

平成 17 年生理学研究所シナプス研究会プログラム 「シナプスの一生：誕生・維持・除去過程の統合的理解に向けて」

12 月 1 日(木) PM1:00–12 月 2 日(金) PM12:45 於 生理学研究所 一階会議室
世話役：柚崎 通介(慶應大医 生理 I) 所内世話役：重本 隆一(脳形態解析研究部門)

セッション 1 (12/1 PM1:00–3:30) 「シナプス骨格系と受容体局在化」

オーガナイザー：林 康紀 (理研-MIT Neuroscience Research Center)

林 康紀 (理研-MIT Neuroscience Research Center, The Picower Center for Learning and Memory, Dept. Brain & Cognitive Science, MIT)

「Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure」

高橋 琢哉 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

「Experience-driven synaptic delivery of AMPA receptors *in vivo*」

渡部 文子 (東京大学医科学研究所 神経ネットワーク)

「リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御」

セッション 2 (PM3:50–6:20) 「シナプス形成・維持と接着分子系」

オーガナイザー：畑 裕 (東京医科歯科大 医歯学総合研究科 病態代謝解析学)

谷口 弘樹 (Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology)

「後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割」

加藤 明彦 (Eli Lilly)

「NMDA 受容体細胞外ドメインの新たな役割」

匂坂 敏朗 (大阪大学大学院医学系研究科 分子生物学)

「シナプス形成における ネクチンの役割」

ポスター発表及び懇親会 (PM6:30–8:30) 五階談話室

セッション 3 (12/2 AM9:00–11:30) 「シナプス前部からみたシナプス形成・維持」

オーガナイザー：大塚 稔久 (富山大学医学部 臨床分子病態学)

大塚 稔久 (富山大学医学部 臨床分子病態学)

「プレシナプスアクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム」

遠藤 啓太 (発生・再生科学総合研究センター 神経回路発生)

「ショウジョウバエ嗅覚地図の構築における Notch コードの役割」

高森 茂雄 (東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 脳神経病態学)

「神経伝達物質放出量の制御機構の一考察」

追加口演 (AM11:45–12:45)

Novel role of CaMKII in the maintenance and regulation of synaptic structure

林 康紀

理研-MIT Neuroscience Research Center

The Picower Center for Learning and Memory

Dept. Brain & Cognitive Science, MIT

The synapse is a highly organized cellular specialization that reorganizes its structure and composition according to input strength-both positively and negatively. The mechanisms orchestrating these changes remain largely elusive. We previously reported that activity dependent bidirectional regulation of actin at the synapse is involved in postsynaptic assembly-disassembly, and serves as a substrate for bidirectional synaptic plasticity. Tetanic stimulation rapidly and persistently shifts the F-actin/G-actin equilibrium towards F-actin in dendritic spines. The molecular mechanism involving this regulation has not yet been discovered.

We have hypothesized that CaMKII, a serine/threonine protein kinase highly enriched in excitatory synapses, is involved in this regulation. Here we present experimental evidence suggesting that CaMKII has a structural role in stabilizing actin cytoskeleton in dendritic spines.

Experience-dependent synaptic delivery of AMPA receptors *in vivo*

高橋 琢哉

Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology

The molecular modifications that occur in the intact vertebrate brain as a consequence of experience are still poorly understood. One crucial question is whether natural stimuli *in vivo* induce the synaptic delivery of GluR1. To test this, I injected Sindbis virus carrying recombinant AMPA receptors into barrel cortex of rats with or without whiskers *in vivo* at P12, an age characterized by rapid experience-dependent development of barrel cortex circuitry. 2 days later, I cut acute slices and tested delivery of recombinant receptors to synapses from layer4 to layer2/3 pyramidal neurons with an electrophysiological tagging technique. Endogenous AMPA receptors show linear I-V relations. On the other hand, recombinant AMPA receptors show little outward current at +40mV, or inward rectification. When recombinant AMPA receptors are inserted into synapses, synaptic transmission shows inward rectification. I found that recombinant GluR1 was delivered to synapses in the intact whisker rats but not in the deprived whisker rats. This showed that synaptic delivery of recombinant GluR1 is experience-dependent. To examine if endogenous GluR1 is delivered to synapse in an experience-dependent manner, I injected cytoplasmic tail of GluR1 (GluR1-ct) into barrel cortex of P12 rats with or without whiskers. This construct can bind to proteins normally associated with GluR1 and thereby prevent delivery of GluR1-containing AMPA-Rs to synapses during LTP. I found that expression of GluR1-ct induced the depression of AMPA amplitude at synapses from layer4 to layer2/3 pyramidal neurons in intact whisker rats but not in deprived whisker rats. This shows that whisker experience drives endogenous GluR1 into synapses. *In vitro* experiments showed that synaptic delivery of GluR2 is activity-independent. Consistent with these *in vitro* results, recombinant GluR2 was delivered to synapses both in the intact and deprived whisker rats. Furthermore, expression of cytoplasmic tail of GluR2 (GluR2-ct) induced the depression of AMPA amplitude in both intact and deprived whisker rats. These results suggest that synaptic delivery of GluR2 is not experience dependent. So the model, which was developed from *in vitro* experiments, applies to experience-dependent plasticity *in vivo*.

リン酸化による NMDA 受容体局在調節とシナプス可塑性の制御

渡部 文子

東京大学医科学研究所 神経ネットワーク

神経伝達効率の長期増強 (LTP) には NMDA 型グルタミン酸型受容体 (NMDA 受容体) が重要な役割を担うことが知られているが、生理的条件下でどのように NMDA 受容体の機能が調節されているのかに関しては未だ不明な点が多い。

再構成系の実験では Src 型チロシンキナーゼである Fyn が NMDA 受容体をリン酸化し、NMDA 電流を増加させることが知られている。また海馬切片において、LTP 誘導刺激により NR2B サブユニットの最も主要なリン酸化部位である 1472 番目チロシン残基のリン酸化が亢進することも示されている。さらに虚血やエタノール暴露、BDNF 処理など様々な刺激により NR2B1472 リン酸化が亢進することが報告されており、様々な系において NMDA 受容体のチロシンリン酸化は生理的に多様な機能を担っていることが示唆されている。

そこで我々は NR2B の 1472 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したノックインマウス (YF) の詳細な解析を行うことにより、NMDA 受容体チロシンリン酸化の生体内での役割を検討した。免疫電顕を用いた解析により NMDA 受容体のシナプス上における局在に変化が見られ、野生型マウス (WT) では受容体はシナプス後肥厚部の中心部分に偏って局在しているが、YF では中心部にも周辺部にも均等に近い分布に変化していた。このような分布の違いは細胞骨格系分子や足場タンパクとの相互作用による可能性が考えられる。実際 YF においては NR2B と α -actinin2 や AP-2 との結合が顕著に低下していた。一方、電気生理学的には扁桃体外側核 (LA) におけるシナプス伝達に有意な差は見られず、NMDA シナプス電流の詳細な解析においても YF には有意な差は認められなかった。このような解剖学的、生化学的変化は生理的にどのような意義を持つのかを検討するため、扁桃体 LA におけるシナプス可塑性を検討したところ、Pairing プロトコールにより誘導した LTP が YF では有意に減弱していた。さらに LTP の誘導に重要な役割を担うことが示唆されている α -CaMKII の NR2B との結合が YF では顕著に減弱しており、 α -CaMKII の刺激依存的活性も低下していた。さらに個体レベルでは YF において恐怖条件付けに障害が見られ、条件刺激提示中のマウスの freezing が有意に低下していた。

これらの結果から、NR2B の 1472 番目のチロシンのリン酸化は受容体の局在やその下流シグナル系を制御することにより、シナプス可塑性の誘導を調節し、学習行動も制御している可能性が示唆された。

後シナプスニューレキシンのシナプス形成における抑制的役割

谷口 弘樹

Columbia University, Dept. Physiology & Cellular Biophysics

現所属 Cold Spring Harbor Laboratory, Neurobiology

シナプスは神経細胞同士の信号伝達を仲介する場所であり、その形態的、機能的変化は学習記憶の基盤メカニズムと考えられている。よってシナプス形成を制御するメカニズムを解明することは発生生物学的見地からのみならず、脳機能を理解する上でも重要かつ興味深い課題となっている。

シナプス形成の制御メカニズムを考えると、大別して正負 2 つのメカニズムを想定することが可能である。発生期のシナプスは動的で形成、除去を繰り返していること、成熟したシナプスも電気活動に依存して増強、減退するという事実もこの考えを支持する。近年、いくつかの膜タンパク分子がシナプス形成を正に制御する分子として同定されてきた。われわれの研究室が着目し解析を行ってきた Neuligin(NLG)、Neurexin1beta(Nrx1beta)もそのような分子のうちの 1 つである。しかしながらこれまでシナプス形成を負に制御する分子メカニズムはほとんど不明であった。

本研究では、シナプス形成を抑制する分子の同定、その機能解析を目的とした。NLG は培養海馬神経細胞に発現すると顕著な前シナプス誘導活性を示すので、スクリーニングの指標として有用であると考えた。そこで、NLG と候補分子を共発現し、NLG の活性を阻害する分子を目的のものとした。その結果、興味深いことに NLG の受容体である Nrx1beta がそのような阻害活性を持つことがわかった。pan-Nrx 抗体を用いた、免疫細胞染色、免疫電子顕微鏡の解析から、Nrx は前シナプスばかりではなく、後シナプスにも存在することが明らかになった。また、NLG とシスで共存する Nrx1beta は、NLG-Nrx1beta 間のトランス相互作用を阻害することが明らかになった。さらに興味深いことに Nrx1beta の培養海馬神経細胞における過剰発現は NLG タンパクの発現増加を誘導することもわかった。以上の結果をふまえ、後シナプス Nrx1beta のシナプス形成における抑制的役割について議論したい。

NMDA受容体細胞外ドメインの新たな役割

加藤 明彦^{1*} David S Bredt^{1*}

¹ Dept of Physiol, UCSF, * 現所属 Eli Lilly

NMDA受容体はシナプス可塑性、過剰な興奮による神経細胞死に関わる最も重要なイオン透過性グルタミン酸受容体である。イオン透過性グルタミン酸受容体は細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内ドメインからなる。細胞外ドメインは、リガンド結合ドメインのほかに400アミノ酸からなる N-terminal domain (NTD)が存在する。NTDは最も大きなドメインであるにもかかわらず、機能解析は立ち遅れている。

私どもはNMDA受容体の必須サブユニットである、NR1のNTDと相互作用する分子を同定することを通してNTDの機能を探ることを試みた。Alkaline phosphataseと融合したNR1-NTDを哺乳動物細胞から分泌させ、これをプローブに用いて海馬の初代培養を染色したところ、神経細胞で強いシグナルが得られた。このことは海馬にNR1-NTDと結合する分子が存在することを示している。次いで、発現クローニングを用いてNR1-NTDと結合する分子の同定を行ったところ、ユビキチンリガーゼの基質特異性を決定するF-boxタンパクのひとつ、Fbx2であることが分かった。Fbx2は糖タンパクと結合してユビキチン化することが報告されている。実際、NR1はFbx2と、high mannoseタイプの糖鎖依存的に結合してユビキチン化されることを見出した。このことは、NR1のNTDがいったんlumen側ないし、細胞外に出た後、再度細胞質側に戻り、ユビキチン化されて分解されるという、「retro-translocation」を受けていることを示している。

さらに興味深いことに、Fbx2のdominant negativeを海馬神経細胞に導入すると、神経活動依存的にNR1の免疫染色強度が増加することに加え、細胞表面のNMDA受容体を介する電流が増加することを見出した。このことから、NR1の細胞外ドメインを介したFbx2によるユビキチン化が、機能的なNMDA受容体の数を減らす役割を果たしているのではないかと考えている。

シナプス形成におけるネクチンの役割

匂坂 敏朗、高井 義美

大阪大学大学院医学系研究科 生体生理医学専攻

生化学・分子生物学講座 分子生物学

神経シナプスはニューロン間の特殊な細胞間接着であり、その特異性と可塑性は細胞間接着分子により制御されている。海馬において、歯状回の顆粒細胞から軸索である苔状線維が伸びて CA3 の透明層に投射し、CA3 錐体細胞の頂上樹状突起とシナプスを形成している。その形は、神経伝達の間（synaptic junction (SJ)）を中心に、その周りをシナプスの機械的な接着（puncta adherentia junction (PAJ)）が取り囲むという同心円状の形をしている。SJ の前シナプス膜には、カルシウムチャンネルが集積しているアクティブゾーンが存在し、シナプス小胞と連結している。後シナプス膜では後シナプス肥厚（post synaptic density (PSD)）と呼ばれる膜裏打ち構造が存在し、神経伝達物質のレセプターが集積している。一方、PAJ は、上皮の細胞間接着と同様に、前、後シナプス膜が対称的な形態を保っており、細胞間接着分子が集積している。この PAJ には、イムノグロブリン系細胞間接着分子であるネクチン-1 が前シナプス膜にネクチン-3 が後シナプス膜に非対称性に局在している。また、ネクチンの結合タンパク質であるアフアディンと N-カドヘリンは対称性に PAJ に局在している。そこで、PAJ におけるネクチンの機能を調べるために、ネクチン-1 とネクチン-3 のノックアウトマウスを作成した。両方の変異マウスにおいて、PAJ の数が減少していた。さらに、苔状線維の走行異常が認められた。これらの結果から、ネクチンは PAJ の形成に関与していて、またそれにより苔状線維の走行を維持していることが考えられた。

神経シナプス・アクティブゾーンにおけるリン酸化プロテオーム

大塚 稔久

富山大学医学部 臨床分子病態学講座

脳内の複雑な神経回路網は、基本ユニットであるシナプスによって分子、細胞レベルで制御されている。シナプスは大きく3つの領域（プレシナプス、シナプス間隙、ポストシナプス）によって構成され、これまでに数多くのシナプス特異的分子が同定・解析されてきた。なかでも、プレシナプスに存在する特殊な構造体であるアクティブゾーンを構成する蛋白質についても、新たな知見が蓄積しつつある。神経伝達物質を含有したシナプス小胞は、活動電位による刺激によりカルシウムイオンが流入すると、プレシナプスの形質膜と融合し神経伝達物質をシナプス間隙に放出する。この一連のステップは、特異的な場であるアクティブゾーンにおいて厳密に制御されている。

アクティブゾーンを構成する蛋白質群としてはBassoon、Piccolo、RIM、Munc13-1、および私共が見いだしたCASTおよびELKSが知られている。なかでも、CAST/ELKSファミリーは、他のアクティブゾーン蛋白質と相互作用することにより、アクティブゾーンにおいて巨大な蛋白質複合体を形成している。さらに、この複合体は静的なものではなく、非常にダイナミックで、神経伝達物質の放出においても重要な役割を担っている。しかしながら、このような蛋白質複合体がどのタイミングで、いかにして形成されるのかは全く明らかになっていない。さらには、アクティブゾーンの構造そのものが生理的にいかなる意義をもつのかについては、全くの不明といっても過言ではない。脳内の複雑で多種多様なシナプスの構造を考慮すると、さらに多くのアクティブゾーン特異的蛋白質が存在することも容易に想像出来る。その意味で、アクティブゾーンの構造とその機能発現に関する研究は、スタートラインにたったばかりであると言える。

このようなアクティブゾーンの構造とその機能発現のメカニズムを明らかにする一連の研究過程において、私共は、神経終末においてユニークな局在を示すセリンスレオニンキナーゼを同定した（SADキナーゼ）。SADキナーゼはノックアウト動物を用いた解析から（線虫およびマウス）、神経発生過程において、axon/dendrite polarityを制御していることが最近明らかになった。しかし、SADの生化学的な特性やシナプスにおける局在、また成熟したシナプスにおける生理機能についてはほとんど明らかになっていなかった。最近私共は、SADが、シナプス小胞とアクティブゾーンの両方に局在するユニークなキナーゼであることを明らかにした。本セッショントークでは、このSADキナーゼの機能解析のデータを中心に紹介し、アクティブゾーン形成とその機能発現におけるリン酸化シグナル伝達機構の役割について議論したい。

ショウジョウバエ嗅覚地図の構築におけるNotchコードの役割

遠藤 啓太

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター(CDB)

神経回路発生研究チーム

機能的な神経回路の構築には、多種多様な神経細胞それぞれが、特定の標的神経細胞に対して軸索を伸ばし、シナプス結合することが必要である。個々の神経細胞の発生運命に応じた特異的な軸索投射／シナプス結合の分子機構を理解する上で、キイロショウジョウバエの嗅覚神経系は優れたモデル系の一つであり、近年、多くの研究者が解析を行っている。キイロショウジョウバエの嗅覚神経系では、脊椎動物の嗅覚神経系同様、特定の嗅覚受容体を発現する嗅覚神経細胞が、一次投射野である嗅覚葉（脊椎動物の嗅球に相当）の特定の糸球体へ軸索を投射しており、細胞の発生運命とその軸索投射の標的との対応を一对一で容易に同定することが可能である。また、嗅覚神経細胞の数や、発現している嗅覚受容体の種類、および軸索投射の標的の数（糸球体の数）が脊椎動物に比べてはるかに少ないため、全ての投射パターンを同定し、回路全体の構築に関わる分子機構を理解することが可能である。

我々は、このような機構に関わる遺伝子の同定を目的とし、キイロショウジョウバエにおいて、嗅覚神経細胞の軸索投射に異常を示す突然変異のスクリーニングを行った。その結果、Notch タンパクが下流の遺伝子を活性化する際に必要な核内因子をコードする遺伝子 *mastermind* の変異体を分離した。この突然変異をホモ接合にもつ嗅覚神経細胞の軸索は、一部の特定の糸球体へのみ投射しており、反対に、Notch シグナルに対して抑制的に働く *numb* 遺伝子の突然変異をホモ接合にもつ嗅覚神経細胞は、これとは相補的な糸球体へのみ投射を行うことが明らかになった。また、発現している嗅覚受容体の種類も、*mastermind* 変異と *numb* 変異とで相補的なパターンを示すことから、嗅覚神経細胞の発生運命が Notch シグナルの ON/OFF によって大きく二分されていることが示された。さらには、詳細なモザイク解析を行い、約 50 種類もの嗅覚神経細胞の全てについて、それぞれ、Notch シグナルによって決定される細胞運命とその軸索投射の標的糸球体を同定した結果、Notch ON/OFF それぞれの発生運命をもつ嗅覚神経細胞の軸索投射領域が嗅覚葉上で大きく分かれ、それぞれドメインを形成していることが明らかになった。この結果は、Notch ON/OFF によって決定される細胞運命に従って、嗅覚神経細胞の軸索投射が制御されていることを示している。Notch ON/OFF それぞれの発生運命をもつ嗅覚神経細胞からの投射ドメインは、その軸索走行のパターンに基づいて、更に複数のサブドメインへとグループ分けできることから、Notch ON/OFF に従った軸索投射機構は、嗅覚神経細胞のもつ他の遺伝情報と組合わさることによって、嗅覚神経系全体の回路構築に寄与していると考えられる。

神経伝達物質放出量の制御機構の一考察

高森 茂雄

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科

脳神経病態学

グルタミン酸は哺乳類神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。ニューロンがグルタミン酸を放出するためには、神経終末の細胞質に存在するグルタミン酸がシナプス小胞内に輸送される必要がある。この重要な過程を担う膜蛋白質が小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)である。2000年のVGLUT1の同定を契機に、現在までに、3つのVGLUTイソ型が同定され、VGLUTを分子指標とした脳内のグルタミン酸神経回路が刻々と明らかになってきた。興味深いことに、哺乳類脳内では、VGLUT1とVGLUT2が相補的な分布を示す。また、VGLUT3は、これまでグルタミン酸作動性ニューロンとは考えられていなかったニューロンに発現しており、その生理学的な意味は謎である。更に最近になって、統合失調患者や虚血モデル動物などで、脳部位特異的なVGLUTイソ型発現量の変化が誘起されることが報告され、VGLUT発現量に伴うシナプス伝達強度の変化の生理学的な意義や病態への関与などが示唆されている。今回は、VGLUT分子同定の経緯を概説すると共に、VGLUTに着目したグルタミン酸神経回路の分子多様性・VGLUTのシナプス伝達強度への影響など、最近の知見を交えて総括的に紹介する。