

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19300108
 研究課題名 (和文) 長期記憶の細胞基盤としての鏡像的シナプス新生と廃止
 研究課題名 (英文) Analyses of synapse formation and elimination, the cellular bases of long-term memory, with special attention to their apparent symmetry
 研究代表者
 小倉 明彦 (OGURA AKIHIKO)
 大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
 研究者番号： 30260631

研究成果の概要 (和文)：

本課題の目的は、長期記憶の細胞基盤と想定されている長期シナプス可塑性 (経験により神経伝達の強さが変化し持続すること) の機構を、代表者が独自に樹立した実験系 (長期安定培養下の脳切片) を用いて解明することである。とくに、シナプス新生と廃止を伴う長期的強化と弱화가、その性質の多くの点で鏡像的であることに着目して解析した結果、強化に脳由来神経栄養因子、弱化にその前駆体分子が関わるという、予想通り鏡像的な機構が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to analyze the mechanisms underlying long-lasting synaptic plasticity, the presumed cellular basis of long-term memory, by using the recipient's original system (stable cultures of brain slice). The long-lasting synaptic enhancement coupled with synapse formation and the long-lasting synaptic suppression coupled with synapse elimination are symmetric phenomena in many properties. Taking this symmetry as a clue for solution, the analyses reveal that the enhancement and suppression are mediated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF), respectively. The mechanisms are symmetric indeed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、長期可塑性

1. 研究開始当初の背景

記憶の細胞基盤は、シナプス可塑性にあると想定されている。哺乳類脳におけるシナプ

ス可塑性の解析は、これまで主として摘出海馬の薄切切片を用いて行われてきたが、急性切片は数時間程度しか正常状態を維持でき

ず、真に長期的な可塑性の解析は望めない。当研究室では、長期可塑性の機構解明を目指し、実際に長期可塑性の観察と解析が可能な、独自の系を樹立している。

幼若ラットから摘出・薄切した海馬切片（培養は海馬以外の部位でも可能である）を、培養下で成熟させると、生体内におけるものと等価な神経回路が構築され、数か月以上の長期間維持可能である。

この安定培養下にある海馬切片に対し、急性切片に対して長期増強（LTP; long-term potentiation）を誘発する刺激を加えると、同等な伝達増強が起こるが、このLTPは24時間以内に減衰・消失してしまう。

ところが、LTPを適切な時間間隔（2時間以上24時間以内）をおいて3回繰り返し以上誘発すると、（3回目のLTPもいったん消失した後に）新たなシナプス強化が数日をかけて発達し、その後3週間以上にわたって維持される。このとき、シナプス構造自体の増加、すなわちシナプス新生が伴っていた。当研究室では、この強化を、従来のLTPと区別するためにRISE（repetitive-LTP-induced synaptic enhancement）と名づけ、真に長期維持されるシナプス可塑性の解析モデル系として提唱した（2002）。

当研究室では、さらに次のような現象を発見した。この長期安定培養海馬切片に中頻度刺激または適当な薬物投与を行うと、急性海馬切片と同等な、いわゆる長期抑圧（LTD; long-term depression）が起こる。

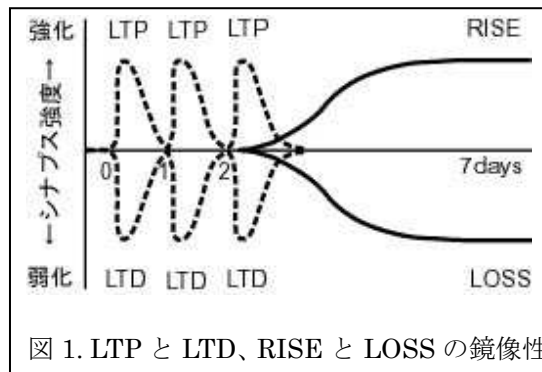
このLTDも、24時間以内に消失してしまうが、LTDを繰り返し3回誘発すると、（3回目のLTDもいったん消失した後に）ゆっくりと新たなシナプス弱화가進行し、その後3週間以上持続する。このとき、シナプス構造自体の消失、すなわちシナプス廃止が伴っていた。当研究室ではこれをLOSS

（LTD-repetition-operated synaptic suppression）と呼んでいる（2005）。【図1参照】

2. 研究の目的

本課題では、RISEとLOSSの成立機構について、その鏡像性（強化・弱化と方向こそ正反対ながら、成立と維持の時間経過、繰り返し依存性、形態的変化の随伴、その他多くの点で相似である性質）を手掛かりにして解明することを、第一の目標とした。

また、この現象が培養切片でのみ起こる特異的な現象ではなく（仮にそうであったとしても、シナプスの可塑性の可能な類型を示すという意義は大きい）、生体の長期記憶の細胞基盤に実際なっていることを動物個体で示すため、これを目標に据えた次の計画に向けて、行動記憶とRISE・LOSSを対比する実験に必要な準備を整えることを、第二の目標とした。



3. 研究の方法

(1) 培養

海馬切片培養は、生後5~7日のラット新生仔より Stoppini の方法に基づいた当研究室の標準法 (Tominaga-Yoshino et al. Neurosci Res 44:357-367, 2002) に従って行った。

海馬の出力先の嗅内皮質をつけて培養する場合には、摘出脳を左右離断後、背側1/2から2/3の間について、厚さ0.4mmの水平断切片を作成し、同様に2週間以上培養した。

(2) 電気生理学

特記しないかぎり、当研究室の標準法にしたがいがい（詳細は Tominaga-Yoshino et al. 2002 参照）、CA3 錐体細胞層に刺激電極を置き、CA1 錐体細胞層ほぼ中央に記録電極を置いて、細胞外記録を行い、興奮性シナプス電位を記録した。

ホールセルクランプの方法は別記した (Tominaga-Yoshino et al. Hippocampus 18:281-263, 2008)。

(3) 電位感受性色素イメージング (VSDI)

既報 (Shinoda et al. Neurosci Res 47:191-200, 2003) によって行った。色素には RH414 または Di-4-ANEPPS を用い、記録は 16x16 高速 photodiode-array によった。

(4) 免疫組織化学

Synaptophysin, drebrin, NeuN などの光顕レベルでの検出は、既報 (Tominaga-Yoshino et al.

2002) に従って、間接抗体法で行った。

電顕レベルの観察は、当研究室の標準法 (Urakubo et al. *Neurosci Lett* 407:1-5, 2006) によった。

(5) 蛍光色素の細胞内注射

組織を 1% paraformaldehyde で仮固定し、CA1 の細胞外記録電極の痕の近傍に Lucifer yellow を充填したガラス微小ピペットを刺入した。細胞内に入ると細胞の輪郭が薄く蛍光を発するので、ここで uA で電気泳動投与する。その後 2% PFA で本固定して、観察に供した。

樹状突起の形態を解析する Scholl-analysis は、UCSD のフリーウェアによって行った。

(6) DNA マイクロアレイ解析

既製 (Agilent 社) のアレイと、協力研究者の青山学院大学田代教授研究室で開発した独自のアレイ (Takahashi et al. *J Neurosci Res* 80:777-788, 2005) を併用した。

(7) リアルタイム PCR 解析

標準的方法に従い、Takara ExTaq と SYBR Green I を用いて、Smart Cycler System 上で増幅した。内部標準には *rpl13a* を利用した。

(8) 免疫ブロット解析

切片全体を lysis buffer で処理し、当研究室の既報 (Taniguchi et al. *Neurosci Lett* 406:38-42, 2006) にしたがって SDS-PAGE にかき、必要に応じて immunoblotting 用に転写した。

(9) 行動解析

成体 C57BL/6 マウスについて、文脈的恐怖条件付けを、当研究室の既報 (Inoue et al. *Neurosci Res* 51:417-425, 2005) に従って行った。

付記: RISE・LOSS への関与可能性を想定した信号系について

BDNF (brain-derived neurotrophic factor; 脳由来神経栄養因子) は、NGF (神経成長因子; nerve growth factor) とならんで、最も早く同定されたタンパク質性神経栄養因子で、とくに中枢神経系での神経生存・分化 (抗 apoptosis、軸索伸長、樹状突起伸展など) に関わることが知られている。単量体の分子量は 14kD で、二量体で機能するが、その mRNA から合成されるタンパク質には分子量 13kD のペプチド鎖が N 端側に先導している。この 27kD の前駆体分子を proBDNF とよぶ。2005 年ころまでの理解では、proBDNF は分泌直後にプロテアーゼによる限定分解を受け、機能型の

mature BDNF (mBDNF) になると考えられていた。いいかえると、proBDNF は mBDNF に適当な立体構造をとらせるうえでの過渡的な不活性 (未活性) 分子とされていた。

しかし、2005 年 B. Lu らは、proBDNF 自体が活性をもつ信号分子である可能性を指摘した。しかもその効果は mBDNF と正反対で、apoptosis 誘発、軸索停止、樹状突起短縮などを誘導する負性制御因子であるとした。Lu らはこれを陰陽作用 (ying-yang effect) と称する。この考えには、当初、proBDNF が mBDNF 相似分子として受容体上で BDNF と拮抗したための dominant negative 作用だという解釈がなされたが、Lu らは、proBDNF が専用の受容体をもつことを示して、dominant negative 作用ではないと主張した。

BDNF には TrkB (tyrosine receptor kinase B) という高親和性受容体が同定されている。しかし、p75^{NTR} という低親和性受容体 (NTR = neurotrophin receptor) も古くから知られており、p75^{NTR} の本来機能が何であるかについては、BDNF、NGF、NT-3 などを含む neurotrophin family 分子を細胞外に係留するとか、作用終了後の回収に関わるとか、いくつかの仮説はあったものの、結論は出ていなかった。Lu らは、この p75^{NTR} が proBDNF (を含む proneurotrophins) の受容体である可能性を示したのである。

本研究では、mBDNF-TrkB 信号系と proBDNF-p75^{NTR} 信号系の陰陽作用を、RISE と LOSS の鏡像効果の分子基盤に想定して、研究を進めた。

4. 研究成果

(1) RISE 誘発因子としての mBDNF-TrkB 信号系

樹状突起伸展作用を含む mBDNF の分化促進効果は、すでに知られている (Alsina et al. *Nat Neurosci* 4:1093-1101, 2001 など)。しかし、これらは数日以上の特続的投与による効果で、実際の脳内で起こるであろうパルス分泌で長期効果が誘導されるかは、確証がない。その点を検証したところ、1 時間のパルス投与では、1 回では短期可塑性のみが起こり、3 回繰り返すことによって初めてシナプス形成を伴う長期に転換された。また RISE は BDNF スカベンジャー (受容体-抗体キメラ) によって抑えられた。(論文発表済)

リアルタイム PCR 定量により、mRNA^{BDNF}の合成量が LTP 誘発を重ねるごとに増すこともわかった。mRNA^{TrkB}の合成量も増す。したがって、その積としての細胞反応は、3 回目に飛躍的に増すと考えられる。(未発表)

(2) mBDNF-TrkB 信号の下流に想定されるエフェクター分子

DNA マイクロアレイ解析によって、LTP の繰り返し誘発後にアクチン制御蛋白の動態が大きく変化することがわかった。cofilin1 や SSH1 など、アクチンを脱重合させる因子が 2 回目に増え、3 回目に減る。いっぽう LIMK や PAK4、Ywhaz などアクチンを重合させる因子は 3 回目に初めて増える。すなわち、2 回の刺激後に再編成の準備がなされ、3 回目の刺激後にアクチン伸長が始まると総括される。(論文発表済)

AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの GluR1 は、シナプス形成期に一過的に発現し、Ca²⁺透過性のある AMPA 受容体を形成する。GluR1 遺伝子の転写は 3 回 LTP 誘発後に増し、GluR1 タンパク質の発現も増した。これと対応するように、生理学的にも RISE 発達期に Ca²⁺透過型 AMPA 受容体が表れる。この機能をクモ毒で阻害すると、RISE 成立が妨げられた。つまり、GluR1 を構成素とする Ca²⁺透過型 AMPA 受容体の出現は RISE の結果であると同時に原因でもある。また、シナプス新生が幼若期にシナプス形成と相同な経過をたどることが(したがって機構の共通性も)示唆された。(学会発表済)

(3) LOSS 誘発因子としての proBDNF-p75 信号系

LOSS 誘発刺激によって proBDNF タンパクの合成が増すことが、免疫ブロット法によって示された。その代謝先である mBDNF も当然増すので、その点では LOSS と RISE は共通である。しかし、LOSS では TrkB は増さず、p75^{NTR}が増した。

そこで p75 を機能阻害性抗体で抑制すると、LOSS の成立は阻害され、むしろ RISE に転換した。(学会発表済)

また、切断部位のアミノ酸を置換して mBDNF に代謝されないように改変した proBDNF を外因的に投与すると、LOSS と相同なシナプス弱化・廃止が起きた。この弱化も p75 機能の阻害により抑制された。このと

き細胞死は起きていない。(論文発表済)

これらから、RISE では mBDNF-TrkB 信号系が、LOSS では proBDNF-p75 信号系が働くとする「鏡像的な」機構が強く示唆される。p75 以降の細胞内信号経路は、LOSS が PKC 阻害剤で抑制されることから、PKC が一つとして想定されるが、確証は今後に持ち越す。

4-1 と 4-3 の成果から、図 2 のような RISE と LOSS の対成立の図式が成立すると考えられる。すなわち、1 つのシナプスで LTP が繰り返し誘発されると、mBDNF/TrkB 信号系が起動してシナプス新生を促すいっぽう、周囲のシナプスに対して proBDNF/p75 信号系を起動してシナプス廃止を促す。proBDNF と mBDNF の差次的作用には、細胞外プロテアーゼの分泌・局在が鍵になると予想される。また、mBDNF は塩基性タンパクで細胞外マトリクスにトラップされやすいが、proBDNF は中性で spill-over しやすいという化学的性状差があり、これが鍵とも考えられる。

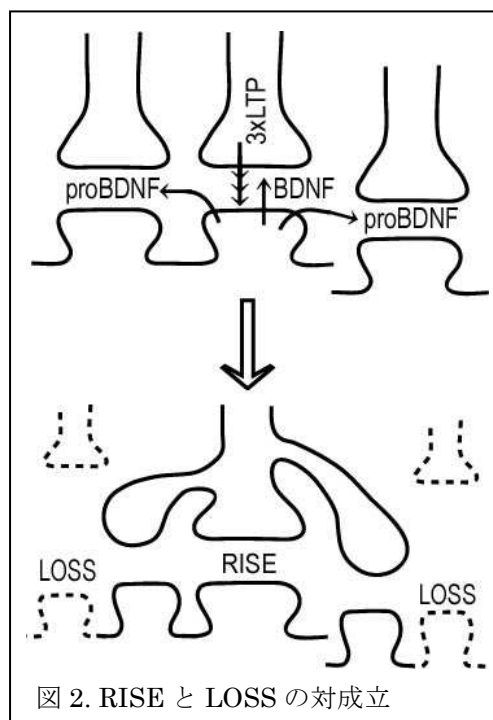


図 2. RISE と LOSS の対成立

(4) RISE の消去

RISE は LTP の長期化ではなく、別個な現象である。LOSS も LTD の長期化ではない。したがって、LTP の繰り返し後に RISE 信号が起動したあと(タンパク質合成阻害剤の効果から LTP 誘発の 6 時間後には起動済みと考えられる)に LTD を起こしても、RISE は抑制されないと予想して、3 回目の LTP の 1 日後に LTD を誘発したところ、意外なこと

に RISE の成立が抑えられた。したがって、RISE と LTD の信号経路にクロストークがあることになるが、解析は今後に持ち越す。(未発表)

(5) 長期記憶の細胞基盤としての RISE の「資格」検討

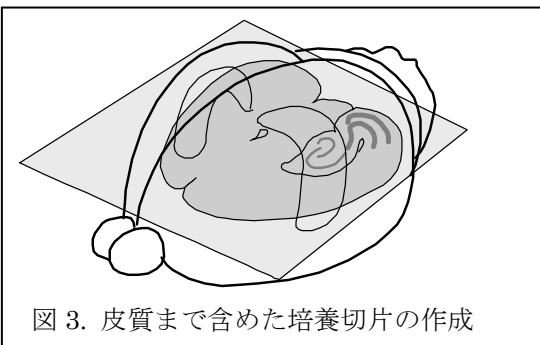
これまで、長期の無菌性維持の必要から RISE/LOSS は切片全体に薬物を投与することで誘発してきたが、RISE/LOSS が生体の長期記憶の細胞基盤であるなら、入力特異性、つまり一部に入力を限ったとき RISE/LOSS もそこに限局して起こることが、必要条件となる。

培養切片にナイフカットを入れて入力経路を二分し、LTP を 2 回目までは forskolin 投与で全体に起こし、3 回目を電気刺激で 1 経路のみに起こして 2 週間後に観測したところ、RISE は 3 回の LTP を経験した部分でのみ起きていることが、VSDI による空間網羅的解析で確かめられた。(学会発表済)

(6) 拡大培養切片における皮質での RISE 相同現象

海馬は記憶の一時貯蔵部位であって最終貯蔵部位ではない。したがって海馬でシナプス新生を伴う長期可塑性が起きるのはおかしい、という批判がある。そこで海馬の出力先皮質までつけた拡大切片培養系の樹立と、皮質での可塑性を検討した。

摘出脳を水平断して拡大培養をつくと、(図 3) 生体内の状況と同等な、皮質浅層→海馬→皮質深層という反響回路が再現することを VSDI で確認した。



次に拡大培養の海馬部に 3 回 LTP を誘発したところ (海馬→皮質の経路に forskolin による LTP は起きない)、2 週間後に RISE 様の伝達強化とシナプス新生が、皮質深層に起きた。これは長期記憶の皮質での長期保存の培養

器内再現であるとともに、情報の移動を細胞レベルで解析できる系がえられたといえる。(学会発表済)

(7) 個体レベルでの記憶情報の皮質移行

RISE/LOSS の生体での意義の確認のため、かつ、ここまで煮詰めてきた RISE/LOSS の細胞内機構仮説を、遺伝子改変動物を用いて実証するため、系をマウスに移す準備を開始した。ラットで起きる現象が、マウスで同条件では必ずしも起こらないことは、過去に多くの例がある (当研究室でも Fujikawa et al. Eur J Neurosci 12:1838-1842, 2000 の例がある)。

C57BL/6 マウスに文脈的恐怖条件づけを施し、最初期遺伝子 Arc の産物タンパク質の免疫組織化学によって、想起時に活動する海馬および皮質ニューロンを可視化した。

その結果、活動するニューロンの分布が、時間の経過とともに変動することが見出された。すなわち、海馬 CA1 領域では獲得時には背側>腹側、1 週間には背側<腹側、2 週間には背側=腹側、海馬と皮質の中継点である海馬台では、獲得時には背側=腹側、1 週間には背側<腹側、2 週間には背側<<腹側。活動部位の背腹差は、すでにここに情報流路ができていたことを意味する。(学会発表予定)

現在皮質での解析が進行中であるが、海馬→皮質への情報移動が確認できれば、4-6 とあわせて、RISE の生理的意義を議論できる系となる。

(8) 他のシナプス可塑性解析系の探索

ラット小脳顆粒細胞の培養系は、活動依存的細胞生存の優れた解析系として知られ、当研究室でも解析している (Tominaga-Yoshino et al. Brain Res 918:121-130,2001 など)。最近、mGluR 刺激によって生存が増強されることを見出し、さらにこれが可塑性相同機構を介する可能性が示唆された (未発表)。

小脳 LTD に関して、GABA 受容体が mGluR と協同的に働いて AMPAR の内在化を増強することを見出した。(論文発表済)

ジストロフィンは、神経筋シナプスにおいてシナプス後構造の維持に重要な役割を果たす構造タンパク質である。神経間シナプスについて示唆をえる目的で、このタンパク質の欠損マウスが示すシナプスの構造の異常について解析した結果、成熟型になれないことを見出した。(論文発表済)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

①Kawaai K, Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Taniguchi N, Kondoh Y, Tashiro H, Ogura A, Tashiro T (2010) Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate. *J Neurosci Res* (in press). 査読有

②Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M (2010) Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* (in press). 査読有

③Koshimizu H, Kiyosue K, Hara T, Hazama S, Suzuki S, Uegaki K, Nagappan G, Zaitsev E, Hirokawa T, Tatsu Y, Ogura A, Lu B, Kojima M (2009) Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Molecular Brain 2:#27* (on line publication). 査読有

④Tominaga-Yoshino K, Urakubo T, Okada M, Matsuda H, Ogura A (2008) Repetitive induction of late-phase LTP produces long-lasting synaptic enhancement accompanied by synaptogenesis in cultured hippocampal slices. *Hippocampus 18*: 281-293. 査読有

⑤Suzuki S, Kiyosue K, Hazama S, Ogura A, Kashihara M, Hara T, Koshimizu H, Kojima M (2007) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) stimulates cholesterol biosynthesis and accumulates presynaptic proteins in lipid rafts: A novel role for BDNF in synapse development. *J Neurosci 27*:6417-6427. 査読有

⑥Kamikubo Y, Tabata T, Kakizawa S, Kawakami D, Watanabe M, Ogura A, Iino M, Kano M (2007) Postsynaptic GABA receptor signalling enhances LTD in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol Lond 585*:549-563. 査読有

[学会発表] (計 18 件)

①Iijima K, Oe Y, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. Is memory transfer reproducible in vitro? A long-lasting synaptic enhancement after repeated LTP induction in cultured brain slice. 36th Intntl Congr Physiol Sci, Kyoto, July 28, 2009.

②Egashira Y, Kojima M, Tominaga-Yoshino K, Ogura A. Possible involvement of proBDNF-p75NTR signals in LTD-repetition operated synaptic suppression, a form of long-lasting synaptic plasticity. 36th Intntl Congr Physiol Sci, Kyoto, July 28, 2009.

[図書] (計 1 件)

①小倉明彦 (2007) 神経伝達物質受容体イオンチャンネル. 生物物理学ハンドブック (石渡信一ほか編) 朝倉書店, pp272-275.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/jp/labo/18/>

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/ogura/home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小倉 明彦 (OGURA AKIHIKO)

大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：30260631

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし