

神経可塑性と長期記憶に関する分子生物学的研究

Molecular Biological Studies on Neural Plasticity and Long-term Memory (研究プロジェクト番号 : JSPS-RFTF 96L00207)

プロジェクトリーダー

井本 敬二 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・教授

コアメンバー

森 泰生 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・助教授 (現 岡崎国立
共同研究機構統合バイオサイエンスセンター・教授)

中井 淳一 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・助手

若森 実 岡崎国立共同研究機構生理学研究所・助手
(現 鹿児島大学医学部・助教授)



1. 研究目的

脳の特徴は状況に応じて自己の構成を変化させていく可塑性にある。その神経可塑性と長期記憶の分子メカニズムを明らかにすることを目標として、以下の2つの観点から、シナプス情報伝達、なかでもカルシウム代謝にかかわる分子機構の研究を推進した。(1) シナプス部位と核の間の情報伝達に關与する分子の同定。(2) 分子センサーおよび測定機構の設計・開発。

2. 研究成果概要

2.1 シナプス部位と核の間の情報伝達に關与する分子の同定

受容体活性型カルシウム透過性チャンネルに関する研究：神経伝達物質受容体の刺激にともない、既知のチャンネル以外に、カルシウムを通すイオンチャンネルが活性化されることが、電気生理学的実験より知られていたが、この分子の実体は不明であった。これら分子は進化的に古く多様であり、神経細胞の活動のみならず、いろいろな細胞の活性調節に關与していると考えられてきた。ショウジョウバエの *trp* (transient receptor potential) チャンネルを研究の糸口として、哺乳類受容体活性型カルシウム透過性チャンネルの分子の実体を明らかにした。

TRP のホモログ蛋白は中央部に疎水性領域をもち、そのうちのいくつかは膜貫通領域を形成していると考えられる。やや低いながらも N 末部および C 末部にでも類似性が見られ、共通のチャンネル開閉調節機構が示唆される。TRP



図1 小脳プルキンエ細胞に発現する

ファミリーのメンバーは各々特異な組織分布を示し、特に脳内分布でも特徴が見られた。TRP3 は小脳皮質のプルキンエ細胞に分布していた (図1)。

TRP チャンネル HEK 細胞に発現させ、ATP、thapsigargin などによるチャンネル活性を検討した。その結果、TRP5、TRP7 は従来言われていたカルシウムストア枯渇とは異なる機構によって活性化されることが明らかとなった。活性化を誘導する ATP 受容体 (P2Y) がアゴニスト刺激による脱感作の後も活性を維持しており、複雑な細胞内情報伝達系の關与が重要であると考えられた (図2)。

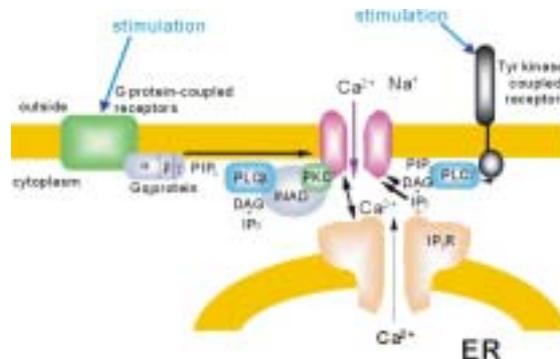


図2 受容体活性型カルシウム透過性チャンネルはいろいろな制御を受ける

TRP ファミリーは機能的にも多様性を有している。例えば TRP7 は常時活性化されており、いわゆるバックグラウンド電流に相当すると考えられる。また TRP チャンネルは神経系以外にも発現しており、平滑筋において TRP6 がアゴニスト刺激による収縮のトリガーとして働くことが示された。

電位依存性カルシウムチャンネルの変異と神経疾患に関する研究：P/Q タイプカルシウムチャンネルは N タイプとともに神経伝達物質放出やカルシウムスパイク生成にかかわる脳の主要なカルシウムチャンネルであり、小脳で多く発現している。P/Q タイプカルシウムチャンネルの変異は、ヒト・マウスにおいて小脳変性症を来すことが報告されている。

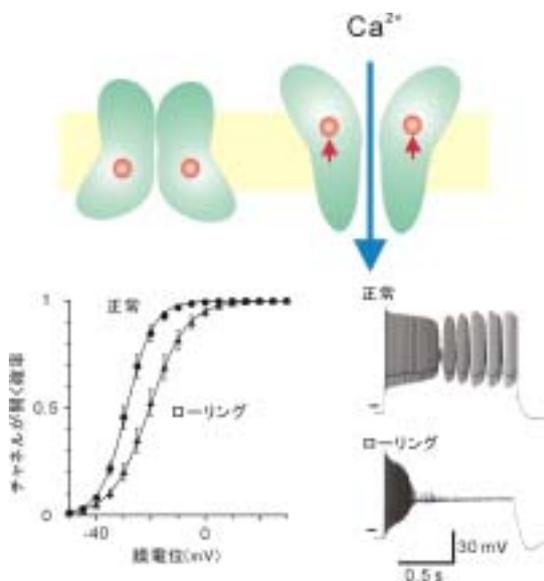


図3 電位センサー（赤丸）が損なわれているため（上）チャンネルが開きにくい（下左）。そのため神経細胞の活動が損なわれる（下右）。

rolling ナゴヤは、名古屋で発見された小脳失調症マウスである。われわれはその遺伝子変異部位を同定し、それが電位センサー部位のアルギニンをグリシンに置換することを見出した。理論的に予測されるとおり、変異カルシウムチャンネルは、活性化の電位依存性が減弱していた。このためにプルキンエ細胞の発火パターンが異常をきたしていた。正常プルキンエ細胞では刺激の強さに応じて頻度が増加するように活動電位を発生することが出来るが、変異細胞では強い入力刺激に対しては活動電位を発生しないことが示された（図3）。

2.2 新しい分子センサーの設計と合成

カルシウム感受性 GFP (Green Fluorescence Protein) の開発：あるタイプの神経細胞を特異的に可視化するには、組織特異的プロモーターを利用して蛍光蛋白を発現することが有効な方法である。従来のカルシウム感受性蛍光蛋白は、蛍光が弱くまた蛍光変化を起こすカルシウム濃度が μM の領域であるため、細胞内カルシウム濃度の変化を可視化するには、非常に鋭敏な測定機器を必要とした。このため、われわれは新たな蛍光カルシウムセンサー蛋白質である G-CaMP を作成した（図4）。G-CaMP は

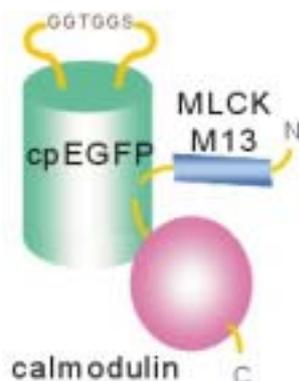


図4 G-CaMP の模式図

カルシウムに対する感受性は高く、また蛍光の最大変化量 $F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$ は約 4.5 であった。培養骨格筋細胞に G-CaMP を発現させたところ、筋肉細胞の収縮とともに蛍光強度が変化するものが顕微鏡を通して肉眼でも観察された。

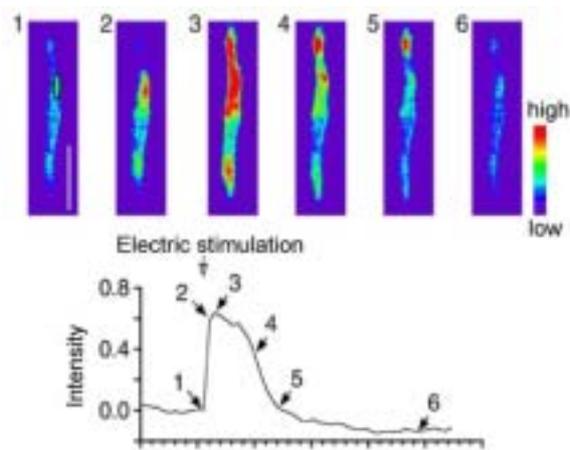


図5 G-CaMP を用いて測定した骨格筋のカルシウム変化

3 . 結論

脳の機能の総合的な理解のためには、今後とも機能分子の解析と方法の開発が不可欠である。

主な発表論文

1. Okada T, Shimizu S, Wakamori M, Maeda A, Kuroski T, Takada N, Imoto K, Mori Y (1998) Molecular cloning and functional characterization of a novel receptor-activated TRP Ca^{2+} channel from mouse brain. *J Biol Chem* 273:10279-10287.
2. Wakamori M, Yamazaki K, Matsunodaira H, Teramoto T, Tanaka I, Niidome T, Sawada K, Nishizawa Y, Sekiguchi N, Mori E, Mori Y, Imoto K (1998) Single tottering mutations responsible for the neuropathic phenotype of the P-type calcium channel. *J Biol Chem* 273: 34857-34867, 1998
3. Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kuroski T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, and Mori Y (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7: Ca^{2+} -permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274: 27359-27370.
4. Mori Y, Wakamori M, Oda Si, Fletcher CF, Sekiguchi N, Mori E, Copeland NG, Jenkins NA, Matsushita K, Matsuyama Z., Imoto K (2000) Reduced voltage sensitivity of activation of P/Q-type Ca^{2+} channels is associated with the ataxic mouse mutation rolling nagoya. *J Neurosci* 20, 5654-62.
5. Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 19:137-141.