein CapZ screened in a rat model of dementia Kitanishi T. ,,, and Yamada M.K.. Genes to Cells 2010;15(7): 737-747.

5) 可塑的变化を起こしたスパイン(シナプス部位)のマーカーとして期待できる分子、CapZ を改変し、EGFP 融合タンパク質とすることで、分子挙動の可視化を可能にしました。さらに Arc7k プロモーターを用いて発現ベクターを作成し、受精卵に注入することにより、EGFP-CapZ トランスジェニックマウスを作成しました。いくつかのマウスラインを選別した結果、最も多いラインでは100 コピー近い EGFP-CapZ が入り発現も高いことが確認できました。トランスジェニックマウス脳切片を高解像度で解析したところ、EGFP-CapZ は多くの場合スパインマーカーの一部と重なる点状の局在を示し、期待通りスパインの一部に局在していると考えられました。

3. 今後の展開

今後は生体内での記憶など神経伝達可塑性との関連解析をいっそう強化し、記憶のメカニズムについて新しい知見を得て早期に論文をまとめます。生化学的な解析とも組み合わせ、記憶の分子メカニズムについても解析を深めていく展望があります。中長期的には、他の、関心を持っていたただけ研究室に開発済みのトランスジェニックマウスを頒布し、広く神経科学領域の発展に資すようにも配慮していく所存です。

4. 自己評価

全く新しいトランスジェニック動物の作成に成功したことから、今後の発展次第では記憶メカニズムに関する重要な発見につながる可能性があります。一般にトランスジェニックマウス作成はリスクが大きいものの、「今後の科学技術に大きなインパクト(新技術の創出、重要問題の解決など)を与える可能性を有している」ことを選考基準とする「さきがけ」のおかげで挑戦的な研究ができたと言えます。終了時点では越えるべきハードルがまだ残っており、期間中にメインの研究成果での論文を発表することができなかったのは大変残念であり反省もしています。さきがけは個人研究であり、自分が実験しないと進まないにもかかわらず、求職活動に力を割いたことなどから研究が思うように進みませんでした。今後の科学振興のためには、制度上の工夫などもあるとよいと思います(例、JST での長期間雇用を保証するなどの方法で、短期間プロジェクトでも即戦力の技術補佐員を確保できる仕組みを作る、公募のあり方の検討等)。

5. 研究総括の見解

脳活動の測定は、測定対象の性質に応じて、種々のレベルで、種々の精度で行われることが望ましい。記憶の形成や消滅にあたっては、単一細胞よりも更に微小なレベル、すなわち、細胞の上にあるシナプスの状態が必須の役割を果たすことが知られているが、その測定手法は未だ、十分とはいえない。本研究では、記憶の形成に際して変化したシナプスを可視化する方法の開発を行った。可塑的变化を起こしたシナプスの選択的可視化により脳活動が記憶や学習につながるルールの解析や機能的神経回路形成誘導を目指すことが可能と考えたからである。このために、分子生物学・細胞生物学的手法を駆使して、新しい蛋白質 CapZ を選択し、それについて

のトランスジェニック動物の作成に成功した。この基盤技術の開発によって、今後の記憶研究が進むことが期待される。また、BMI の使用に伴って必然的に生ずる脳の可塑的变化は、実用上からも倫理上からも極めて重要な要素である。BMI 開発にとって、脳の可塑性は欠かせない要素といえるが、その基礎的な知見が蓄積されることは期待が持たれる。

6. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

▼2010/12/1

著者／発表者: YR. Peng, SY. Zeng, HL. Song, MY. Li, MK. Yamada and X.Yu

表題: Postsynaptic Spiking Homeostatically Induces Cell-autonomous Regulation of Inhibitory Inputs via Retrograde Signaling

発表先: Journal of Neuroscience 2010;30: 16220–31

▼2010/6/1

著者／発表者: T. Kitanishi, J. Sakai, S. Kojima, Y. Saitoh, K. Inokuchi, M. Fukaya, M. Watanabe, N. Matsuki and MK. Yamada

表題: Activity-dependent localization in spines of the F-actin capping protein CapZ screened in a rat model of dementia

発表先: Genes to Cells 2010;15(7): 737–747

▼2009/11/19

著者／発表者: T. Kitanishi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, MK. Yamada

表題: Experience-Dependent, Rapid Structural Changes in Hippocampal Pyramidal Cell Spines

発表先: Cerebral Cortex 2009, Nov;19(11):2572–8. Epub 2009 Feb 24.

▼2009/1/31

著者／発表者: M. Tamura, N. Tamura, T. Ikeda, R. Koyama, Y. Ikegaya, N. Matsuki, MK. Yamada

表題: Influence of Brain-derived Neurotrophic Factor on Pathfinding of Dentate Granule Cell Axons, the Hippocampal Mossy Fibers

発表先: Molecular Brain 2009, Jan 31;2(1):2

(2)特許出願

特になし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

▼2011/9/17

著者／発表者: 山田 麻紀、岡部 繁男

表題: LTP マーカー候補 CapZ の EGFP 融合タンパク質 TG マウスの解析

Transgenic mice for visualizing memory encoding spines using a candidate LTP-marker protein,

EGFP-CapZ

発表先: 神経科学学会年会 Neuro2011

▼2010/9/2

著者／発表者: 山田麻紀、岡部繁男

表題: スパイン関連タンパク質 CapZ の局在の特異性—他分子との局在比較による解析

Unique localization of a spine protein, CapZ, in comparison with other spine-related molecules

発表先: Neuro2010(第33回日本神経科学大会第53回日本神経化学学会大会第20回日本神経回路学会大会合同大会)神戸

▼2008/11/16

著者／発表者: T. Kitanishi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, MK. Yamada

表題: Acute and coordinated spine reorganization in behaviorally activated neurons

発表先: Annual Meeting of Society for Neuroscience 2008, Washington D.C. 239.4