

神経形態とその可塑性を制御するシグナル伝達機構の探索

尾藤 晴彦

神経回路の形成には、正確な神経線維投射が不可欠であり、軸索・樹状突起の形成伸展の精密な制御を必要とする。さらに、シナプス形成と成熟のためには、神経伝達物質を放出する神経終末と受容するシナプス後部の両者の機能と形態のつりあいが取れることが要求される。本総説では、神経回路網の基盤となる神経細胞の形態形成・成熟機構におけるアクチン細胞骨格の重要性を取り上げ、特に低分子量Gタンパク質 Rho シグナリング、カルシウムシグナリング、シナプス後肥厚部におけるタンパク質-タンパク質相互作用を介した制御の一端を概説する。

はじめに

「Cogito ergo sum 我思う故に我在り」というデカルトの言葉に象徴されるように、脳は人が人たる所以の臓器である。脳の諸機能のおかげで、人は社会活動を営み、文化的な生活を営むことができる。日本のように、少子化と高齢化が急速に進行しつつある超成熟型社会では、脳の機能発達を助け、脳高次機能を維持し続け、脳高次機能低下を予防し、さらに、一度障害された場合でも、可能な限り再建する、というチャレンジが、21世紀医療の中核課題の一つとなろう。そのための科学的基盤は何か。

発育時における脳神経回路網の発達異常が、精神・認知・神経の障害をもたらす根本原因の一つであるという考え方が最近有力視されている。またいったん正常な発育を遂げた場合でも、正常範囲の加齢とともに、脳神経回路網の機能的異常が蓄積し、脳高次機能（意識、情動、記憶、意欲、注意など）の機能障害が高い確率で襲ってくるといわれている。このことから、今日の神経生化学の大きな課題の一つは、神経回路形成ならびにシナプス形成の基本原

理と分子基盤の解明である。このような中核課題に地道に取り組むことによってこそ、脳高次機能を守り、育み、活かす知恵が今後生まれてくると予見される。

では、神経回路はどのように形成されていくのか、神経細胞は、細胞極性の形成と同時に、軸索ならびに樹状突起と呼ばれる2種類の機能的に分化した突起を伸ばす¹⁾。軸索の先端の神経終末には、神経伝達物質放出を司る分子装置が整備され、樹状突起スパイン上の後シナプス肥厚部と呼ばれる特殊な構造と対をなし、細胞間接着装置であるシナプスを形成する²⁾。こうして神経伝達物質の放出と受容を介して情報を一方向的に伝達する機構が完成する。軸索および樹状突起の形成・伸展やシナプス形成過程には、アクチン・微小管細胞骨格の動的役割が不可欠と考えられている³⁾。

その一方で、成熟神経回路形成が完了した後は、神経細胞の形態やシナプス結合は大きく変化せず、細胞骨格系は静的な構造支持装置であるという考えが長らく主流であった。しかしながら例えばHebbは、シナプス可塑性を予言する考察の中で、シナプスの増減を説明しうる機構として活動依存的な突起の動的な新生・消退をあげていた⁴⁾。長期増強や長期抑圧などのシナプス可塑性の実在が確認された1980年以降、シナプスを含む神経形態の活動依存的変化を実証することが急務となった。興奮性シナプスの多くは、スパインと呼ばれる樹状突起上の微小な突起に形成されているが、最近シナプス伝達の長期増強(LTP)に伴いスパイン、スパイン頸部、スパイン数などが変化する様相がづいに明らかにされた⁵⁾。

東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生化学分野 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Signaling mechanisms controlling neuronal morphogenesis and structural plasticity

Haruhiko Bito (Department of Neurochemistry, University of Tokyo Graduate School of Medicine, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

この総説は、2004年度奨励賞を受賞した。

本総説においては、このような神経形態形成と維持に関する新たな関心の高まりの中で、私たちがこの10年弱の期間において明らかにしてきた神経形態形成における様々な素過程を担う細胞内情報伝達系に関する知見を紹介したい。

1. 初期突起形成・伸展過程における Rho/ROCK/LIMK 経路と Rho/mDia1 経路による拮抗的制御 —小脳顆粒細胞の例—

1-1. 小脳顆粒細胞初代培養系を用いた遺伝子導入とタイムラプス観察

神経回路網が形成される途上で、神経細胞はダイナミックな形態変化を引き起こす。すなわち、極性が形成され、軸索と樹状突起が現れ、別々に伸展し、さらに細胞体が移動し、またガイダンス因子が働いた結果、特異的な投射先の選択とシナプス結合が誘導され、遺伝的プログラムによって定まった回路が形成される⁹⁾。またシナプス形成後も、例えば神経回路内に記憶を固定・貯蔵する過程で、シナプスの位置や形が、神経活動依存的に変化することが示唆されている^{7,8)}。しかし、このような形態可塑性の根底にある神経突起の細胞骨格制御機構についての詳細は未だ解明されていない。

神経発生途上の回路形成において、最初に最も肝腎なことは、軸索形成と親展を正しく行い、神経投射を正確に実現することである。この過程では、軸索形成・伸展時に最もダイナミックな形態変化が伴うので、この過程を制御す

る分子スイッチについて探索を行った。実験系としては、小脳顆粒細胞初代培養系を用いたが、それは同細胞が、1) 均一な細胞集団を *in vitro* で形成し、2) 遺伝子導入が比較的容易であり、さらに、3) 他の神経細胞と異なり2本の軸索を正常時に形成するため、突起形成自体の退縮伸展制御機構と、極性形成の制御機構を分離することが可能だからである⁹⁻¹¹⁾。また、小脳顆粒細胞は海馬錐体細胞初代培養系と異なり、コートしたガラス表面上に培養した後、直後から突起形成を行わず、数時間丸い形のまま接着状態を維持し、その後1本、そして2本と突起を形成する(図1)。このような性質は、シグナル伝達分子およびその変異体を遺伝子導入して、突起生成初期の機構を解き明かすのに非常に好都合である。

神経細胞の軸索形成には、突起形成(neurite formation)、突起伸展(neurite elongation)の少なくとも二つのステップが存在するといわれている¹²⁾。しかしその二者を区別し、各々の分子機構を解析することは今まで困難であった。そこで、小脳顆粒細胞初代培養系を用いて、両者を区別できる解析法の開発を試みた¹³⁾。

小脳顆粒細胞を血清存在下で培養すると、培養開始後約10時間程度で、最初の1本目の突起が生成してくる。EGFP cDNA を lipofection 法により導入すると、培養開始後約6時間後から GFP 蛍光が検出され始めるので、突起形成初期の可視化が可能となった(図1)。突起形成の初期の段階では、アクチン細胞骨格が主たる成分であるため、アクチン収縮系の作用により、突起形成と突起退縮

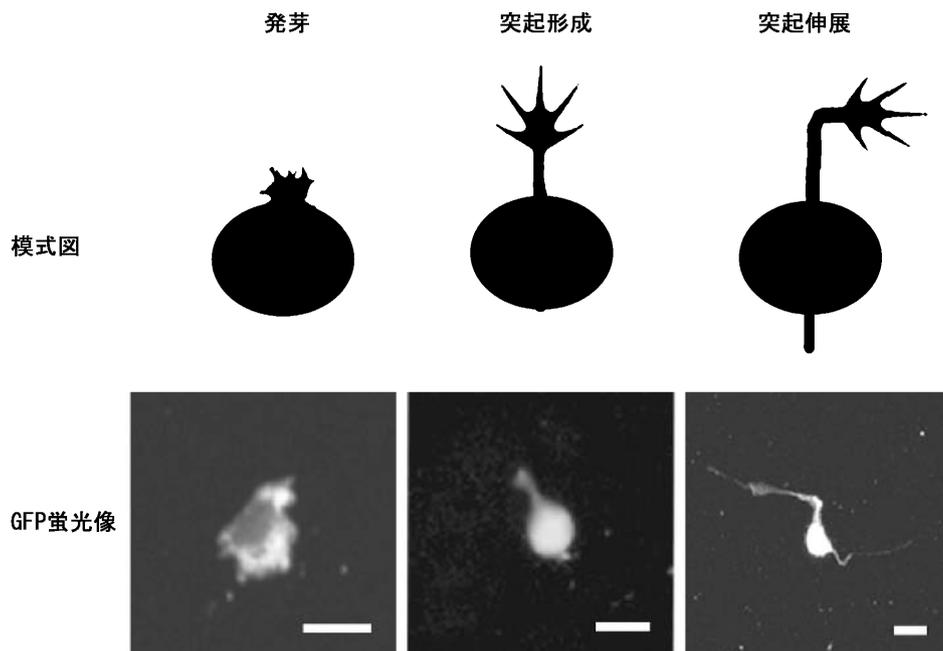


図1 小脳顆粒細胞における突起の形成
上段：突起形成の3段階(発芽, 形成, 伸展)；
下段：EGFP発現細胞における3段階の可視化。スケール, 10 μ m。

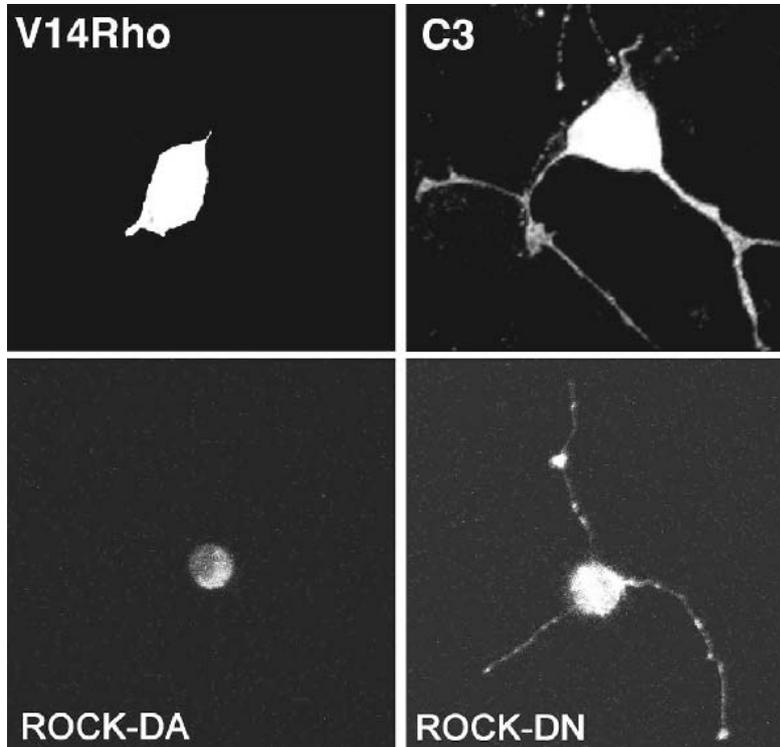


図2 小脳顆粒細胞軸索形成に対する Rho-ROCK 経路による負の制御
 V14Rho：活性化 Rho を発現した小脳顆粒細胞
 C3：Rho を失活させるボツリヌス菌体外 ADP リボシル化酵素 C3 を発現した小脳顆粒細胞
 ROCK-DA：活性化 ROCK (文献 20) を発現した小脳顆粒細胞
 ROCK-DN：ドミナントネガティブ ROCK (文献 20) を発現した小脳顆粒細胞
 文献 31 より改変.

が交互に起こる。そしていったんその過程が終了し、突起数が決定されるとチューブリンが微小管として安定的に軸索に挿入され、その後持続的な軸索伸展が起ると考えられた。

1-2. Rho-ROCK 経路による軸索形成に対する負の制御とその分子機構

このような過程に関与している分子スイッチの候補としてまず低分子量 GTPase Rho を取り上げ、その寄与について調べた。

Rho シグナル伝達系は、神経突起の形態形成・制御に不可欠な役割を果たすことが培養細胞系にて示唆されていた¹⁴⁾が、神経形態形成初期の軸索形成あるいは軸索伸展のいずれに作用するのかは不明であった。Rho エフェクターの中で最も解析が進んでいたのは Rho により直接活性化されるキナーゼ p160ROCK であった^{15~20)}。実際にモデル細胞系において、ROCK 活性化により突起退縮が起ることが確認された^{21~23)}。そこで、初代培養神経細胞において軸索形成・軸索進展の過程に Rho あるいは ROCK シグナル伝達系が関与するのかどうか解明することを試みた¹³⁾。

EGFP cDNA とともに、Rho あるいは ROCK の活性変異体 (ドミナントアクティブ体またはドミナントネガティブ体) を小脳顆粒細胞に培養開始と同時に強制発現させたところ、**図2**の通りの結果が得られた。すなわち、Rho および ROCK のいずれのドミナントアクティブ体を発現しても、軸索形成が有意に阻害された (**図2**左)。また、Rho および ROCK のいずれのドミナントネガティブ体を発現しても、軸索形成が有意に促進されて、突起数が正常の2本から有意に増加し、双極性ニューロンの典型である小脳顆粒細胞に3本以上の軸索を形成させることに成功した (**図2**右)。

さらに、ROCK の下流の基質の関与を調べた結果、ROCK/LIMK/cofilin カスケード^{24,25)}の重要性が浮かび上がった。すなわち、Rho, ROCK, LIMK の活性化状態では、突起のない、丸のままの細胞状態が優位 (つまり軸索数ゼロ) となるのに対して、Rho, ROCK, LIMK のドミナントネガティブ体または活性阻害体の過剰発現により軸索突起の数が3以上となった¹³⁾。このように最大活性と最小活性の間の両極端を人為的に設定することにより、LIMK 活性の制御を介して、Rho-ROCK 経路が突起数を、

ゼロと4~5の間で両方向性に制御していることを初めて明確に示した。

生理的な環境や、血清存在下の培養条件下において軸索数が極めて再現性よく2本であることから、上記の結果は、小脳顆粒細胞内で、Rho/ROCK/LIMK/cofilin シグナリングのバランスが実は中間的に維持されていることを意味する。

1-3. 小脳顆粒細胞形態形成における Rho-ROCK 経路と Rho-mDia1 経路による拮抗的かつ強制的な制御

我々は同時に、成長円錐の運動性が ROCK により抑制的な制御を受けていることを明らかにした¹³⁾。実際、ROCK 阻害薬存在下では、成長円錐の運動性は著明に増し、突起形成も速やかに増進した。しかし予想に反し、形成された突起のさらなる伸展が有意に増大されるわけではないことも明らかになった。従って、一旦形成された軸先突起の一層の伸展には、Rho/ROCK 以外の別のメカニズムが作用していることが考えられた。

突起伸展に関わる分子機構として、外因性の因子と内因性の因子の両者に分けて探索したところ、次のような点が明らかになった。まず神経細胞の遊走因子として知られているケモカインである SDF-1 α が小脳軟膜に豊富に存在することが知られていた^{26~30)}が、小脳顆粒細胞の突起形成のタイミングと一致して、非常に特異的な Rho 活性化リガンドとして働くことを見いだした³¹⁾。Rho 活性化を引き起こすことから、SDF-1 α は小脳突起形成を阻害することが予想された。事実、高濃度では突起形成が著しく遅れたが、中間的濃度では、むしろ著明な突起伸展が引き起こされた。この突起伸展は、驚くべきことに Rho 活性化阻害により抑制された。

このような事実から、突起形成を抑制する Rho エフェクターである ROCK 以外に、小脳顆粒細胞では別の Rho 標的分子が突起伸展に正の制御をかける可能性を新たに探索した。種々の Rho 標的分子の関与を検討したところ、formin ファミリーのメンバーで、アクチン重合と核形成を促進する mDia1^{32~35)} という Rho 標的分子が突起伸展の正の制御因子となることを裏付ける知見を得た³¹⁾。mDia1 の RNA 干渉により、中間濃度の SDF-1 α による突起伸展作用が完全に消失した。

このような知見から、小脳顆粒細胞の発達過程においては、1) 最終分裂後の Rho 活性が高い時期に ROCK のゲート作用により神経突起形成のタイミングが決定され、2) このステップに引き続き、一旦形成された突起が、引き続き中間的 Rho 活性下でも mDia1 依存的にその伸展を着実に実現するメカニズムが存在することが示唆された³⁶⁾。この過程は、おそらく外顆粒層の増生に伴い、軟膜からの距離に反して急激に低下していく SDF-1 α の濃度勾配の派生と

密接に相互作用していると考えられる³⁶⁾ (図 3)。

2. 成熟神経細胞におけるアクチン細胞骨格再編成の可視化と Ca²⁺ 依存的機構によるアクチン動員機構

神経細胞同士の結合が形成され神経回路が出来上がると、脳は、外界からの入力情報に対して適切な出力を演算することが可能となり、この結果高次機能を遂行できると考えられる。しかもこのような入出力関係は、それまでの入力経験に照らして絶えず最適化が行われている。このため、刻一刻と過ぎていく入力・出力の対応関係を逐一記録し加工した上で、何らかの形で神経ネットワーク上の「経験」として保存する機構の存在が必要と考えられる。このようなオンライン記録の機能は、海馬ならびに周辺領域の神経回路が担っていると現在考えられている。この過程には、CREB を含む神経活動依存的転写活性化やタンパク質翻訳の機構が大きく貢献している^{37~39)}。

しかし、転写制御による特定遺伝子産物の発現量、翻訳量増大のみで、入力特異的なシナプス伝達の長期的調節はすべて説明できるだろうか。転写活性化は、興奮性入力を受けた神経細胞の神経核で起こる。そのため、転写産物がシナプス局所で機能を発揮するためには、神経核で転写された転写産物、または細胞体で翻訳された翻訳産物が、シナプス伝達効率の変化したシナプス近傍まで輸送されなければならない⁴⁰⁾。また受け入れるシナプスにおいては、新規タンパク質の受け入れに合わせて、シグナル複合体の組換えや再配置を行う必要がある。このため、活動依存的に、シナプス内のタンパク質複合体再構成やシナプス局所の形態再編成が生じるという可能性も早くから指摘されていた⁴¹⁾。

これらの局所シグナル再編成の問題を解くためには、シナプス内およびシナプス近傍にある細胞骨格のダイナミクスを理解しなければならない。また、そもそも如何なる分子機構によって、シナプスのような特殊シグナル装置が局在する微小突起が生成されるのか、その分子機序を明らかにする必要がある。

この類の難問を解決する目的で、神経活動が起こりつつある神経組織（特に軸索・樹状突起内）の中における細胞骨格ダイナミクスをリアルタイムでイメージングする手法の開発が待たれた。幸い EGFP-融合タンパク質による新規蛍光プローブの開発、ニューロン培養細胞技術の改良や遺伝子導入技術の向上により、EGFP-アクチンを種々の神経細胞へ遺伝子導入して、アクチン細胞骨格の動態観察を生きた神経細胞で行うことが実現した^{42~44)}。我々も、アクチン線維におけるアクチン分子の構造を鋳型に、適切なリンカー長を選択し、EGFPと β -actinの融合タンパク質 EGFP-actin を作出し、独自に動的アクチン挙動の可視化に成功した⁴⁵⁾。

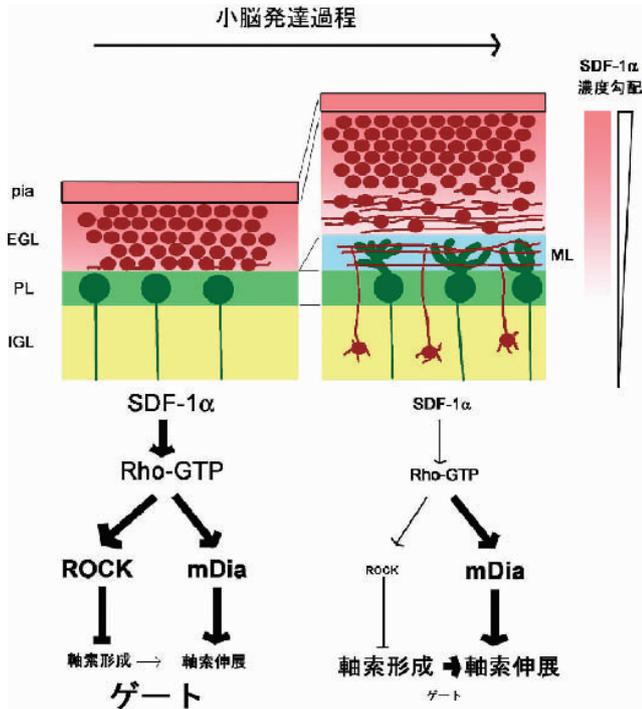


図3 小脳顆粒細胞形態形成における Rho-ROCK 経路と Rho-mDia1 経路による拮抗的かつ強調的な制御

小脳外顆粒層 (EGL) が薄い幼弱小脳期には、軟幕 (pia) から放出される SDF-1 の濃度が EGL の最内層でも高く、Rho-ROCK 経路と Rho-mDia1 経路の両者が活性化されるが、ROCK 依存的ゲートがオンのままなので、突起形成も突起伸展も抑えられている。小脳発達過程で EGL の厚みが増してくると、濃度勾配がより顕著となり、EGL 最内層での SDF-1 の濃度が低下すると考えられる。そのような状況では活性化 Rho 量が下がるため、Rho 依存性が低い mDia1 活性は維持されながらも、Rho 依存性が高い ROCK 活性は低下し、ゲートがオフとなる。そのような場合に速やかな突起形成と軸索伸展の共役が実現すると想定される。
文献 36 より改変。

2-1. EGFP-actinを用いたアクチン動態解析の妥当性確認

作出した EGFP-actin が、内在性アクチン分子の良いプローブであることを確認するために、EGFP-actin を HeLa 細胞に発現すると、アクチン線維への取り込みが観察された。さらに *in vitro* においても EGFP-actin は、精製 β-actin と重合し線維を形成することが示された。すなわち内在性アクチン分子に対し EGFP-actin はアクチン重合活性を有しており、局在も概ね同一であることが明らかになった。また、過剰発現をしない範囲で発現させた場合、すなわち EGFP-actin を低～中度に発現する HeLa 細胞や PC-12 細胞では、アクチン線維束誘導や神経様細胞の突起伸展を阻害せず、正常なアクチンの働きを阻害しないことが示された。すなわち、EGFP-actin は発現量を制限すればアクチン依存的な細胞現象を阻害しないことを確認した。

最後に EGFP-actin の蛍光特性に変化を与える環境的要因として pH とアクチン重合について検討したところ、

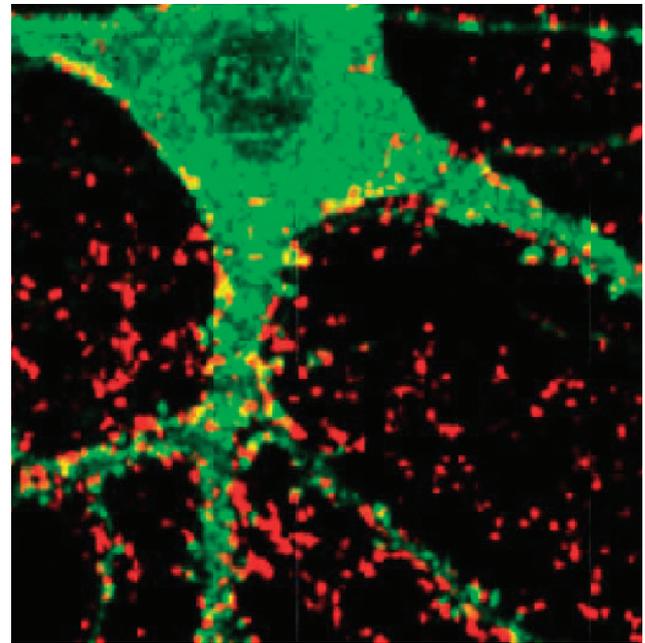


図4 神経伝達物質放出がある活動的神経終末に接着した樹状突起スパインにおける EGFP-actin の濃染

海馬錐体細胞初代培養系における EGFP-actin 蛍光像 (緑) と FM4-64 染色像 (赤) は、空間的に近接している。
文献 45 より改変。

EGFP-actin は EGFP と同様 pH 感受性を持っていた。また、*in vitro* において EGFP-actin の蛍光はアクチン重合によって影響されなかった。このことから、EGFP-actin の挙動は、1) 発現量が過剰に過ぎない範囲で、2) 細胞内微小環境変化による EGFP 蛍光変化さえコントロールすれば、ほぼ正確に内在性アクチンのダイナミクスを反映することが明らかとなった⁴⁵⁾。

そこでこれ以降、EGFP-actin の解析は全て EGFP を対照実験に使い、pH などの微小環境変化に伴う EGFP の蛍光特性の変化による効果を除外した。また、海馬培養神経細胞へ導入する目的で EGFP-actin cDNA を発現する組換えアデノウイルスを作成し、低い MOI 条件下で実験することにより、EGFP-actin 過剰発現による artefact を排除するように心がけた。

このような条件下では、EGFP-actin のスパインへの集積が観察され、EGFP-actin 発現スパインに隣接する神経終末のほとんどは、シナプス顆粒放出が認められる神経終末の指示薬である FM4-64 に陽性であった。すなわち、EGFP-actin 発現が機能的なシナプスやスパインの形成を妨げないことが確認された (図 4)。

2-2. スパインにおける動的アクチン制御の存在とその多様性

スパインのアクチン構造は単一ではない。シナプス間隙に沿って存在するもの、スパイン内部に広がり内膜構造の

近傍にあるもの、またスパイン頸部における束状のものなどが電子顕微鏡などの観察により知られている。このようなアクチン構造の多様性の意義については、まだ不明である。単にシナプスにおける異なる裏打ち構造に対応しているのか、あるいは、個々のアクチン構造でのアクチン重合・脱重合が異なる制御を受けているのであろうか。

まず、未刺激の神経細胞にEGFP-actinを導入して観察したところ、驚くべきことに、定常状態においても神経細胞内部の至るところで、EGFP-actinの集積が観察され、その多くに定期的な移動と停止が観察された。EGFP発現細胞では、このような蛍光シグナルの分布の移動が認められなかったため、アクチン分子は、神経細胞内で実際に動的な挙動を示すことが明らかになった⁴⁵⁾。

では、このような性質は重合していないEGFP-actin単量体の動的挙動のみに由来するのであろうか。すでに記した通り、EGFP-actinの蛍光強度はアクチンの重合状態に依存しない。しかし、EGFP-actinの蛍光強度が一見変化していても、アクチン分子の平衡動態が変化している可能性はある。微小領域に局限して励起光をあてて蛍光分子を消光し、その部分の蛍光強度の回復より分子のturnoverを

類推するfluorescent recovery after photobleaching (FRAP)法は、この平衡動態を解析するのに有効な手法である。例えば薬理的にアクチンの重合状態を変えるとアクチンの拡散による移動度が変化するが、これはEGFP-actinのFRAPの変化として捉えられる。FRAPを用いると、スパインのアクチン分子の多くが数分以内にturnoverすることが明らかになった^{46~48)}。この結果、スパインにおいては、アクチン線維自体のダイナミクスが高く、重合・脱重合の平衡動態が極めて動的に制御されていることが示唆された。

このようなアクチン挙動の動的制御機構を明らかにするため、EGFP-actinを発現した海馬初代培養神経細胞に細胞外電気刺激を加え、グルタミン酸性シナプスの活動に伴うアクチン動態変化を可視化した⁴⁵⁾。短い高頻度刺激を間歇的に与えると安定したCa²⁺流入が繰り返し引き起こされるが、これに伴い、EGFP-actinの分布は速やかに変化した。特に、スパインや細胞体辺縁に著明な集積が多数観察された(図5, 図6)。

スパインへのアクチン集積のキネティクスは概ね同調しており、刺激開始後1分程度で大きく増大し始めた。そ

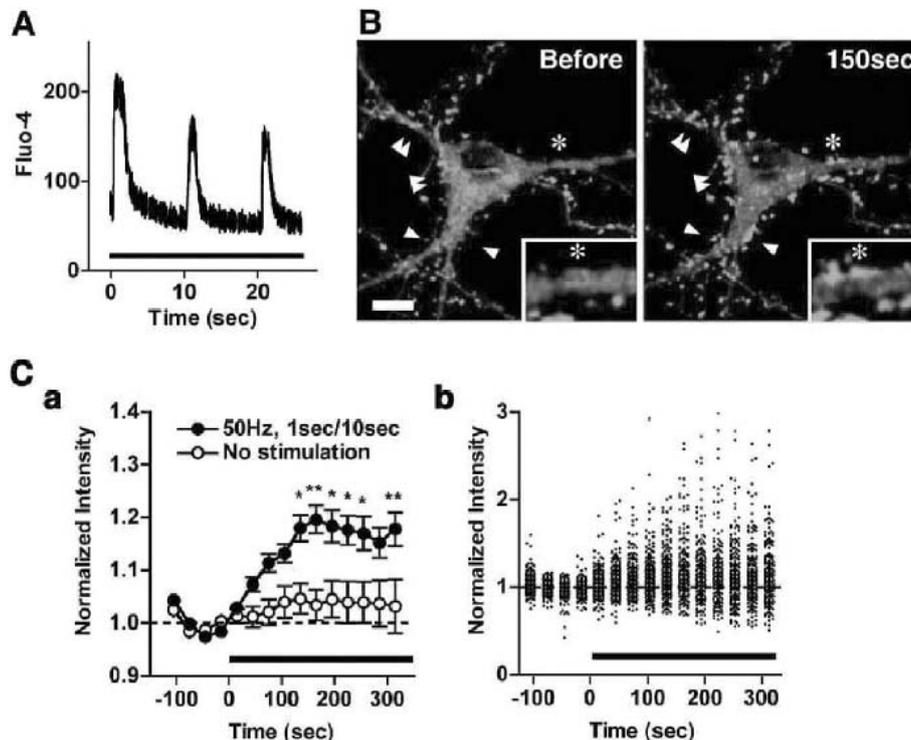


図5 高頻度刺激によるスパインアクチン動態の変動

- A. フィールド電場刺激 (50Hz 1秒) を10秒に1回加えると、Ca²⁺流入が脱感作せずに繰り返し引き起こされる。
 B. 刺激開始前と刺激開始150秒後のEGFP-actin染色。矢頭で示されるスパインに刺激依存的なアクチン集積増強が認められる。拡大像 (*). スケール、10 μ m。
 C. 刺激依存的なスパイン内EGFP-actin集積の時間経過：平均値(a)ならびに個別スパイン蛍光シグナル分布(b)。

文献45より改変。

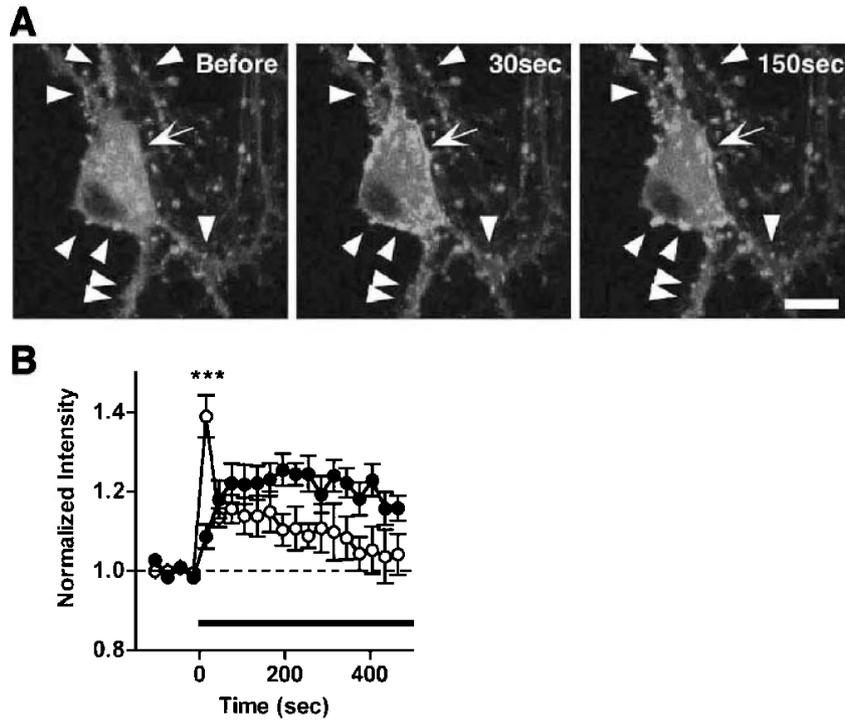


図6 二つの活動依存的アクチン集積機構の分離
 緩やかかつ持続的なスパイン内アクチン集積 (A 矢頭, B●) と速やかかつ一過性の細胞体辺縁部アクチン集積 (A 矢印, B○) が一つの細胞で共存している. スケール, 10 μ m.
 文献45より改変.

の一方で、スパインから消失するアクチンの速度はスパイン間で大きくばらついていた。このことから、スパインごとにアクチン集積が独立して制御されている可能性が示唆された。さらに、アクチン集積の速度の解析により、細胞体辺縁における集積はスパインにおける集積より速やかに誘導されることが明らかになった。このような性質の違いから、スパインと細胞体辺縁では異なるアクチン制御が関与している可能性が考えられた (図6)。

2-3. NMDA 受容体と電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した特異的なアクチン制御

このような二つのアクチン集積は、異なる Ca^{2+} 源により制御されるのではないかと推測された。そこでまず、NMDA を Mg^{2+} 非存在下 (および電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害条件下) で投与して NMDA 受容体によるアクチン制御について検討した⁴⁵⁾。すると、NMDA 受容体刺激によってスパインへのアクチン集積が持続的に誘導されたが、細胞体辺縁への集積は起こらなかった。これと対照的に、90mM カリウムイオンを含む細胞外液 (High K) による神経細胞の脱分極操作により電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを強く活性化したところ、EGFP-actin は細胞体辺縁に一過性に集積したが、この刺激ではスパインへの集積は起こらなかった。High K による細胞体辺縁へのアクチン集積は、

NMDA 受容体の特異的阻害薬を投与しても変化しないが、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの阻害によって完全に抑制される。これらの結果から、NMDA 受容体はスパインへの持続的なアクチン集積に、一方、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは細胞体辺縁への一過性集積に特異的に関与することが示唆された。

これと合致するように、細胞外電気刺激によるスパインへのアクチン集積は NMDA 受容体の阻害薬により実際に完全に抑制されるが、細胞体辺縁への集積は部分的にしか抑制されなかった。

それでは、 Ca^{2+} 源の相違によりアクチン制御が異なるのはなぜか。NMDA 受容体はスパインに多く局在しており、一方、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは細胞体に多く分布する。実際に NMDA 受容体単独刺激と High K 刺激における Ca^{2+} 動態を比較すると、 Ca^{2+} 上昇の空間的分布はこのような Ca^{2+} 源局在とよく合致した。すなわち、 Ca^{2+} が高度に上昇する Ca^{2+} 源近傍において、局所的にアクチン制御の分子メカニズムが活性化され、シナプス刺激と細胞全体の脱分極では、異なるアクチン動態変化を引き起こすことが示唆された。

神経細胞の発達段階、神経活動の頻度や持続時間、パターンによって個々の Ca^{2+} チャンネルの活性化パターンは大きく変化するので、種々の刺激は、異なる Ca^{2+} 上昇を

介して異なるアクチン細胞骨格応答を示すのであろう。これまで Ca^{2+} 源の近傍において共役が顕著な情報伝達活性化の例として、シナプス小胞分泌⁴⁹⁾や CREB 依存性転写制御^{50,51)}などが知られているが、アクチン動態制御も特にシナプス直下での Ca^{2+} 上昇に強く規定されると考えられた。

我々の研究に相前後して、長期抑圧ならびに長期増強に併行して、シナプス内および近傍のアクチン動態や重合状態が大きく変化することを示すデータが報告されている^{46,47)}。今後、さまざまな刺激に対する Ca^{2+} 上昇とアクチン再構築の系統的な解析が待たれる。

3. シナプス機能成熟とシナプス形態成熟を結ぶ機構の探索

軸索ならびに樹状突起の形成の最終過程においては、神経終末と後シナプス肥厚部 (PSD) が接着し、最適なシナプス伝達が神経伝達物質受容体を介して行われるようにシナプス形成が進行する。シナプス形態が完成し、適切な規模のシナプス神経伝達物質受容体複合体がシナプス後膜に出来上がると、シナプス形成が完了する。しかし、シナプス機能成熟とシナプス形態成熟がどのように釣り合いをとるのかという問題については、全く明らかにされていない。おそらく、グルタミン酸受容体の活動とスパイン内アクチン動態の間の何らかのフィードバック機構が存在することが考えられるが、その分子基盤はこれまで不明である。

このような機構の存在を明らかにする目的で、アクチン細胞骨格を調節する Rho シグナリングの上流あるいは下流に位置する分子について、シナプス局在の有無を探索した。まず、Rho 標的分子 Citron⁵²⁾が前脳の多くの神経核のスパインの PSD 構造に局在することを見だし、NMDA 受容体複合体の構成因子であることを同定した⁵³⁾。さらに同様に代謝型グルタミン酸受容体 mGluR と結合する

Homer2/Cupidin も PSD に局在する上に、Cdc42 結合活性があり、F-actin と共沈することを示した⁵⁴⁾。しかしながら、アクチン細胞骨格と PSD 集積タンパク質複合体の関係は単純でなく、アクチン重合阻害により動態が著しく影響を受ける成分と大きく影響されない成分に分かれることが明らかになった。前者は Homer1/PSD-Zip45, GKAP, Shank などを、後者は特に膜表面受容体と結合する PSD-95 を含むことが FRAP 解析により判明した⁴⁸⁾。

PSD-95 は、中枢神経系の興奮性シナプス後部の PSD に豊富に存在する。PSD-95 を中心的なアダプターとして集積した複合体には、シナプス可塑性やアクチン動態にも大きく影響を与える NMDA 受容体が含まれる。従って、NMDA 受容体を中核とした、要となるタンパク質群とのクラスター形成がどのように制御されているかを理解することは、シナプスシナグリングの大きな課題である⁵⁵⁻⁵⁷⁾。PSD-95 は、三つの PDZ ドメイン、SH3 ドメインならびに GK ドメインの五つのタンパク質-タンパク質結合ドメインを有し、各々を介したタンパク質-タンパク質結合により複合体形成に寄与する。

各ドメインは特異的なリガンドを独立に結合して、それぞれ異なるシグナルの橋渡しをするのだろうか。或いは、リガンド結合による分子構造変化などの協同的な作用がドメイン間にあるのだろうか。後者を支持するものとして、PDZ ドメインのリガンド結合で GK ドメインのリガンド親和性が変化したという *in vitro* での報告がある⁵⁸⁾。さらに連続した二つの PDZ ドメインで解かれた構造⁵⁹⁾もまた、この説を支持している。

そうだとすると、PDZ ドメイン欠損変異体を用いた解析では、PDZ 結合自体の欠損と、PSD-95 全体構造への間接的貢献の影響を分離することが不可能となる。すなわち、個々の PDZ ドメインの意義を特異的に問うためには、PSD-95 全長の分子構造を保持しつつ、特定 PDZ ドメイン

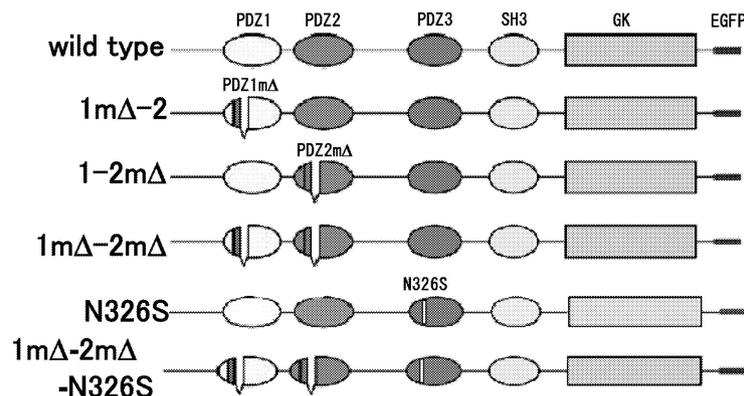


図7 特異的 PDZ ドメイン変異による PSD-95 の変異体作成

PDZ1, PDZ2, PDZ3 の各々の結合活性を特異的に欠落した変異ドメインを作成し、PSD-95 全長構造の中に戻した PSD-95 変異体を作成した。文献 61 より改変。

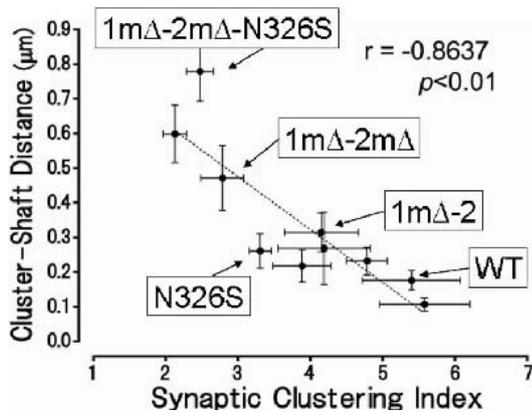


図8 PSD-95 変異体を用いた過剰発現解析から明らかになったPSD-95 クラスター形成とスパイン長（シナプス後部と樹状突起幹部の間の距離）の間の反比例関係

PSD-ドメイン変異が逐次的に蓄積されると、クラスター形成が徐々に低下するとともに、スパイン長の長いスパインの増生が認められた。

文献 61 より改変。

の結合能のみ欠落している全長変異体を用いる工夫が必要ではないかと考えられた。そこで、PDZ1, 2 と PDZ3 との構造比較を元に、PDZ1, PDZ2 および PDZ3 の PDZ 結合能のみを特異的に欠落した変異 PDZ を作成し^{60,61}、各変異ドメインを全長 PSD-95 内の各野生型 PDZ1-3 ドメインとそれぞれ入れ替え、結合能を有する PDZ ドメインの数が 0, 1, 2, 3 の様々な PSD-95 変異体を作成した (図 7)。これらをマウス海馬の神経初代培養細胞に遺伝子導入し、表現型解析を行った⁶¹。

各全長 PSD-95 変異体はシナプスに集積したが、クラスター形成効率は低下した。このとき、変異 PDZ ドメインの数が 1, 2, 3 と増すにつれて、クラスター形成効率が順次低下した (図 8)。変異 PSD-95 を発現している神経細胞では、スパイン長が異常に伸展したままの幼弱なスパインの先端にクラスターを形成した。定量解析により、変異 PDZ ドメインの数が 1, 2, 3 と増すほど、順次スパインが長くなる傾向が見られた。また、クラスター形成効率とスパイン長との間に有意な負の相関関係があった (図 8)。スパイン長の伸展は、精神遅滞や脆弱性 X 染色体症候群などの疾患で見られる長いスパインと酷似していると考えられた⁶²。

さらに、PSD-95 のクラスター形成効率低下に伴い、PSD タンパク質の一つである SynGAP^{56,57} の PSD 集積が低下していた。そこで PDZ 結合モチーフを削った SynGAP 変異体を神経細胞に発現させたところ、PSD-95 変異体と同様に、PSD-95 クラスター形成効率低下とスパイン形態異常を示した。

これまで PSD-95 の三つの PDZ ドメインは、リガンド特異性が異なることから、独立した機能を受け持つと考え

られてきた。しかし上記の実験から、新たに PDZ1, 2, 3 が高密度クラスター形成とスパイン形態成熟に対して相加的な作用を示すことを明らかにした。これらの結果は、PDZ ドメインが等価な機能単位としても機能するというを示した。つまり、PSD-95 のマルチドメイン構造では、等価な結合スロットが存在し、リガンド結合が加算的に制御されている可能性が示唆された。

このように、PSD-95 には SynGAP のような細胞骨格制御分子との結合を通して、PSD-95 の PDZ ドメインとスパイン形態との間に定量的連関をもたらす作用が存在する。すなわちシナプスのシグナル伝達をスパイン形態に反映させる機能を持つことが示唆される。

4. 最後に—神経マイクロドメインの生化学を目指して

近年、シナプスや神経突起先端の成長円錐のような限局した容積を持つマイクロドメインにおける酵素反応や、タンパク質・タンパク質、タンパク質・膜、タンパク質・細胞骨格相互作用が、神経回路網形成を正確に実現し、正常な脳機能を支える重要な分子基盤の一つとして浮上してきている。ヒトにおける遺伝性精神神経疾患 (例えば脆弱性 X 染色体症候群や種々の精神遅滞など) の患者脳や、その関連遺伝子改変マウス脳などでは異常なスパイン形態の増加や、突起形成、細胞移動による投射異常などが観察される。このような知見を総合すると、神経回路網がマクロ的にも、ミクロ的にも正しく形成され、正常な高次機能が伴うためには、神経細胞骨格修飾やシナプス形態制御が極めて重要な役割を果たしていることが考えられる。

Ramon y Cajal が神経形態に関する包括的な考察を行ってからほぼ 1 世紀が経つが、その間、我々の神経細胞に関する知識は飛躍的に進歩した。特にここ 10 年間においては、これらの知識と現代バイオテクノロジーの総力を結集して脳の機能修復・再建に結び付けようとする努力が目覚ましい。脳外科領域においては、脳腫瘍などに対する遺伝子治療的アプローチが臨床治験に供されている。まさに、個々の神経細胞の分子治療により、神経回路網損傷による高次機能発現の低下から回復するということが、全くの夢物語でなくなりつつあるといえるかもしれない。本総説で扱った、神経マイクロドメインでの生化学的研究により明らかにされた、神経細胞局所における細胞骨格シグナリングの原理が、将来、神経回路網の破綻を予防し、機能低下を修復するための基盤となることを願って止まない。

謝辞

本研究は、筆者が京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学教室在籍中に、成宮周教授のご指導の下、大学院生 (当時) の古屋敷智之博士、竹本-木村さやか博士、荒川芳輝博士ならびに医学部学生 (当時) の大前彰吾氏、丹治正

大氏と共同で構想・実行されたものである。また、京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学教室藤吉好則教授、土井知子助教授ならびに大学院生の野中美応氏との共同研究にも基づいているものである。

長年にわたりご指導ならびに叱咤激励を賜った成宮研究室スタッフの皆様、特に渡邊直樹助教授、石崎敏理助手、前川みどり助手(当時)、ならびにすべての教室員の皆様に篤く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Goodman, C.S. & Shatz, C.J. (1993) *Cell*, **72** Suppl, 77-98.
- 2) Waites, C.L., Craig, A.M., & Garner, C.C. (2005) *Annu. Rev. Neurosci.*, **28**, 251-274.
- 3) Bradke, F. & Dotti, C.G. (2000) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 574-581.
- 4) Hebb, D. (1949) *The Organization of Behavior: A Neuropsychological theory*, Wiley, New York.
- 5) Matus, A. (2005) *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 67-72.
- 6) Charron, F. & Tessier-Lavigne, M. (2005) *Development*, **132**, 2251-2262.
- 7) Yuste, R. & Bonhoeffer, T. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1071-1089.
- 8) Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., & Nakahara, H. (2003) *Trends Neurosci.*, **26**, 360-368.
- 9) Gao, W.Q., Liu, X.L., & Hatten, M.E. (1992) *Cell*, **68**, 841-854.
- 10) Randall, A. & Tsien, R.W. (1995) *J. Neurosci.*, **15**, 2995-3012.
- 11) Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., & Greenberg, M.E. (1997) *Science*, **275**, 661-665.
- 12) Dingwell, K.S., Holt, C.E., & Harris, W.A. (2000) *J. Neurobiol.*, **44**, 246-259.
- 13) Bito, H., Furuyashiki, T., Ishihara, H., Shibasaki, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (2000) *Neuron*, **26**, 431-441.
- 14) Jalink, K., van Corven, E.J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., & Moolenaar, W.H. (1994) *J. Cell Biol.*, **126**, 801-810.
- 15) Leung, T., Manser, E., Tan, L., & Lim, L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 29051-29054.
- 16) Ishizaki, T., Maekawa, M., Fujisawa, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Fujita, A., Watanabe, N., Saito, Y., Kakizuka, A., Morii, N., & Narumiya, S. (1996) *EMBO J.*, **15**, 1885-1893.
- 17) Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., & Kaibuchi, K. (1996) *Science*, **273**, 245-248.
- 18) Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., & Lim, L. (1996) *Mol. Cell Biol.*, **16**, 5313-5327.
- 19) Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., & Kaibuchi, K. (1996) *Science*, **275**, 1308-1311.
- 20) Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., & Narumiya, S. (1997) *FEBS Lett.*, **404**, 118-124.
- 21) Katoh, H., Aoki, J., Ichikawa, A., & Negishi, M. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 2489-2492.
- 22) Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Fukata, Y., Yano, T., Shibata, M., Ikebe, M., & Kaibuchi, K. (1998) *Genes Cells*, **3**, 177-188.
- 23) Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., & Narumiya, S. (1998) *J. Cell Biol.*, **141**, 1625-1636.
- 24) Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., & Narumiya, S. (1999) *Science*, **285**, 895-898.
- 25) Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., & Mizuno, K. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 3577-3582.
- 26) Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I., & Littman, D.R. (1998) *Nature*, **393**, 595-599.
- 27) Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P.R., Segal, R.A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., Bronson, R.T., & Springer, T.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 9448-9453.
- 28) Klein, R.S., Rubin, J.B., Gibson, H.D., DeHaan, E.N., Alvarez-Hernandez, X., Segal, R.A., & Luster, A.D. (2001) *Development*, **128**, 1971-1981.
- 29) Reiss, K., Mentlein, R., Sievers, J., & Hartmann, D. (2002) *Neuroscience*, **115**, 295-305.
- 30) Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X.C., Nagasawa, T., Wu, J.Y., & Rao, Y. (2002) *Nat. Neurosci.*, **5**, 719-720.
- 31) Arakawa, Y., Bito, H., Furuyashiki, T., Tsuji, T., Takemoto-Kimura, S., Kimura, K., Nozaki, K., Hashimoto, N., & Narumiya, S. (2003) *J. Cell Biol.*, **161**, 381-391.
- 32) Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., & Narumiya, S. (1997) *EMBO J.*, **16**, 3044-3056.
- 33) Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999) *Nat. Cell Biol.*, **1**, 136-143.
- 34) Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., & Boone, C. (2002) *Science*, **297**, 612-615.
- 35) Sagot, I., Rodal, A.A., Moseley, J., Goode, B.L., & Pellman, D. (2002) *Nat. Cell Biol.*, **4**, 626-631.
- 36) Bito, H. (2003) *J. Biochem.*, **134**, 315-319.
- 37) 尾藤晴彦 (1998) 生化学, **70**, 466-471.
- 38) Bito, H. (1998) *Cell Calcium*, **23**, 143-150.
- 39) Bito, H. & Takemoto-Kimura, S. (2003) *Cell Calcium*, **34**, 425-430.
- 40) Frey, U. & Morris, R.G. (1997) *Nature*, **385**, 533-536.
- 41) Martin, K.C. & Kosik, K.S. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 813-820.
- 42) Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., & Matus, A. (1998) *Neuron*, **20**, 847-854.
- 43) Colicos, M.A., Collins, B.E., Sailor, M.J., & Goda, Y. (2001) *Cell*, **107**, 605-616.
- 44) Watanabe, N. & Mitchison, T.J. (2002) *Science*, **295**, 1083-1086.
- 45) Furuyashiki, T., Arakawa, Y., Takemoto-Kimura, S., Bito, H., & Narumiya, S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14458-14463.
- 46) Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., & Murthy, V.N. (2002) *Nat. Neurosci.*, **5**, 239-246.
- 47) Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., & Hayashi, Y. (2004) *Nat. Neurosci.*, **7**, 1104-1112.
- 48) Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K., & Okabe, S. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 7693-7706.
- 49) Neher, E. (1998) *Neuron*, **20**, 389-399.
- 50) Deisseroth, K., Bito, H., & Tsien, R.W. (1996) *Neuron*, **16**, 89-101.

- 51) Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R.W. (1996) *Cell*, **87**, 1203-1214.
 - 52) Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1998) *Nature*, **394**, 491-494.
 - 53) Furuyashiki, T., Fujisawa, K., Fujita, A., Madaule, P., Uchino, S., Mishina, M., Bito, H., & Narumiya, S. (1999) *J. Neurosci.*, **19**, 109-118.
 - 54) Shiraishi, Y., Mizutani, A., Bito, H., Fujisawa, K., Narumiya, S., Mikoshiba, K., & Furuichi, T. (1999) *J. Neurosci.*, **19**, 8389-8400.
 - 55) Craven, S.E. & Brecht, D.S. (1998) *Cell*, **93**, 495-498.
 - 56) Kennedy, M.B. (2000) *Science*, **290**, 750-754.
 - 57) Kim, E. & Sheng, M. (2004) *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 771-781.
 - 58) Funke, L., Dakoji, S., & Brecht, D.S. (2005) *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 219-245.
 - 59) Long, J.F., Tochio, H., Wang, P., Fan, J.S., Sala, C., Niethammer, M., Sheng, M., & Zhang, M. (2003) *J. Mol. Biol.*, **327**, 203-214.
 - 60) Imamura, F., Maeda, S., Doi, T., & Fujiyoshi, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 3640-3646.
 - 61) Nonaka, M., Doi, T., Fujiyoshi, Y., Takemoto-Kimura, S., & Bito, H. (2006) *J. Neurosci.*, **26**, 763-774.
 - 62) Fiala, J.C., Spacek, J., & Harris, K.M. (2002) *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **39**, 29-54.
 - 63) Harris, K.M., Jensen, F.E., & Tsao, B. (1992) *J. Neurosci.*, **12**, 2685-2705.
-