

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590247

研究課題名 (和文) ニコチンによる海馬シナプスのリモデリング

研究課題名 (英文) Nicotine induces dendritic spine remodeling in hippocampal neuron

研究代表者

田中 秀和 (TANAKA HIDEKAZU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70273638

研究代表者の専門分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：ニコチン・シナプス・可塑性・スパイン

### 1. 研究計画の概要

ニコチンによる依存性形成のメカニズム、なかでも、脳神経回路網のリモデリングについて検討する。

神経伝達物質アセチルコリンの受容体は、主に副交感神経からの伝達を受容するムスカリニック・アセチルコリン受容体と、自律神経節や神経筋接合部での伝達を受容するニコチニック・アセチルコリン受容体の2種類に分けられる。脳内にはこれら両者が存在し、アセチルコリン作動性神経終末から分泌されたアセチルコリンにより制御を受けるとともに、喫煙によって血液脳関門を通過したニコチンの作用点ともなる。

近年分子生物学の進歩により、脳内ニコチニック受容体の実体が同定されてきた。例えば、記憶の座である海馬の錐体神経細胞には、グルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性シナプスが形作られている。海馬興奮性シナプスのシナプス前終末、そしてそこから化学的シナプス伝達を受け取る樹状突起スパイン両側に、ニコチニック・アセチルコリン受容体の一種  $\alpha 7nAChR$  が存在する。これらの  $\alpha 7nAChR$  をニコチンにより刺激することにより、グルタミン酸によるシナプス伝達の効率が修飾される。しかしながらニコチン長期連用による神経回路網のリモデリングについては未知である。そこで (1) ニコチンを長時間作用させることによるスパインの形態変化をとらえる。次に (2) ニコチンによるシナプスのリモデリングが、脳内ニコチニック受容体を介するものかどうかを確認する。続いて (3) ニコチンによるスパインのリモデリングが、グルタミン酸によるシナプス伝達を介するものかどうかを検討する。

さらに (4) ニコチンによるスパインのリモデリングが、いかなる細胞内情報伝達系を介しているか同定する。最後に (5) スパインのリモデリングを引き起こす運動機構が何かを、スパイン内アクチン細胞骨格を最初のターゲットとして突き止める。

### 2. 研究の進捗状況

最初にラット海馬ニューロン (神経細胞) を培養し、それに蛍光蛋白質 GFP 遺伝子導入を行うことで、生きた神経細胞の形態を可視化した。この系により、ニコチン ( $2\text{-}5\ \mu\text{M}$ ) 存在下 60分-120分で、きのこ型をしたスパインの頭部から、細長い形をした、針状の突起が1本から数本伸展する姿の観察に成功した。次にこの現象が、脳内のニコチン性アセチルコリン受容体を介するメカニズムで起きることを、受容体の特異的拮抗薬メカミラミンならびに MLA で確かめた。ニコチン性アセチルコリン受容体は陽イオンチャンネルであり、ニコチン刺激でイオンの流入が起こり、細胞内カルシウム等のセカンドメッセンジャーが動員される。そこで、培養ニューロンに、カルシウム濃度上昇を検出出来る蛍光色素 Fluo4 を取り込ませ、ニコチンへの反応を観察した。以上の実験は、培養ニューロンを用いたものであり、シナプスの周囲は培養液に浸された空間である。しかしながら我々の脳内では、シナプス近傍を星状膠細胞が取り巻いているので、異なる挙動を示す可能性がある。そこで、より生体に近い条件での観察を行うために、脳切片培養法を行った。今後そこに GFP を発現させ、ニコチンによる形態変化を観察する。観察に必要な二光子レーザー顕微鏡システムでの実験を行

うため、岡崎共同研究施設との打ち合わせを行った。以上研究計画5大項目のうち4項目まで達成し、並行して脳スライスなどのより生体に近い実験系での検討も加えた。残り1項目も、期間内に達成したい。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね当初の計画通りに進展している。(理由)当初の研究計画5大項目のうち4項目まで達成し、並行して脳スライスなどのより生体に近い実験系での検討も加えた。残り1項目も、期間内に達成を目指している。

### 4. 今後の研究の推進方策

残りの1項目を完成し、論文発表する。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計8件)

①Yagita Y, Sakurai T, Tanaka H, Kitagawa K, Colman DR, Shan W.  
N-cadherin regulates differentiation of neural precursor cells.  
J Neurosci Res. 87:3331-42 (2009)  
査読有

② Sugiura H, Tanaka H, Yasuda S, Takemiya T, Yamagata K  
Transducing Neuronal Activity into Dendritic Spine Morphology: New Roles for p38 MAP Kinase and N-Cadherin.  
Neuroscientist. 15:90-104 (2009).  
査読有

③ Yasuda S, Tanaka H, Sugiura H, Okamura K, Sakaguchi T, Tran U, Takemiya T, Mizoguchi A, Yagita Y, Sakurai T, De Robertis EM, Yamagata K  
Synaptic Activity-induced Protocadherin Arcadlin Regulates Dendritic Spine Number by Triggering N-Cadherin Endocytosis via TA02 $\beta$  and p38 MAP Kinases.  
Neuron. 56:456-71 (2007).  
査読有

[学会発表] (計3件)

① Tanaka H  
Dynamic roles of proteins in synaptic adherens junction.  
36<sup>th</sup> International congress of physiological sciences, 2009/7/27-8/1, Kyoto

[その他] (計1件)

① 新聞報道  
「学習障害解明に光」  
朝日新聞2007年11月16日科学欄 (ほか各紙) (*Neuron*. 56:456-71 (2007) を紹介)