

樹状突起機能制御チーム

Regulation and Function of Dendritic Spines

チームリーダー SHENG, Morgan H.

我々の全体的な興味は、脳シナプスにおける長期情報蓄積の分子のおよび形態学的基礎である。本特定プロジェクトの目的は、樹状突起棘の形態形成を調節する分子メカニズムを理解することであるが、この樹状突起棘は主ニューロンの樹状細胞軸上に見られる小さな突起である。これらのシナプス後の特殊化は、高度に不均一である点において注目されているが、この形態は著しく可塑的であり、神経構造の中でも樹状突起棘はおそらく最も納得がいく形で形態および数について活性依存性変化を示している。樹状突起棘の形態形成の調節は、シナプスおよび回路の可塑性において中心的な重要性を持つと広く信じられている。しかしながら十数年間にわたり魅力を示しているにもかかわらず、樹状突起棘の形成または大きさおよび形態を調節する分子メカニズムに関しては、ほとんど知られていない。さらにこの問題に関しては多数の学問的議論が存在するが、それにもかかわらず樹状突起の情報処理または認知機能（例えば学習および記憶）において、突起棘が実際に果たす役割は理解されていない。樹状突起棘の特定タンパク質成分のクローニングにおける近年の進歩により、突起棘の形態形成の分子メカニズムに分け入る道が開かれている。樹状突起棘を調節する特異的分子の同定により、遺伝的アプローチを行い、生体内においてそれらが示す生理学的意味合いを調べることができるだろう。

実験目標は、以下のとおりである。

(1) 樹状突起棘の数、大きさおよび形態を決定する特異的分子（「突起棘調節タンパク質」）の同定と分子的キャラクタリゼーション。

(2) 培養ニューロンおよび切片培養での、樹状突起棘の成長および運動性の時間差イメージング；突起棘調節タンパク質がこれらの動態反応にどのように影響するか；突起棘調節タンパク質の動きの時間差イメージングと、それらによるシナプス活性の調節。

(3) マウスにおいて突起棘調節分子に対する形質転換処置を行うことによって示される、これらの物質が *in vivo* で樹状突起棘の形態形成に関与していることの確証；およびこれらの遺伝子修正マウスにおける樹状突起棘の形態形成における変化が、変性脳機能および生理学的性質に対して有する相関。

1. 樹状突起棘の形態形成の分子メカニズム

昨年の研究では、シナプス後の密度タンパク質である Shank, Homer および SPAR に焦点を絞ったが、我々はこれらの物質が突起棘に対して興味深い独自の影響を持つことを発見した。培養された海馬ニューロンにおいて Shank を過剰発現させることにより、突起棘頭部の滑らかな伸張が生じたが、突起棘の数には影響しない。Shank によるこの効果は、この物質の Homer に対する結合能に依存してい

る。実際に、Shank と Homer は協調して働き、これによって突起棘頭部の成長と、拡大した突起棘頭部における IP3 受容体および各種シナプス後タンパク質の蓄積が誘導される。Shank に対する優性の干渉構成物は突起棘の消失をもたらす、このため Shank が突起棘の形成または安定性に関係していることが示唆される。

SPAR (RapGAP タンパク質の1つ)の過剰発現の結果、突起棘頭部の拡大と複雑性の増大が生じるが、この場合も明らかに突起棘の数に対する影響は見られない。SPAR の優性ネガティブ構成物で、触媒性 RapGAP ドメインに変異を含むものを用いた結果、突起棘の形状が変化し、伸張して糸状仮足の形態となった。我々の推測によれば、微量の GTPase Rap (通常は SPAR の GAP 活性として計測される)の作用により糸状仮足の形成が生じるが、これはおそらく突起棘および関連シナプスの脱安定化が原因である。次年度には、シナプス後シグナル発信および突起棘の調整における Rap の機能について主な作業を集中させるように計画している。

交通中の AMPA 受容体と突起棘の形態形成の間のつながりに対する調査は、昨年の調査計画における提案通りに行われた。予備的結果では、シナプスを標的とした AMPA 受容体と突起棘の形成との間に関連性が見いだされた。とりわけ、リブリン (神経表面を標的とした AMPA 受容体において重要であることを我々が発見したタンパク質の一種)の優性の干渉構成物により、樹状突起棘の消失をもたらす結果が生じた。さらに、特定の AMPA 受容体サブユニットの過剰発現によって有棘ニューロンにおける突起棘の密度が増大し、しかも通常は無棘性である海馬介在ニューロンにおいてすら突起棘の形成を生じた。これらの興味深い結果は、次年度においてさらに追求する予定である。

2. 樹状突起棘の動力学に対する時間差イメージング

突起棘は運動性が大きいため、これらをリアルタイムで研究し、これらの調節に関してさらに洞察を得ることが重要である。これまでの進歩は技術的なものである。これまでに共焦点顕微鏡システムを設置しているが、これを用いて培養ニューロンおよび脳切片の時間差イメージングが可能となっている。現在は突起棘の形態形成および運動性について、時間差記録を行うための培養条件を最適化する段階であり、形質移入または感染した GFP を用いて細胞を満たし、可視化を行っている。さらに、GFP (あるいはその変異種)を問題となるシナプス後タンパク質 (例えば PSD-95, アクチン, コルトアクチン, Shank など) に接着した構成物またはウイルスを作成している。これらの GFP タグ化構成物を用いれば、突起棘に出入りする特定分子の動きを可視化でき、またこれらの動きを突起棘の形態形成と関連づけることができるようになる。

3. 脳内における樹状突起棘の機能的意味合いに対する遺伝子的アプローチ

以上の2つの目的は原則として *in vitro* 試料に関連するため、遺伝子的アプローチを用いてこれらの分子的研究をマウスにまで拡げることを計画した。ここでは培養ニューロンでの突起棘の成長のために Shank が重要であることを示しているが、*in vivo* における重要性については未知である。そのためこれまでの年月、マウスにおいて相同遺伝子組換えを用い、Shank1 のヌル変異を作り出すことに注力していた。ほ乳類の脳で発現する Shank 遺伝子が3種類存在するため (Shank1 は脳に限定して存在する)、ここではノックアウトマウスの生存可能性にはあまり関心を払わず、従来の (非条件的、組織非特異的な) マウスで Shank1 をノックアウトしたものを設計した。現時点ではこの変異の生殖細胞伝達を得られており、適切な遺伝的背景において同型接合体を得るための交配の途中である。この作業の一部は条件的遺伝子操作研究チームの援助を受けて行われている。

Research Subjects and Members of Regulation and Function of Dendritic Spines

1. Molecular Mechanisms of Dendritic Spine Morphogen-

esis

2. Time Lapse Imaging of Dendritic Spine Dynamics and Their Regulation
3. A Genetic Approach to the Functional Significance of Dendritic Spines in Brain

Head

Principal Investigator

Dr. Morgan H. SHENG

Postdoctoral Associates

Dr. Michael WYSZYNSKI

Dr. Anthone DUNAH

Dr. Myung Jong KIM

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) * 印は査読制度がある論文誌

Sala C., Piech V., Wilson N. R., Passafaro M., Liu G., and Sheng M. H.: "Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by shank and homer", *Neuron* **31**, 115-130 (2001). *