

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19500285
 研究課題名(和文)
 成熟後に外来から誘導された眼優位可塑性の分子・細胞メカニズムについての研究
 研究課題名(英文) Molecular and cellular mechanisms of ocular dominance plasticity in adult induced by serine proteases

研究代表者
 俣賀 宣子(Mataga Nobuko)
 独立行政法人理化学研究所・生体物質分析支援ユニット・支援ユニットリーダー
 研究者番号：20209464

研究成果の概要(和文)：

臨界期後の可塑性を高める手段を分子・細胞レベルで理解するために、臨界期可塑性に必須であるセリンプロテアーゼにより制御されている基質を探索した。その結果、臨界期と成熟後のマウスにおいてプラスミンにより限定分解を受ける細胞外基質や細胞接着分子が見いだされた。なかでもスパインの成熟を抑制するテレンセファリンはプラスミンにより限定分解され、一方、形の可塑性に必要なプラスミンはシナプス形成を促すという興味深い所見が得られた。

研究成果の概要(英文)：

To understand the molecular and cellular mechanisms of ocular dominance (OD) plasticity in adulthood, we explored candidate substrates of serine proteases, which are essential for morphological plasticity. Using mice during and after the CP for OD plasticity, we found proteolysis of extracellular matrix proteins and adhesion molecules including telencephalin (TLCN) by plasmin. Interestingly, telencephalin slowed spine maturation while plasmin enhanced synaptic formation, suggesting that there is a negative correlation between the full-length TLCN and plasmin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：(1) 眼優位可塑性 (2) 臨界期 (3) 興奮性入力 (4) スパイン
 (5) セリンプロテアーゼ (6) テレンセファリン (7) 酵素消化

1. 研究開始当初の背景

ヒトを始めとする哺乳類の感覚系は、誕生

時には未熟であり、中枢性感覚機能は、乳幼児期の外界の環境に適応しながら急速に育まれていく。

一方、大人になると多くの感覚機能の特性を修正することは容易でなくなる。例えば、幼児期に眼帯をして、両目からの入力のバランスを崩したとする（図1、単眼遮蔽、●は閉じていた目を視覚刺激）。1週間後に眼帯を外すと、網膜に異常がないにも関わらず閉じていた目が弱視になっている。なぜなら、大脳皮質・第一次視覚野（以後、視覚野）において、局所神経回路が再構成されて閉じていた目に応答する細胞数が減少するからである（図1左下）。一方、成人に同じ処置をしても、劇的な変化は起こらない（図1右下）。この現象を眼優位可塑性と呼ぶ。

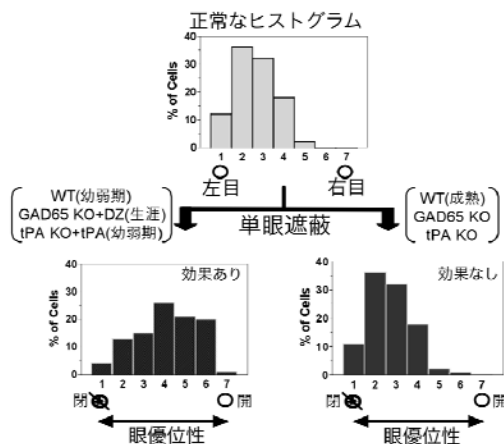


図1. マウスの眼優位ヒストグラム

神経細胞外記録による機能解析

上段：正常なマウスから得たヒストグラム。

下段左：視覚環境に見合った変化

下段右：片目を閉じてもその効果はない

グループ1は、左目のみ、7は右目のみ、2-6は両方の日に応答する細胞数。正常なマウスの場合は、記録と対側側の日に応答する細胞が多い（図では、左目が対側）。

研究代表者は従来ネコやマウスをモデル動物として用い、幼弱期の眼優位可塑性に関わる分子・細胞メカニズムについて研究を重ねてきた。その結果、主に①抑制性神経伝達物質 γ -アミノ酪酸 (GABA) の正常な機能が「臨界期」の開始に欠かせないことが、GABAの合成酵素であるグルタミン脱炭酸酵素 (GAD) のサブタイプ GAD65 を遺伝子欠失変異 (KO) させたマウスを用いた研究から (図1, Hensch, Mataga et al., Science, 1998)、②形態変化を伴うこの可塑性には細胞外セリンプロテアーゼである組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) が必須であることが、その阻害剤や tPA ノックアウト (KO) マウスを用いた研究から (Mataga, Hensch et al. PNAS, 2002; Neuron 2004)、国内外で初めて明らかになった。現在までの学際的研究

から得られた結果は、発達期に生じる内因性の可塑性に興奮・抑制の至適なバランスと、それに続く形の変化、すなわち、tPA によるシナプスの再編成 (スパインの剪定) が不可欠ことを示唆していた。シナプスが再編成されるためには、細胞外の基質タンパク質がセリンプロテアーゼである tPA により酵素分解を受けるのではないかと考えられるが、未だ仮説の域を出ていない。さらに、GAD65 KO や tPA KO マウスの「臨界期」眼優位可塑性の低下のように、幼児期に正常に育まれなかった脳機能を回復する手段を分子・細胞レベルで理解することは、今後の大きな課題のひとつであった。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、幼児期に正常に育まれなかった脳機能を回復する手段として、薬理的に誘導される外来性の脳視覚野・眼優位可塑性を分子・細胞レベルで明らかにすることにある。そのために、臨界期において単眼遮蔽をすることにより生じるスパインの剪定という形の変化に必須である組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) に着目する。すでに研究代表者は、tPA の脳室内投与により、成熟後の tPA KO マウスに眼優位可塑性を惹起できることを確認している。血液線溶系では tPA はプラスミノゲン (Plg) を基質として活性プラスミン (Pln) となり、主にプラスミンが酵素として働くが、脳内の tPA の作用点は明らかでない。そこで脳内における tPA の作用点を多方面から調べることで、これらが外来より可塑性を惹起するか、また、そこに関わる分子群 (基質タンパク質群) を明らかにしていく。

3. 研究の方法

セリンプロテアーゼ (tPA, Pln) により薬理的に誘導される可塑性を分子・細胞レベルで理解するために、大脳皮質視覚野にみられる眼優位可塑性をモデルとした。

(1) 外来性プラスミンによる可塑性の回復

臨界期および60日齢以上の成熟マウス (WT, tPA KO, Plg KO) の片目をハロタン麻酔下で縫合し、同時にtPAあるいはプラスミン (1ug/u1) を脳室内より投与して4-7日後の単眼遮蔽効果の有無を調べた。機能解析には、単一神経細胞外記録を用いた。マウスはネンブタールで麻酔し、記録中は、酸素、笑気ガス、およびハロタンを吸入、体温は37°Cに維持した。視覚刺激には光スリットを用い、眼優位性は7段階に分けて下記の計算式

で評価した。尚、プロテアーゼ活性は不安定なため、脳室内へ1日1回投与した。

Contralateral Bias Index (CBI)
$CBI = \frac{(n_1 - n_7) + (2/3)(n_2 - n_6) + (1/3)(n_3 - n_5) + N/2N}{N}$
N=total number of cells
n_x =number of cells in each ocular dominance group

可塑性の評価計算式

(2) tPA-プラスミンのプロテアーゼ作用

成熟後に外来より誘導される可塑性に関連するタンパク質を知るために、tPAまたはプラスミンにより酵素消化されるタンパク質について視覚野抽出液を用いて調べた。試料には、臨界期および成熟後の野生型およびtPA, Plg KOの視覚野から得られた抽出液を用い、in vitro酵素消化は37°Cにて行った。始めに、酵素消化時間の検討を行い、4時間のインキュベーションで充分タンパク質が消化されていることを確かめた。またプロテアーゼの濃度は、10ng-1000ng/100ug proteinで展開した。目的とするタンパク質は、可塑性との関連が疑われるミエリン、プロテオグリカンを始めとし、細胞接着分子 (NCAM, テレンセファリン、ラミニンなど) に焦点をあてた。解析には、ウエスタンブロット法を用いた。

Perineuronal nets (PNs) は成熟した動物の視覚野・抑制性細胞の周辺に認められるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPGs) を主成分とした細胞外基質である。近年、成熟ラットからPNsを酵素で分解させると可塑性が高まったとの興味深い報告がなされた (Pizzorusso et al., Science, 2002)。一方、研究代表者が以前に行なった成熟後のマウス (野生型、tPA KO) 視覚野の前額断切片 (パラホルムアルデヒド固定) を用いたレクチン染色からは、可塑性レベルとPNs形成には相関がなかった。そこで、本研究ではこの基盤研究の成果を発展させて、PNsの構成成分に違いがあるかどうかをウエスタンブロット法で検討した。

成熟後の可塑性レベルに関与すると思われるもうひとつの候補としてミエリン形成が疑われている (McGee et al., Science)。そこで、tPA KOおよびPlg KOマウスにおいて正常にミエリンが形成されているかどうか

については、ミエリン構成成分の抗体 (MBP, MAGなど) を用い、ウエスタンブロット法および免疫組織化学法にて検討した。

(3) 興奮性入力の変化的変化 (臨界期と成熟後)

研究代表者は、興奮性入力機能解析マーカーとして、グルタミン酸トランスポーター (vGlut1, vGlut2) が有用であることを、先の基盤研究で明らかにした。すなわち、臨界期の単眼遮蔽あるいはテトロドトキシン単眼投与により左右の入力のインバランスを起こすと vGluts の発現が減少し、この変化は神経細胞記録による機能解析結果と一致していた。そこで、成熟後の単眼遮蔽では vGluts の変化が生じるかどうかを確認した。

(4) セリンプロテアーゼとテレンセファリンの関係

本研究において、細胞接着分子 (主にテレンセファリン, TLCN) がプラスミンにより限定分解されることが初めてわかった。そこで当初は成熟後に焦点をあてた研究ではあったが、成熟後に限らずTLCNとプロテアーゼ tPA, Plnの関係を明らかにするために、大脳皮質、および、海馬の培養神経細胞を用いて、形態観察を行った (16-21DIV)。すなわち、興奮性神経細胞の樹状突起上のスパイン成熟を指標とし、プラスミンによりTLCNが限定分解された、あるいは、プラスミン阻害剤投与によりTLCNが蓄積された事により、スパインの成熟度がいかに変化するかを調べた。スパインの成熟度の指標には、vGluts PSD95などを用い、スパインの可視化には、GFP (gap-Venus) を用いた。

(5) マイクロアレイと質量分析を用いた網羅解析

tPA KOやPlg KOマウスの大脳視覚野における遺伝子発現やタンパク質発現を網羅的に比較検討することは意義が大きい。そこで、マウス遺伝子発現用のTORAY社製の3D-Geneを用いて臨界期のWTとtPA KOの比較を行った。視覚野組織から得られたtotal RNAはCy3あるいはCy5でラベル後、3D-Geneにハイブリダイズし、GenePixで蛍光強度を読み取った。得られた画像 (RGB) を数値化して、エクセルを用いた計算処理により発現の差違を調べた。また、臨界期と成熟後のWT, tPA KO, 外来性Plnの投与の有無などの比較検討を始めた。

一方タンパク質レベルの網羅的な解析を続けるために、高感度の質量分析計 (LC-ESI法, LTQ) と安定同位体ラベル法 (iTRAQ) を用いた定量プロテオーム解析を始めた。はじめにHPLCのグラジエントの条件を変え (70min, 240min)、追跡できるタン

パク数の比較検討を WT と tPA KO マウスを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 外来性プラスミンによる可塑性の回復

環境に応じて局所神経回路網を精緻化する大脳皮質視覚野を用い、生後発達期の臨界期可塑性に必須である組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) およびプラスミン (Pln) の役割を、臨界期および成熟後のマウスを用いて研究した。研究代表者は先に神経細胞外記録により、tPA ノックアウト (KO) マウスにおいて、生涯可塑性が低いことを報告している。さらに、成熟後に tPA を外来から投与することで tPA KO マウスの可塑性が高まることを確かめた。そこで tPA の脳内での役割が、血液線溶系と同じであるかどうかを確かめるために、tPA の基質であるプラスミノゲンのノックアウトマウスにおいても同様の細胞外記録を行った。

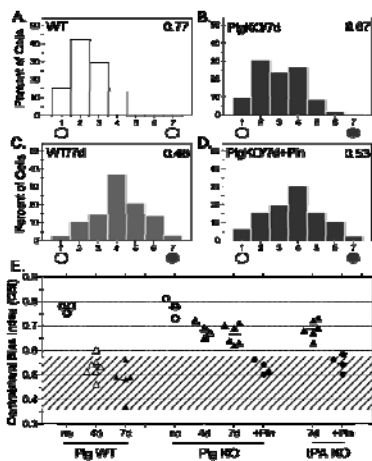


図2. 外来性プラスミンによる可塑性の回復

その結果、プラスミノゲン (Plg) ノックアウトにおいても可塑性レベルが低いこと、また、外来より tPA あるいは Pln を注入することでどちらの KO マウスにも可塑性の臨界期を惹起できることがわかった (図2)。これらの結果から、tPA と Pln はセリンプロテアーゼとして同じ作用点に働き、眼優位可塑性を高めると考えられる。

ベンゾジアゼピンは、臨界期前の未熟なマウスあるいは GAD65 遺伝子を欠損することで臨界期を正常に迎えなかった成熟マウスに臨界期を誘導するが、一度臨界期を迎えた正常な成熟マウスの可塑性を高めることはない。そこで、tPA を成熟後の野生型マウスに投与してみた。残念ながら、ベンゾジアゼピンと同様に外来性の tPA 投与により臨界期可

塑性を経験したマウスに2度目の臨界期を誘導するには至らなかった。

(2) tPA-プラスミンのプロテアーゼ作用

tPA および Plg KO マウスは、幼児期に可塑性という脳機能が正常に発達しなかったモデル動物となることがわかった。また、セリンプロテアーゼとして tPA-プラスミン (tPA-Pln) システムが可塑性レベルを高めることが明らかとなったため、これらの基質となりうるタンパク質について考えた。近年、細胞外構造 Perineuronal nets (PNs) とミエリンが、マウス視覚野の臨界期可塑性終了に関与する可能性が唱えられた。事実、酵素や遺伝子操作によりこれらの構造を破壊すると可塑性は高まる。そこで、これらの候補分子を中心に細胞外構造の構成成分のうち可塑性を反映し、かつ、tPA-Pln により制御を受けているタンパク質の探索を始めた。大脳皮質の抽出液を用いて、tPA-Pln により限定分解を受けるタンパク質を調べたところ、期待より多くのタンパク質が 37°C で4時間以内に分解されることがわかった (図3)。またそのほとんどは tPA ではなく、プラスミンによる酵素消化が必要であることがわかった。

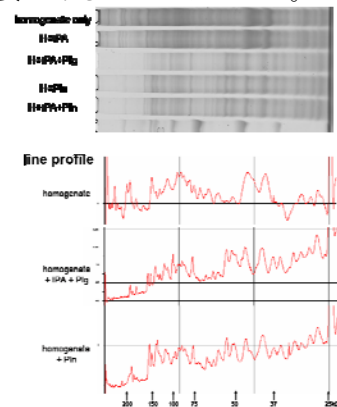


図3. In vitro digestion 法

Pln により分解されるタンパク質は数多い。

さらにウエスタンブロット法からは、野生型 (WT) と tPA KO マウスの視覚野においてミエリン構成成分のうち、発達曲線の異なるタンパク質 (2種) が見いだされた。またプロテオグリカンに関しては、2つのメジャーなプロテオグリカンのうち1つはプラスミンによって消化されなかった。

(3) 興奮性入力の変化的変化 (臨界期と成熟後)

可塑性を分子レベルで評価するためのタンパク質マーカーの詳細を検討した。研究代表者は、先に左右の目からの入力バランスを崩した幼弱マウスを用いて視覚野での興奮性入力を反映するマーカー-vesicular glutamate transporters (vGluts)

を報告した。本研究では、このマーカーが単なる神経活動ではなく、臨界期可塑性のレベルを反映することを、成熟マウスを用いて明らかとした。すなわち、vGlut の発現は臨界期に単眼遮蔽をすると2/3層から減少していくが、成熟後ではこの変化は認められなかった。一方、眼優位可塑性には必須ではないが、その発現が神経活動に依存する転写因子(egr-1)は成熟後も単眼遮蔽により低下していた。そこで、vGlut の変化はシナプスの形態変化と相関があると考え、このマーカーは今後脳高次機能が回復したことを評価するために有用と思われる。

(4) セリンプロテアーゼにより限定分解される細胞外構造

臨界期、および、成熟後のマウス視覚野抽出液(野生型(WT)、tPA KO, P1n KO)を用いて、外来性の tPA または P1n によって酵素消化される細胞外タンパク質があるかどうかを調べた。解析には主に、ウェスタンブロット法を用いた。その結果、細胞接着分子の中で可塑性との関連が予想されているテレンセファリン(TLCN)、NCAM、および、細胞外基質タンパク質であるラミニンが、tPA のみで

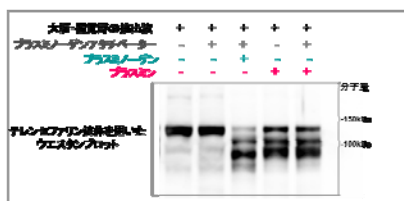
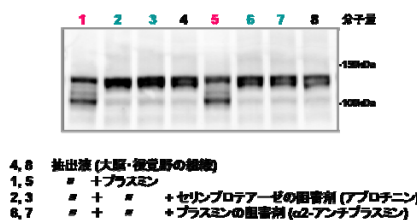


図4. セリンプロテアーゼによる限定分解(テレンセファリン)

は分解されないが、P1n の存在下で限定分解されることがわかった(TLCN, 図4)。

臨界期と成熟後のWT、および、tPA KO, P1n KO など、可塑性レベルの異なるマウスの脳組織を用いても外来性P1nによる酵素消化が認



4, 8 抽出液(大脳・視覚野の組織)
1, 5 # + プラスミン
2, 3 # + # + セリンプロテアーゼの阻害剤(アプロチニン)
6, 7 # + # + プラスミンの阻害剤(α 2-アンチプラスミン)

図5. プラスミンによるテレンセファリンの限定分解は選択的阻害剤によって抑制される

められ、プラスミンの選択的阻害剤でこの限定分解は抑制された(図5)。

この結果は、内因性の tPA により活性化され

た P1n は、臨界期が終了した成熟後の細胞外環境を流動的にすることができる可能性を示唆している。

そこで、眼優位可塑性との関連が明らかになってきた TLCN に関して、リコンビナント TLCN タンパク質を用いて P1n による切断箇所をエドマン解析で決定したところ、細胞外に3箇所あることがわかった。

(5) セリンプロテアーゼとTLCNの関係

細胞接着分子(テレンセファリン, TLCN) が P1n により限定分解されることがわかった。研究代表者の所属チームの研究から、テレンセファリンは可塑性に対してマイナス方向に作用することが明らかになってきた。そこで始めに生体内で TLCN が P1n の基質となるかウエスタンブロット法を用いて調べた。しかし野生型と tPA KO マウス脳組織内には TLCN 限定分解物は殆ど存在せず、単眼遮蔽で可塑的变化を起こしても限定分解物は有意に変化しなかったことから、in vivo でのこれらの関係を証明に至らなかった(限定分解物は脳虚血でのみ顕著に増加した)。

TLCN はスパイン成熟を抑制することがわかっている。そこで成熟後に限らず TLCN と P1n の関係を明らかにするために、細胞レベルでの解析を行った。大脳皮質と海馬の初代培養細胞を用いて興奮性神経細胞の樹状突起上のスパイン成熟を調べた所、P1n を加えることにより TLCN 陽性の未熟なフィロポディアが減少し、樹状突起上にグルタミン酸トランスポーター(vGlut2)陽性の興奮性入力が増加した(図6)。

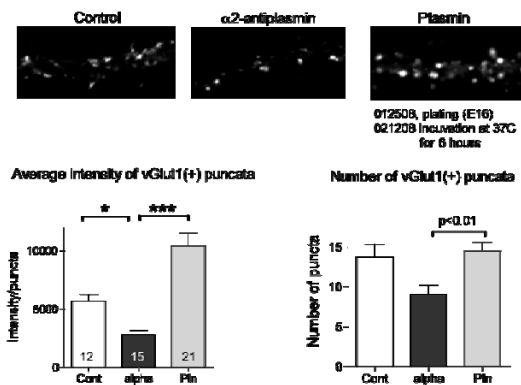


図6. プラスミンによるシナプス形成の促進
大脳皮質の初代培養(18DIV)

この結果は、TLCN が P1n により限定分解されその機能を失い、スパインが成熟したことを示唆している。今回用いた培養細胞は幼弱期(16-21DIV)のものであるが、プラスミンには成熟後のシナプス再編成においても同じ作用があるかもしれな

い。その理由のひとつとして、成熟後の視覚野にも臨界期とほぼ同量のテレンセファリンが存在する。

(6) マイクロアレイと質量分析を用いた解析

最後に、分子レベルで tPA, Plg KO の視覚野における遺伝子やタンパク質の発現を網羅的に解析し始めた。3D-gene マイクロアレイを用いて、野生型と tPA KO の間での比較を行った。興味深いことに、すでに Pln により限定分解される事が明らかとなっている BDNF や、小児自閉症の原因遺伝子として知られる MECP2, GABA や NMDA 受容体の発現制御が異なることわかった。しかし、最近開発されたこのアレイには解析用ソフトウェアがないため、多数のデータを比較することができない。そこで現在、一般に公開されているデータベース (GEO など) にリンクする解析用ソフトウェアの作成を検討中である。

一方質量分析では、HPLC を始め定量プロテオーム解析をするための前処理の検討に時間を要した。先に研究代表者がプロテオーム解析により見いだしたアネキシン VI (未発表) をはじめ、今回 tPA で限定分解することが明らかとなったミエリン関連タンパク質が候補としてあがってきものの、そのリストの殆どは含量の多いユビキタスなタンパク質 (アクチン、チューブリンなど) であり、シナプス部位に存在するような脳特異的なタンパク質が検出できなかった。そこで、現在さらに前処理法などの検討を続けている。

今回の研究全体から、プラスミンを外来から与えることで、正常な臨界期を迎えなかった成熟後の視覚野において眼優位可塑性を高めることができる可能性がでてきた。これはプラスミンがタンパク質分解酵素として働き細胞外環境を流動的にし、新しいシナプス形成を促した結果かもしれない。

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 3 件)

① Mataga, N., (6 名中 2 番目) Automated analysis of dendritic protrusions from reconstructed confocal images, Neuroscience Research, 65 (S1), S144, 2009, 査読無.

② Mataga, N. and Hensch, T.K. Excitatory inputs reflect critical period

plasticity in visual cortex, Neuroscience Research, 61 (S1), S51, 2008 査読無.

③ Mataga, N., Poyer, J., Mori, K., Yoshihara, Y., and Hensch, T.K. Proteolytic cleavage of telencephalin by plasmin in mouse visual cortex, Neuroscience Research, Volume 58 (S1), S190, 2007 査読無.

[学会発表] (計 5 件)

① 俣賀宣子, シナプス可塑性と大脳皮質～可塑性メカニズムの解明～脳科学最前線 2009「階層性と多様性の問題への挑戦」, 2009 年 11 月 25 日, 前橋市。

② 矢野和佳子, 俣賀宣子, 佐藤康平, 大関和夫, 青木義満, ヘンシュ貴雄, スパイン自動画像解析の新しいアルゴリズム, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋。

③ 俣賀宣子, ヘンシュ貴雄, マウス大脳皮質視覚野における興奮性入力の変化は臨界期可塑性を反映する第31回日本神経科学大会, 2008年7月9日, 東京。

④ Mataga, N., Yoshihara, Y., Mori, K., Hensch, T.K, Proteolysis of telencephalin by tissue-type plasminogen activator- plasmin system in mouse visual cortex, 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience. (Neuroscience 2007) 2007, 11, 5, San Diego, U. S. A.

⑤ 俣賀宣子, Poyer, J., 吉原良浩, 森憲作, Hensch, T.K. マウス視覚野のテレンセファリンはプラスミンにより限定分解される, 第30回日本神経科学大会・第50回日本神経化学学会大会・第17回日本神経回路学会大会 (Neuro2007), 2007年9月12日, 横浜。

[図書] (計 2 件)

① 岩井陽一, 俣賀宣子, 生体の科学, 神経活動によって調節される局所GABAA受容体の機能, 61(5), in press.

② 俣賀宣子, ヘンシュ貴雄, JT年刊「生命誌」, 生まれてから変化する柔軟な脳, 53-55, 135-141, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

俣賀 宣子 (Mataga Nobuko)

独立行政法人理化学研究所・生体物質分析支援ユニット・支援ユニットリーダー

研究者番号: 20209464