

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500344

研究課題名（和文） 開口放出レベルでの神経栄養因子の分泌制御

研究課題名（英文） Regulation of neurotrophin secretion by exocytosis

研究代表者 松田 尚人

(MATSUDA NAOTO)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：40313100

研究成果の概要（和文）：脳由来神経栄養因子(BDNF)分泌と生理的神経回路の機能変化を解明するために、生体に近い実験系で BDNF 分泌をイメージングする。①ゼブラフィッシュの BDNF 相同遺伝子に基づく分泌プローブを新たに作製したが、ゼブラフィッシュ稚魚の視覚系神経細胞では軸索や樹状突起に蛍光の局在を認めず、当初の目標である光刺激による分泌の観察はできなかった。②マウス海馬にレンチウイルスや電気穿孔法で BDNF 分泌プローブを発現させ、脳スライスで BDNF 分泌と記憶形成の関係を解明する実験系の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）： We aimed to establish experimental systems to observe BDNF secretion in living animals to elucidate the changes in brain functions associated with BDNF secretion. (1) We tried to express BDNF-pHluorin based on the zebrafish homolog in the visual system of living zebrafish larvae. However, we failed to observe significant fluorescence of BDNF-pHluorin. (2) We successfully expressed BDNF-pHluorin in the mouse hippocampus by lentivirus or electroporation, which enables us to investigate BDNF secretion in relation to memory formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学 神経栄養因子 開口放出

### 1. 研究開始当初の背景

脳由来神経栄養因子 BDNF は発生期のシナプス形成と生後シナプスの可塑的变化に重要な働きをする分泌蛋白質であり、その活動依存的な分泌はシナプス機能調節に重要な役割を果たしている。しかし、BDNF の小胞からの分泌と拡散を直接可視化し、解析した研究

は未だなかった。申請者は、世界に先駆けて BDNF の分泌過程を可視化するプローブ (BDNF-pHluorin) を開発し、海馬あるいは大脳皮質神経細胞の初代分散培養を用いて、BDNF の分泌過程を全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRF、エバネセント場蛍光顕微鏡) で観察した。この実験システムを用いて、BDNF を含有する分泌小胞 (有芯小胞 dense core

vesicles)が刺激に対して軸索と樹状突起で異なる開口放出様式を示すことを見出した。

①樹状突起では、低頻度刺激からシナプス長期増強を誘発しうる高頻度刺激まで広い刺激条件下で、BDNFを含む分泌小胞が細胞膜と融合細孔(fusion pore)を形成した後、その径が拡張し、最終的には細胞膜と完全に融合することにより BDNF を含む小胞内容物が細胞外に放出され、拡散してゆく様子が観察された。対照的に、軸索では融合細孔がすぐに閉じてしまい、小胞が BDNF 分子を保持したままエンドサイトーシスされた。シナプス小胞では、前者は“full-collapse fusion”、後者は“kiss-and-run”と呼ばれ、分子量が 150 Da のグルタミン酸はいずれの場合においても小胞から放出されシナプス伝達が起こる。しかし、BDNF 単量体は大きさが  $6 \times 2.5 \times 1.5$  nm と推定され、“kiss-and-run”時に形成される融合細孔の径( $\sim 1.4$  nm)より大きいために、“kiss-and-run”タイプの開口分泌では放出されないと考えられた。

②高頻度刺激を 1 分以上続けると軸索からも BDNF が分泌されうることを観察したが、この恐らく病的な神経活動下では分泌調節機構が破綻し、貯蔵されている BDNF が細胞のあらゆる部位から「漏れ出す」と考えられ、生理的な環境では軸索からの BDNF 分泌が積極的に抑制されていることを示唆した。

培養神経細胞で観察された開口放出様式の選択による分泌制御が生体でも同様に見られるのか、その制御がどのような生体機能に使われているのかは、明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

脳由来神経栄養因子 BDNF はシナプス可塑性に重要な分泌蛋白質であるが、BDNF シグナルのオンオフ制御に関してはほとんど知られていない。本研究では、シナプス可塑性に伴う BDNF の分泌源と分泌を引き起こすための生理的な刺激条件を探索する目的で、マウス海馬神経細胞初代培養系に代わる、より生理的な刺激法を開発する。

一つの有効候補として、ゼブラフィッシュ視覚系で BDNF 分泌を可視化する実験系を確立する(図 1)。具体的には、ゼブラフィッシュの感覚中枢(視蓋)を BDNF 分泌の *in vivo* 解析の対象とし、

①BDNF プローブをゼブラフィッシュ視蓋で発現させ、網膜への直接電気刺激や生理的な光刺激により BDNF の分泌源を探る。

②種々の薬理学的実験や分子操作により、軸索と樹状突起で異なる開口放出様式を可能

にする分子機構と刺激分泌連関のメカニズムを解明する。

③異なる感覚様式(視覚と体性感覚)の刺激を与え、樹状突起で入力特異的な BDNF 放出が観察されるか、それが生体にとってどのような機能発現をもたらすのかを探索する。

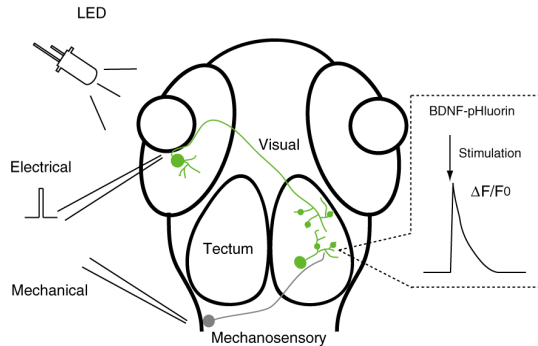


図 1 光、電気、機械刺激によるゼブラフィッシュ網膜神経節細胞軸索と視蓋神経細胞樹状突起における BDNF 開口放出の誘発

この研究の成果は、BDNF 分泌異常との関連が示唆されている精神神経疾患の病理解明と新規治療法の新たな作用点を提供しうる。

## 3. 研究の方法

### (1) ゼブラフィッシュ胚での BDNF プローブ発現システムの構築

ゼブラフィッシュ感覚中枢視蓋で BDNF 分泌プローブを発現させ、網膜への電気刺激や光刺激により視神経軸索や視蓋神経細胞樹状突起からの BDNF 分泌を生体レベルで可視化する実験系を確立する。この実験系を用いて、軸索と樹状突起で BDNF の分泌を引き起こすための刺激必要条件を探索する。開口放出とエンドサイトーシスを薬理的・分子生物学的に変調させ、BDNF 分泌に与える影響を解析し、分泌制御の分子機構に迫る。分泌された BDNF プローブの拡散範囲を免疫組織学的手法などにより推定し、BDNF シグナルと可塑的变化のシナプス特異性を検討する。異なる種類の入力刺激(体性感覚刺激)による BDNF 分泌誘発も試み、入力特異性やスパイクタイミングとの関連性についても検討する。

すでに予備的実験により網膜神経節細胞と視蓋神経細胞特異的な発現を可能にするプロモーターを単離しており、これらの細胞に GFP 蛋白を発現させることに成功している。これらのプロモーターと BDNF プローブ遺伝子をつなぎ、発現ベクターを構築する。これをゼブラフィッシュ受精卵に微量注入することで、「ただらに」BDNF プローブを発現するゼブラフィッシュ胚を作製する。受精後 4

～5日には網膜視蓋投射は完成するので、この時期に視蓋を観察すればシナプス前部と後部でBDNF分泌プローブのイメージングが可能である。

pH感受性の異なる2種類のBDNF分泌プローブを用いることで開口放出の様式を推定する。pH依存性BDNF-pHluorinでは、刺激により蛍光は瞬時に一過性に上昇し、融合細孔形成の検出器として働く。一方、pH低感受性BDNF-GFPでは、小胞内の絶対量を反映して分泌の有無により蛍光輝度は増減する総量検出器として働く。すなわち、BDNF-pHluorin蛍光が刺激の瞬間に上昇しBDNF-GFP蛍光に変化が認めなければ、kiss-and-runタイプである。BDNF-pHluorin蛍光が刺激の瞬間に上昇しBDNF-GFPの蛍光が減少すれば、放出を伴うfull-collapseである。このストラテジーの有効性は、培養神経細胞を用いた先行研究で確認している。厚みのある生体試料ではTIRFを用いた高信号雑音比イメージングは不可能であるが、上記の2種類のプローブを用いて蛍光強度の秒単位の時間変化を比較することにより、開口分泌の様式を推定することが可能となる。

BDNF分泌プローブが正しく分泌小胞に局在していることを、Secretogranin IIなどのマーカーとの共染色により確認する。BDNF-pHluorinが小胞内で酸性環境により蛍光が減弱していることを、細胞外液に塩化アンモニウムを加えることでH<sup>+</sup>濃度勾配が壊れ、蛍光の上昇が見られることにより確認する。

## (2) 視覚刺激による分泌誘発

レンズを除去した眼にガラス電極を刺入し電気刺激を行うか、網膜に光刺激を行うことで視神経に活動電位を誘発する(研究業績4)。視神経の高頻度電気刺激や反復光刺激によりシナプス後部にも活動電位を誘発しうることがわかっている。このような刺激条件下に、視神経軸索終末および視蓋神経細胞の樹状突起でBDNF含有小胞の開口放出による蛍光輝度の上昇が認められることを観察する。刺激が活動電位を誘発していることは、BDNFプローブ発現細胞にFura-2やOregon Greenなどをロードし、細胞体のカルシウムイメージングで確認する。

視覚刺激により生体でも軸索と樹状突起で分泌様式が異なることが再現されれば、さらに他の感覚様式(体性感覚)刺激を試み、分泌制御の分子機構を解明する。もし、軸索と樹状突起での分泌様式の相違が明らかでなかった場合、抗GFP抗体による定量的免疫組織染色によりシナプスでのBDNFプローブ

の増減の検出を試み、軸索と樹状突起での分泌を推量する。

BDNF分泌と拡散範囲の免疫組織学的検証  
分泌されたBDNFプローブが遊離され拡散した範囲を、BDNFプローブのイメージング実験後に固定した標本において抗GFP抗体で推定する。このプローブがTrkB受容体を活性化することは先行実験で示したが、実際に生体内でTrkBシグナルがオンになったかどうかは薬理的阻害実験あるいはTrkBシグナルの下流にあるCREBのリン酸化で証明する(Kuczewski et al., J. Neurosci. 28:7013-7023, 2008; Fiorentino et al., J. Neurosci. 29:11650-11661, 2009)。

## (3) 樹状突起における入力特異的なBDNF分泌

視蓋には視覚と体性感覚が層特異的に入力していることが知られている。ゼブラフィッシュ胚に接触刺激や振動刺激による体性感覚入力を与え、視蓋神経細胞でBDNF-pHluorinの蛍光上昇を観察する。ある視蓋神経細胞が視覚にも体性感覚にも反応すれば、同時刺激時あるいは種々のスパイクタイミングでの刺激条件下で、2つの異なる入力BDNF分泌に対し相加的に作用するのか、相乗的に働くのかなどを解析する。

## (4) BDNF分泌制御のメカニズム

さらにエクソサイトーシスとエンドサイトーシスを薬理的あるいは分子生物学的手法で抑制あるいは活性化し、BDNF分泌制御を司る分子メカニズムへと切り込んでゆく。カルシウム結合小胞蛋白質Synaptotagmin IVがBDNF遊離を抑制する(Dean et al., Nat. Neurosci. 12:767-776, 2009)という報告があり、小胞周辺のマイクロドメインでのカルシウム動態の差が開口放出様式の違いを生んでいる可能性がある。カルシウムキレート剤(BAPTA, EDTA)、エンドサイトーシスの阻害剤(dynasore)、小胞SNARE蛋白のノックダウンなどで鍵分子を探索する。

## 4. 研究成果

(1) 研究室を異動し、ゼブラフィッシュ飼育施設やインジェクション実験設備の立ち上げを行った。

(2) マウス型BDNF-pHluorinプローブのゼブラフィッシュでの発現

①これまで用いてきたマウス由来のBDNF分泌プローブをゼブラフィッシュの視覚系(網

膜神経節細胞および視蓋神経細胞) 特異的に発現させ、蛍光実体顕微鏡ならびに共焦点顕微鏡で観察を行った。同時に注入した赤色蛍光タンパクの発現は認めたものの、BDNF 分泌プローブはゼブラフィッシュでは期待された発現様式を示さなかった。すなわち、細胞体のみプローブ由来の緑色蛍光を観察し、樹状突起や軸索上には局在しなかった。

### (3) ゼブラフィッシュ型 BDNF-pHluorin プローブの作製

①マウス由来 BDNF-pHluorin が期待通りの発現が見られなかった原因として、タンパクのソーティングに重要な役割を果たす BDNF 前駆体のシグナル配列が異なることが考えられた。そこで、ゼブラフィッシュの BDNF ホモログをクローニングし、ゼブラフィッシュの BDNF 分泌プローブを作製した。しかし、視覚神経では蛍光を認めることができなかった。

②視神経特異的プロモーターが弱く、発現量が充分でない可能性を考慮し、Tet システムや Gal4 システムの発現誘導システムを導入した。薬剤による発現増強は見られたものの、視神経や視蓋細胞の軸索や樹状突起に蛍光顕微鏡で観察可能な蛍光を認めなかった。

③先行実験により BDNF プローブは TrkB 活性化能を持つことが明らかになっており、受精卵への微量注入法による過剰発現がゼブラフィッシュ胚の初期発生異常を起こす可能性が考えられたが、初期発生は正常に認められた。

### (4) マウス脳での BDNF 分泌プローブの発現

マウスやラット由来の培養神経細胞ではマウス型 BDNF-pHluorin は発現することがわかっているため、マウス脳での BDNF 分泌イメージングに発展させることも検討した。

特に、記憶形成に重要な海馬はその神経回路網がよく研究されており、記憶の実体とされるシナプスの長期増強と BDNF 分泌の関連を明らかにすることで、研究目標を達成することは可能である。したがって、マウス海馬スライスで BDNF プローブを発現させ、空間記憶形成の際に生体で観察されるシータバーストで電気刺激を行うことを第2の目標とした。

①マウス胎児脳で電気穿孔法により BDNF プローブを遺伝子導入し、生後成獣脳からスライスを作製し、プローブの発現を確認した。

②BDNF-pHluorin をマウス成獣の脳で発現さ

せるために、レンチウイルスベクターの作製を行った。脳定位固定装置により、海馬を狙ってレンチウイルスベクターを微量注入する方法を導入した。コントロールとして GFP を発現するレンチウイルスを作製し、注入するウイルスの効力と注入量、注入部位における脳組織損傷の度合いを検討した。

③引き続き、マウス脳で BDNF の分泌を引き起こす生理学的刺激条件による BDNF-pHluorin の蛍光変化を観察する。

### (5) 微小タグ型 BDNF 分泌プローブ

pHluorin の分子量は 27 kDa であり、成熟型 BDNF は 14 kDa であるため、相対的に分子サイズが大きい pHluorin が融合しているため、ゼブラフィッシュの神経細胞で細胞内輸送が阻害され、軸索や樹状突起で BDNF-pHluorin が観察されない可能性が考えられた。

したがって、微小タグ型の BDNF 分泌プローブの開発に取り組んだ。pHluorin を数アミノ酸の小さなタグに置換し、内在性 BDNF とほぼ分子量が同じ新規分泌プローブを作製した。蛍光物質を外来性に添加することにより、微小タグが蛍光を発し、BDNF の挙動をより正しく観察されると期待した。HEK293T 細胞株や初代培養海馬神経細胞で発現を確認した。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 尚人 (MATSUDA NAOTO)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：40313100