

- 8) Scheffer, G.L., Schroeijers, A.B., Izquierdo, M.A., Wiemer, E. A., & Scheper, R.J. (2000) *Curr. Opin. Oncol.*, 12, 550-556.
- 9) Gopinath, S.C., Matsugami, A., Katahira, M., & Kumar, P.K. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, 4874-4881.
- 10) Yu, Z., Fotouhi-Ardakani, N., Wu, L., Maoui, M., Wang, S., Banville, D., & Shen, S.H. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 40247-40252.
- 11) Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A., & Bennett, A.M. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 29374-29385.
- 12) Kim, E., Lee, S., Mian, M.F., Yun, S.U., Song, M.K., Yi, S., Ryu, S.H., & Suh, P.G. (2006) *FEBS J.*, 273, 793-804.
- 13) Kowalski, M.P., Dubouix-Bourandy, A., Bajmoczy, M., Golan, D.E., Zaidi, T., Coutinho-Sledge, Y.S., Gygi, M.P., Gygi, S.P., Wiemer, E.A., & Pier, G.B. (2007) *Science*, 317 130-132.
- 14) Kato, K., Tanaka, H., Sumizawa, T., Yoshimura, M., Yamashita, E., Iwasaki, K., & Tsukihara, T. (2008) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 64, 525-531.
- 15) Holm, L. & Sander, C. (1996) *Science*, 273, 595-603.

田中 秀明^{1,2}, 加藤 公児³, 住澤 知之⁴, 山下 栄樹¹

(¹ 大阪大学蛋白質研究所,

² 科学技術振興機構・さきがけ,

³ 兵庫県立大学生命理学研究科,

⁴ 鹿児島女子短期大学生活科学科)

Elucidation of the function based on the whole structure of rat liver vault, the largest ribonucleo-protein particle
Hideaki Tanaka^{1,2}, Koji Kato³, Tomoyuki Sumizawa⁴ and Eiki Yamashita¹ (Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, ²PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST), 4-1-8 Honcho Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan, ³Department of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Akoh, Hyogo 678-1297, Japan, ⁴Kagoshima Women's Junior College, 6-9 Kourai, Kagoshima 890-8565, Japan)

シナプスタグ仮説の実証

1. 記憶の分子機構研究の目標

我々が何かを体験する際に受け取るあらゆる感覚情報は、各受容器で電気信号に変換された後、シナプス伝達を介して神経細胞を次々と伝えられる。経験の認知は脳のこのような神経活動なので、その追認可能な形態である記憶も神経回路活動である。Hebbは、一定の感覚情報が特定の神経細胞群からなる回路を伝わりやすくなる結果、経験に対応する神経回路ができると考えた。更に、その仕組

みとして神経回路の使用によりシナプス伝達効率が変わると予想した¹⁾。その後の電気生理学的研究により、確かにシナプス伝達効率は一定ではなく、経験の頻度、強度、情動などに依存して変化し、その変化が維持されることが分かった。この性質をシナプス伝達の可塑性といい、記憶などの高次脳機能を担う神経回路形成の基本原則と考えられている。

シナプス伝達可塑性は初期及び後期可塑性に分類され、それぞれ短期と長期記憶に対応する。変化が増加のとき長期増強、減少なら長期抑圧と呼ばれ、記憶の性質を神経回路の性質を介して説明することを目標に分子機構の研究が盛んである。長期記憶が一生涯保持されることは記憶の目覚ましい特徴の一つであり、人が人として生きるために不可欠であるが、物質としての脳が常に代謝を受けていることを考えると驚異的である。後期可塑性の仕組み解明により、長期記憶の保持と想起の仕組み、他の記憶との連合による変化等の記憶の謎を解き、記憶障害に対する対抗手段を得ることができよう。

シナプス可塑性の分子機構を理解するには表現機構と入力特異性機構を明らかにする必要がある。げっ歯類海馬CA1野錐体細胞とSchaffer側枝のシナプス伝達の長期増強を例に解説しよう。表現機構とは可塑的変化の実体と局在(シナプスのどこで何が起きたか)のことで、シナプス後膜上のグルタミン酸受容体の一種である2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl) propanoic acid (AMPA)受容体の表面発現増加が初期可塑性の主要な表現機構である。一方、シナプス可塑性を起こす時に活動したシナプスでのみ可塑性が起きる性質を入力特異性という。一つの神経細胞には数千から数万のシナプスがあるので、入力特異性は可塑性を起こすシナプスを限定する仕組みである。初期可塑性につながる一連の反応は、シナプス前後の同時活動により起きる同時検出反応で始まる。例えば、N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)受容体チャンネルは脱分極時にのみCa²⁺イオンを通す性質がある。このため、シナプス後細胞の脱分極時にシナプス前から放出されたグルタミン酸が起こすNMDA受容体依存性Ca²⁺流入は同時検出機構であり、この下流の反応で初期可塑性が起きるので、入力特異性機構として働く。各シナプスには異なる情報が運ばれてくるので、入力特異性機構は経験が含む多くの情報の中から覚える記憶内容を選ぶ仕組みでもある。このように、初期可塑性の主要な分子機構はかなり解明されたのだが、後期可塑性の表現機構と入力特異性機構は未解明である。

2. 後期可塑性の入力特異性

海馬を 400 μ m 厚の切片にすると、酸素と栄養を与え続けられれば試験管内で数時間は生理的な反応を記録することができる。この海馬急性切片の CA1 野で Schaffer 側枝を 100 Hz で 1 秒間刺激すると集合シナプス電位の初期勾配が 1-2 時間の間増強する（初期長期増強）。このような刺激を適当な間隔で数回繰り返すと、増強はより長時間持続する。持続性の長期増強を起こす刺激をタンパク質合成阻害剤存在下で与えると、増強は起きるが持続時間は初期長期増強に相当する程度に短くなる。持続性の長期増強では、タンパク質合成に依存しない初期可塑性が先行し、新規タンパク質合成に依存した後期可塑性が続く。長期記憶や後期可塑性は新規タンパク質合成に依存する点が短期記憶や初期可塑性と異なる。

後期可塑性の表現機構とは、新規に発現誘導される百を超える種類のタンパク質の機能に他ならない。AMPA 受容体表面発現変化の維持やスパイン形態の変化などが考えられるが詳細は不明である。

後期可塑性の入力特異性機構は、覚え続けるべき経験内容をコードした神経回路の入出力関係だけを保持する仕組みであろう。長期記憶と経験との一貫性を保証しつつ、覚え続ける記憶内容を選ぶ仕組みとも言える。新規タンパク質の合成は樹状突起と細胞体で起きる。入力特異的に後期可塑性が起きるためには、シナプス入力为新規合成遺伝子産物の機能するシナプスを決定する仕組みが必要である。樹状突起に局在する mRNA から入力依存的翻訳により新規タンパク質合成が起きる局所合成は海馬などで長期増強に必要なことが報告されている。

3. シナプスタグ仮説

一方、細胞体で合成されたタンパク質の入力特異的機能の仕組みはシナプスタグと呼ばれる。Frey と Morris はラット海馬急性切片で CA1 野 Schaffer 側枝を二箇所刺激し、一つの記録電極から独立した二経路の集合シナプス電位を測定した（図 1A）²⁾。一方の刺激電極 S1 に後期長期増強を起こす刺激を与えた後、他方の刺激電極 S2 から初期長期増強を起こす刺激を与えた。その結果、本来ならば S1 で後期長期増強、S2 で初期長期増強が入力特異的に起きるはずだが、両経路で後期長期増強が起きた（図 1D）。この S2 経路の変化は連合性後期長期増強といい、これを説明するためにシナプスタグという仮説が考案された。シナプスタグは、初期長期増強（及び後期長期増強）を起こ

す刺激を受けたシナプスで活性化する仮想的な生化学活性で、細胞体で新規合成された後期可塑性関連タンパク質はシナプスタグが活性化したシナプスでのみ機能できると仮定する。上記の実験では両シナプスでシナプスタグが活性化しているから、S2 シナプスの後期可塑性は S1 シナプス入力に従って合成されたタンパク質を S2 シナプスが横取りしたために起きたと解釈できる。

上記の二経路実験はシナプスタグの操作的な定義となる方法で、重要な性質をいくつか明らかにした。まず、連合性後期可塑性が起きたので、合成を指示した S1 シナプス以外のシナプスでも新規合成タンパク質が機能できることが分かった²⁾。細胞体で合成されたタンパク質は行き先が決定されないまま樹状突起を輸送されるのである。次に、S1 経路の刺激でタンパク質合成が起きていれば S2 経路の刺激時にタンパク質合成阻害剤が存在しても連合性後期可塑性が起きた（図 1F）から²⁾、S2 経路の可塑性は局所合成に依存しない。そして、S1 と S2 の刺激は約 2 時間程度まで隔たっても連合性可塑性が起きたので、シナプスタグには寿命がある³⁾。まとめると、シナプスタグは、1) 初期可塑性に伴い、2) 入力特異的に、3) タンパク質合成によらずに、4) 一過性に活性化し、5) 目的地を知らずに輸送される細胞体由来タンパク質の、6) シナプス機能発現を可能にする生化学的活性である。二経路実験からはその他、PKM ζ 、PKA、MEK1/2、CaMK II⁴⁾、neuropsin⁵⁾などが連合性可塑性の成立に関与すること、海馬錐体細胞の尖端及び基底樹状突起では関与分子が異なることが示唆されている⁶⁾。

二経路実験はシナプスタグ活性を直接測るのではなく、連合性後期可塑性の有無を観測する。シナプスタグは後期可塑性の内部過程の一つに過ぎず、最終結果から内部過程の特定の一つの状況を推論するには更に実験結果の解釈に仮定を追加せざるを得ない。シナプスタグの定義は「上記 1)-5) を満たすような 6)」という曖昧なものである。二経路実験は操作的な定義を与えるが、生化学的には定義されていない⁷⁾。シナプスタグの生化学実体を知るには、候補活性を仮定し、それが実際にシナプスタグの性質を持つかどうかを検討するしかなかった。

4. シナプスタグの生化学実体

樹状突起の物質輸送は主に微小管・キネシン系による。一方、興奮性シナプス後部は樹状突起上の棘（スパイン）と呼ばれる小突起にあるが、スパイン内の輸送系は F アクチン・ミオシン系しかない。輸送小胞が樹状突起からス

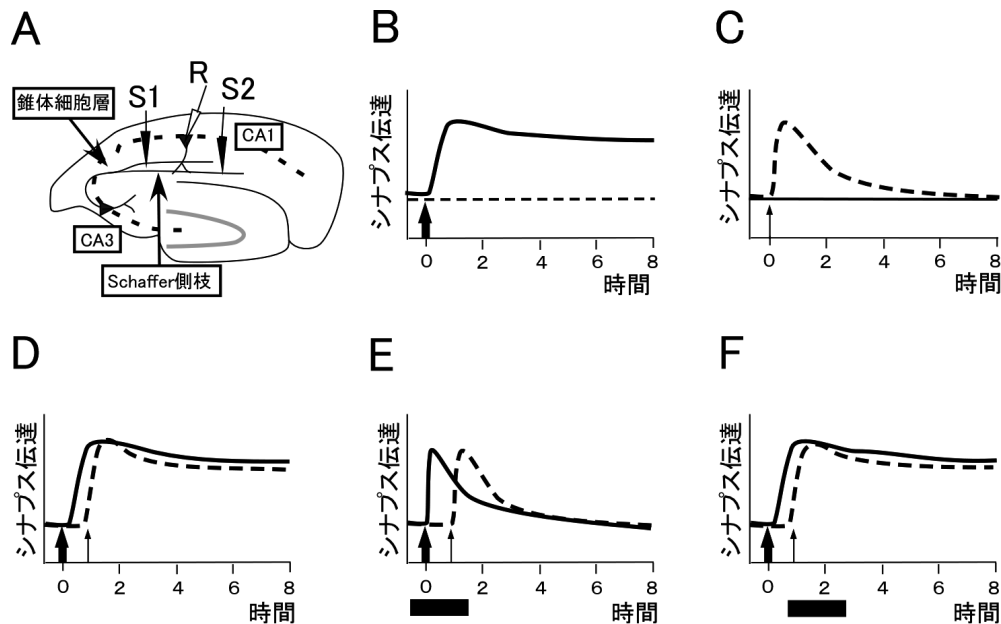


図1 二経路実験

- A セットアップ. 海馬急性切片のCA1領域で集合シナプス電位を計測する(電極R). 独立した二つの入力線維束をS1とS2の刺激電極で刺激し分ける.
- B S1に後期長期増強を起こす刺激(S:太矢印)を与えると, S1シナプスのみ(実線)後期長期増強を起こす. B-Fで図の縦軸はシナプス伝達効率の指標となる集合シナプス電位. 横軸はSやW刺激を与えた時を起点とする時間経過(単位は時間).
- C S2に初期長期増強を起こす刺激(W:細矢印)を与えると, S2シナプスのみ(破線)初期長期増強を起こす.
- D S1にSを与え, 30分後にS2にWを与えると, 両シナプスが後期長期増強を起こす.
- E タンパク質合成阻害剤アニソマイシン存在下(黒バー)ではSを与えても後期長期増強が起きない.
- F S1にSを与えた後, アニソマイシン存在下でS2にWを与えると両経路で後期長期増強が起きる.

スパインに入る際にはレール載せ換えの仕組みが必要である. 実際, いくつかのタンパク質のスパインへの出入りはシナプス入力の制御下にある. そこで我々は, 後期可塑性の際に細胞体で誘導合成されシナプス部で機能するタンパク質の, 樹状突起からスパイン内への進入のシナプス入力による制御がシナプスタグとして働く, という仮説を立てた(図2)⁸. スパイン内に入ることが後期可塑性や長期記憶の必要条件となるようなモニタータンパク質のGFP融合タンパク質の挙動を観察すればこの仮説は検証できる. シナプス入力が融合タンパク質をスパイン内に送り込む制御をしており, その制御が上記の6つのシナプスタグの性質を持てば, この制御活性をシナプスタグと言えるだろう.

Vesl-1L (Homer-1c) は標的タンパク質結合部位と自己会合部位を持つためシナプス後部でタンパク質複合体を形成する足場タンパク質の一つである⁹. 代謝調節型グルタ

ミン酸受容体とIP₃受容体を結び付けるなど重要な役割を果たしている. Vesl-1S (Homer-1a) は1Lと同じ遺伝子の産物だが, ポリA選択によって生じるスプライスバリエントで¹⁰, 自己会合部位を持たずVesl-1L複合体のドミナントネガティブとして作用する. Vesl-1Sタンパク質は短寿命で平常時にはほとんど検出できないが, 長期増強を起こす刺激により最初期遺伝子として細胞体で合成され, シナプス部で機能してVesl-1L複合体を壊す¹¹. この結果, シナプス後部の再構築が可能になるので後期可塑性に必要な分子である. 実際, Vesl-1S特異的欠損マウスでは長期記憶に異常がある¹².

我々はVesl-1Sをモニタータンパク質に選びEGFPを融合したタンパク質(VE)をラット初代培養神経細胞に導入し, スパイン形成が完成するまで約2週間培養を続けた. 細胞体からスパインまでVEの蛍光が均一に見られ

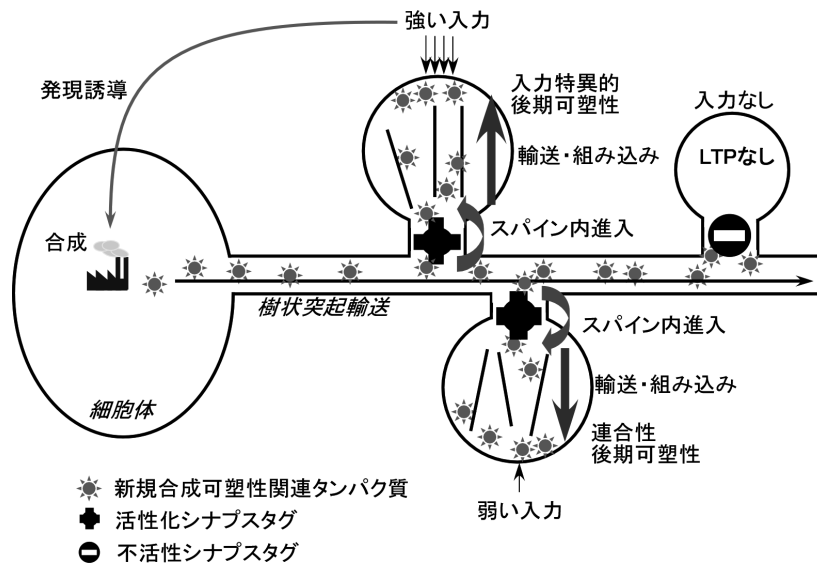


図2 我々の仮説

細胞体から樹状突起を輸送されてきた新規合成タンパク質をスパインに取り込む機構がある。この機構はシナプス入力によって活性化され、新規合成タンパク質はこの活性によって樹状突起からスパインに入る。シナプス部で後期可塑性に必須の役割を持つタンパク質がこの機構でスパインに配送されれば、この機構はシナプスタグである。

た。Mg²⁺を含まない細胞外溶液でシナプス部のNMDA受容体を活性化すると、スパイン内のVE蛍光が有意に増加した。この刺激は遺伝子発現やスパイン形態の変化を起こさない。また、スパイン内VE蛍光増加はタンパク質合成阻害剤やプロテアソーム阻害剤の存在下でも同様に起きたので、樹状突起内のVEがスパイン内に入ったための変化である。この変化は誘導によりVE量を増加させただけでは起きず、初期可塑性に必要なシナプス部のNMDA受容体活性化によって入力特異的かつ一過的に活性化された。最後に、VEの代わりに光活性化GFPとの融合タンパク質(VPA)を発現した神経細胞の細胞体にレーザー光を照射して、細胞体内のみにVPA蛍光を発生させた。この蛍光は細胞体を出発して全ての樹状突起に広がるがスパイン内には入らなかった。微小灌流法で一部のスパインでのみNMDA受容体を活性化するとその領域内のスパインにのみVPAの蛍光が集積した。従って、スパインへの輸送活性は細胞体を出発したVes1-1Sタンパク質を基質とすることができる。このように、Ves1-1Sのスパインへの輸送制御はシナプスタグの六つの要件をすべて満たす。Ves1-1Sタンパク質は後期可塑性に必要なから、細胞体からスパインに入力特異的にこれを輸送する活性はVEが入ったシナプスに後期可塑性を引き起こす必要条件になる。従って、

この活性はVes1-1Sタンパク質に対するシナプスタグとして機能すると結論した。

最後に本研究⁸⁾から分かったことを三つ挙げる。まず、シナプスタグ仮説は二経路実験で支持されていたが、この仕組みが実在すると結論するには、仮説に合致した挙動をするタンパク質例が必要であった。本研究によってVes1-1Sを例としてシナプスタグ仮説は実証された。次に、局所合成の知見と合わせ¹³⁾、新規合成シナプスタンパク質を機能すべき局所部位に輸送する活性が後期可塑性の入力特異性機構(の一部)である。最後に、シナプスタグの生化学的実体が分かったことで、シナプスタグと初期可塑性を独立に操作し、後期可塑性の分子機構を解明する道が開けたと言える。

- 1) Hebb, D.O. (2002) *The Organization of Behavior*, pp. 62. Lawrence Erlbaum Associates, Publishers. Mahwah, New Jersey.
- 2) Frey, U. & Morris, R.G.M. (1997) *Nature*, 385, 533-536.
- 3) Frey, U. & Morris, R.G.M. (1998) *Neuropharmacol.*, 37, 545-552.
- 4) Sajikumar, S., Navakkode, S., & Frey, J.U. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 5068-5080.
- 5) Ishikawa, Y., Horii, Y., Tamura, H., & Shiosaka, S. (2008) *J. Neurosci.*, 28, 843-849.

- 6) Sajikumar, S. & Frey, J.U. (2004) *Neurobiol. Learning Memory*, 82, 12–25.
- 7) Martin, K.C. & Koscic, K.S. (2002) *Nature Rev. Neurosci.*, 3, 813–820.
- 8) Okada, D., Ozawa, F., & Inokuchi, K. (2009) *Science*, 324, 904–909.
- 9) Kato, A., Ozawa, F., Saitoh, Y., Hirai, K., & Inokuchi, K. (1997) *FEBS Letters*, 412, 183–189.
- 10) Niibori, Y., Hayashi, F., Hirai, K., Matsui, M., & Inokuchi, K. (2007) *Neurosci. Res.*, 57, 399–410.
- 11) Inoue, Y., Udo, H., Inokuchi, K., & Sugiyama, H. (2007) *Neuroscience*, 150, 841–852.
- 12) Inoue N., Nakao, H., Migishima, R., Hino, T., Matsui, M., Hayashi, F., Nakao, K., Manabe, T., Aiba, A., & Inokuchi, K. (2009) *Mol. Brain*, 2, 7.
- 13) Wang, D.O., Kim, S.M., Zhao, Y., Hwang, H., Miura S.K., Sossin, W.S., & Martin, K.C. (2009) *Science*, 324, 1536–1540.

岡田 大助¹, 井ノ口 馨^{2,3}

(¹北里大学大学院医療系研究科分子神経生物学,
北里大学医学部生化学,

²富山大学大学院医学薬学研究部,
富山大学医学部生化学,

³JST, CREST)

Molecular evidence for synaptic tagging hypothesis
Daisuke Okada¹ and Kaoru Inokuchi^{2,3} (¹Kitasato University, School of Medicine, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara 252-0374, Japan, ²Toyama University, School of Medicine, 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan)

分子遺伝学で探るシヨウジョウバエの聴覚と重力感覚の神経回路

はじめに

分子遺伝学ツールが整備されたモデル生物を利用した脳研究が、近年急速に拡大してきた。特定の細胞で任意の遺伝子を発現させることができる遺伝子発現誘導系を用いると、神経細胞を解析するための様々なタンパク質を、目的の細胞のみで発現誘導できる¹⁾。例えば GFP などの、神経細胞の形態を可視化するようなタンパク質を発現させれば、従来抗体染色やゴルジ染色で行われていた解剖学的解析を置きかえることができる。異なる種類の遺伝子発現誘導系を組み合わせることにより、別々の細胞群を異なるタンパク質で染め分けることも可能である²⁾。また、神経活動に応じて蛍光が変化するタンパク質や、神経の発火やシ

ナプス伝達を阻害するような毒素を発現させた個体を作成すれば、特定の条件下における神経細胞の活動や、その阻害が脳機能に及ぼす効果を観察できる。光や熱刺激によって開口するチャンネルタンパク質を発現させることで任意のタイミングで特定の神経活動を操作することができる。光遺伝学や熱遺伝学も発展してきた³⁾。このようなツールの発達により、解剖学・生理学・行動学を連携させて特定の神経の機能を統合的に解析することが可能になってきたのである。

私たちは、音情報を処理する神経機構を解明するためのモデルとして、このような遺伝子発現誘導系が整備されたシヨウジョウバエにいち早く着目し、研究を行ってきた。これまでの研究により、6億年以上前に分岐した生物種であるシヨウジョウバエと哺乳類の脳において、視覚・嗅覚・味覚など様々な感覚情報処理系の神経回路に多くの類似性が見いだされている⁴⁻⁶⁾。これは、シヨウジョウバエの脳の理解が、私たちの脳における感覚情報処理の理解にも貢献しうることを示している。また、シヨウジョウバエは求愛や学習記憶で高度な行動様式を示すにも関わらず、脳の神経細胞数が片半球数万個と少ない。そのため、特定の感覚情報処理に関わる神経細胞を網羅的に同定する、といった解析も現実的である。本稿では、このような観点から私たちが進めてきた、シヨウジョウバエを用いた聴覚・重力感覚研究の最新知見を紹介する。

1. シヨウジョウバエの「耳」の感覚細胞

空気の微小な振動として伝わる「音」と、物体にかかる力の向きである「重力」を、私たちはどちらも耳で受容する。哺乳類の内耳には音を感知する「蝸牛器官」と、直線加速度や重力の方向を感知する「耳石器官」という別々の感覚器が存在し、それぞれ蝸牛核と前庭核とよばれる脳の中枢に情報を送っている。ヒトなどの哺乳類と同様に、昆虫においても音検知は外界環境の認知や仲間どうしのコミュニケーションに、重力検知は姿勢の制御に大きな役割を果たしている。例えばシヨウジョウバエは、種特異的な周波数と時間パターンを持つ求愛歌(羽音)を持ち、その求愛歌により雌雄共に配偶行動が促進される⁷⁾。これは、脳が音の持つ特徴を認識して適切な行動を導き出す、という一連の神経機構を理解するためのモデルとして、シヨウジョウバエの聴覚系が有用であることを意味している。そこで私たちはまず、シヨウジョウバエの「耳」から始まる一次神経回路の解析を開始した。シヨウジョウバエは触角基部にあるジョンストン器官と呼ばれる機械感覚器で音を