

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300132

研究課題名(和文) BDNFとproBDNFの陰陽効果による長期シナプス可塑性

研究課題名(英文) Long-lasting synaptic plasticity mediated by yin-yang effect of BDNF and proBDNF

研究代表者

小倉 明彦(Ogura, Akihiko)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：30260631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：記憶を獲得過程と固定過程に分けて考えるとき、前者の機構は海馬長期増強(LTP)と長期抑圧(LTD)というモデル系を利用して理解が進んでいるが、後者の機構は未解明である。私は海馬切片の安定培養を用い、LTPの繰返しによってシナプス新生が、LTDの繰返しによってシナプス廃止が起こることを見出し、これらをモデル系とした解析を提唱している。今回、シナプス新生が神経サイトカインの一種BDNFとその受容体TrkBを介して生じ、シナプス廃止がBDNFの前駆体分子proBDNFとその受容体p75を介して生じすることを明らかにした。一見正反対なシナプスの新生と廃止が、同一の遺伝子で制御されていることになる。

研究成果の概要(英文)：Brain memory is established through 2 steps; acquisition and consolidation, the cellular mechanisms of the former step have been well analyzed using LTP (long-term potentiation) and LTD (long-term depression) as model phenomena for analysis, while those of the latter remain unclear. We previously reported in the stable cultures of hippocampal slice that 3 repeated inductions of LTP and LTD lead to the long-lasting strengthening and weakening of neuronal circuit supported by new synapse formation and elimination, respectively. In the present research, we demonstrated that the synapse formation is mediated by a BDNF (brain-derived neurotrophic factor)-TrkB signaling pathway, while the synapse elimination is mediated by a proBDNF (precursor protein of BDNF)-p75 pathway. Since BDNF and proBDNF are the products of a single gene, the apparently opposite cellular events are regulated by epigenetic regulation, this fact may provoke a paradigm shift in memory research.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・薬理学

キーワード：記憶 シナプス新生 シナプス廃止 BDNF proBDNF 脳切片培養

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類脳における記憶の細胞基盤については、「海馬長期増強現象(LTP)・抑圧現象(LTD)を解析モデル系として、分子機構まで大略解明済みであり、現在はその知見を海馬以外の個別の系に適用して、系ごとの補正を行う精密化段階にある」との見解が広く行われている。しかし本当にそうだろうか。

LTP・LTDは、摘出後薄切した切片標本で解析される場合が大多数で、標本の制約から数時間以上の観測は困難であり、日・週オーダーの長期にわたってシナプスの伝達強化状態が維持されるか否かは、判定できない。

LTP・LTDが、既存のシナプスで即時に起こる伝達強化反応であり、記憶の獲得過程のガラス器内再現として優れたモデル系であることは疑いないが、記憶の固定過程には別の未知の機構がある可能性がある。

一方、日常経験から、記憶の長期保持には課題の反復実行が必要なことはほとんど自明だが、LTP・LTDで記憶のすべてを解釈する立場では、この反復の意義は判然しない。

(2) 上記のような状況の下、平成19-21年度科学研究費補助金基盤研究(B)「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」(代表者：小倉明彦)において、以下のような知見をえた。i) 週オーダー以上の長期間解析可能な培養脳切片において、単発のLTPは24時間以内に消失する、ii) LTPを3回以上反復誘発すると、シナプス新生を伴って数週以上持続する強化(RISE)が成立する、iii) LTDも同様で、単発では24時間以内に消失するが、3回以上反復すると、シナプス廃止を伴って数週以上持続する弱化(LOSS)が成立する、iv) RISE成立には脳由来神経因子(BDNF)が関与する。

これらの結果から、RISEと多くの点で鏡像的なLOSSについて、次のような推論ができる。v) BDNFと鏡像的な作用をもつとされるBDNF前駆体分子が関与するのではないか。vi) BDNFとその前駆体は同一遺伝子の産物であり、遺伝子発現とは異なるレベルで神経機能調節が行われているのではないか。

2. 研究の目的

(1) 上記のように、本課題の第一の目的は「長期記憶成立(記憶固定)の細胞基盤と想定されるシナプス新生現象と廃止現象について、その鏡像的な性質に着目して、BDNFとその前駆体proBDNFの鏡像的效果として説明する」ことである。

(2) BDNFはNGFと並んで1960年代より知られる古典的神経栄養因子の1つだが、最近その前駆体がBDNFと全く正反対の作用をもつ別個の神経制御因子として機能するとする「陰陽仮説」が注目されている。もちろんBDNFとproBDNFは同一遺伝子の産物であり、教科書的にはBDNFは遺伝子発現介して神経機能を制御すると考えられてい

るが、陰陽仮説が正しければ、BDNFによる神経機能制御は発現レベルではなく、その翻訳後調節のレベルで行われることになる。本研究は、陰陽仮説の当否の検討を通じて、BDNF作用のパラダイム転換を促すことを第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス新生仔脳より海馬を摘出し薄切後、多孔膜フィルター上で2週間以上培養して安定を待つ。これを安定培養海馬切片とよぶ。

(2) 安定培養海馬切片にforskolin(FK; アデニル酸シクラーゼ活性化剤)を投与しLTPを誘発する。これを1日1回で3回繰り返してRISEを誘導する。

(3) 安定培養海馬切片にDHPG(代謝型グルタミン酸受容体活性化剤)を投与しLTDを誘発する。これを1日1回で3回繰り返してLOSSを誘導する。

(4) RISE・LOSS誘導刺激時に、BDNFスカベンジャー、TrkB(BDNFの高親和性受容体で、proBDNF低親和性受容体)の遮蔽抗体、p75(BDNFの低親和性受容体で、proBDNF高親和性受容体)遮蔽抗体を投与し、RISE・LOSSの成立への干渉を検討する。

(5) RISE・LOSSの成否は、機能的には細胞外電場電位記録(CA3刺激CA1記録)、形態的にはLucifer Yellow細胞注射による樹状突起棘可視化、によって行う。

(6) その他の実験手法は成果項に個別に記す。

4. 研究成果

(1) 検証すべき仮説は「RISEはBDNF-TrkB経路を経て成立し、LOSSはproBDNF-p75経路を経て成立する」ことである。

(2) 外因的にBDNFを投与すると、RISE様のシナプス強化・新生が成立し、proBDNFを投与するとLOSS様のシナプス弱化・廃止が成立した。

(3) RISE誘導刺激である3回目のLTP誘発の1時間後から(つまりLTPの成立自体には干渉しない時間帯に)BDNFスカベンジャーを投与すると、RISE成立は阻止された。同様に、TrkB遮蔽抗体の投与によってもRISE成立は阻止された。また、LOSSについても、3回目のLTD誘発の1時間後からp75遮蔽抗体を投与するとLOSS成立は阻止された。

(4) しかし、3回のLTP誘発の全てでTrkBを遮蔽すると、単にRISEが阻止されるのではなく、LOSSに変換された。また、3回のLTD誘発の全てでp75の遮蔽を行うと、単にLOSSが阻止されるのではなく、RISEに変換された。

(5) 4の結果は「RISE成立には各回のLTPごとにBDNF信号が関与し、その際TrkBが遮蔽されていればBDNFはp75経路を活性化してLOSSが成立する」、「LOSS成立には各回のLTDごとにproBDNF信号が関与し、その際p75が遮蔽されていればproBDNFは

TrkB 経路を活性化して RISE が成立する」と解釈でき、1 の仮説を支持する。

(6) TrkB 遮蔽抗体の投与時期を様々に振ったところ、BDNF の作用時期には 2 相あることが示唆された。

(7) BDNF は分子量 13.5kD の塩基性蛋白質であるが、生合成時には 12kD の酸性ペプチドを N 端につけた形で作られる。これが proBDNF で、細胞内で(または分泌後に細胞外で; 両説あって未確定)切断される。proBDNF の切断部位を他残基に置換して BDNF に転換できない変異マウスが作られた。連携研究者(産業技術総合研究所、小島正己博士)よりこの変異マウスの提供を受け、以下の実験を行った。

(8) 変異マウスより作成した安定培養海馬切片(培養自体は可能で、細胞数は正常)に FK を 3 回投与しても RISE は成立しなかった。この操作で LOSS が成立することもなかった。

(9) FK と同時に外因的に BDNF を投与すると、RISE が成立した。すなわち、変異マウスはシナプス新生を行う能力自体を欠くわけではなかった。

(10) DHPG の 3 回投与は LOSS を誘導しなかった。変異マウスの培養海馬切片のシナプス電位は対照群に比べて小さく、すでに LOSS 様状態にあり、そのためさらなる LOSS 誘導がオクルードされたとみられる。なお、DHPG による LTD 自体は誘発可能だった。

(11) 8~10 の結果は 1 の仮説をより強固にするものである。

(12) これまで海馬 CA1 領域を検討対象としてきたが、海馬別領域および海馬外皮質についても RISE 様シナプス強化・新生が起こるかどうか検討した。その結果、海馬 CA3 領域では、CA1 領域を切除した場合がぎって類似の強化が成立した。また海馬の出力先である嗅内皮質について検討すると、RISE 様の強化が成立したが、このとき CA1 での強化は消失した。この結果の解釈は未確定だが、最終的強化は神経回路内のいずれか 1 か所(経路の終点?)でのみ成立する可能性がある。

(13) RISE 成立の際には、幼若型 AMPA 受容体(CP-AMPA)の一過的発現と機能が重要なことがわかっている。RISE の生理的意義を知るため、マウスに恐怖条件づけを行い、その後に CP-AMPA 阻害剤を脳室内投与したところ、すくみ反応の時間を指標として、1 日後の記憶には影響がなかったが、1 週間後の記憶に低下がみられた。この結果は RISE が個体の記憶と関連していることを強く示唆する。

(14) 総合的な結論として、「記憶固定過程の新規解析モデル現象 RISE は、BDNF-TrkB 経路を経て成立し、LOSS は proBDNF-p75 経路を経て成立する」とする仮説が立証された。また、その結果「BDNF の神経機能制御は発現レベルではなく翻訳後調節レベルでなされる」ことが示唆された。

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 8 件)

- 1 Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. (2011) Local establishment of repetitive-LTP-induced synaptic enhancement in cultured hippocampal slices with divided input pathways. *J. Neurosci. Res.* 89, 1419-1430. 査読あり
- 2 Ohira, Y., Matsuoka, Y., Kawano, F., Ogura, A., Higo, Y., Ohira, T., Terada, M., Oke, Y. & Nakai, N. (2011) Effects of creatine and its analogue, beta-guanidinopropionic acid on the differentiation and nucleoli in myoblasts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 75, 1085-1089. 査読あり
- 3 Ohira, T., Wang, X. D., Terada, M., Kawano, F., Nakai, N., Ogura, A. & Ohira, Y. (2011) Region-specific responses of adductor longus muscle to gravitational load-dependent activity in Wistar Hannover rats. *PLoS ONE* 6:e21044 (on line publication). 査読あり
- 4 Shimada, T., Takai, Y., Shinohara, K., Yamasaki, A., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A., Toi, A., Asano, K., Shintani, N., Hayata-Takano, A., Baba, A. & Hashimoto, H. (2012) A simplified method to generate serotonergic neurons from mouse embryonic stem and induced pluripotent stem cells. *J. Neurochem.* 122, 81-93. 査読あり
- 5 Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Hasegawa, S. & Ogura, A. (2013) Dendritic spine dynamics in synaptogenesis after repeated LTP inductions: Dependence on pre-existing spine density. *Sci. Rep.* 3, 1957 doi:10.1038/srep01957 (on line publication). 査読あり
- 6 Sakuragi, S., Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. (2013) Involvement of TrkB- and p75^{NTR}-signaling pathways in two contrasting forms of long-lasting synaptic plasticity. *Sci. Rep.* 3, 3158 doi:10.1038/srep03158 (on line publication). 査読あり
- 7 冨永恵子, 小倉明彦 (2013) 長期記憶の細胞機構解明を目指して. *日薬理誌*, 142, 122-127. 査読あり
- 8 小倉明彦, 冨永恵子 (2014) 記憶固定の細胞生物学. *科学*, 83, 256-262. 査読なし

[学会発表](計 21 件)

- 1 Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Input-pathway specific establishment of

- repetitive-LTP-induced long-lasting synaptic enhancement in cultured hippocampal slices. IBRO World Congress of Neuroscience (Florence) 2011.7.
- 2 浦久保知佳、河合克宏、小倉明彦、冨永吉野恵子; 長期可塑性成立過程のシナプス形成とAMPA受容体GluR1サブユニットの動向. 日本神経科学学会(横浜)2011.9.
 - 3 大江祐樹、冨永吉野恵子、小倉明彦; 新規スパインの形成は樹状突起のスパイン密度に依存する. 日本神経科学学会(横浜)2011.9.
 - 4 川上拓宏、小倉明彦、冨永吉野恵子; 大脳皮質における海馬依存的な記憶固定のインビトロ再現の試み. 日本神経化学会(石川)2011.9.
 - 5 桜木繁雄、冨永吉野恵子、小倉明彦; 切片培養での長期シナプス増強におけるBDNF放出の関与. 日本神経化学会(石川)2011.9.
 - 6 Nakamura, E., Ogura, A. Tominaga-Yoshino, K.; Dorsoroventral bias of active neuronal population as an index of information transfer related to memory storage. Society for Neuroscience (Washington DC) 2011.11.
 - 7 Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Changes in gain and loss of dendritic spines after repeated LTP induction. Society for Neuroscience (Washington DC) 2011.11.
 - 8 長谷川卓也、森田大樹、志賀千明、冨永吉野恵子、小倉明彦; ラット小脳顆粒細胞の生存に対する橋核の影響:代謝型グルタミン酸受容体の関与. 生理研研究会(岡崎)2011.12.
 - 9 長谷川卓也、小倉明彦、冨永吉野恵子、志賀千明; 培養ラット小脳顆粒細胞の生存に対する共存橋核の影響と代謝型グルタミン酸受容体の関与. 日本生理学会(松本)2012.3.
 - 10 浦久保知佳、河合克宏、小倉明彦、冨永吉野恵子; Ca透過型AMPA受容体の阻害はスパイン新生と長期可塑性をともに抑制する. 日本生理学会(松本)2012.3.
 - 11 桜木繁雄、冨永吉野恵子、小倉明彦; 海馬培養切片での長期シナプス可塑性におけるBDNF-TrkB信号経路の関与. 日本神経科学学会(名古屋)2012.9.
 - 12 有賀理瑛、谷本浩亀、冨永吉野恵子、小倉明彦; 苔状線維-CA3間シナプスで繰り返し長期増強の誘発が引き起こす長期シナプス強化の可能性. 日本神経化学会(神戸)2012.9-10.
 - 13 Sakuragi, S., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Involvement of the BDNF-TrkB signaling pathway in the long-lasting synaptic plasticity in hippocampal slice cultures. Society for Neuroscience (New Orleans) 2012.11.
 - 14 桜木繁雄、冨永吉野恵子、小倉明彦; 繰り返しLTP・LTD誘発後のシナプス新生・廃止現象とBDNF・proBDNFシグナリング. 生理研研究会(岡崎)2012.12.
 - 15 長谷川翔、大江祐樹、冨永吉野恵子、小倉明彦; 繰り返しLTD誘発後の長期持続的シナプス減弱におけるスパイン動態. 日本生理学会(東京)2013.3.
 - 16 桜木繁雄、冨永吉野恵子、小倉明彦; BDNFとその前駆体分子の作用による対照的な長期可塑性. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会(京都)2013.6.
 - 17 長谷川翔、大江祐樹、冨永吉野恵子、小倉明彦; 繰り返しLTD誘発後の長期持続的シナプス減弱での海馬錐体細胞樹状突起の動態. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会(京都)2013.6.
 - 18 有賀理瑛、冨永吉野恵子、小倉明彦; 苔状線維CA3間シナプスで繰り返し長期増強の誘発後に生起する可塑的变化. 日本神経科学学会・日本神経化学会合同大会(京都)2013.6.
 - 19 Hasegawa, S., Oe, Y., Tominaga-Yoshino, K., Ogura, A.; Asymmetric dendritic spine dynamics in the apparently symmetric long-lasting synaptic plasticity phenomena after repeated LTP/LTD inductions. Society for Neuroscience (San Diego) 2013.11.
 - 20 長谷川翔、冨永吉野恵子、小倉明彦; 繰り返しLTD誘発後の長期持続的シナプス減弱(LOSS)生起時の樹状突起棘の動態. 生理研研究会(岡崎)2013.12.
 - 21 永岡昭吾、浦久保知佳、冨永吉野恵子、小倉明彦; RISE(繰り返しLTP誘発後の長期シナプス強化)の生理的意義:個体での検討. 日本生理学会(鹿児島)2014.3.
- 〔図書〕(計 3件)
- 1 小倉明彦、冨永恵子「記憶の細胞生物学」朝倉書店 2011
 - 2 Tominaga-Yoshino, K. & Ogura, A. An in vitro model for analyzing the conversion of short-term to long-term memory. In “Short-Term Memory: New Research” Eds Kalivas, G. & Petralia, S. F., Nova Science Pub., New York. 2012
 - 3 小倉明彦 記憶と夢の仮説. 近藤寿人編「芸術と脳」大阪大学出版会 2013
- 〔産業財産権〕
○出願状況(計 0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小倉明彦 (Akihiko Ogura)

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

富永恵子 (吉野恵子) (Keiko

Tominaga-Yoshino)

大阪大学 大学院生命機能研究科・准教授

研究者番号：60256196

(3)連携研究者

小島正己 (Masami Kojima)

(独)産業技術総合研究所 関西センター
セルエンジニアリング研究部門・グループ長

研究者番号：40344171