

Title	ニワトリ胚大脳解離培養系における興奮性シナプス伝達の長期的増強現象の解析
Author(s)	工藤, 卓
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144304
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ニワトリ胚大脳解離培養系における
興奮性シナプス伝達の長期的増強現象の解析

博士学位論文
1998年4月

科学技術振興事業団

工藤 卓

要旨

記憶、学習など脳の高次情報処理機構の解明には、その基礎過程である単一シナプス間の情報伝達の特徴を、細胞全体の機能を視野に入れて分子レベルから詳細に検討する必要がある。そこで本研究では、大量培養が容易であり、シナプス可塑性に関与する物質の分子的探索が容易である、ニワトリ胚解離培養系を確立し、この培養系において誘導されるシナプス伝達効率の長期的増強の特性を明らかにした。本系における主要な興奮性神経伝達を担っているのは、グルタミン酸作動性シナプスであり、 α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate / kainate 型グルタミン酸受容体 (A/K-R) による電流成分が興奮性シナプス後電流(EPSCs)の主要な成分である。シナプス伝達効率の増強の解析には、自発性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents; SEPSCs) を記録し、その3分間の平均振幅をシナプス伝達効率の指標として用いた。SEPSCs の平均振幅は、15分間の一時的な Mg^{2+} -free 条件により増大し、増強誘導前の振幅と統計的に有意な差があった。このようなシナプス伝達効率の長期的増強は少なくとも 1 時間 30 分以上にわたって持続した。

A/K-R のアンタゴニスト、6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) 及び tetrodotoxin(TTX) を Mg^{2+} -free 条件時に加えることで増強現象が阻害されたことから、この増強現象はシナプス活動に依存したものである。また、N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸受容体(NMDA-R)のアンタゴニストである D,L-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D,L-APV)により、 Mg^{2+} -free 条件時の NMDA-R の活性を阻害したところ、SEPSCs の増強は抑えられたことから NMDA-R が活性化することが SEPSCs の増強に必須であることが示唆された。さらに、タンパク質キナーゼCを阻害することで、増強は阻害された。このことから、NMDA-R の活性化に伴う細胞内カルシウムの上昇により、タンパク質キナーゼC (PKC) が活性化することがこ

の増強に必須であることが示唆された。

タンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン Dもこの増強を抑えたことから、15分間の Mg^{2+} -free 条件の間に mRNA、タンパク質が新規に合成されることが SEPPSCs の増強を発現するために必須であることが明らかとなった。ホールセル記録電極内液中にシクロヘキシミドを加えてシナプス後細胞のみ選択的にタンパク質合成を阻害したところ、タンパク質合成を阻害した細胞においてのみ選択的に増強の誘導が阻害された。この結果から、少なくともシナプス後細胞においてこの増強現象に必須であるタンパク質合成が行われていることが明らかとなった。

さらに、新規に合成されたタンパク質が何らかの拡散性増強促進因子として細胞外に放出されている可能性を検討した。 Mg^{2+} -free 条件により、増強を誘導したのち、この Mg^{2+} を含まない記録外液を採取し、1mM の $MgCl_2$ を加えて通常の記録外液とイオン組成が同じになるように調整し、条件付け記録外液 (CM) とした。別の培養皿のニューロンに対し、ホールセル記録を行い、このCMを添加すると、SEPPSCs の振幅が有意に上昇した。対照実験として Mg^{2+} -free による増強の誘導を行わない場合の記録外液を他の培養皿のニューロンに添加した場合は、増強が起こらないことも確認した。この結果は、CM 中に含まれる因子は、 Mg^{2+} -free 条件による増強誘導条件によって放出されることを示唆する。

この CM は熱処理、トリプシン処理することで増強誘導活性を失ったことから、CM に含まれる増強因子はタンパク質性のものであることが明らかとなった。また、限界ポアサイズを持つフィルターで CM を分画したところ、50k-100k のところに活性があった。タンパク質分子の特性によりフィルター孔を通る分子の大きさが変わることを考慮すると、増強因子は少なくとも 30k 以上の大きさを持つことが示唆された。

近年、グリア細胞がシナプス伝達効率に関わるといういくつかの報告があるが、

本培養系においては、合成ペプチドSFP4によりグリア細胞を除去した系においても、 Mg^{2+} -free 条件、及び CM によって SEPSCs の増強が誘導されることが明らかになった。このことは CM 中の因子はグリア細胞を介することなく直接神経細胞自体に作用することを示す。

カルフォスチン C によるタンパク質キナーゼ C 阻害条件下でもこの CM は SEPSCs の増強を誘導した。この結果から、CM に含まれる因子は、タンパク質キナーゼ C を介さない細胞内情報伝達系により作動することが示唆され、タンパク質キナーゼ C は NMDA-R の活性化からタンパク質合成までの経路に関わる可能性が高い。また、シクロヘキシミドによりタンパク質合成を阻害した状態で CM を加えても、SEPSCs の振幅は有意に増加した。このことは、CM 中の因子による増強には新規タンパク質の合成を必要としないことを示唆するものである。これに対し、 Mg^{2+} -free 条件による増強の誘導には、 Mg^{2+} -free 条件時にタンパク質が新規に合成されることが必須であったことを併せて考察すれば、 Mg^{2+} -free 条件による増強現象の発現には細胞外に放出されるタンパク質性のシナプス伝達効率促進因子が必須であり、これを合成するためのタンパク質合成が必要であると考えられる。タンパク質合成がシナプス後細胞において必須であること、および、増強に伴うシナプス部位の増加が微小シナプス後電流 (mEPSCs) 解析の結果から示唆されることからこのタンパク質性因子はシナプス後細胞で合成され、一種の逆行性伝達物質としてシナプス前細胞に作用する仮説が成り立つ。

結論として SEPSCs の増強にはタンパク質性の拡散性因子が放出されることが必須であり、この因子の放出のために新規タンパク質合成が必要である。

目次

第1章 序論	1
1. シナプス伝達機構の調節	1
2. リン酸化と可塑性	4
3. 蛋白質合成の必要性	5
第2章 Mg^{2+} -free 条件による シナプス伝達効率長期的増強現象の解析	8
第1節 序論	9
第2節 材料及び実験方法	11
1. ニワトリ胚大脳の初代解離培養	10
2. グリア除去細胞培養	12
3. 電気生理学的手法	13
4. 微小 EPSCs の解析	17
第3節 実験結果	18
1. Mg^{2+} -free 条件の SEPSCs に対する効果	18
2. SEPSCs 増強現象の神経活動依存性	22
3. SEPSCs の増強への NMDA 型グルタミン酸受容体の関与	22

4. グリア除去培養系における SEPSCs 増強の誘導	25
5. mEPSCs の変化	25
第4節 考察	31
1. Mg ²⁺ -free 条件による SEPSCs の神経活動依存的増強	31
2. SEPSCs 増強のグリア細胞非依存性	33
3. SEPSCs の増強に伴う mEPSCs 頻度の上昇	34
第3章 シナプス伝達効率長期的増強現象 における蛋白質キナーゼ及び蛋白質合成の関与	36
第1節 序論	37
第2節 材料及び実験方法	40
1. ニワトリ胚大脳の初代解離培養	40
2. 電気生理学的手法	40
3. 薬理的実験	41
第3節 実験結果	42
1. SEPSCs の増強のタンパク質キナーゼ依存性	42
2. SEPSCs の増強のタンパク質合成依存性	45

第 4 節 考察	49
1. SEPSCs の増強のタンパク質キナーゼ依存性	49
2. SEPSCs の増強のタンパク質合成依存性	50
第 4 章 シナプス伝達効率の増強を 誘導する拡散性蛋白因子作用機序の解析	52
第 1 節 序論	53
第 2 節 材料及び実験方法	55
1. ニワトリ胚大脳の前代解離培養	55
2. 電気生理学的手法	55
3. 条件付け記録外液 (CM) の調製	55
4. CM のトリプシン処理	55
第 3 節 実験結果	58
1. CM による SEPSCs の増強	58
2. CM 中のタンパク質性因子	62
3. 増強誘導因子とタンパク質合成の関連性	65
4. グリア細胞除去培養下での CM の活性	65
第 4 節 考察	71

第5章 結論	74
謝辞	78
参考文献	79
論文発表及び学会発表	87

第1章

序論

長期増強、長期抑圧に代表されるシナプス伝達効率の可塑的長期変化は、記憶・学習の神経的な基礎として、精力的に研究されている現象である。長期増強現象(Long-term potentiation; LTP, Bliss and Lomo 1973)は記憶の形成に必須であるという知見が学習実験などからも示唆されている(Bach et al. 1995; Barnes 1995; Barnes et al. 1994, Aiba et al. 1994,)。また、長期抑圧現象(Long-term depression; LTD, Ito et al. 1982)は小脳での運動学習に深く関わっている証拠があり、運動学習に対する詳細な数学的モデルも提出されている(Ito 1986)。しかしながら、これらのシナプス部位での変化がどのような形で統合され、調節されて、脳の高次機能が発現されるのかは依然として不明な部分が多い。

1. シナプス伝達機構の調節

シナプス伝達機構の調節が LTP/LTD の本質であるが、このメカニズムは受容体のクラスター形成、シナプス部位の拡大縮小、放出確率の増減、シナプス小胞の再回収(リサイクリング)など様々な要素を含む。近年、NMDA-R しかもたないシナプス、すなわち、静的シナプス(サイレントシナプス)の存在が報告され(Isaac et al. 1995; Kiyosue et al. 1997; Liao et al. 1995)、シナプス部位の拡大はこれをもとにした機構でも説明できる。すなわち、サイレントシナプスに、機能する A/K-R が挿入されることで有効なシナプス(アンサイレントなシナプス)に変われば、シナプス前細胞の活性が変わらなくとも有効なシナプス部位が増大したことになる。Liu らは、早い動力学特性(カイネティクス)を持つグルタミン酸受容体阻害剤 γ -D-glutamylglycine (γ -DGG) を用いて、各単一シナプス部位におけるグルタミン酸

によるシナプス伝達が、飽和しているかどうかを解析した(Liu and Tsien 1997)。この結果、小さい振幅のシナプス電流を持つシナプスの方が優位に大きく阻害された。最も大きな振幅のシナプス電流を持つシナプス以外は、そのシナプス間隙に於いてグルタミン酸が飽和していないことを示すものである。LTP に伴い伝達物質放出量が増大するメカニズムもあり得ることになる。しかし、Mainen らの報告では、LTP の誘導によっては、A/K-R の頻度依存性阻害剤による EPSCs 振幅の減少曲線は変化しなかった。このことは、LTP の発現に於いてシナプス前細胞の伝達物質放出量は変化せず、また、シナプス後細胞の A/K-R の数・配置などが変化していないことを同時に示唆する(Mainen and Malinow 1997)。つまり、サイレントシナプスのアンサイレント化などの新しいシナプス部位の出現の可能性が示唆される。Kullmann らは、サイレントシナプスに対し、スピルオーバーという新しい概念を提唱している(Kullmann and Asztely 1998; Kullmann et al. 1996)。サイレントシナプスは NMDA-R を介する電流のみ観察されるシナプスであるが、観察された現象は、グルタミン酸がシナプス間隙より漏れ出て(スピルオーバー)、近傍のシナプスへ達して NMDA-R を活性化するということでも説明できる。NMDA-R は A/K-R よりグルタミン酸に対する親和性が高いため、A/K-R が活性化しない濃度のグルタミン酸でも活性化し得るので NMDA-R 電流のみ観察されるという概念である。

また、シナプス伝達の不応期を利用して、5ms または 30ms の時間間隔で 2 つの刺激を与えたときの1発目の EPSCs の振幅と2発目の振幅の大きさを比べることで、シナプス前膜におけるシナプス伝達物質の放出確率 (Pr)を割り出した、Hjelmstand らの報告では、LTP や LTD の前後でこの Pr は変化しなかった(Hjelmstand et al. 1997)。さらに、Schulz らの報告では、ペアード・パルス・ファシリテーション(paired pulse facilitation; PPF)の比が LTP/LTD の誘導でどのように変化するか解析したところ、PPF の比の変化はシナプス電流の初期値にのみ依存

しており、刺激前の伝達物質放出確率と誘導される LTP の大きさに相関があるというものであった(Schulz and Fitzgibbons 1997)。これらの結果は放出部位の数(n)の増加と LTP の発現が関連していることを示す。もし LTD が LTP と逆の誘導機構で起こるならば、LTD では、この結果と逆の結果が期待されるが、LTD 後、PPF の比は上昇するので、LTD は LTP の単純な逆転現象ではないと主張している。

LTP のメカニズムとして伝達物質放出部位が増えるという説と整合性があるように思われるのがシナプス部位の形態変化と LTP の発現との関連性である。LTP の誘導後 45 分で、スパインの長さが短くなり(Rusakov et al. 1996)、LTP 後 24 時間で、スパインの形がへこんだ形(シナプス前膜部がシナプス後膜部へ陥入)に変わる(Weeks and Petit 1997)という報告がある。興味深いのは、軸索-スパイン間のシナプスが LTP の誘導に伴い、一つのシナプスが複数のシナプスへ分割されたが、軸索-樹状突起幹部間のシナプスの数は変わらない、というもので、スパインの数自体が増えると言うより、形が変わることで放出部位の数をかえるという概念が提唱されている(Rusakov et al. 1997)。これらのシナプス部位の変化は成長因子による神経突起の伸長と重なる機構があるかもしれない。こうした文脈から、成長因子とシナプス可塑性の関連性も注目されている。神経栄養因子に関しては、脳由来神経栄養因子(Brain-Derived Neurotrophic Factor; BDNF)、ニューロトロフィン-3(Neurotrophin-3; NT3)が LTP 誘導活性を持ち、神経成長因子(Nerve Growth Factor; NGF)は持たないという結果が主流である(Kang and Schuman 1995a; Kang and Schuman 1995b)。また、BDNF で誘導した LTP により、シータバースト刺激で誘導した LTP は閉塞(occlude)されないが、テタヌス刺激で誘導した LTP は閉塞されるという結果から、成長因子による LTP はテタヌス-LTP の維持相と共通のメカニズムを持つこと、また、さらに LTP の維持相が Trk-B 抗体及び、あらかじめ誘導された BDNF-LTP により阻害されるが、この阻害が起こる時間部分が決まって

おり、30分-70分という臨界期(critical period)があることが報告されている(Kang et al. 1997)。

2. リン酸化と可塑性

グルタミン酸受容体のリン酸化、もしくは、 Ca^{2+} により活性を調節されるタンパクキナーゼ (PKC, CaMK II など) による遺伝子発現と LTP/LTD の発現の関連性については、様々な議論がなされてきたが、未だ一つの見解には統一されていない。実験に用いる動物種、組織、材料の処理方法、増強の誘導条件などさまざまな要因により影響を受けるものと思われる。その中で、タンパク質キナーゼA(PKA)はアメフラシ、海馬 CA1 領域、海馬歯状回などの様々な部位でシナプス伝達効率の変化に際して、cAMP response element 結合タンパク質(CREB)を介して遺伝子発現を誘起するという報告がある。Kandelらのグループは、マウス海馬 CA1 領域に於いて、PKA に依存し、新規タンパク質合成を必要としない中間層(intermediate-LTP; I-LTP)があることを提唱している。LTP 発現に於ける PKA の役割として、まず、遅延相(late-LTP; L-LTP)の発現維持に必要なタンパク質のリン酸化と、I-LTP に必要なフォスファターゼ活性の抑制という異なる役割を主張している(Winder et al. 1998)。また、Huang と Kandel らは、カルシウム/カルモジュリン依存性タンパクキナーゼ II (CaMK II)を阻害すると LTD を阻害するが、LTP は阻害せず、PKA を阻害するとLTPを阻害するが、LTDは阻害しないという結果を報告をした(Huang and Kandel 1996)。この結果は LTP と LTD で異なる細胞内情報伝達系が駆動される可能性を示している。PKC, CaMK II についても、実際に酵素活性や自己リン酸化の度合いが LTP に伴って変化することが確かめられている(Barria et al. 1997, Sacktor et al. 1993)。CaMK II に関しては、近年、Otmakhovらがピペット内還流の手法で阻害剤を効率的にシナプス後細胞に導入し、CaMK II は LTP の誘導に

必須であるが、維持には必要でないことを示した(Otmakhov et al. 1997)。また、PKC に関しては、細胞外に存在するエクトタンパク質キナーゼが PKC 活性を持ち、これと LTP の関連性が主張されている(Chen et al. 1996; Ehrlich 1996)。LTP と対照的に小脳の LTD に関しては、Hartell や Linden の報告のように PKC, タンパク質キナーゼ G (PKG)の必要性がほぼ定説となっている(Hartell 1996; Linden and Connor 1991)。このように、タンパク質キナーゼによるリン酸化の増強現象への関与は、組織や実験系によって微妙に異なっている。

3. タンパク質合成の必要性

シナプス伝達効率の可塑的長期変化の機構として、増強あるいは抑圧したシナプス伝達のレベルを長期間にわたって維持するためのタンパク質合成の必要性は広く支持されている。そのタンパク質合成に要する時間については、実験系や実験材料、方法によって諸説があり、シナプス伝達効率変化の時間経過のどこに対応するのかという点についてもまだ一致を見ていない。従来、LTP には、Ca²⁺の流入による一時的な増強による誘導相、タンパク質リン酸化 (Malenka et al. 1986) や、タンパク質合成による構造的変化を伴う持続相の二つの相がある(Malenka 1991; Nguyen and Kandel 1996)と考えられてきたが、現在この境界は曖昧になっている。タンパク質キナーゼの恒久的活性化による持続相の実現という仮説(Malinow et al. 1988)や、いずれの相にも分類不能な中間フェーズが存在する(Winder et al. 1998)という報告、比較的早いタンパク質合成による増強の発現など、新しい概念が中心的になっている。タンパク質合成と可塑性の関係において近年中心的な話題の一つはシナプティックタグ(Frey and Morris 1997)と局所的タンパク合成(Kang and Schuman 1996)という概念である。前者は、条件刺激によってシナプス部位に”シナプティックタグ”という、「伝達効率の変化を誘導したこと」の何らかの指標が形

成され、これを目印として細胞体で合成されたタンパク質、mRNA が特定のシナプス部位に供給されるというものである。後者は、シナプス部位のごく近傍に CaMK II や PKA などの酵素群、mRNA,リボソームなどの合成装置が準備されており、条件刺激によって局所的タンパク合成が駆動されて LTP を発現するという概念で、どちらも LTP のシナプス特異性を説明できる。局所的タンパク合成では、速いタンパク質合成が期待できるが、これを示唆する報告として LTP 誘導後 20 分で NMDA-R のサブユニット、NR2A と NR2B が一過性に上昇し、誘導後 48 時間付近で再び上昇が見られるというものがある(Zastrow and Browning 1997)

in vitro で見られる現象の延長線上に *in vivo* で見られる現象があるはずだが、脳の複雑さ、実験手法上の困難のために、その間には実験結果の断絶があるのが現状である。こうした矛盾点の一つの原因として、実験の時間経過の差というものがある。*in vitro* ではなかなか *in vivo* のような長期的記録が得られないため、*in vivo* で起こった現象を検証しにくい。逆に、シナプス伝達効率の調整に関与する分子をとらえたり、微細な構造の詳細な解析を行うには *in vitro* の系が適している。

これまで述べてきた長期増強現象に関する議論のうち手法上の困難によって明確でない問題点がいくつかある。例えば、シナプス部位の形態の変化と増強の関連性に関しては、生きたままの状態でシナプス部位を観察しつつ増強を誘導した例は少ない。こうした研究が増えてくればより早い時間でシナプス部位の形態が変化する過程がとらえられる可能性もある。微細な構造を生きたまま観察しつつ各種の操作を加えるには、培養系のようにより単純な系が必要である。また、長期増強現象のタンパク質合成依存的な維持層が増強誘導後どのくらいで開始されるかは未だ不明確であるが、これは、スライス標本を用いた研究では、各種阻害剤が組織に浸透するのに時間がかかるため、細かな時間間隔での阻害の調節がしにくいことも一因である。

培養系ならば速やかな薬物投与が可能であり、不必要に高濃度の薬物を投与する必要もなく、こうした薬理学的実験に適正がある。このように *in vivo* の系で起こっている現象をより単純な培養系で再現し、得られた新しい知見を *in vivo* の系にフィードバックすることは脳機能を分子から機能発現まで統合して理解するためには是非とも必要な過程である。また、本研究で用いたニワトリ胚大脳解離培養系は、大量培養が容易であり、シナプス伝達効率の調整に関与する分子群を検索し、精製するにも有効な系である。本研究では、シナプス伝達効率を調節する分子を検索するのに有効な解離培養系を用いてシナプス伝達効率を評価する手法を確立し、一つの系で増強現象の誘導から発現までの一連の機構を解析することを試みた。

第2章 Mg^{2+} -free 条件による シナプス伝達効率長期的増強現象の解析

第1節 序論

Bliss らによって初めて発見された長期増強現象(LTP; Bliss and Lomo 1973)は現在、記憶の神経的な基礎としてもっとも有力なものである。シナプス後電流の振幅増大が長期間にわたって持続する現象であり、ノックアウトマウスを用いた研究でこの長期増強を阻害したものでは学習障害をきたす(Aiba et al. 1994) など、記憶との関連性が報告されている(Barnes et al 1994)。齧歯類海馬 CA1 で観察される長期増強現象は、もっとも典型的な例であり、多くの知見がある。この部位においては、NMDA-R に依存した機構が提唱されている。高頻度刺激、もしくはペアリング刺激等の長期増強誘導刺激により、シナプス後細胞の脱分極が誘導され、 Mg^{2+} による NMDA-R の電位依存的阻害がはずれる。NMDA-R は、 Ca^{2+} に対し、高い透過性を持ち、NMDA-R から流入した Ca^{2+} が細胞内情報伝達系を駆動してシナプス伝達が増強される(Kauer et al. 1988; Malenka 1991)。LTP の発現機構は組織、回路動物種により様々であるが、神経活動に依存してシナプス伝達が増強するという現象は広く一般的に観察される。鳥類においても、この現象に類似の増強が報告されているが、その分子機構は未だ明らかではない(Kiyosue 1996; Margrie 1998)。

本研究で用いたニワトリ胚大脳解離培養系においては、神経細胞の発火に伴う、自発的な回路性の現象である自発性シナプス後電流が観察される。SEPSCs は、培養を開始した胚令と培養日数の和である E·E days に依存してその振幅・頻度が増大し、E·E days 16-17 で安定する(Kiyosue et al. 1996; Kiyosue et al. 1997; Kudoh et al. 1997; Tokioka et al. 1993)。SEPSCs は比較的容易に計測可能であり、シナプス伝達を調整する因子の評価系として大量のアッセイを行うのに適している。そこで、この時期の SEPSCs を本解離培養系におけるシナプス伝達の指標として解析した。シナプス伝達を調整する刺激としては、 Mg^{2+} -free 条件を用いた。

Mg²⁺-free 条件は Ca²⁺チャンネルを活性化して神経細胞の自発活動を活発化し、また NMDA-R を活性化することでシナプス増強を引き起こすことが、海馬スライスを用いた系で報告されている (Neuman et al. 1987; Psarropoulou and Kostopoulos 1991)。本系においても、機能的な NMDA-R が存在することが、電気生理学的、免疫組織科学的に示されている (Kiyosue et al. 1996; Kiyosue et al. 1997; Kudoh et al. 1997; Tokioka et al. 1993)。研究の第一段階として、解離培養系における増強現象の誘導可能性を検証し、その現象の特性を解析した。

第2節 材料及び実験方法

1. ニワトリ胚大脳の初代解離培養

胚齢 10 日 (E10) のニワトリ胚から大脳を取り出し、 Ca^{2+} - Mg^{2+} 除去リン酸緩衝液 (PBS⁻) で洗い、髄膜を除去してメスで 2mm 厚程度の切片にした。0.05% トリプシン (Gibco 社製)、10mM グルコースを含む PBS⁻ 中で 37°C で 30 分間酵素処理したのち、培養液 (表 1) で数回洗って、トリプシンを除去した。この後スポイト (FALCON 社製) で穏やかに 10-15 回ピペッティングして細胞を解離させ、35mm デイッシュ (Corning 社製) に細胞密度 5×10^5 cells/cm² でまいた。培養液は 2 日目、5 日目に半分 (1ml) 交換した。培養皿はあらかじめポリ-L-リジン (Mw.300k, Sigma 社製) でコートした。ポリ-L-リジンを培養皿に 25 μ g/ml の濃度で 1ml ずつ入れ、30 分から 3 時間静置してコートした。その後、超純水で 3 回洗浄して、遊離しているリジンを取り除き、30 分以上乾燥させたものを用いた (Kiyosue et al. 1996; Kiyosue et al. 1997; Kudoh et al. 1997; Tokioka et al. 1993)。

表.1 使用した培養液組成

改良 Eagle's MEM 培地 (Yamamoto and Taguchi 1992)

50% Earle's minimum essential medium (Gibco)

40% GIT 培地 (日本製薬)

10% Fetal calf serum (FCS)

glucose	10	m M
L-glutamine	2	m M
NaCl	30	m M
CaCl ₂	2	m M
HEPES-Na (pH7.4)	25	m M
Sodium Pyruvate	0.5	m M
Na ₂ SeO ₃	25	μ M
Choline-Cl	50	μ M
ZnS ₄	0.1	μ M
CuSO ₄	1	n M
Inositol	0.1	mM
penicillin	100	U/ml
streptomycin	100	μ g/ml
insulin	5	μ g/ml

2. グリア除去細胞培養

グリア除去培養系においては、神経細胞の基質への接着が弱くなるため、ポリ-L-リジンによる培養皿のコートを工夫した。前述の通り、ポリ-L-リジンで培養皿をコートした後、2時間程度乾燥させ、さらに同様の手法でもう一度コートを施した。神経細胞の摘出、解離は通常の培養と同様であるが、培養開始時に合成ペプチド (SFP4 と命名) を 400 μ M の濃度で加えた。SFP4 はインテグリン受容体の認識モチーフであるRGD配列を含み、S-S 結合によりループ状の立体構造を保持したペプチドである。アミノ酸配列を表.2 に示す(Taguchi et al. 1995)。培地交換時には、培養液中の SFP4 の濃度が維持されるように SFP4 を補給した。

表.2 SFP4 のアミノ酸配列

H-Gly-Ala-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Leu-Ala-NH₂

(Cys-Cys 間に S-S 結合を作る。)

3. 電気生理学的手法

培養開始後 6-8 日目の神経細胞を用いて電気生理学の実験を行った。細胞からの電氣的記録は ホール・セル記録法を用いて電位を-60mV に固定して行い、SEPSCs の変化を解析した。用いた記録外液、電極内液の組成は、以下の通りである (mM)。

記録外液: 130 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose

10 Na-Hepes (pH 7.3).

Mg²⁺-free 記録外液は、これより MgCl₂を除き、CaCl₂ を 3 mM にした。

電極内液: 130 KCH₃SO₄, 10 KCl, 0.2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 1 EGTA,

2 Mg-ATP 10 K-Hepes (pH 7.2).

ガラス電極 (GD-1.5, 成茂社製) の抵抗は、電極内液をいれて 3-6M Ω 、先端直径 1 μ m 程度のものを用いた。シリーズ抵抗と入力抵抗は記録直後に 30 ms の脱分極刺激を加えることで測定した。シリーズ抵抗の平均値は 37.8 \pm 12.8M Ω (n=72)、入力抵抗の平均値は 1.28 \pm 0.98G Ω (n=72) だった。これらの値が測定中に 20% 以上変動したものはデータとして採用しなかった。記録外液中には 25 μ M ピクロトキシン (PTX, 和光社製) を加え、抑制性シナプス後電流をブロックして興奮性のシナプス伝達のみに着目した。リキッド・ジャンクション・ポテンシャルは各測定直前に補正した。また、すべての実験は室温 (18-25 $^{\circ}$ C) で行った。

記録はパッチ・クランプ用アンプ (日本光電社製 CEZ-2400) により、1kHz のロー・パス・フィルターを通してサンプリング周波数 1kHz で A/D 変換し

(DIGIDATA 1200, Axon Instruments 社製)、パーソナルコンピューター (PROLINEA MT 4/66, COMPAQ 社製)に取り込み解析した。

実験には胚齢 10 日の胚を用い、培養開始後 6-8 日目の細胞を用いたが、この期間の培養細胞では Mg^{2+} -free 条件に対する SEPSCs の反応に差がないことはあらかじめ確認した。

シナプス伝達の解析には、シナプス前細胞を刺激して誘導されるシナプス後電流(誘導 EPSCs)を解析するほうが詳細な情報が得られる。しかし、本系においては、シナプス前細胞の灌流により、長時間安定した記録を容易に得ることが技術的に困難である。また、増強因子のアッセイなどの目的にはより簡便にシナプス伝達効率の変化を評価できる手法が必要である。そこで、誘導 EPSCs に代わるものとして、SEPSCs をシナプス伝達効率評価の指標として用いた。誘導 EPSCs との一致性を確実にするため、二つの細胞に同期して入力する SEPSCs にのみ着目して解析を行った。同期の基準は SEPSCs の開始点で $\pm 5mS$ とした。こうした SEPSCs は記録している 2 細胞に共通の入力ソースとなっているシナプス前細胞もしくは細胞群の発火によるものであり、誘導 EPSCs に対応するものであると考えられる。概念図を図 1 に示す。

細胞外記録外液を灌流により Mg^{2+} -free 記録外液に置換し、電流固定に切り替えて 15 分間静置する事で増強を誘導した(図 2)。 Mg^{2+} -free 条件は、シナプス前細胞において Ca^{2+} チャンネルを活性化し、また NMDA-R の電位依存性 Mg^{2+} ブロックをはずすことで NMDA-R の活性化を引き起こすと考えられる。この時、 Mg^{2+} -free 記録外液によって、SEPSCs の頻度が変わらないもの、遅い時定数の成分の振幅が変化しないものは、NMDA-R の発現が不十分であると考え、棄却した。

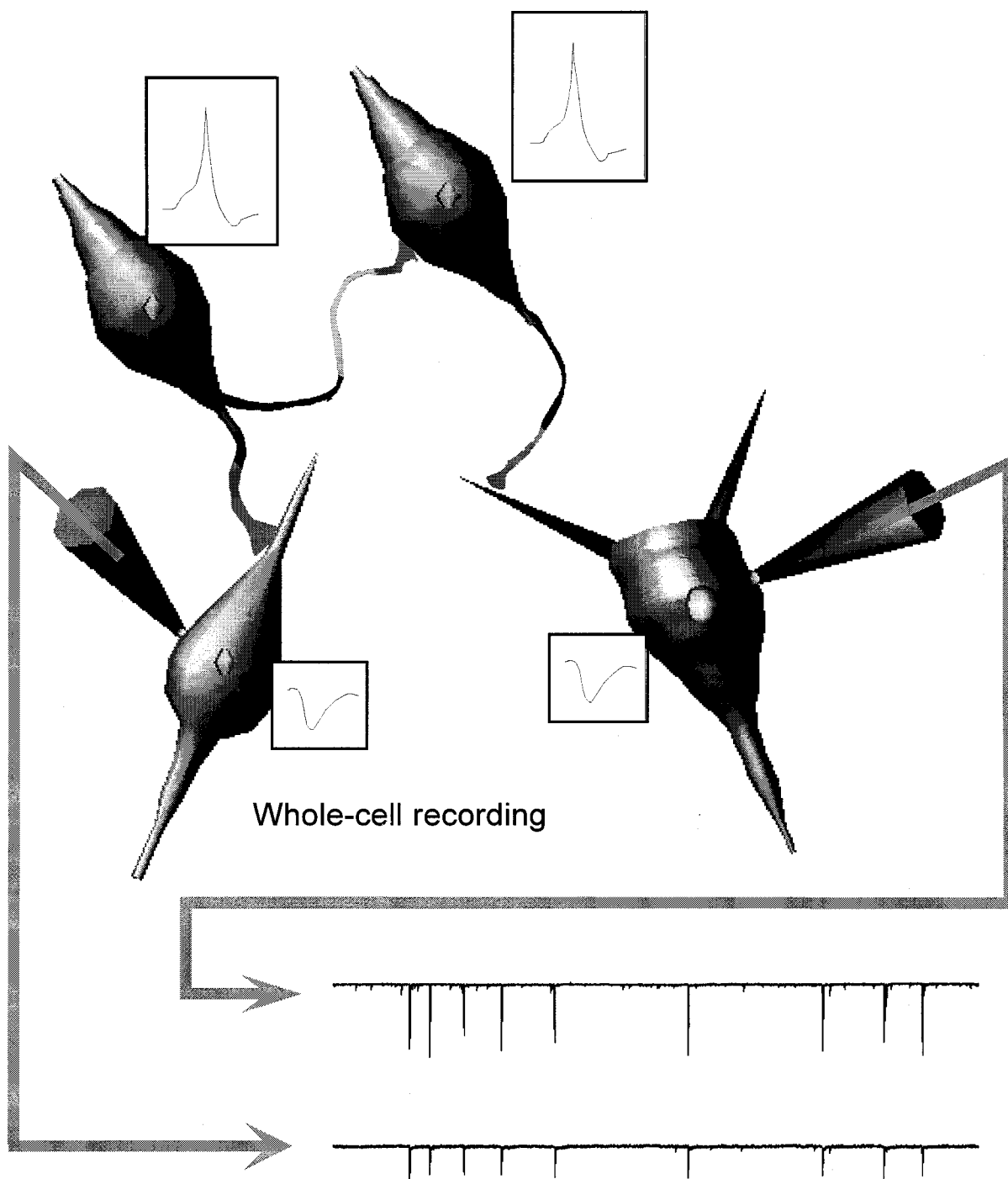


図1 誘導 EPSC に相当する同期した自発性シナプス後電流 SEPSCs

このように2細胞に対するほぼ同期した入力、共通のシナプス前細胞もしくは、前細胞群の活動により誘導されたものである。

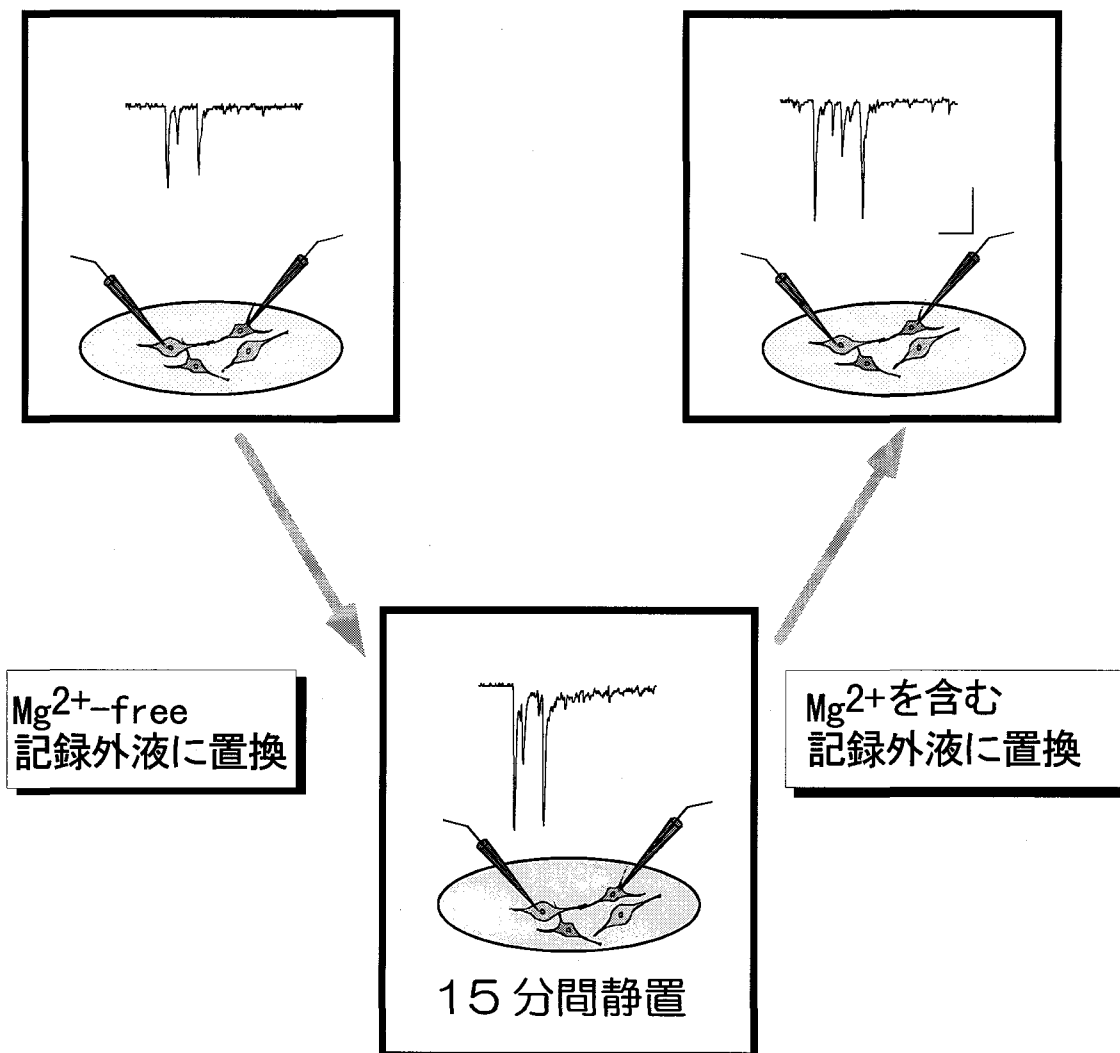


図2 Mg^{2+} -free 条件による SEPSCs 増強の誘導

初期状態の SEPSCs を記録した後、細胞外記録外液を環流により Mg^{2+} 除去記録外液に置換した。電流固定に切り替えて 15 分間静置する事で増強を誘導した。記録外液を Mg^{2+} を含む通常の外液に再置換して SEPSCs を記録し、初期状態の振幅と比較した。

4. 微小 EPSCs の解析

シナプス伝達の増強が、シナプス伝達物質量の増大によって発現されるのか、シナプス後細胞のグルタミン酸受容の感受性が増大することによるのか検討するため、mEPSCs の解析を行った。mEPSCs は、原則として単一のシナプス小胞の自発的放出によって引き起こされる EPSCs であり、増強に伴ってその頻度が上昇するならば伝達物質量の増大を示唆し、振幅が上昇するならばシナプス後細胞のグルタミン酸受容の感受性増大を示唆する。本培養系では、1mM $MgCl_2$ を含んだ記録外液中では微小 EPSCs (mEPSCs) は比較的頻度が少なく、解析が困難である。そこで、1 μ M の tetrodotoxin (TTX)、25 μ M の D,L-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D,L-APV) を含む Mg^{2+} -free 記録外液を用いて mEPSCs を記録した。この条件では、SEPSCs の増強が起こらないことは確認済みである。実験の手順は、はじめに通常の記録外液下で SEPSCs を記録し、次に TTX, APV を含む Mg^{2+} -free 記録外液に置換して mEPSCs を記録した。この後、TTX, APV を含まない Mg^{2+} -free 記録外液により SEPSCs の増強を誘導した。続いて、通常の記録外液に置換して SEPSCs を記録して増強が誘導されたことを確認したのち、再び TTX, APV を含んだ Mg^{2+} -free 記録外液下で mEPSCs を記録した。

第3節 実験結果

1. Mg^{2+} -free 条件の SEPSCs に対する効果

本系においては、培養開始後シナプス形成が進行し、これに伴って SEPSCs が観察されるようになる(図.3A)。胚令 10 日目の胚から取り出した神経細胞は培養開始後 6-7 日目でシナプス形成が完了する事が報告されている(Tokioka et al. 1993)ので、実験には E10 の胚から取り出した神経細胞を 6-8 日間培養したものをを用いた。この時期の SEPSCs の平均振幅は細胞によって異なり、50pA 前後から、800pA までの範囲に分布しており、平均 $222.2 \pm 31pA$ であった(mean \pm S.E., N=50 cells from 50 cultures)。SEPSCs の生起頻度も細胞によりばらついたが、平均 $0.43 \pm 0.2Hz$ であった(mean \pm S.E., N=50 cells from 50 cultures)。記録外液を Mg^{2+} -free 記録外液に置換すると、SEPSCs の頻度が増加し、時定数の遅い電流成分の振幅が大きくなった(図 3 B 矢印)。この成分は APV によって消失するので NMDA-R が関与するものと考えられる。 Mg^{2+} -free 条件下の SEPSCs 頻度は有為に増大し、平均 $1.02 \pm 0.3Hz$ であった(mean \pm S.E., N=50 cells from 50 cultures, Student's t-test)。 Mg^{2+} -free 条件に置くことによって波形の変化がみられないものは、SEPSCs の振幅増強が顕著にみられないものが多かった。 Mg^{2+} -free 条件下では電流固定してシナプス入力に膜電位に反映されるようにした。記録外液を通常のものに再置換して記録した SEPSCs は、初期状態の SEPSCs と比較して振幅が有為に増大した。(n=8, Student's t-test, 図 3 A,B, 4,6)。平均変化率は $192.5 \pm 7.5\%$ (mean \pm S.E.) だった。また、対照実験として Mg^{2+} -free 記録外液の代わりに通常の記録外液で灌流した場合、SEPSCs の増強は誘導されなかった。SEPSCs の振幅の平均変化率は、 $109.1 \pm 17.8\%$ だった(n=8, Student's t-test, 図 4,6)。この SEPSCs の振幅の増大は、 Mg^{2+} -free 記録外液を通常の外液に再置換した後、30 分以上持続し、最長 96 分間の長期にわたる持続を確認した。また、ホ

ール・セル完了後、40 分以上たったあとに Mg^{2+} -free 外液に置換した例では、SEPPCs 振幅の上昇はみられないことが多かった。これは細胞内灌流が原因であると考えられる。

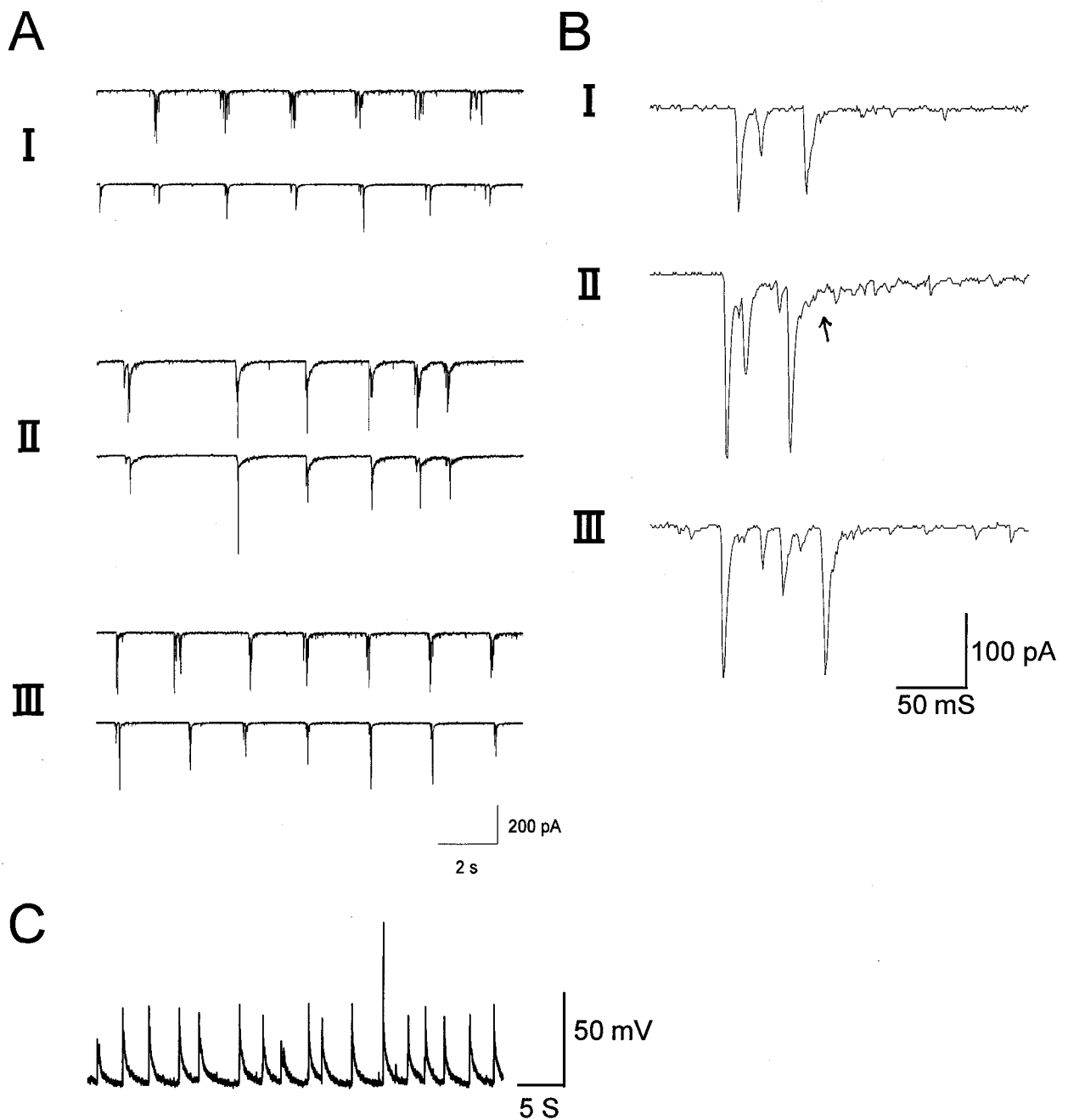
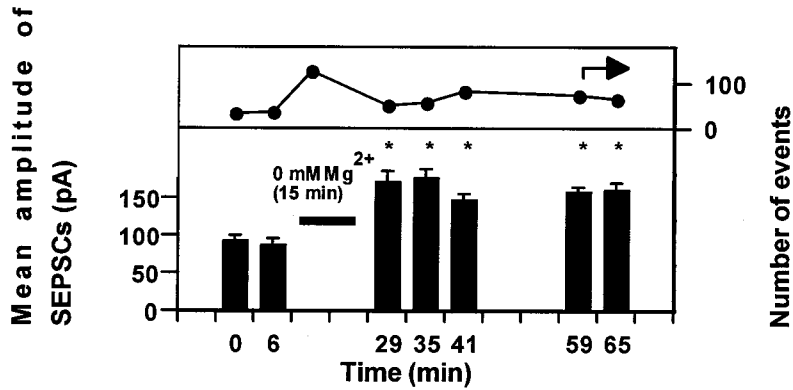


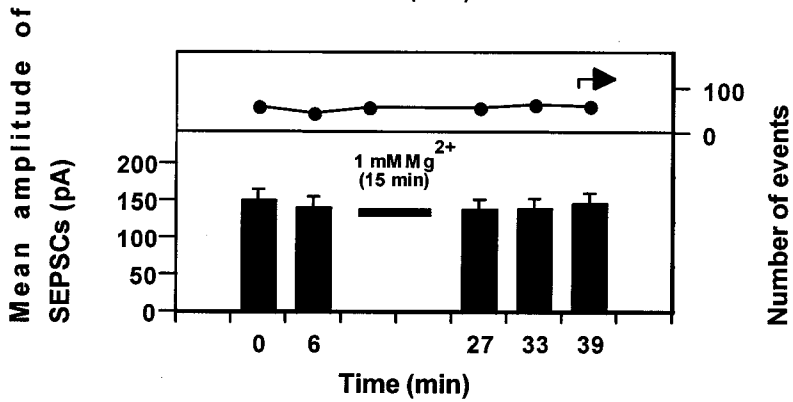
図3 SEPSCs 増強の典型例

- A. 上下2本のトレースは二つの細胞からの同時記録である。Iは初期状態のSEPSCs、IIは、Mg²⁺-free条件下、IIIは、通常の記録外液に再置換後のSEPSCsの記録である。I、IIを比較すると明確にIIのSEPSCs振幅が増大している。-60mVに電圧固定。
- B. 波形の拡大。I、II、IIIはそれぞれA図中の記号に対応している。Mg²⁺-free条件下では、時定数の遅い電流成分が増大していることに注目。-60mVに電圧固定。
- C. Mg²⁺-free条件下、電流固定下での膜電位の記録。

A



B



C

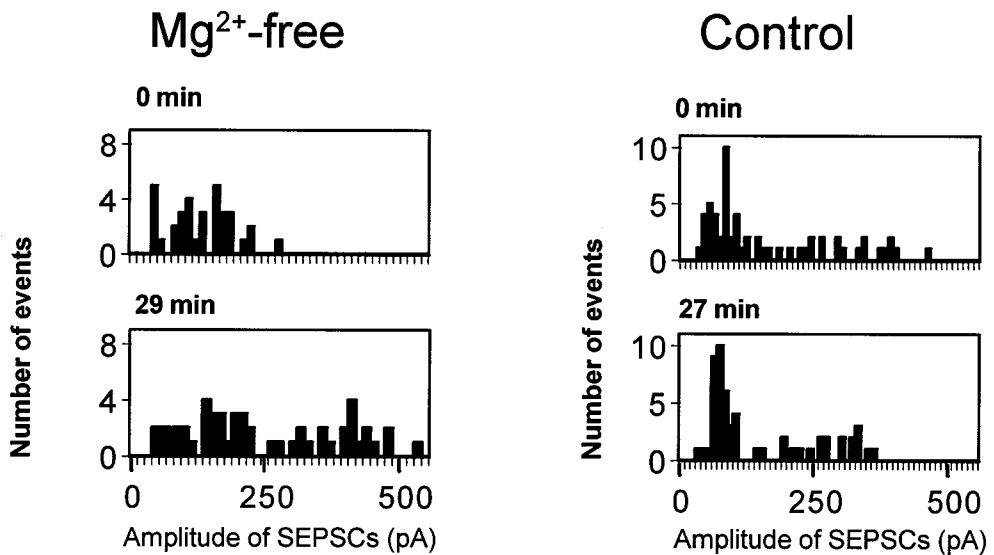


図 4 SEPSCs 増強の解析

- A. Mg²⁺-free 条件による SEPSCs 増強の経時変化。アスタリスクは、初期状態に比べ有為に上昇していることを示す。
- B. 対照実験。Mg²⁺を含む通常の記録外液で灌流した場合はSEPSCsの振幅は変化しない。
- C. SEPSCsの振幅分布の変化。左のパネルは増強を誘導したもので、右のパネルは対照実験として通常の記録外液で灌流したものの。いずれも下段が外液灌流後の分布。

2. SEPCs 増強現象の神経活動依存性

Mg²⁺-free 記録外液中に 500nM TTX を加えて Na チャネルを阻害して同様の実験を行った。TTX 存在下では、シナプス前細胞の発火が抑制されて SEPCs はほとんど観察されず、10-50pA 程度の EPSCs のみ観察された。これらは自発放出による mEPSCs である。TTX を加えた Mg²⁺-free 記録外液は SEPCs の増強を誘導しなかった。この場合の SEPCs の振幅の平均変化率は 106.6 ± 28% で、Mg²⁺-free 条件の前後で有意な差はなかった (n=5, Student's t-test, 図 5,6)。この結果は、Mg²⁺-free 条件でグルタミン酸が放出するだけで NMDA-R が活性化できる条件であるにもかかわらず、ミニアチュア放出のみでは増強を引き起こすのに不十分であることを示している。

また、5 μM CNQX を Mg²⁺-free 記録外液中に加えて A/K-R を阻害すると、シナプス伝達はほぼ完全に阻害された。この場合も、Mg²⁺-free 条件によって SEPCs は増強されなかった。SEPCs の平均変化率は 109.5 ± 24.1% であった (n=5, Student's t-test, 図 5,6)。これらの結果は、Mg²⁺-free 条件によって誘導される SEPCs の増強がシナプス前細胞の発火に伴うシナプス活動に依存するものであり、イオン組成の変化によるアーティフィシャルな現象ではないということを示唆している。

3. SEPCs の増強への NMDA 型グルタミン酸受容体の関与

25 μM D,L-APV を Mg²⁺-free 記録外液に添加し、NMDA-R を阻害して同様な実験を行った。D,L-APV 存在下では、A/K-R を介した、時定数が短く振幅の大きいシナプス後電流のみが観察される。D,L-APV 存在下では、Mg-free 条件による SEPCs の増強は阻害された。振幅の平均変化率は 88.9 ± 29.2% で、有意差はなかった (n=4, Student's t-test, 図 5, 6)。この結果は NMDA-R が SEPCs の増強に必須であることを示している。

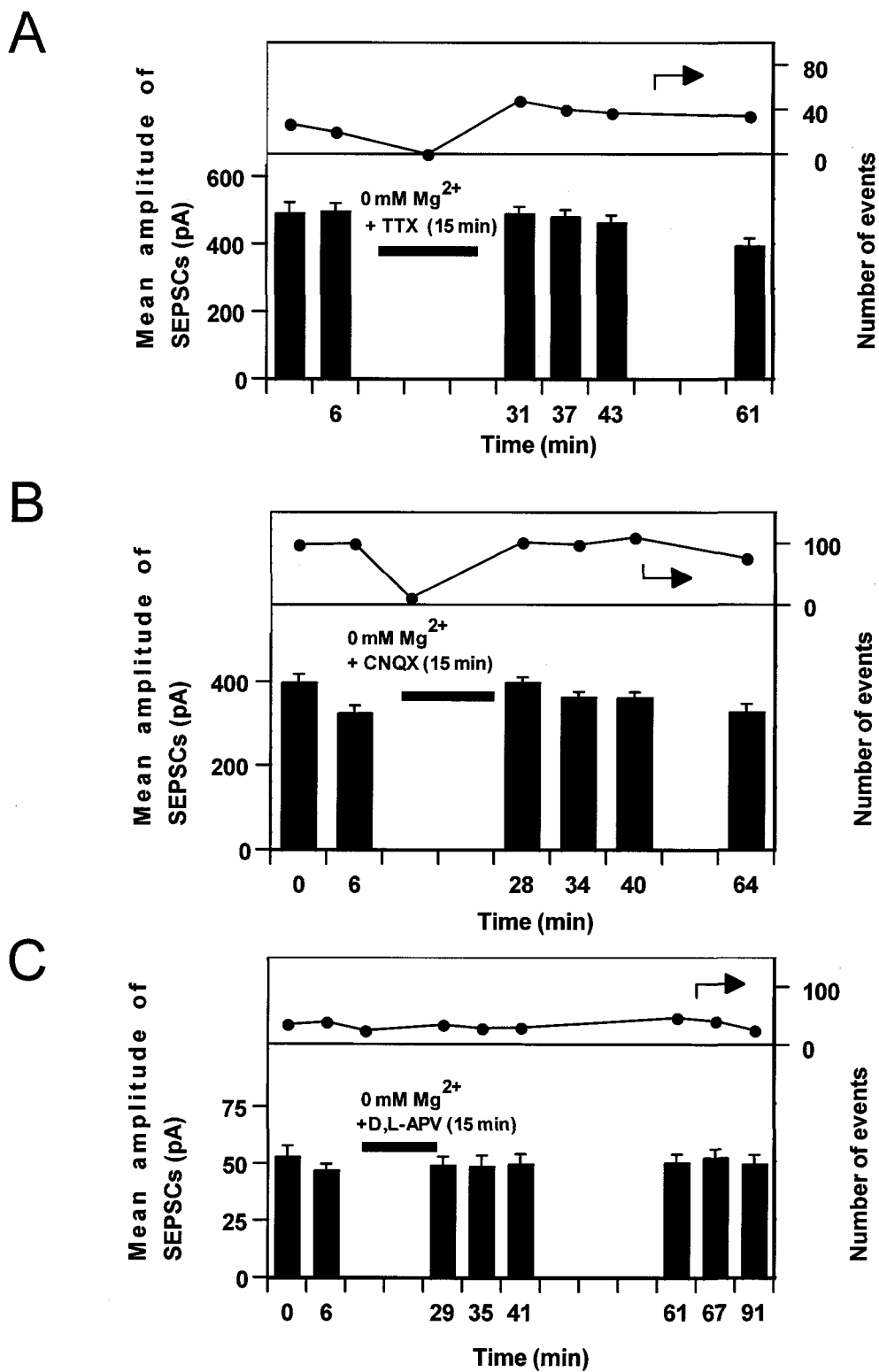


図5 SEPSCs 増強のシナプス活動依存性

- A. 500nM TTXにより、神経回路網の活動を阻害した場合、Mg²⁺-free条件によってSEPSCs増強は誘導されなかった。
- B. 5 μM CNQXにより、A/K-Rを阻害すると、SEPSCsは増強しなかった。
- C. 25 μM D,L-APVによりNMDA-Rを阻害すると、神経活動は維持されているにもかかわらず、SEPSCs振幅は増加しなかった。

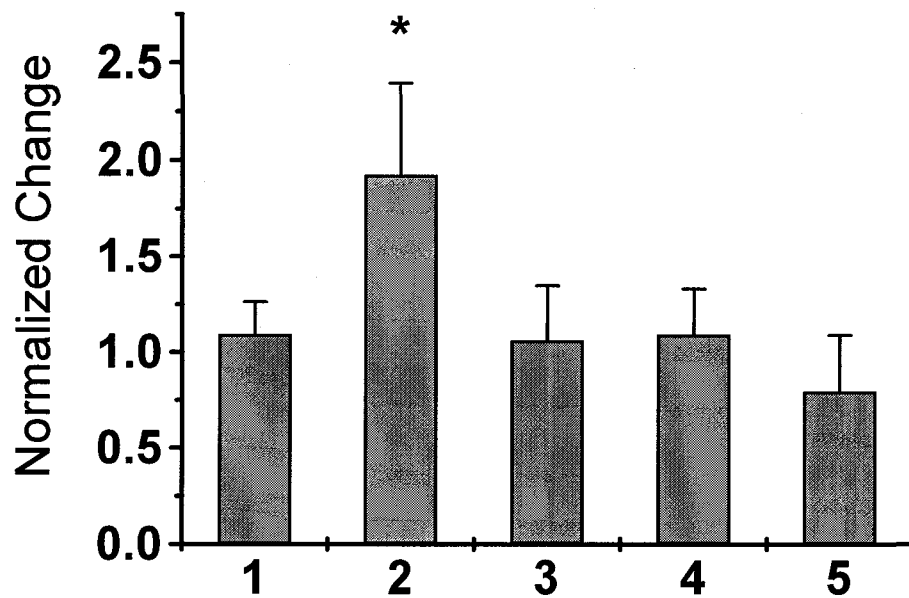


図6 SEPSCs 増強への各種イオンチャンネル阻害剤の効果

それぞれの棒グラフは各実験の SEPSCs の振幅平均値の変化率 (% ± S.E.) を示している。アスタリスクはそのほかに対し、有為差があるもの。

1. 対照実験。Mg²⁺を含んだ通常の記録外液で灌流したもの(n=8)。
2. Mg²⁺-free 条件で処理したもの(n=8)。
3. 500nM TTX を含んだ Mg²⁺-free 記録外液で処理したもの(n=5)。
4. 5 μ M CNQX を含んだ Mg²⁺-free 記録外液で処理したもの(n=5)。
5. 25 μ M APV を含んだ Mg²⁺-free 記録外液で処理したもの(n=4)。

以上の結果より、解離培養系のようにランダムに構成された神経回路網においてもシナプス伝達効率の増強現象が確認された。

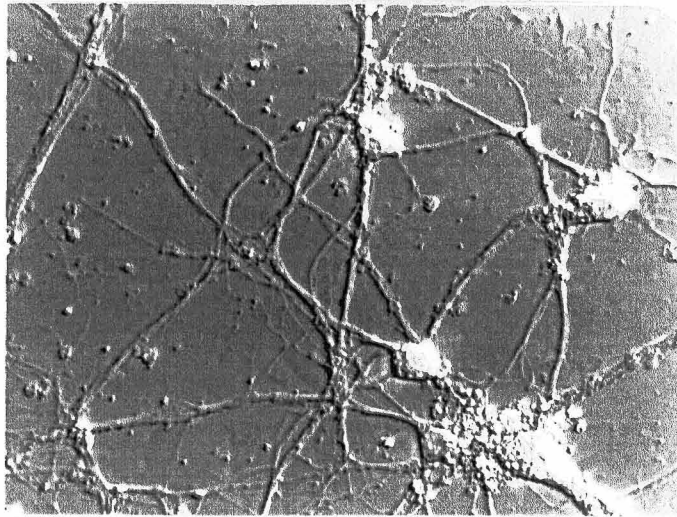
4. グリア除去培養系における SEPSCs 増強の誘導

グリア細胞がシナプス増強に積極的に関わっているという証拠がいくつか報告されている(Mennerick and Zorumski 1994; Sastry et al. 1988)。ニワトリ胚大脳解離培養系もグリア細胞と神経細胞の混在培養系であるから、これらのグリア細胞が Mg^{2+} -free 条件による SEPSCs 増強に必須である可能性がある。そこで、グリア除去培養系を準備し(図 7)、この系における同様な SEPSCs の増強誘導を検討した。グリア除去培養系においてもグリア混在培養系と同様に SEPSCs が観察され、その頻度や振幅に有為な差は見られないことが報告されている(Taguchi et al. 1995)。 Mg^{2+} -free 条件下における SEPSCs の波形・頻度の変化もグリア混在培養系と特に違いは見られなかった。しかしながら、 Mg^{2+} -free 記録外液に還流置換を開始してから、SEPSCs の波形に変化が現れるまでの時間はグリア除去培養系の方が短かった。これは、シナプス部位を包むようなグリア細胞が存在しないために記録外液の置換がより速やかに行われた結果であると考えられる。グリア除去培養系に於いても、 Mg^{2+} -free 条件による SEPSCs の増強が誘導された。振幅の平均変化率は $177.3 \pm 20.9\%$ ($n=7$, Student's t-test, 図 8)で有為に振幅が増大していた。なお、グリア混成培養における Mg^{2+} -free による SEPSCs 平均変化率($192.6 \pm 47.6\%$)とは、有為な差がなかった(Student's t-test, $P=0.07$)。この結果はグリア細胞は SEPSCs の増強に必須ではないことを示すものである。

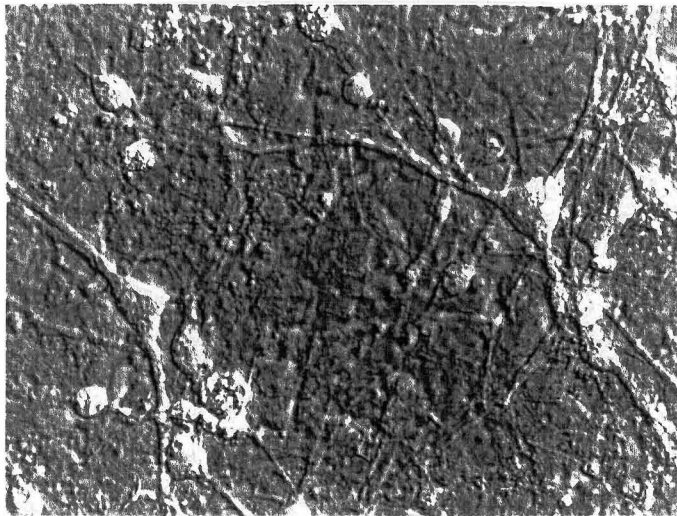
5. mEPSCs の変化

SEPSCs の増強の発現機構を検討するため、 $1 \mu M$ TTX 存在下で mEPSCs の変化を検討した。mEPSCs は自発放出によって引き起こされると考えられるので、

A



B

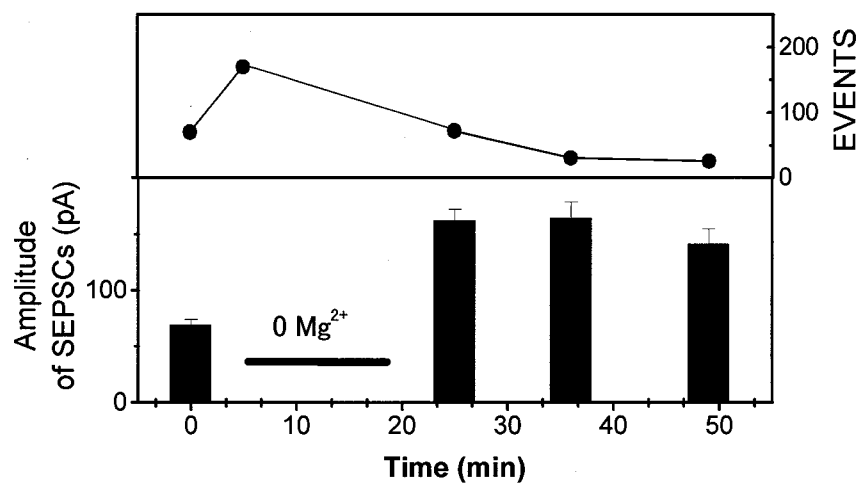


50 μ m

図7 グリア除去培養系

- A. E10D7 合成ペプチド SFP4 (400 μ M) によるグリア除去培養系。神経細胞のみが回路網を形成している。
- B. E10D7 通常のニワトリ胚大脳解離培養系。培養皿底面をグリア細胞が覆っているのが確認できる。

A



B

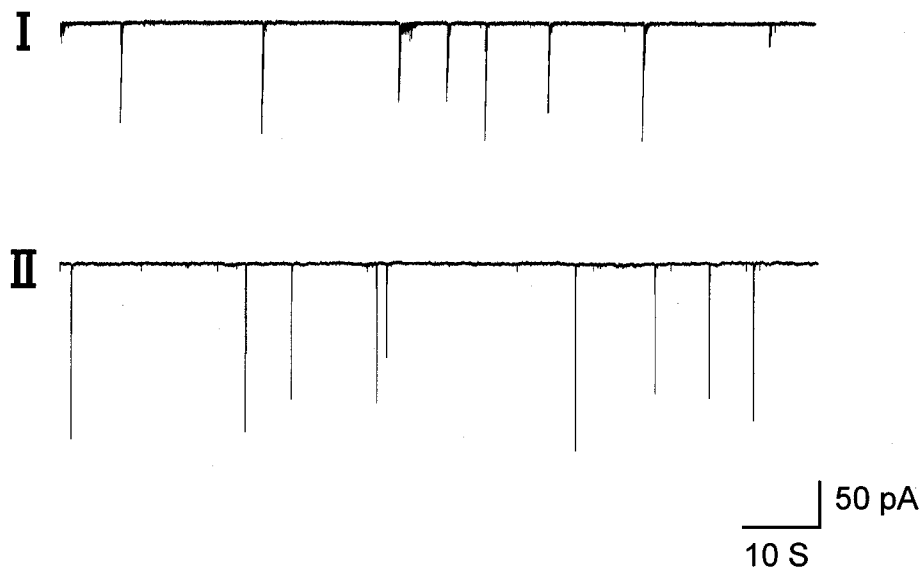


図8 グリア除去培養系における SEPSCs の増強現象

- A. グリア除去培養系における SEPSCs 増強の経時変化。
- B. I、IIを比較すると明確にIIのSEPSCs振幅が増大している。-60mVに電圧固定。

振幅の変化からシナプス後細胞のグルタミン酸受容体の変化、頻度の変化からはシナプス部位の増減、伝達物質放出確率をある程度見積もることができる。SEPPSCs 増強に伴い、mEPSCs の平均振幅は有為に変化しなかった。mEPSCs の振幅の平均変化率は $93.96 \pm 7.0\%$ であった。これに対し、その頻度は、有為に増加し、平均増加率は $334 \pm 47\%$ であった ($n=3$, Student's t-test, 図 9,10)。mEPSCs の分布変化の一例を図 10 に示す。また、単一の神経細胞から得られた記録では、mEPSCs の立ち上がり時間は、平均で $1.06 \pm 0.1\text{ms}$ ($n=48$) であったが、増強誘導後では、 $1.05 \pm 0.07\text{ms}$ であった。減衰時間は、平均で $2.06 \pm 0.10\text{ms}$ ($n=48$) が、増強誘導後は、 $2.46 \pm 0.10\text{ms}$ で、有為差はなかった。このように、増強誘導後も mEPSCs の波形に変化はなかった。この結果から、SEPPSCs の増強現象は、シナプス後細胞の受容体の変化によって起こるものではなく、シナプス部位の増大(サイレントシナプスの活性化を含む)、もしくは伝達物質放出確率の増大によるものであることが示唆される。

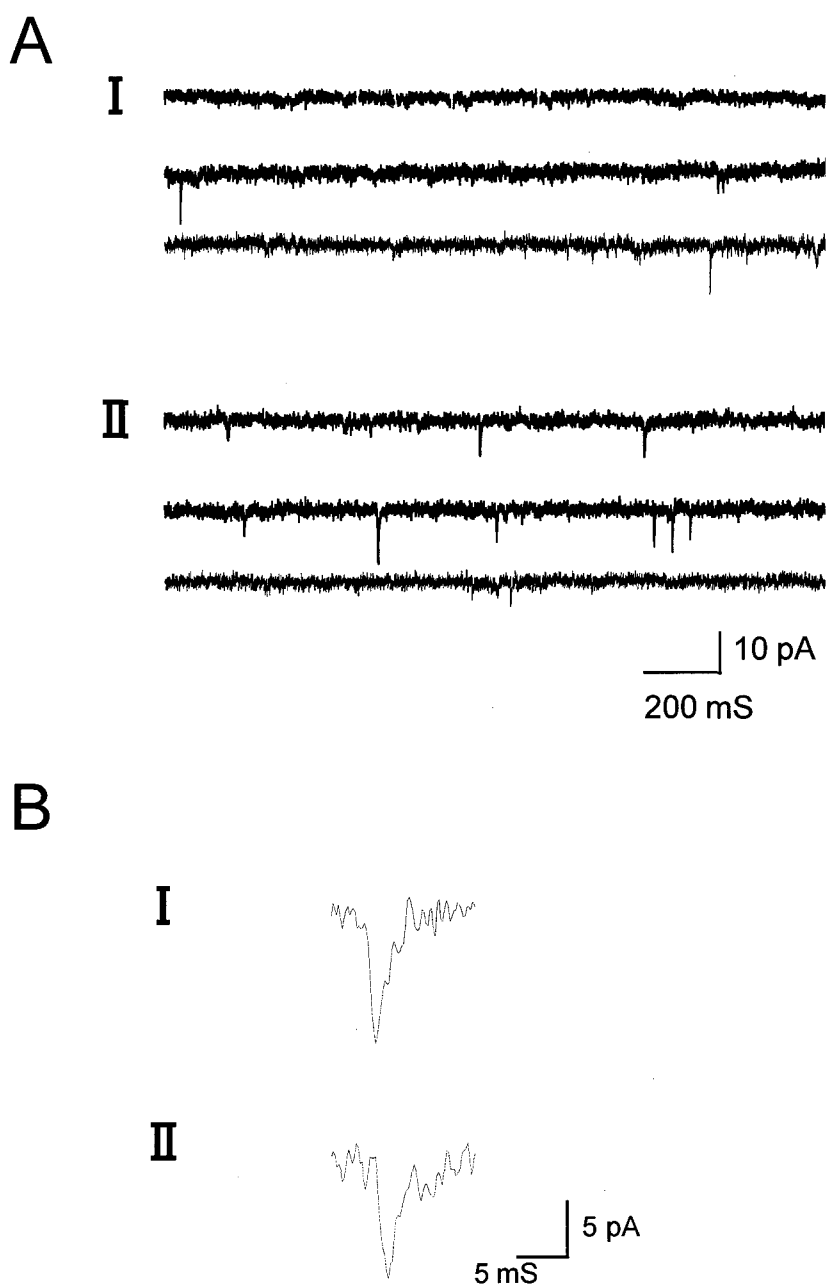
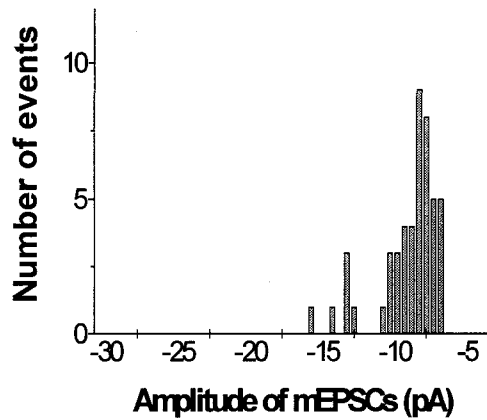


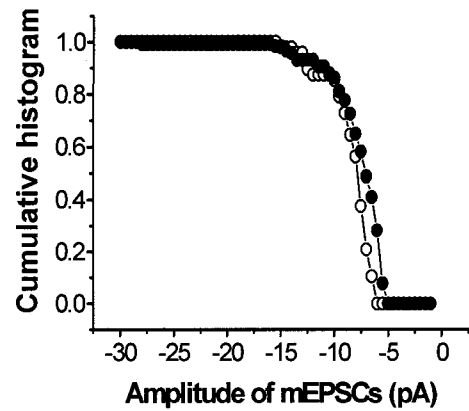
図9 ミニアチュアシナプス後電流 (mEPSCs)の典型例

- A. 増強を誘導する前の初期状態の mEPSCs (I)、及び Mg^{2+} -free 条件による増強誘導後の mEPSCs (II)。比較すると明確に II の mEPSCs の頻度が増大している。振幅に変化はない。1 μ M TTX, 25 μ M APV 存在下の記録。-60mV に電圧固定。
- B. 波形の拡大。I、II は A に対応する。波形にも明確な変化はない。

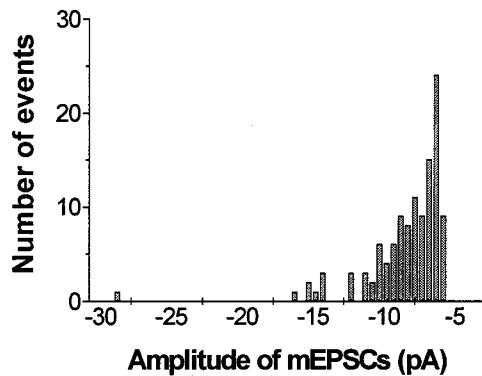
A



C



B



D

	Before	After
Mean	8.96852	8.34897
S.E	0.302628	0.278047
Mode	8.205	7.595
Median	7.893	6.345
S.D.	2.096672	3.007539
S.V.	4.396032	9.045293
Sum	430.489	976.829
Events	48	117

図 10 mEPSCs の SEPSCs 増強に伴う 変化の解析

- A. 初期状態の mEPSCs の分布。
 B. 増強誘導後の mEPSCs の分布。A と比較して分布の形に有為な変化はみられない。
 C. mEPSCs の累積度数分布。増強誘導前(○)と増強誘導後(●)。
 D. mEPSCs の統計量。

第4節 考察

1. Mg^{2+} -free 条件による SEPSCs の神経活動依存的増強

SEPSCs の頻度が Mg^{2+} -free 条件によって増加することの原因としては、 Mg イオンの除去によってシナプス前細胞のカルシウムチャンネルが活性化することが考えられる。また、NMDA-R の Mg^{2+} ブロックが除去されることでシナプス伝達が強化され、神経回路網が活性化したことも考えられる。ラット海馬 CA1, CA3 等で報告されているてんかん様のバースト発火も、APV の投与によって NMDA-R が阻害されると、消失、あるいはその頻度が低下することが報告されている (Neuman et al. 1987)。SEPSCs 振幅増強は、TTX, CNQX によってそれぞれ阻害された。TTX を加えない Mg^{2+} -free 条件に細胞が曝されている間、ホール・セル記録を行ったシナプス後細胞が発火しない場合でも振幅が上昇した例があったことからシナプス後細胞の発火は必ずしも必要ではないと考えられる。TTX が SEPSCs の増強を阻害したのはシナプス前細胞の発火を抑制し、増強に十分なシナプス伝達が引き起こされなかったためと解釈できる。CNQX はこの系で観察されるされるシナプス伝達の内、主要な成分であると考えられる A/K-R を阻害するので、系全体のシナプス活動が低下する。従って、シナプス前細胞の発火を抑えたために効いたのか、A/K-R を阻害した結果なのか断定はできない。しかし、これらの結果から、 Mg^{2+} -free 条件 による SEPSCs の振幅上昇はイオン組成の変化によるアーティフィシャルな現象ではなく、神経細胞の活動に依存したものであるといえる。 Mg^{2+} -Free 条件下では、時定数の遅い電流成分が増大するが、これは NMDA-R が活性化し、主にカルシウムイオンが流入することによる (図 3B)。NMDA-R はカルシウムイオン透過性が高く、この流入カルシウムイオンが細胞内情報伝達系を駆動して長期増強が誘導されることが海馬等で報告されている (Abraham and Mason 1988; Kauer et al. 1988; Linden et al. 1988; Wigstrom and Gustafsson 1986)。本系においても、SEPSCs 増強に

NMDA-Rが重要な役割を果たしているものと考えられる。Mg²⁺-Free 記録外液下で、頻度が上昇しても SEPSCs の波形に変化が無かった少数の例においては、神経活動の上昇にも関わらず SEPSCs の増強が起こらなかった。Mg²⁺-Free 条件で SEPSCs 波形に変化がなかったのは、NMDA-R が機能的に発現していないためではないかと考えられる。この結果も、SEPSCs の増強に NMDA-R が必須であることを示唆する。

最近、ニワトリ海馬領域に於いて、LTP が誘導されることが報告されている (Margrie et al. 1998)。この LTP は、NMDA-R 非依存的で、シナプス後細胞へのカルシウムイオン流入も必要としないものであり、本系で観察されている増強とは性質が大きく異なっている。一方、ヒヨコ intermediate and medial part of hyperstriatum ventral (IMHV) 領域における LTP は NMDA-R 依存的であることが報告されている (Bradley et al. 1993)。このように鳥類における増強現象にも、哺乳動物同様部位や発生時期により複数の機構が存在していることが示唆される。本培養系では、誘導方法に Mg²⁺-free 条件を用いているので観察されるのは NMDA-R 依存型の増強のみである。高頻度刺激と誘導 EPSCs の解析を併用して解析すれば、異なる形式の増強が確認されうる可能性がある。例えば、シナプス前細胞に加える刺激の周波数によってシナプス後細胞にどのような活動電位が誘起されるかは神経細胞のタイプあるいは回路によって異なっており、それに伴って誘導されるシナプス伝達効率の変化も異なることが提示されている (Gerstner et al. 1997; Markram and Wang 1977)。この報告では、新皮質スライス標本において錘体細胞へ入力するシナプスでは、速い周波数に依存したシナプス抑制がおこる。一方、非錘体細胞に入力するシナプスは、低い周波数では増強誘導の成功率にばらつきが多いが、周波数を上げると速やかに増強することが示されている。また、海馬 CA1 における LTD は動物の生後週数が進むと、1Hz の低頻度刺激 (low frequent

stimuli; LFS)では誘導されなくなることが通説であったが、ペアード・パルス低頻度刺激を用いたり(Kemp and Bashir 1997)、あらかじめ 100Hz で 1 秒間、3 トレインの条件刺激を与えておく(プライミング)ことで誘導されることが報告されている(Holland and Wagner 1998)。増強を引き起こす複数の違った機構が単一の神経細胞に潜在していて、形成された神経回路網の制限によって、ある増強の形式が決定されるということも考えられる。今後検討が必要な課題である。

実際の脳機能発現には、こうした条件刺激の代わりに内在性の神経活動が重要な働きをしている可能性がある。一例を挙げれば、自発性の神経電流が発生期におけるシナプス形成に必須であることが報告されている(Chub and MJ 1998; Mendelson 1994)。このような自発的活動は、発生期ばかりに存在するのではなく、成熟動物の海馬においても観察されることが報告されている(Berry and Thompson 1978; Eichenbaum et al. 1989)。さらに、海馬におけるシータ様の周期的神経活動が記憶形成に重要であるという報告(Winson 1978)や、こうした周期的興奮パターンが特定の空間的に離れた細胞群に対し選択的に LTP を誘導する報告(Yeckel and Berger 1998)があり、内在性の活動により神経回路網全体の特性が調整され得るという点で興味深い。

2. SEPPSCs 増強のグリア細胞非依存性

グリア細胞のシナプス伝達への関与を示唆する研究で、最近、Linden らによる報告が興味深い。この研究では、小脳解離培養系について顆粒細胞とグリア細胞によるシナプス伝達の存在と、そこで起こる LTP を報告している(Linden 1997)。今までにも、グリアには機能的なグルタミン酸受容体が存在しているという報告はあったが、恒常的なシナプスが形成されうるという報告はおそらく初めてである。また、

Sastrey らは、グリア細胞が LTP 誘導に必須な拡散因子を放出するという結果を報告している(Sastry et al. 1988)。これに対し、本培養系に於いては、グリア細胞は、シナプス形成にも、増強現象にも影響を及ぼさないことが示された。本培養系は血清を用いているため、グリア細胞が存在していなくても栄養的なサポートはある程度維持されていると考えられる。グリア細胞がシナプス形成に影響があるという報告 (Pfrieger and Barres 1997) もあるが、これは無血清培地を用いた報告であった。本系に於いてもグリア細胞から放出される因子が、シナプス形成を支持する可能性は否定できないが、あったとしても比較的 basal なものであり、グリア細胞が積極的にシナプス形成やシナプス増強を調節しているというものではないと考えられる。

3. SEPSCs の増強に伴う mEPSCs 頻度の上昇

SEPSCs の振幅増強現象の機構を検討するため mEPSCs の変化を解析した。ミニアチュア解析の手法はいくつか提案されているが (von Kitzing et al. 1994)、詳しい解析は行わなかった。複数のシナプス部位由来の mEPSCs を分離できないこと、シナプス形成の細胞上の部位に関する情報などが不足している培養系へ適用する事の問題性から、厳密な解釈は不可能であるからである (Larkman et al. 1991; Lisman and Harris 1993)。従って、本研究では、mEPSCs の変化から、振幅を単一シナプス部位におけるおまかな感受性の指標、頻度をシナプス部位の数もしくは伝達物質放出確率のおおまかな指標として用いるにとどめた。

SEPSCs の増強が誘導された後も mEPSCs の波形に変化はなく、振幅も増大しなかった。これに対し、頻度が明らかに増大していることは、シナプス部位の増大、もしくは伝達物質放出確率の上昇が起こっている可能性が高い。最近の知見では、シナプス後膜において NMDA-R のみ活性を持つサイレントシナプスが、LTP 発現に伴って活性を持った A/K-R が存在する通常のシナプスへと転換するという報告が

ある (Singer 1997)。本培養系に於いてもサイレントシナプスが存在することが報告されている (Kiyosue et al. 1997) ことから、SEPPCs 増強の発現にも、サイレントシナプスが関与する有効なシナプス部位の増大が重要である可能性がある。

第3章 シナプス伝達効率長期的増強現象 におけるタンパク質キナーゼ 及びタンパク質合成の関与

第1節 序論

長期増強の誘導・発現に各種のタンパク質キナーゼが関わっている証拠は数多く報告されている。カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMK II)、タンパク質キナーゼ A (PKA)、タンパク質キナーゼ C (PKC) が LTP (Bach et al. 1995; Huang and Kandel 1996; Malinow et al. 1988; Nayak et al. 1996) に、タンパク質キナーゼ C (Linden and Connor 1991) 及びタンパク質キナーゼ G (Hartell 1996) が LTD に関わっているとされている。これらのキナーゼが LTP の比較的初期の相に必須であるのか、維持相に必須であるのかが議論されている。初期相にはシナプス後細胞の、続いてシナプス前細胞におけるタンパク質キナーゼの活性化が必要であるという報告もあるが (Huang et al. 1992)、矛盾するように見える報告が複数あり、未だ混沌としている。主要な仮説の一つは、タンパク質キナーゼの恒常的活性化によって LTP の維持相が実現されるというものである (Malinow et al. 1988)。タンパク質キナーゼの恒常的活性化型への変換が、細胞内のホスファターゼとのバランスによるリン酸化状態のバランスを変え、長期的につづくシナプス伝達の修飾を引き起こすという仮説がある (Hrabetova and Sacktor 1996)。この仮説と一致するものに LTP に伴って、PKC が分解を受けて PKM という常時活性状態のキナーゼに変化するという報告がある (Sacktor et al. 1993)。また、LTP の誘導により、CaMK II が自己リン酸化により常時活性化状態へ移行し、A/K-R をリン酸化するという報告もある (Barria et al. 1997)。

しかし、Otmakhov らによる最近の報告は、この仮説に反する結果である (Otmakhov et al. 1997)。この研究ではホールセル記録法の電極内灌流の手法を用いて LTP 誘導後に CaMK II の阻害剤をシナプス後細胞内に加えている。CaMK II の阻害剤は、一度確立した LTP の維持相について、その増強した伝達のレベルを減衰させることはなかった。これに対し、ホールセル記録開始と同時に CaMK II の

阻害剤を加えて 20 分後に LTP 誘導刺激を加えた場合は LTP は完全に阻害された。

タンパクキナーゼがシナプス可塑性に関与する別の仮説として、CREB によって調節される Ca^{2+} 依存性の遺伝子発現に関わるというものがある。CREB は、PKA のほか、CaMKII, PKC などによっても活性化されることが報告されている(Dash et al. 1991; Xie and Rothstein 1995)。こうしたメカニズムでは、タンパク質キナーゼの活性化は LTP の比較的早い相で要求されることになるが、タンパク質キナーゼ阻害剤の効果は維持層で現れるということも考えられ、研究結果が一致しない一つの原因となっている。さらに、近年、誘導相と維持相の境界が不明確になってきた。従来タンパク質合成が起こるのは LTP 誘導後数時間後とされていたが、最近の仮説では数十分というより早い時間領域へ移行してきている。こうした仮説の中で興味深いものは局所的タンパク質合成という概念である。シナプス部位近傍に mRNA のプールがあり、条件刺激によってそこで局所的にタンパク質が合成されるという仮説である(Kang and Schuman 1996)。この仮説では、核との情報のやりとりがないのでタンパク質の合成が速やかに起こりうる。また、LTP の入力特異性をシナプス後細胞性の機構で説明する事ができる。

Frey の報告では、“シナプティック・タグ”という新しい概念を提示している(Frey and Morris 1997)。ラット海馬 CA1 において、二つの独立したパスにあるシナプスは、それぞれ独立して LTP を誘導でき、この LTP はアニソマイシンにより維持相(2 時間-9 時間)が阻害される。そこで、まず、入力1で LTP を誘導し、そのあとアニソマイシンを加えて入力2にテタヌス刺激を加えると、この場合は維持相が阻害されず LTP が誘導される。このことから、テタヌス刺激により、“シナプティック・タグ”が合成され、はじめに入力1で合成されたタンパク質が入力2のタグにも供給されると考えられる。次に入力1でアニソマイシン存在下でテタヌス刺激し、その 120 分後、入力2で

LTP を誘導しても入力1は維持相を欠いた増強が誘導される。つまり、Tag を形成してから、120 分たつと、タンパク質が供給されてもシナプス部位へ供給されない、すなわち、Tag の寿命は 120 分より短いということになる。さらに、入力2で弱いテタヌス刺激により 1-2 時間続く短期的増強(short-term potentiation; STP)を誘導しても、入力1で誘導した LTP によって影響を受けないが、より強いテタヌス刺激で 4-6 時間持続する早期 LTP (early-LTP)を誘導した場合、入力1でLTPを誘導することで、この早期 LTP が 8 時間以上続く維持相を伴った LTP に変換される。この現象には PKA 依存型の mRNA 合成が関わっている可能性があるという報告がある。

このように、LTP の発現機構については、タンパク質キナーゼやタンパク質合成などが複雑に絡み合っており、LTP のフェーズに関しても様々な説がある。本研究ではニワトリ胚解離培養系における増強現象についても、その発現の分子機構の解析を試みた。

第2節 材料及び実験方法

1. ニワトリ胚大脳の初代解離培養

細胞培養の手順は第2章第2節参照。培地の組成を表3のものに変更した。この培地を用いた場合と、表1の培地を用いた場合において、細胞の形態、電気生理学的特性に大きな差異はなかった。

表.3 使用した培養液組成

45% Earle's minimum essential medium (Gibco)	
45% F12 (Gibco)	
10% Fetal calf serum (FCS)	
penicillin	50 U/ml
streptomycin	50 μ g/ml
insulin	5 μ g/ml

2. 電気生理学的手法

第2章と同様、培養開始後6-8日目の神経細胞を用いて電気生理学の実験を行った。細胞からの電氣的記録はホール・セル記録法で行い、SEPSCsの変化を解析した。K⁺チャンネルの影響を排除し、よりノイズの少ない波形を得るため、CsMSベースの電極内液を用いた。用いた記録外液の組成は、(in mM) 120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, 10 Na-Hepes (pH 7.3)である。浸透圧はシュクロースを加えて300mOsmに調節した。電極内液の組成は、(in mM) 130 CsCH₃SO₄, 5 CsCl₂, MgCl₂, 0.5 EGTA, 2 Mg-ATP and 10 Cs-Hepes (pH 7.2)である。浸透圧はシュクロースを加えて295mOsmに調節した。また、SEPSCsの記録は、サンプリング周波数5kHzにて行った。解析には、アクソグラフプログラム(Axon instruments社製)のイベント解析プログラムを用いて自動で解析した。イベ

ントの閾値を 20pA、イベントの分離閾値をピークの 10%として解析した。その他の手法は第 2 章と同様である。

3. 薬理学的実験

各種阻害剤を加えた記録外液を灌流することで、細胞外から投与した。細胞内に十分浸透するのを確実にするため、ホール・セル記録を行う 15 分前にあらかじめ阻害剤を加えておき、その後 SEPSCs を記録し、初期状態とした。記録外液を阻害剤を含む Mg^{2+} -free 記録外液に置換し、15 分間静置した後、阻害剤を含む記録外液に再置換し、SEPSCs を記録した。

第3節 実験結果

1. SEPSCs の増強のタンパク質キナーゼ依存性

セリン-スレオニン タンパク質キナーゼの非特異的阻害剤である 1-(5-isoquinolinesulphonyl)-2-methylpiperazine (H7)は PKA, PKC, PKG, CaMK IIを非特異的に阻害する。海馬 CA1 領域では、H7 を加えることで誘導 EPSCs の振幅が小さくなることが報告されている(Hrabetova and Sacktor 1996)。これは、シナプス前細胞においてシナプス伝達物質放出機構に作用するものと考えられている。しかしながら、本解離培養系においては、H7 によるこのような伝達効率の低下は引き起こされなかった。H7(10 μ M)を含んだ記録外液を灌流して 20 分後の記録では、平均振幅の変化は、 $104.5 \pm 9\%$ (mean \pm S.E., n=4, Student's t-test, 図 11 で有為差はなかった。また、単一の神経細胞から得られた記録では、SEPSCs の立ち上がり時間は、平均で 1.8 ± 2.97 ms (mean \pm S.E., n=43)であったが、H7 を含んだ記録外液を環流した後、 1.95 ± 2.83 ms であった。減衰時間は、平均で $4.05 \pm 0.46\%$ (mean \pm S.E., n=43)が、H7 還流後は、 5.2 ± 0.6 ms で、いずれも有為差はなかった(Student's t-test)。このように、H7 還流後 SEPSCs の波形にも大きな変化はなかった。H7 (10 μ M)存在下で Mg^{2+} -free 条件の効果を検討した。H7 存在下では、 Mg^{2+} -free 条件によって SEPSCs の増強は誘導されなかった。SEPSCs 振幅の平均変化率は $91 \pm 7.4\%$ で、有為差はなかった (n=5, Student's-t test, 図 12A,C)。この結果は何らかのタンパク質キナーゼが SEPSCs の増強誘導に必須であることを示唆する。次に、どのタンパク質キナーゼが増強現象に関与する検討するため PKC の特異的阻害剤であるカルフォスチン C (200nM) の増強に対する効果を解析した。カルフォスチン C も刺激前のシナプス伝達にたいし、影響を及ぼさなかった。カルフォスチン C により PKC を特異的に阻害した場合も、 Mg^{2+} -free 条件は SEPSCs の増強を引き起こさなかった。その平均変化率は $89 \pm 6.1\%$

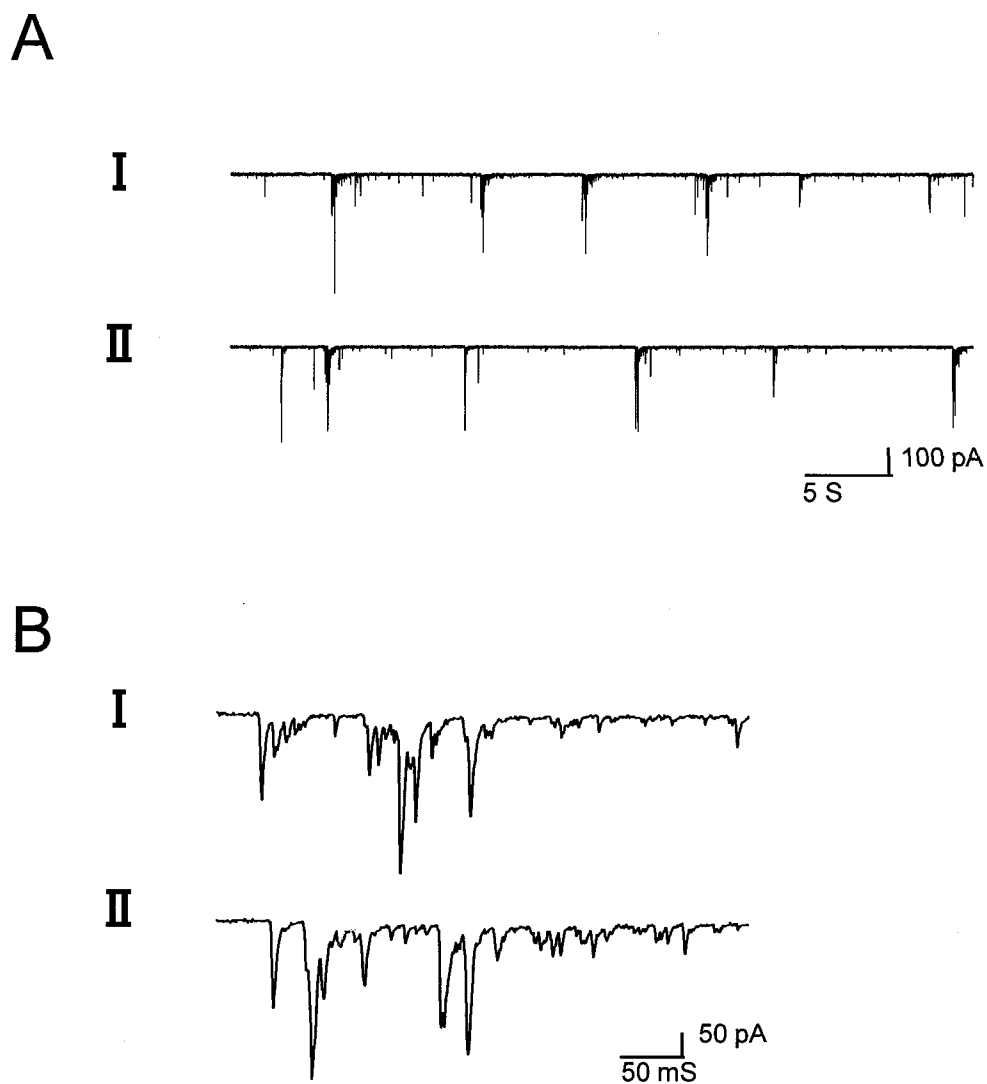


図 11 H7 灌流前後の SEPSCs の典型例

A.B. 10 μ M H7 灌流前 (I)、後 (II) の SEPSCs の典型例。振幅、頻度に明確な変化はみられない。

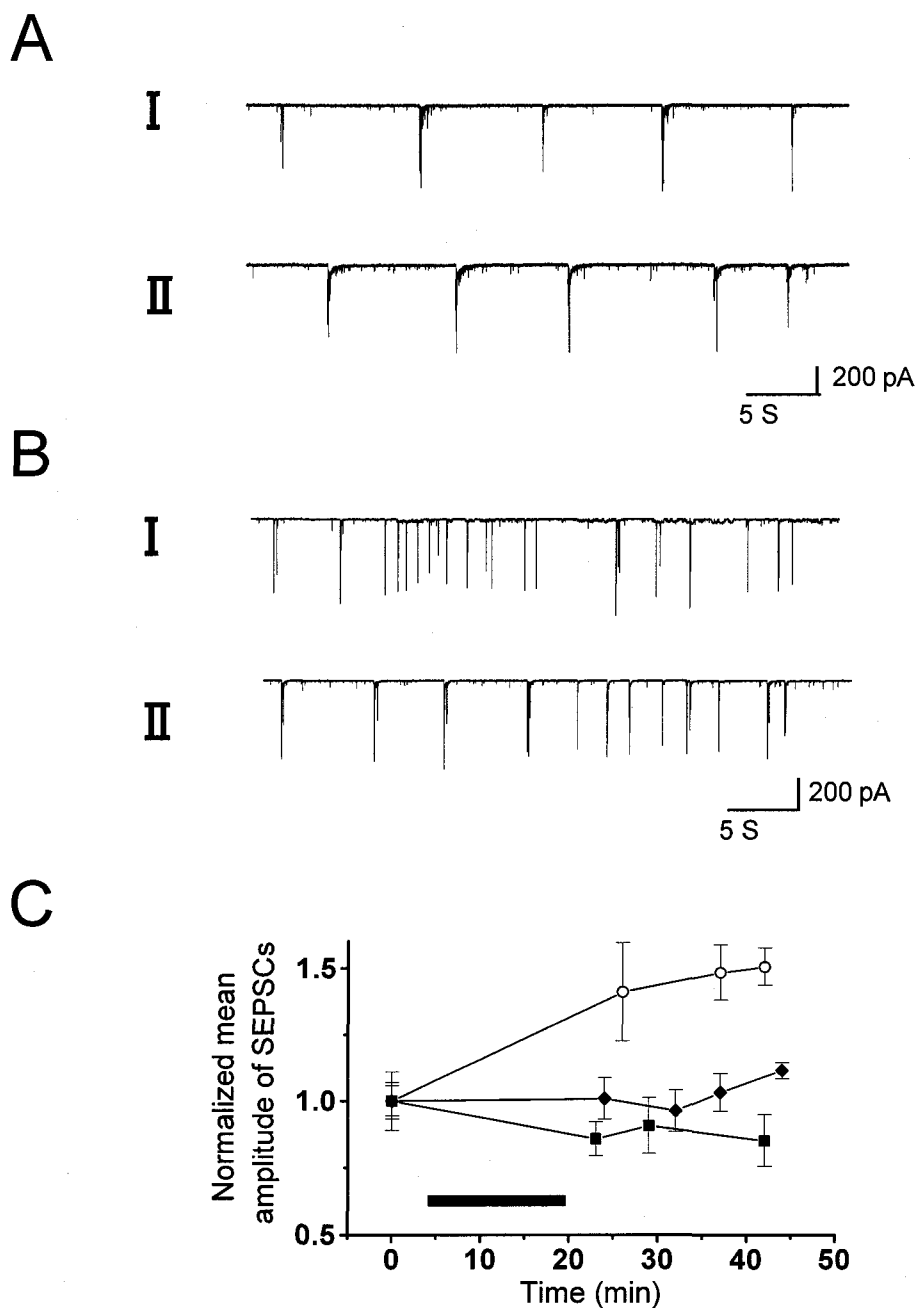


図 12 蛋白キナーゼ阻害剤による SEPSCs 増強の阻害

- A. 10 μ M H7 存在下での、Mg²⁺-free 条件灌流前 (I)、後 (II) の SEPSCs の典型例。
-60mV 電位固定。
- B. 200nM カルフォスチン C 存在下での、Mg²⁺-free 条件灌流前 (I)、後 (II) の
SEPSCs の典型例。-60mV 電位固定。
- C. 蛋白キナーゼ阻害剤による SEPSCs 増強の阻害。対照実験としての阻害剤を加え
ない Mg²⁺-free 条件 (○)、10 μ M H7 存在下 (■)、200nM カルフォスチン C 存在
下 (◆)。

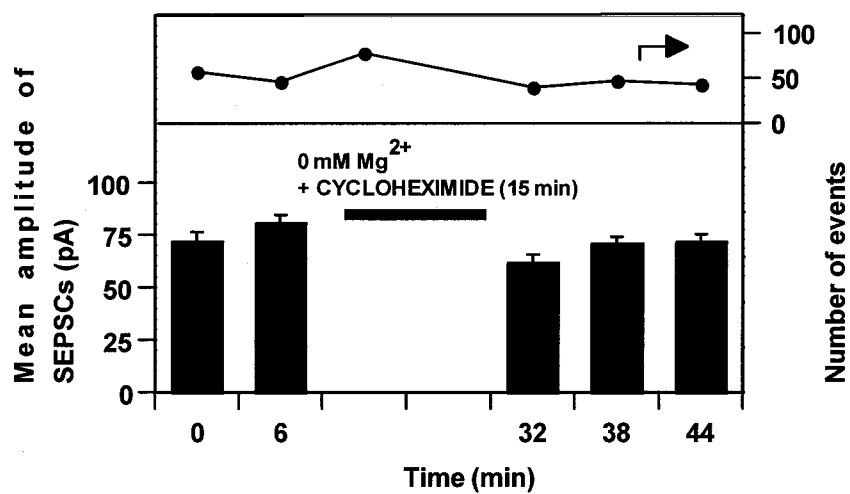
で、SEPSCs 振幅は有為に増加しなかった。(n=5, Student's-t test, 図 12 B,C)。この結果は、少なくとも PKC は、この増強に必須であることを示す。しかしながら、他のキナーゼの関与を否定するものではなく、複数のキナーゼが同時に活性化することが必要である可能性もある。また、シナプス前細胞と後細胞で活性化が要求されるキナーゼに差がある可能性もある。このことに関して、PKA, CaMK II, PKG の阻害剤、KT5720, KN62, KT5827 の増強現象に対する効果も検討したが、一定した結果が得られなかった。一つの要因としては、本解離培養系が複数の細胞種からなるヘテロな系であり、細胞種によって増強発現のメカニズムが微妙に違うことが考えられる。その中で、PKC の関与する機構は比較的一般的に用いられているものであるといえる。

2. SEPSCs の増強のタンパク質合成依存性

SEPSCs 増強に新規タンパク質合成が必須であるかを検討するため、タンパク質翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド (1 μ M) を Mg^{2+} -free 記録外液中に加えて実験を行った。シクロヘキシミドが細胞に浸透するのを確実にするためにホール・セル記録開始の 20 分前にシクロヘキシミドを加え、常にシクロヘキシミド存在下で SEPSCs を記録し、比較した場合も、 Mg^{2+} -free 条件の間のみシクロヘキシミドを加えた場合も、どちらも増強を阻害したので同種の実験としてデータを整理した。シクロヘキシミドは、SEPSCs の刺激前の活性、 Mg^{2+} -free 条件に対する反応に影響を及ぼさなかった。しかし、SEPSCs の増強は完全に阻害され、SEPSCs 振幅は、一過的にも明確に上昇しなかった。平均変化率は、 $79.5 \pm 10.8\%$ で、有為差はなかった (n=4, Student's t-test, 図 13A) だった。また、転写阻害剤であるアクチノマイシン D (8 μ M) も SEPSCs の増強を同様に阻害した。平均変化率は $92.6 \pm 25.7\%$ であった (n=3, Student's t-test, 図 13B)。これらの結果は 15 分間という比較的短い時間

で新規タンパク質合成が行われ、これが SEPSCs の増強に必須であることを示唆している。上記の結果はシクロヘキシミドを細胞外から加えているため新規タンパク質の合成が、シナプス前細胞、シナプス後細胞、グリア細胞の何処で行われているか不明確である。そこで、ホール・セル記録法を用いていることを利用して、記録電極内液に $2\mu\text{M}$ のシクロヘキシミドを加えておき、 Mg^{2+} -free 条件の効果を解析した。実験は 2 つの細胞から同時に記録を取り、一方の細胞の電極電極にのみシクロヘキシミドを加え、他方は通常の電極内液とした。この条件で Mg^{2+} -free 条件により増強の誘導を試みたところ、シクロヘキシミドを加えない神経細胞においてのみ SEPSCs の増強が誘導された。シナプス後細胞のタンパク質合成を選択的に阻害した場合、 Mg^{2+} -free 条件後の SEPSCs の変化率は $106.98\pm 6.0\%$ であり、有為差はなかった ($n=6$, Student's t-test, 図 14 A)。このことは、少なくともシナプス後細胞におけるタンパク質合成が SEPSCs の増強に必須であることを示すものである。

A



B

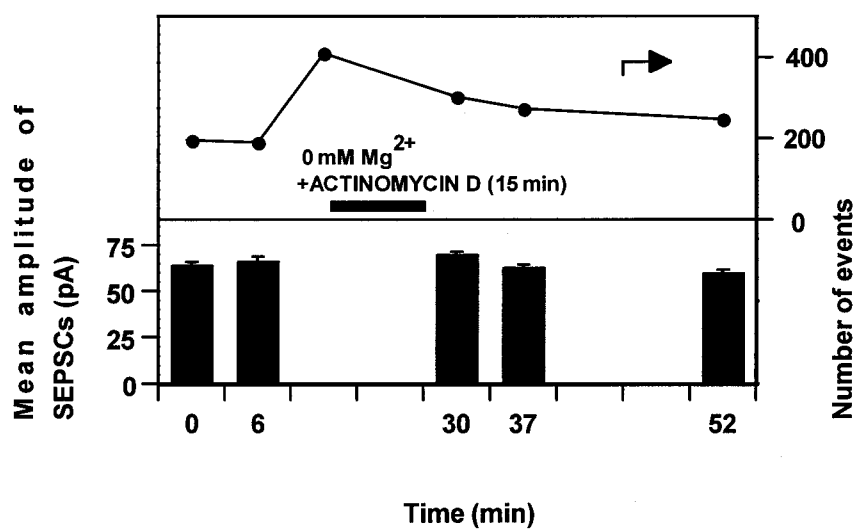
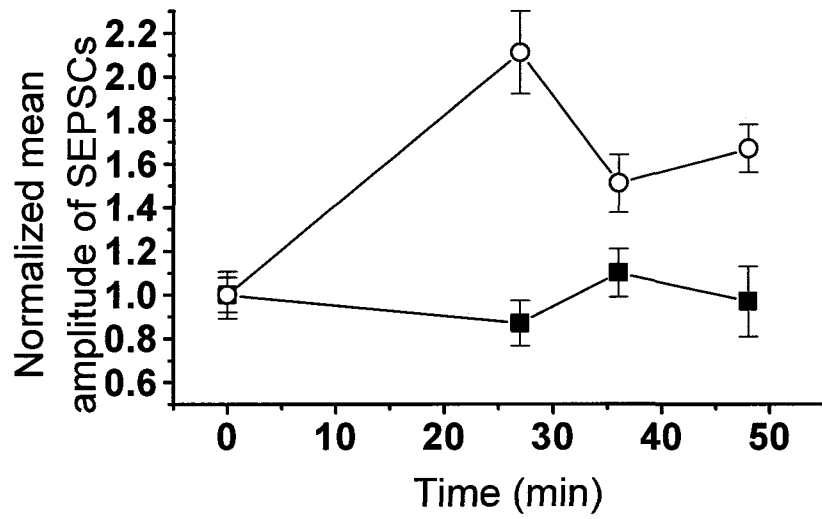


図 13 タンパク質合成阻害による SEPSCs 増強の阻害

- A. 1 μ M シクロヘシミドによる SEPSCs 増強の阻害。
- B. 8 μ M アクチノマイシン D による SEPSCs 増強の阻害。

A



B

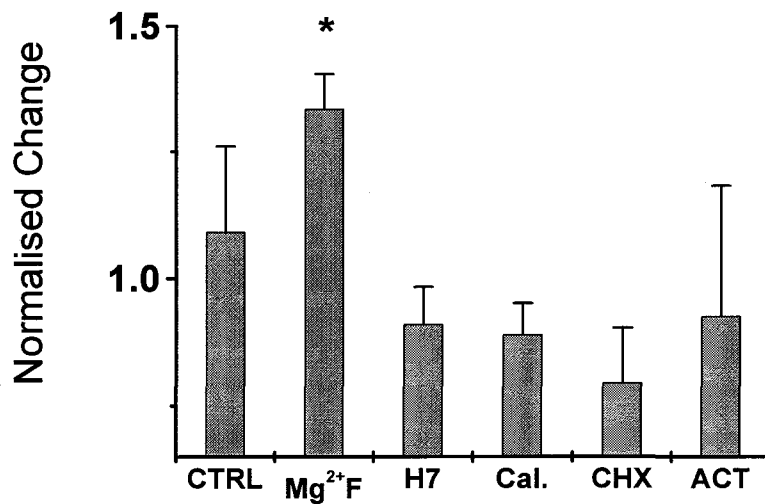


図 14 蛋白キナーゼの活性化・タンパク質合成の必要性

- A. シナプス後細胞選択的タンパク質合成阻害による SEPSCs 増強の阻害。
シナプス後細胞に $2\ \mu\text{M}$ シクロヘキシミドを加えたもの (○) は増強が阻害されたが、同時記録した通常の電極内液を用いた細胞では増強が誘導された (■)。
- B. 蛋白キナーゼの活性化・タンパク質合成の必要性。Cal. はカルフォスチン C、CHX はシクロヘキシミド、ACT はアクチノマイシン D の略である。

第4節 考察

1. SEPPSCs の増強のタンパク質キナーゼ依存性

H7 がシナプス前細胞に於いてタンパク質キナーゼを阻害し、この結果刺激前のシナプス伝達が抑制されるという結果(Hrabetova and Sacktor 1996)や、逆にホルボールエステルなど PKC を活性化させる薬剤によりシナプス伝達が増強されることがラットを使った実験で報告されている(Reymann et al. 1988)。しかし、本系で観察される SEPPSCs は、H7、及びカルフォスチン C によりその振幅・頻度・波形が有為に変化しなかった。同じ濃度で SEPPSCs の増強は阻害するので、阻害剤が効いていないということはない。ニワトリ胚大脳培養系においては、シナプス前終末におけるタンパク質キナーゼの分布や、フォスファターゼとのバランスが、ラットとは異なっていることがあると考えられる。

カルフォスチン C を用いた実験から、SEPPSCs の増強には少なくとも PKC の活性化が必須であることが示唆される。PKC の活性が LTP に必須であるという報告はいくつかある。一つは、PKC が Ca^{2+} 依存的に部分分解されて制御部位が切り離された恒常的活性型の PKM に転換され、GAP43 などの基質タンパク質をリン酸化するものである(Lovinger et al. 1986; Meberg et al. 1993; Sacktor et al. 1993)。LTP の誘導後、PKC が転写因子である NF- κ B を活性化するという報告もある(Meberg et al. 1996)。長期抑圧や海馬 CA3 領域における NMDA-R 非依存的な LTP については、細胞質 PKC の細胞膜への移動が LTP に伴って起こることが報告されている(Son et al. 1996)。また、海馬において NMDA-R が PKC とタンパク質フォスファターゼのバランスによって長期増強、抑圧の双方向の制御を行っているという仮説が Hrabetova らにより提示されている(Hrabetova and Sacktor 1996)。SEPPSCs の長期増強が新規タンパク質合成に依存していることを考えあわせると、本系においては PKC がタンパク質合成に関与している可能性が高い。 Ca^{2+} 依存的遺

伝子発現を調節する CREB が、PKA, PKC, CaMK II により制御されるので、この機構が本系でも働いていることも考えられる(Xie and Rothstein 1995)。このことは、PKA, CaMK II も SEPSCs の増強に関わっている可能性も依然としてあるということも示唆する。

2. SEPSCs の増強のタンパク質合成依存性

シクロヘキシミドはリボソームから tRNA の遊離を阻害し、タンパク質合成の翻訳過程を阻害する。アクチノマイシン D は mRNA 合成を阻害し、転写を阻害する。この二つのタンパク質合成阻害剤が SEPSCs の増強を阻害するという結果を単純に解釈すると、増強を誘導する 15 分という比較的短い時間の中で、mRNA の新たな合成が起こり、新規タンパク質が合成されていることが考えられる。Mg²⁺-Free 条件にする時間を 5 分以内にする、SEPSCs の長期的増強は起こらなかったことも、増強の誘導にある程度時間を必要とするという点でこの結果を支持するものである。速いタンパク質合成という点では局所的タンパク質合成という可能性もあるが、アクチノマイシン D の阻害結果はこれを否定している。しかし、寿命の短い mRNA がシナプスの近傍にあり、一定量のプールを維持するために常に mRNA を合成によって補給しているというモデルを仮定することもできる。この場合、タンパク質合成はシナプス近傍の局所において起こるが、これを維持するために恒常的な mRNA 合成が必要である。また、アクチノマイシン D に副作用があることも考えられるので、より厳密にはさらに複数の阻害剤を併用しての実験が必要である。しかし、従来考えられてきた時間より短い時間でタンパク質合成が起こることを示す結果が近年多数報告されており、核とシナプス部位との情報伝達にかかる時間という観点でも、細胞質から神経突起の末端への物質輸送で速いものが報告されている(Barinaga 1997)。これらの報告を斟酌すれば、15 分という時間は、新規タンパク質合成が可能な時間である

といえる。

タンパク質合成の行われる場所については、電極内液にシクロヘキシミドを加えた実験の結果から、少なくともシナプス後細胞におけるタンパク質合成が必須であることを示している。以上の結果から、NMDA-R からの Ca^{2+} 流入により、PKC が活性化し、これがシナプス後細胞におけるタンパク質合成を誘導するという経路が可能性としてあげられる。

第4章 シナプス伝達効率の増強を 誘導する拡散性タンパク因子作用機序の解析

第1節 序論

LTPの発現がシナプス前細胞によるものか、後細胞によるものかという議論は、未だに決着が付いていない問題の一つである。海馬 CA1 で観察される LTP は、シナプス後細胞の NMDA-R の活性化が必須であること、さらに入力特異性があることから、シナプス後細胞から逆行性の伝達物質が放出され、これがシナプス前細胞の伝達物質放出機構を修飾するという仮説が提唱されている。ミニアチュア解析の結果にも、LTP に伴ってシナプス部位の数が増大するという報告があり(Bolshakov et al. 1997; Voronin et al. 1992)、逆行性伝達物質の存在と相まって注目を浴びた。さらに、シナプス前細胞性のサイレントシナプス、つまり伝達物質の放出機構はあっても活動電位が伝わらないなど何らかの機構により実際には伝達物質を放出しない型のシナプスの存在も考えられている。

最近の報告では、シナプス前膜—シナプス後膜間の情報伝達に加えて、シナプス伝達効率変化のシナプス間伝搬という概念もいくつか報告されている。例えば、海馬スライスを用いた研究で、一方の入力で LTP を起こすと他方の入力で LTD が同時に生じるという報告 (Muller et al. 1995)や、小脳プルキニエ細胞で LTD が近接した細胞へと伝搬するという報告がある (Hartell 1996)。また、培養系を用いたものでは、シナプス結合により接合した3つの神経細胞(A→B→C)による単純な回路網において、LTD の神経細胞間伝搬を解析し、B→Cで LTD を誘導するとA→Bにも LTD が誘導される(逆行性伝搬)というものがある (Fitzsimonds et al. 1997)。この逆行性伝搬は、グルタミン酸作動性シナプスのみで誘導され、 γ -アミノ酪酸(GABA)作動性シナプスでは誘導されない。また、1個のシナプス前細胞が2個のシナプス後細胞に入力している場合(A→B&A→C)、LTD はこの二つのシナプスに伝搬するという(シナプス前細胞性伝搬; presynaptic propagation)。さらに、2個のシナプス前細胞が1個のシナプス後細胞に入力している場合(A→C&B→C)、

やはり LTD は伝搬した(シナプス後細胞性伝搬; postsynaptic propagation)。これらの現象は、樹状突起から細胞体を伝わる内在性シグナルと、シナプス後細胞から前細胞へ伝わる逆行性拡散シグナルの存在を示唆する。こうした結果は、連合的可塑性という文脈から大変興味深い。

このように、細胞外拡散性因子の存在を示唆する報告は多いが、その実体についてはほとんど報告がない。シナプス後細胞から前細胞への逆行性伝達物質としては、アラキドン酸(Lynch et al. 1989)や NO(Southam and Garthwaite 1991)などが有力な候補である。タンパク質性の因子としては、成長因子があげられる。BDNF や NT3 は、比較的遅い(約 40 分)時間で発現する LTP を引き起こすことが報告されている(Kang et al. 1997)。しかし、タンパク質性の拡散因子に関しては、成長因子以外ほとんど報告がない。Xie らは、ウサギ海馬をテタヌス刺激した後、組織液中にタンパク質性の増強誘導因子が放出されることを報告しているが、分子の単離にまではいたっていない(Xie et al. 1991)。vivo の実験やスライス標本を用いた実験では、タンパク質性因子を含んだ試料液を大量に調節したりアッセイするのに困難が多いことも、こうした因子の解析が進んでいない一つの理由であると思われる。本研究では、解離培養系の利点を活かしてこうした増強誘導因子の存在の可能性を検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

1. ニワトリ胚大脳の初代解離培養

第3章参照

2. 電気生理学的手法

第3章参照

3. 条件付け記録外液 (CM) の調製

胚令 10 日目のニワトリ胚を用いて、100mm 培養皿に大脳解離培養を行った。16ml の培養液を用い、2 日目と 5 日目に半量分培地交換を行った。それ以外は、35mm 培養皿の培養法に準じた。7 日間培養の後、16ml のホール・セル記録用外液で 1 度洗浄し、再び記録外液を入れて 5 分間静置した。次に記録外液を Mg^{2+} を含まない記録外液 16ml と置換し、15 分間静置する事でシナプス伝達の増強を誘導した。この条件付け上清(conditioned medium; CM)を採取し、 $MgCl_2$ を 1mM になるように加えた。調製法の概要を図 15 に示す。

この CM を培養皿 10 枚分収集し、50k Da, 100k Da の限界ポアサイズを持つ Centriprep (Amicon 社製)を用いて $1500 \times g$ 、 $4^{\circ}C$ の条件で 30 分遠心した。これを何度か繰り返し、分離濃縮した。最終的に調製された CM の量を測定し、アッセイに用いる際の希釈の目安とした。おおよそ 100 倍程度に濃縮した。

4. CM のトリプシン処理

濃縮した CM を同体積のトリプシン溶液 ($100 \mu g/ml$) に加えた。室温にて 20 分間静置したのち、トリプシン インヒビター (最終濃度で $500 \mu g/ml$) を加えて、トリプシンの酵素反応を終了させ、CM のトリプシン分解産物とした。対照実験として CM を、トリプシンとトリプシン インヒビター混合溶液に加え、同様に室温にて 20 分間静置したものを調製した。これらの CM 修飾産物を $50 \mu l$ 培養に加えたときのトリプシ

ン, トリプシン インヒビターの最終濃度は、それぞれトリプシンが $2.5 \mu\text{g/ml}$ 、及び、トリプシン インヒビターが $12.5 \mu\text{g/ml}$ であった。

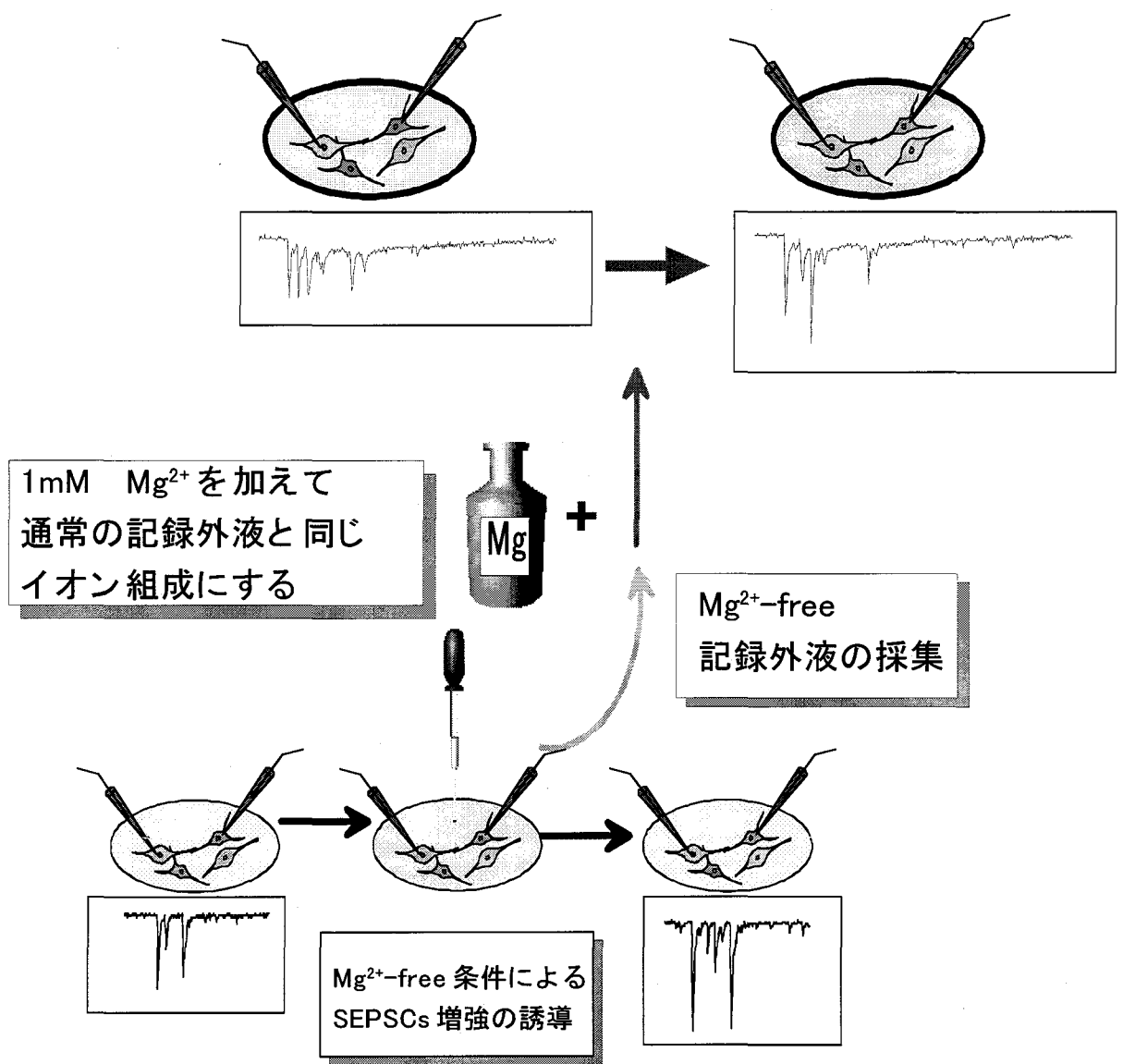


図 15 Conditioned Medium (CM) の調製法

細胞外記録外液を環流により Mg^{2+} -free 記録外液に置換し、電流固定に切り替えて15分間静置する事で増強を誘導した。この Mg^{2+} -free 記録外液を採取し、 $1 \mu M$ の $MgCl_2$ を加えて通常記録外液と同じイオン組成にした。これを濃縮して実験に用いた。

第3節 実験結果

1. CM による SEPSCs の増強

増強を誘導した Mg^{2+} -free 記録外液を採取し、 $1mM$ $MgCl_2$ を加えて条件付け培地 (CM) とした。この CM を実験手法に記述した手法で濃縮し、ほかの培養皿中の神経細胞に対して加えた。CM は、添加後約 5 分で SEPSCs の振幅を有為に上昇させた(Student's t-test)。CM 添加後 10 分ほどで振幅の上昇はほぼ飽和した。CM による SEPSCs の変化率は、用いた CM のロットによりばらつきがあったが、120-200%の範囲にあり、平均 $130.14 \pm 5.8\%$ ($n=19$, 図 16,17A,B)であった。これに対して、 Mg^{2+} を含んだ通常の記録外液から調製した条件付け培地をほかの培養細胞に加えたところ SEPSCs の平均変化率は $99.49 \pm 4.1\%$ で、有為な変化はなかった($n=5$, Student's t-test, 図 17B)。この結果は Mg^{2+} -free 条件によって SEPSCs の増強を誘導する間に増強を誘導する何らかの拡散性因子が放出されていることを示唆する。さらに、CM によって一度増強を誘導した後、記録外液を CM を含まないもので環流して増強誘導因子を洗い流した後でも増強は維持された(図 17B)。この結果は、CM 中の因子は増強の誘導に必要であり、維持相には必須でないことを示している。

調製した CM を限界ポアサイズを持つ膜で分画し、分子量 30k 以下、30k-50k、50k-100k、100k 以上の 4 分画に分けた。それぞれの CM の SEPSCs への効果を解析したところ、平均変化率は、30k 以下は $97.5 \pm 5\%$ ($n=9$)、30k-50k は $97.96 \pm 7.3\%$ ($n=7$)、50k-100k は、 $132 \pm 5\%$ ($n=13$)、100k 以上は $103.8 \pm 9.7\%$ であり、50k-100k のところに有為な活性があった(Student's t-test, 図 18)。100k 以上も lot によっては若干活性を示すものもあった。CM 中の有効成分が 100k 近辺にあるのか、もしくは 50-100k の大きさの因子のほかに微量な因子を含むことも考えられる。50k の限界ポアサイズといっても、分子の性質によってその通過サイズが変わるので

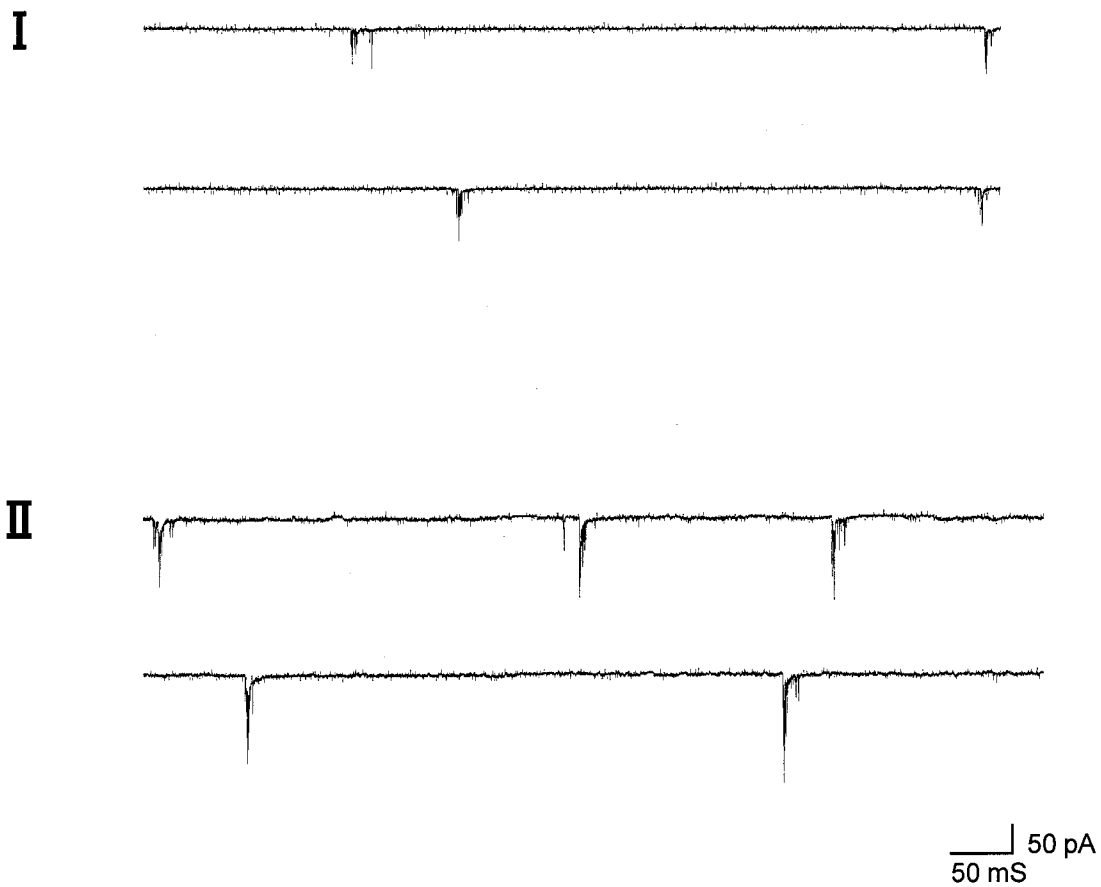


図 16 CMによる SEPSCs 増強の典型例

Iは初期状態の SEPSCs、IIは、CMを加えて10分後の SEPSCsの記録である。I、IIを比較すると明確にIIの SEPSCs 振幅が増大している。-60mVに電圧固定。

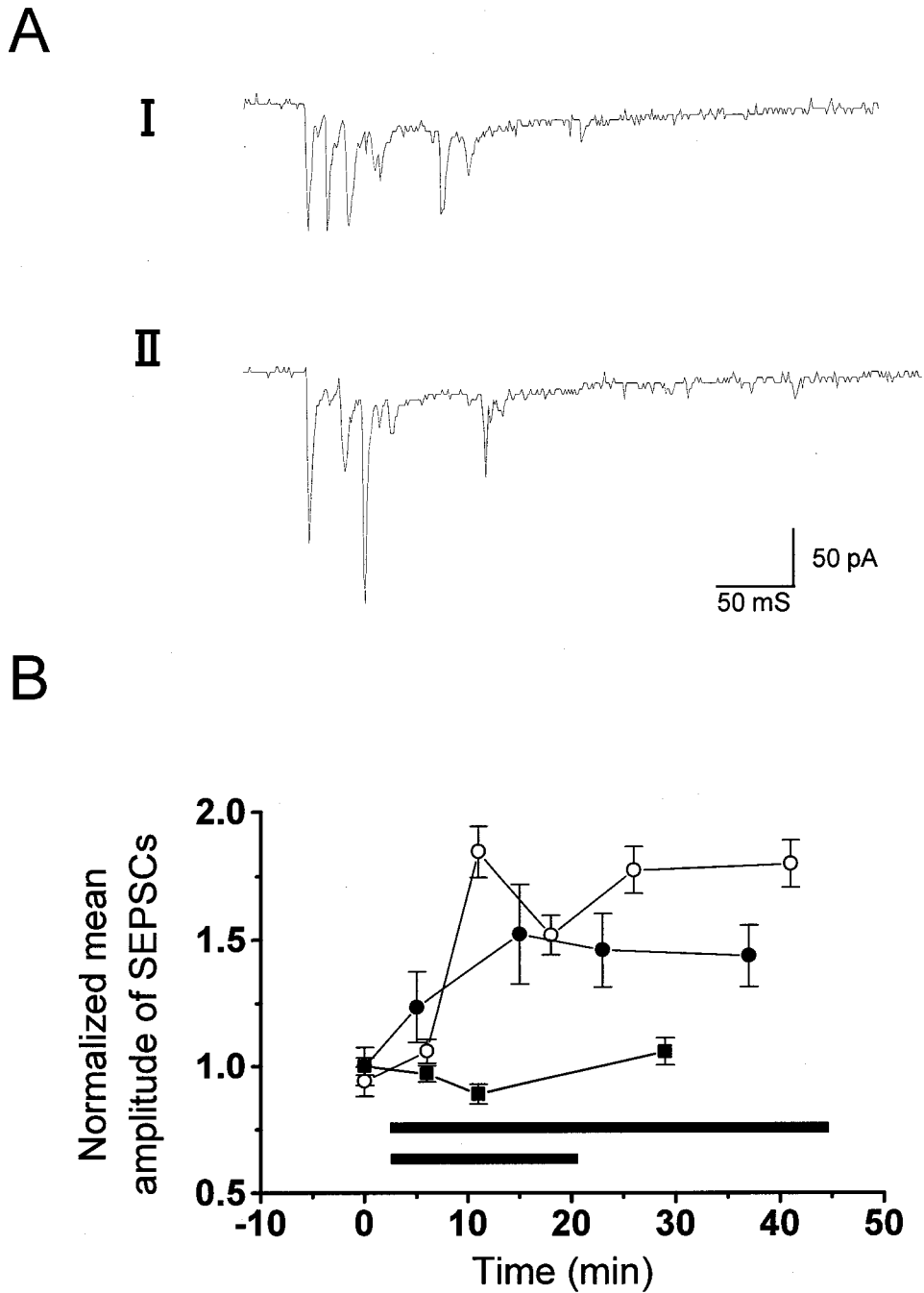


図 17 CMによる SEPSCs 増強の典型例

- A. CMによる SEPSCs 増強の波形の拡大。I は初期状態の SEPSCs、II は、CMを加えて 10 分後の SEPSCs の記録である。-60mV に電圧固定。
- B. CMによる SEPSCs 増強の経時変化。CMによる SEPSCs 増強(○)、CMによる SEPSCs 増強誘導後、灌流により CMを洗い流したもの(●)、対照実験として Mg^{2+} を含む記録外液から調製した CMの効果(■)。下部のバーは CMを加えた時間を示し、上段が(○)、下段が(●)である。

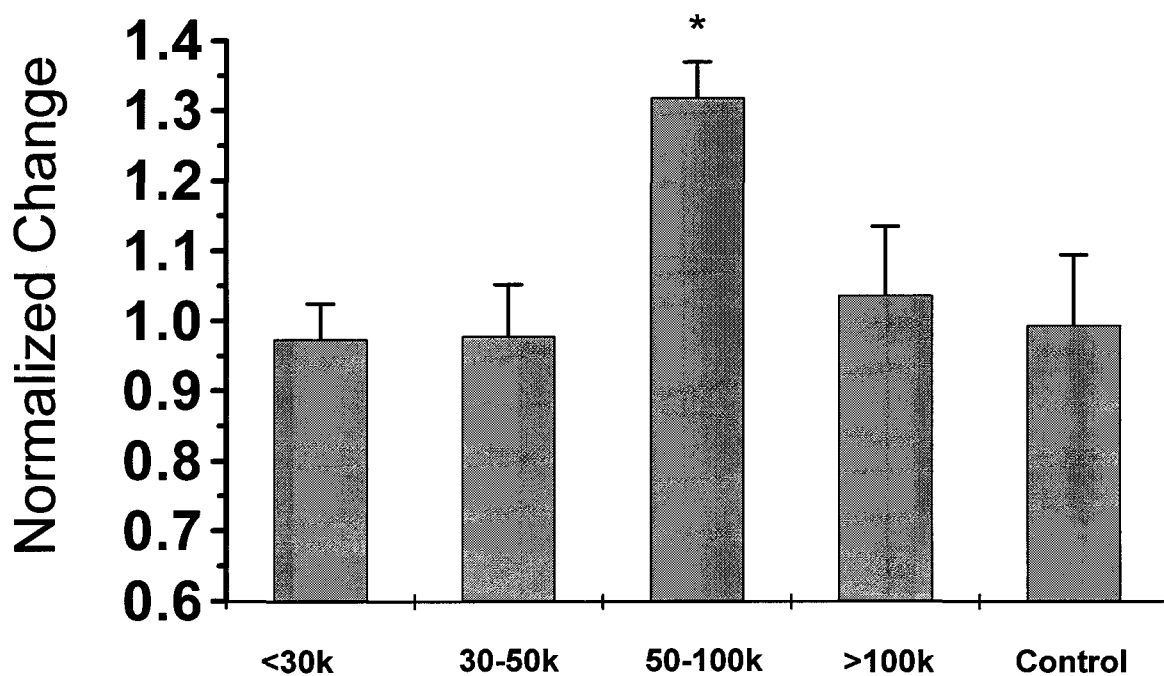


図 18 分画した CM の効果

アスタリスクは、他のカラムに対して有為差があることを示す。

CM 中の増強活性因子は、少なくとも 30k 以上の分子量を持っていることが示唆された。

2. CM 中のタンパク質性因子

CM 中の活性因子は少なくとも 30k 以上の分子量を持つことが示唆された。このように分子量が大きい因子はタンパク質性である可能性が高い。そこで、CM 中の因子がタンパク質であるかどうか検討するために以下の 2 つの実験を行った。まず、十分な増強誘導活性を持っていることを確認した CM を、90°C、20 分熱処理した。この熱処理した CM は、増強誘導活性を失った。熱処理 CM を加えた場合の SEPSCs の平均変化率は $94.3 \pm 8.9\%$ であった ($n=5$, Student's t-test, 図 20)。

さらに、トリプシンで処理した CM は増強誘導活性を失った。100 μ g/ml のトリプシンで 20 分間室温にて処理し、タンパク質分解したのちにトリプシン阻害剤にて反応を停止させた。このタンパク質分解処理した CM を加えたときの SEPSCs の平均変化率は $95.06 \pm 3.9\%$ であった (Student's t-test, $n=5$, 図 19、20)。これに対し、対照実験としてトリプシンとトリプシン阻害剤の混合溶液に CM を加えた混合物を添加した際の SEPSCs の平均変化率は $145.13 \pm 14\%$ で、振幅は有為に増加した (Student's t-test, $n=5$, 図 19、20)。これらの結果から、CM に含まれている増強を誘導する活性を持つ因子がタンパク質性であることを強く示唆するものである。

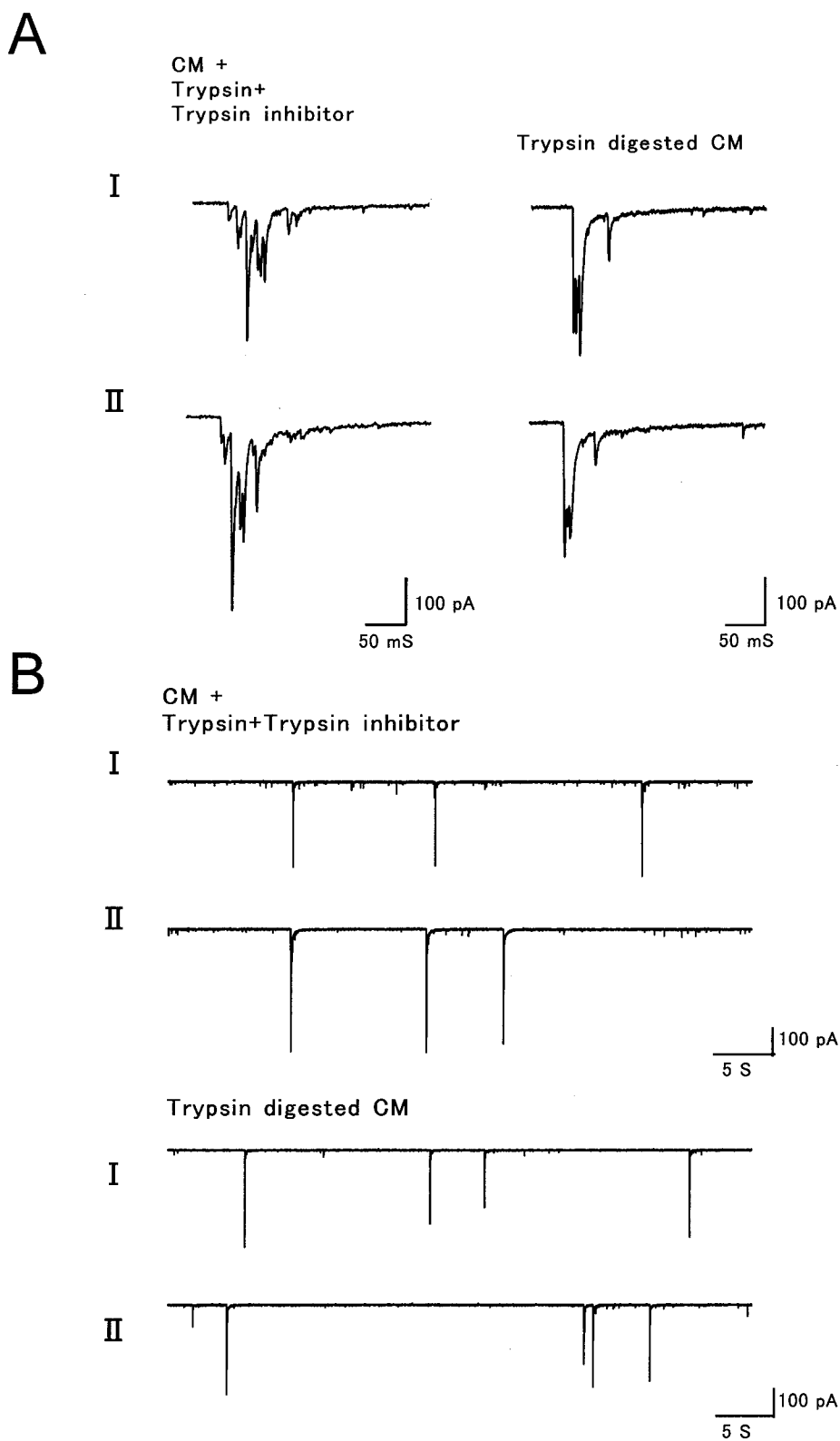


図 19 トリプシン処理した CM の効果の解析

- A. トリプシン処理した CM の添加前 (I)、後 (II) の SEPSCs の典型例。左のパネルは対照実験。-60mV 電位固定。
- B. トリプシン処理した CM の添加前 (I)、後 (II) の SEPSCs の典型例。上のパネルは対照実験。-60mV 電位固定。

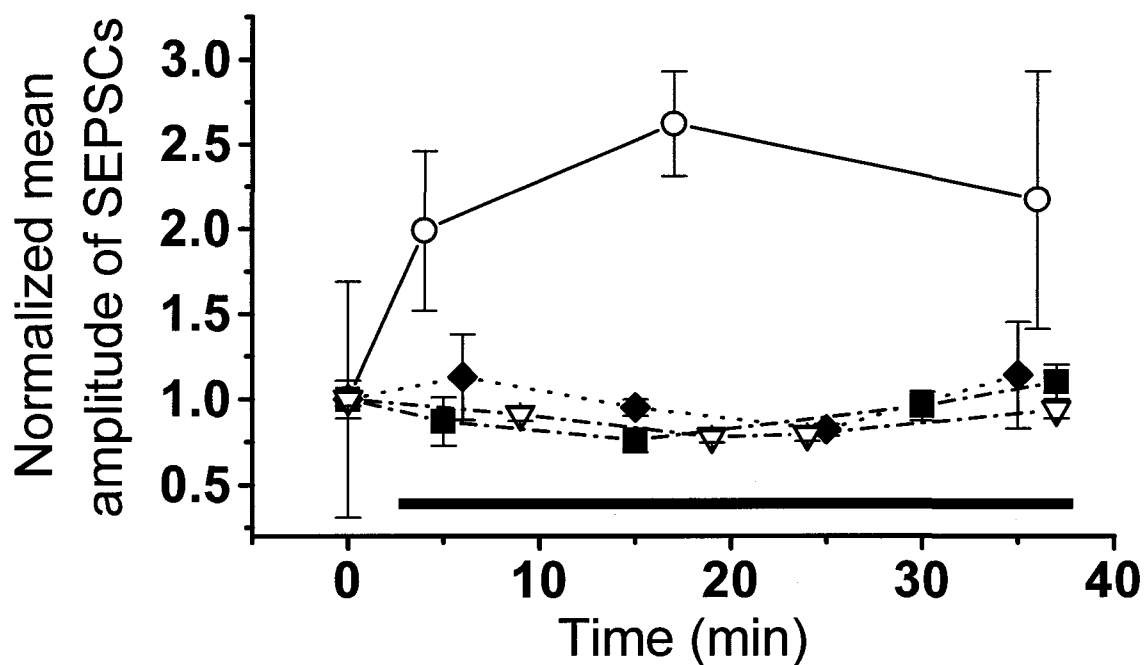


図 20 変成処理した CM の効果の解析

CMによる SEPSCs 増強の経時変化。CMをトリプトファンとトリプトファンインヒビターの混合物に加えて調製した対照実験試料による SEPSCs 増強(O)、トリプトファン処理した CM (■)、熱変性させた CM (▽)、対照実験として Mg²⁺ を含む記録外液から調製した CM の効果 (◆)。下部のバーは CM を加えた時間を示す。

3. 増強誘導因子とタンパク質合成の関連性

CM 中の活性因子がタンパク質性であり、また SEPSCs の増強が新規タンパク質合成に依存する。これらの結果から、新規タンパク質合成により CM が作られ、これが SEPSCs の増強に必須であるという仮説をたてることができる。この仮説を検証するために、PKC 阻害剤、及び、タンパク質合成阻害剤存在下で CM の活性を解析した。各種阻害剤が細胞に十分浸透するのを確実にするためホール・セル記録開始の 20 分前に阻害剤を記録外液に加えた。初期状態の SEPSCs を記録した後、CM を加えて SEPSCs の変化を解析した。その結果、カルフォスチン C により PKC を阻害した状態でも、CM の添加により、SEPSCs の振幅は有為に増大した。平均変化率は $144.8 \pm 10.9\%$ であった ($n=5$, Student's t-test, 図 21)。PKC の阻害は、 Mg^{2+} -free 条件による増強を阻害したので、これらの結果から、PKC の活性は CM 中の活性因子を放出するために必須とされることが示唆される。

また、同様にシクロヘキシミドでタンパク質合成を阻害した状況においても、CM は SEPSCs の増強を誘導した。SEPSCs の振幅の平均変化率は $133.5 \pm 6\%$ であった ($n=7$, Student's t-test, 図 22)。タンパク質合成は Mg^{2+} -free による SEPSCs の増強には必須であったから、このとき必須とされたタンパク質は CM 中の活性因子放出に必須なタンパク質であるか、もしくは因子そのものである可能性が示唆される。また、これら二つの実験から CM 中の増強因子が Mg^{2+} -free 条件による増強に必須であり、CM による増強現象が Mg^{2+} -free による SEPSCs 増強現象の一部として含まれていることが示唆される。これらの実験のまとめを図 23 に示す。

4. グリア細胞除去培養下での CM の活性

これまでの実験はすべてグリア細胞と神経細胞の混在培養系において行ってきた。そのため、CM が効果を及ぼすのがグリア細胞であり、これがさらに神経

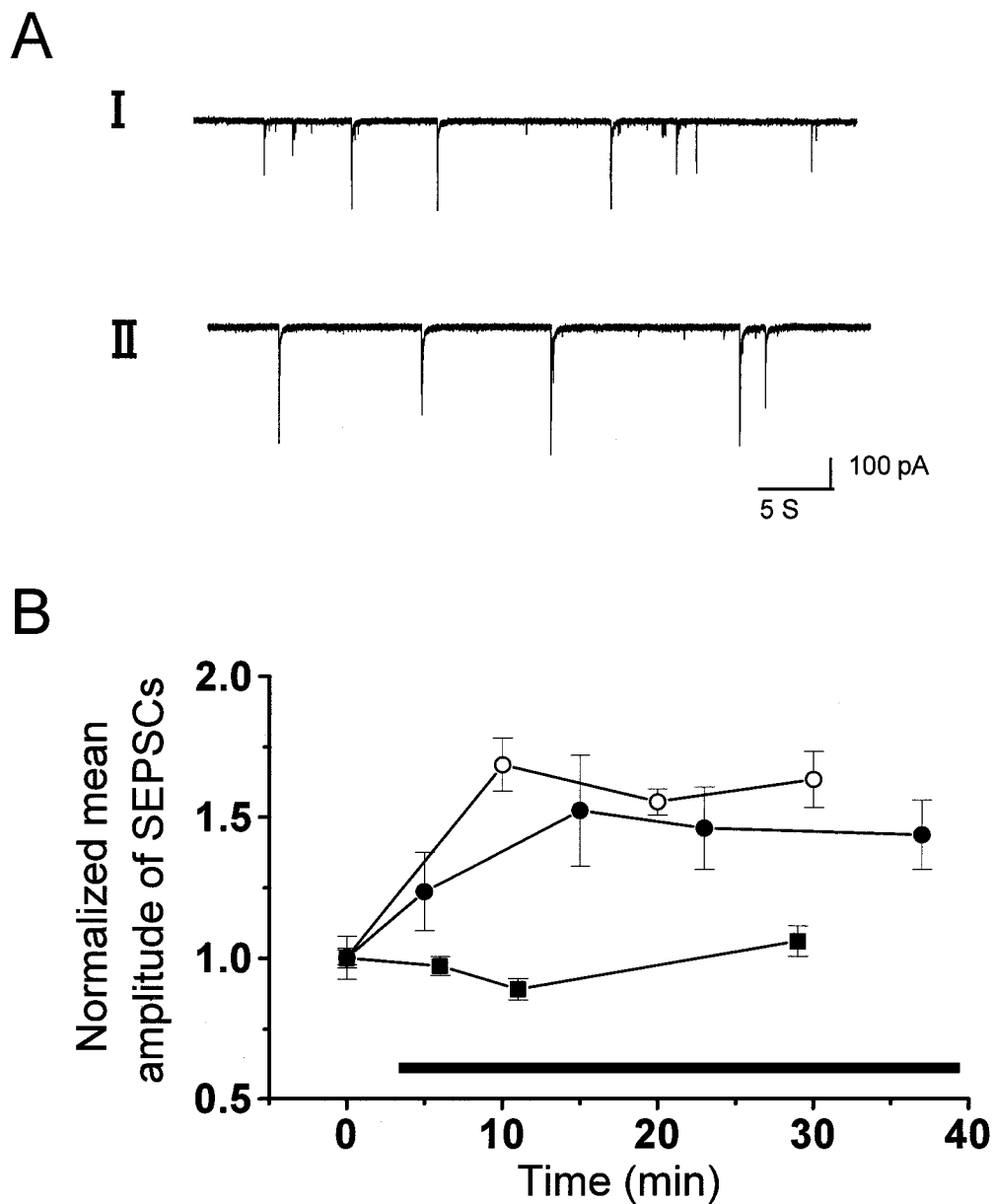
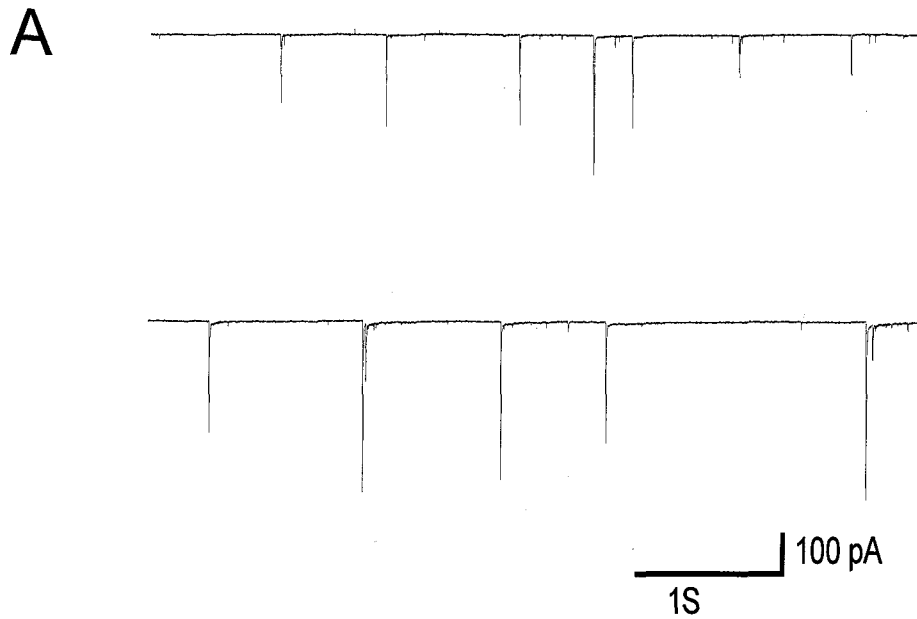


図 21 200nM カルホスチン C 存在下での CM による SEPSCs 増強

- A. I は初期状態の SEPSCs、II は、200nM カルホスチン C 存在下で CM を加えて 10 分後の SEPSCs の記録である。I、II を比較すると明確に II の SEPSCs 振幅が増大している。-60mV に電圧固定。
- B. 200nM カルホスチン C 存在下での CM による SEPSCs 増強の経時変化。
200nM カルホスチン C 存在下での CM による SEPSCs 増強(○)、CM 単独による増強の誘導 (●)、対照実験として Mg²⁺ を含む記録外液から調製した CM の効果(■)。
下部のバーは CM を加えた時間を示す。



B

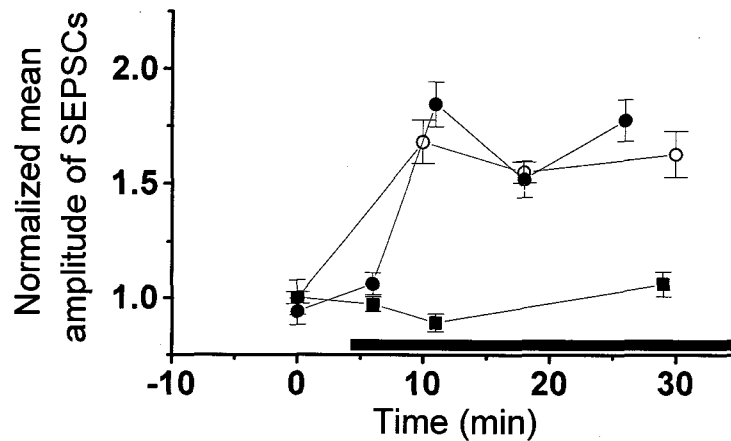


図 22 $1 \mu\text{M}$ シクロヘキサミド存在下での CM による SEPSCs 増強

- A. I は初期状態の SEPSCs、II は、 $1 \mu\text{M}$ シクロヘキサミド存在下で CM を加えて 10 分後の SEPSCs の記録である。I、II を比較すると明確に II の SEPSCs 振幅が増大している。 -60mV に電圧固定。
- B. $1 \mu\text{M}$ シクロヘキサミド存在下での CM による SEPSCs 増強の経時変化。 $1 \mu\text{M}$ シクロヘキサミド存在下での CM による SEPSCs 増強(○)、CM 単独による増強の誘導 (●)、対照実験として Mg^{2+} を含む記録外液から調製した CM の効果(■)。下部のバーは CM を加えた時間を示す。

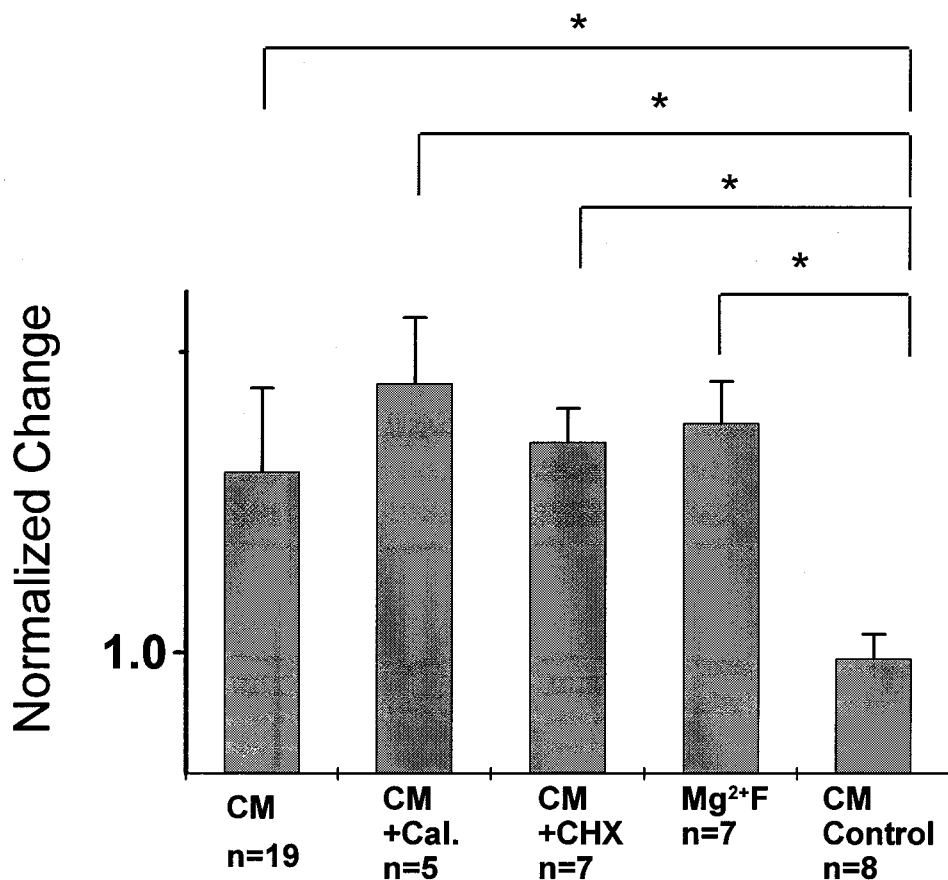


図 23 CM による増強の
 蛋白キナーゼの活性化・タンパク質合成への非依存性

Cal.+CMは200nMカルフォスチンC存在下でのCMの効果、CHXは1μMシクロヘキシミド存在下でのCMの効果の略である。アスタリスクは有為差があることを示す。

伝達を調節している可能性が否定できない。そこで、グリア除去培養下で CM の効果を検討した。実験は通常の培養に対するアッセイ法と全く同様に行った。結果、グリア除去培養においても CM は SEPSCs の振幅を増大させた (n=4 図 24)。振幅の平均変化率は $127.5 \pm 12\%$ であった。この結果は、CM 中の活性因子がグリア細胞を介さず直接神経細胞に作用していることを示唆する。

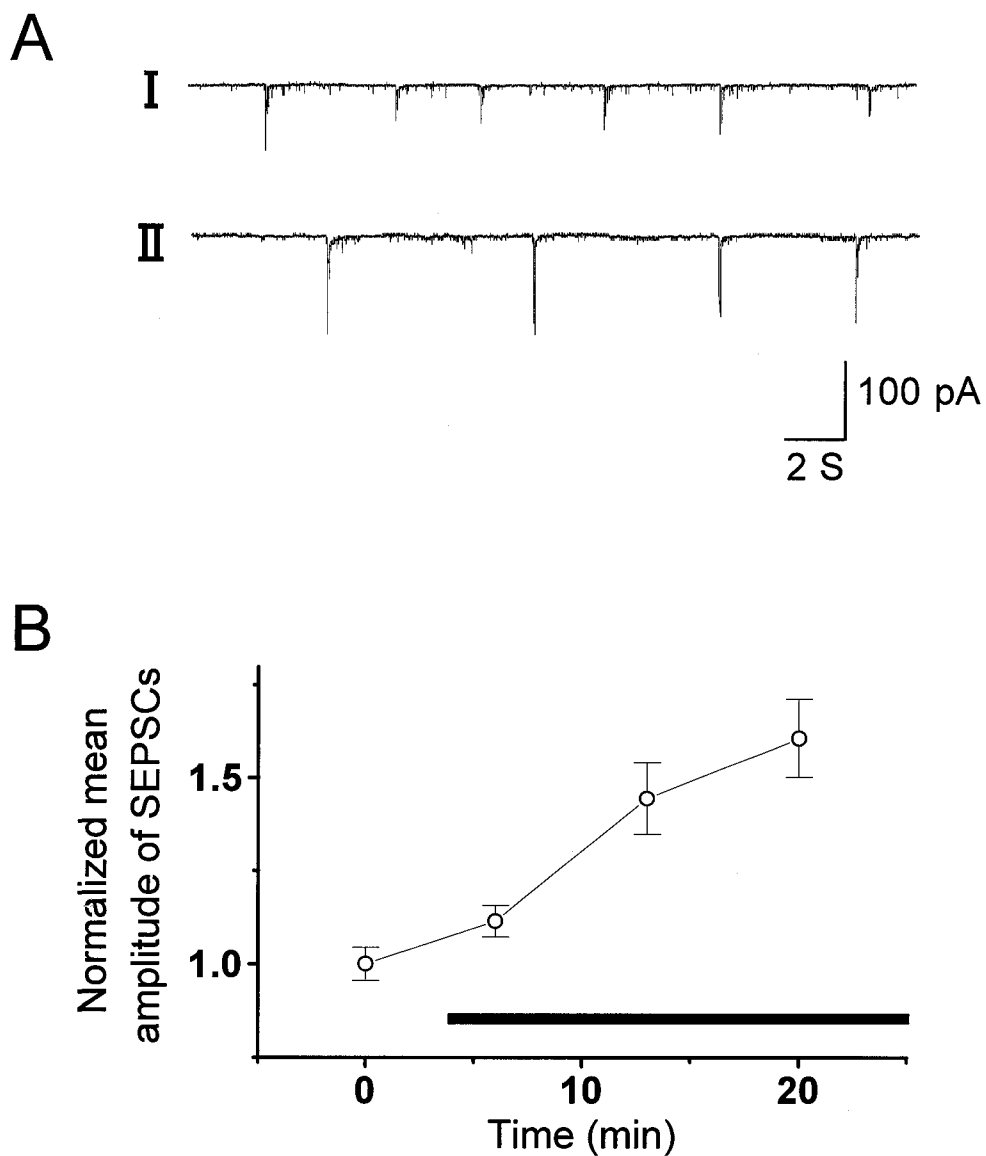


図 24 グリア除去培養系での CM による SEPSCs 増強

- A. I は初期状態の SEPSCs、II は、グリア除去培養系に CM を加えて 10 分後の SEPSCs の記録である。I、II を比較すると明確に II の SEPSCs 振幅が増大している。 -60mV に電圧固定。
- B. グリア除去培養系での CM による SEPSCs 増強の経時変化。下部のバーは CM を加えた時間を示す。

第4節 考察

CM による SEPSCs の増強は、5 分程度の比較的早い時間経過で起こり、また、一度増強が誘導されてしまうと、CM を洗い流しても増強のレベルは維持される。この結果は CM 中の増強因子は SEPSCs の増強を発現する一連の機構を発動するが、これを維持するのに恒常的に必要とされるものではないことを示す。この文脈において、CM 中の因子は増強の誘導が起こったという情報を伝達する一種のシグナルとして働くものであると考えられる。

CM 中の増強誘導活性を持つ因子がタンパク質分子であることが明確に示された。証拠としては、熱変性すること、30k 以上の比較的大きな分子量を持つこと、そして決定的な結果は、トリプシンによるタンパク質分解処理により活性を失うという結果である。現在、このタンパク質分子を精製し同定すべくアッセイを継続している。Mg²⁺-free 条件による SEPSCs 増強の発現には、シナプス後細胞における新規タンパク質が必要である。また CM 中の増強因子はタンパク質性であり、Mg²⁺-free 条件による SEPSCs 増強に必須である。さらに、CM 中の因子が放出された後では新規タンパク質合成は増強の誘導に必須ではない。これらの結果の解釈は、増強因子はシナプス後細胞において新規にタンパク質合成されて放出されるという仮説と矛盾しない。

長期増強を誘導する刺激により放出されるタンパク質性の拡散性因子についてはあまり報告がないが、Xie らが、ウサギの大脳皮質において、テタヌス刺激によって放出された拡散因子の存在を報告している(Xie et al. 1991)。彼らは、分子量 3k 以下、3k-10k、及び 50k 以上の分画に LTP 誘導活性があることを見いだしており、このうち 50k 以上の分画に存在する因子は電気泳動の結果から 69k のタンパク質であることを報告している。残念ながら、このタンパク質分子を精製したという報告は未だないが、この因子を含む分画がグリア細胞に脱分極を引き起こし、PC12 細胞の

突起を伸長する活性を持つことが同じグループから報告されており、興味深い (Sastry et al. 1988)。本系における CM 中の増強因子はグリア細胞を介さずに増強に作用するという点で、Xie らの拡散因子とは異なる可能性が高いが、このようなタンパク質性拡散因子によるシナプス伝達効率の調整が、複数の動物種にわたって確認できたことになり、興味深い。

タンパク質性の因子でシナプス伝達効率を調節するものとして神経栄養因子があげられる。近年 BDNF、NT3 が新規タンパク質合成依存的な LTP を誘導することが報告されているが、これらの報告では、EPSCs の振幅が増強して一定レベルで飽和するまで約 40 分の時間を要し、LTP は比較的遅く発現される (Kang et al. 1997)。この時間は、CM 中の活性因子による増強と大幅に異なることを考えると、この因子はこうした既知の成長因子ではない可能性が高い。しかし、CM 中の増強因子が神経成長促進活性を持っていないとはいえないので、これは今後検討すべき課題である。

拡散性因子は、近傍のシナプスへシナプス伝達効率の変化を伝搬する機構としても有力である。序論で述べたとおり、近年各種の可塑的変化のシナプス間伝搬現象が報告されており、これらの中には拡散性細胞外因子により誘導される可能性を示唆したものもある。近傍のシナプス間でのシナプス伝達効率の伝搬は連合学習や連想学習を実現する機構である可能性があり、大変興味深い。

CM 中の増強因子はグリア細胞を介さず直接神経細胞に作用することがグリア除去培養系を用いた実験で示された。グリア細胞が増強誘導因子に関与するもう一つの可能性として、グリア細胞が神経細胞から何らかのシグナルを受けて CM を放出している可能性がある。これを検討するには、原理的にはグリア除去培養系を用いて CM を調製すればよいが、培養失敗確率の高いグリア除去培養系を大量に準備する必要があり、これは技術的に困難である。しかしながら、グリア除去培養において

も Mg^{2+} -free 条件による SEPSCs の増強が誘導されること、CM 中の増強因子はこの増強に必須であることをあわせて考察すれば、この増強因子がグリア細胞から分泌される可能性は低い。

第4章 結論

大脳解離培養系においても、シナプス伝達の活動依存的可塑的变化が引き起こされることが確認された。また、本系においては、グリア細胞を除去した培養系においても SEPSCs の増強が確認できたことから、このような可塑的な変化は神経細胞に内在したメカニズムであると考えられる。

Mg²⁺-free 条件による SEPSCs の増強は、神経回路網の活動と NMDA-R の活性化により誘導される。NMDA-R の選択的阻害剤による SEPSCs 増強の阻害や、NMDA-R が関与する電流波形の変化は、この増強に Mg²⁺-free 条件下での NMDA-R の活性化が必要であることを示しているが、十分条件ではない。このことは TTX による阻害実験から明らかである。TTX 存在下における自発放出のみでは、Mg²⁺-free 条件にしても増強は誘導されなかった。この増強現象はシナプス活動に依存したものであり、生体内で起こっている刺激誘導的 LTP に相当するものであると考えられる。

さらに、PKC を阻害することで、増強は阻害されたことから、NMDA-R の活性化に伴う細胞内カルシウムイオンの上昇による、PKC の活性化が増強に必須であることが示唆された。また、タンパクキナーゼの阻害剤は刺激前のシナプス伝達を直接修飾しなかったことから、この増強は、タンパク質キナーゼによる受容体のリン酸化やタンパク質キナーゼによる伝達物質放出の調整によるものでないと思われる。しかし、刺激前の伝達とは別の経路でタンパク質キナーゼが調整する付加的な伝達が増強に必須である可能性も否定できない。

タンパク翻訳阻害剤であるシクロヘキシミド、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D もこの増強を抑えたことから、mRNA、タンパク質が新規に合成されることが SEPSCs の増強を発現するために必須であることが明らかとなった。しかも、シナ

プス後細胞のみ選択的にタンパク質合成を阻害した場合も、 Mg^{2+} -条件による SEPPSCs 増強は阻害された。この結果から、少なくともシナプス後細胞においてこの増強現象に必須であるタンパク質合成が行われている。ただし、この結果は、シナプス前細胞における新規タンパク質合成の必要性を否定するものではない。

シナプス後細胞で NMDA-R が活性化すること、また、少なくともシナプス後細胞においてタンパク質合成が必須であることを考えると PKC の活性化はシナプス後細胞における Ca^{2+} 依存性の遺伝子発現機構に関わっている可能性が高い。PKC が、CREB の活性化に関わっているという報告や、特定の転写因子を活性化するという報告もあり、この可能性は十分あるといえる。CaMKII、PKA がこの増強に関与する可能性も残っている。

さらに、拡散性増強促進因子が細胞外に放出されていることが確認された。しかも、この因子はタンパク質性のものであり、少なくとも 30k 以上の分子量を持つことが確認された。対照実験として Mg^{2+} -free による増強の誘導を行わない場合の記録外液を他の培養皿のニューロンに添加した場合は、増強が起こらないことから、この因子は、増強を誘導する刺激によって放出が開始される。

この因子による増強は5分程度の比較的短時間で発現し、ラット等で報告のある神経栄養因子(BDNF や NT3)による増強のタイムスケールより明らかに短い時間で作動した。成長因子による増強現象はゆっくりとした時間経過で起こるものしか報告されておらず、本系における CM 中の増強因子がこうした既知の成長因子である可能性は少ないといえる。しかし、この因子が神経に対し栄養的な活性を持つ可能性はあり、今後さらに解析すべき課題である。

CM 中の増強因子は神経細胞に直接作用することがグリア除去培養系を用いた実験により確認された。合成ペプチド SFP4 によりグリア細胞を除去した系においても、 Mg^{2+} -free 条件、及び CM によって SEPPSCs の増強が誘導される。本系にお

いては、SEPSCs 増強に必須な機構は全て神経細胞に内在していると考えられる。

CM が SEPSCs 増強に必要なにしてかつ十分であることが示された。カルフォスチン C による PKC 阻害条件下でも CM は SEPSCs の増強を誘導した。さらに、シクロヘキシミドによりタンパク質合成を阻害した状態で CM を加えても、SEPSCs の増強は誘導可能であった。このことは、CM 中の因子による増強には新規タンパク質の合成を必要としないことを示唆する。これに対し、 Mg^{2+} -free 条件による増強の誘導には、 Mg^{2+} -free 条件時にタンパク質が新規に合成されることが必須であった。これらの結果から、 Mg^{2+} -free 条件による増強現象の発現には細胞外に放出されるタンパク質性のシナプス伝達効率促進因子が必須であり、これを合成するためにタンパク質合成が必須である可能性が高い。また、CM に含まれる因子は、PKC を介さない細胞内情報伝達系により作動することが示唆され、PKC は NMDA-R の活性化からタンパク質合成までの経路に関わる可能性が高い。

これらの結果に加え、mEPSCs 解析の結果、増強に伴ってシナプス部位が増加する可能性が示唆された。このシナプス部位の増大がシナプス前細胞の変化によって引き起こされるとすると、このタンパク質性因子はシナプス後細胞で合成され、一種の逆行性伝達物質としてシナプス前細胞に作用する可能性が考えられる。また、シナプス部位の数の増大が、サイレントシナプスが有効なアンサイレントシナプスに転換されることによって実現されるとすると、この因子が近傍のサイレントシナプスに作用する可能性も考えられる。さらに、近年報告が多いシナプス間の「シナプス伝達効率変化の伝搬現象」を担うことも考えられ、連合学習等のメカニズムに寄与する可能性も。この CM 中の因子がタンパク質性であることから、因子が修飾を受けて様々な調整が可能であることも考えられる。受容する側の状態によってその作用機序を変えるなど、効果の多様性が期待できる。

この SEPSCs 増強機構の概念図を図 25 に示す。

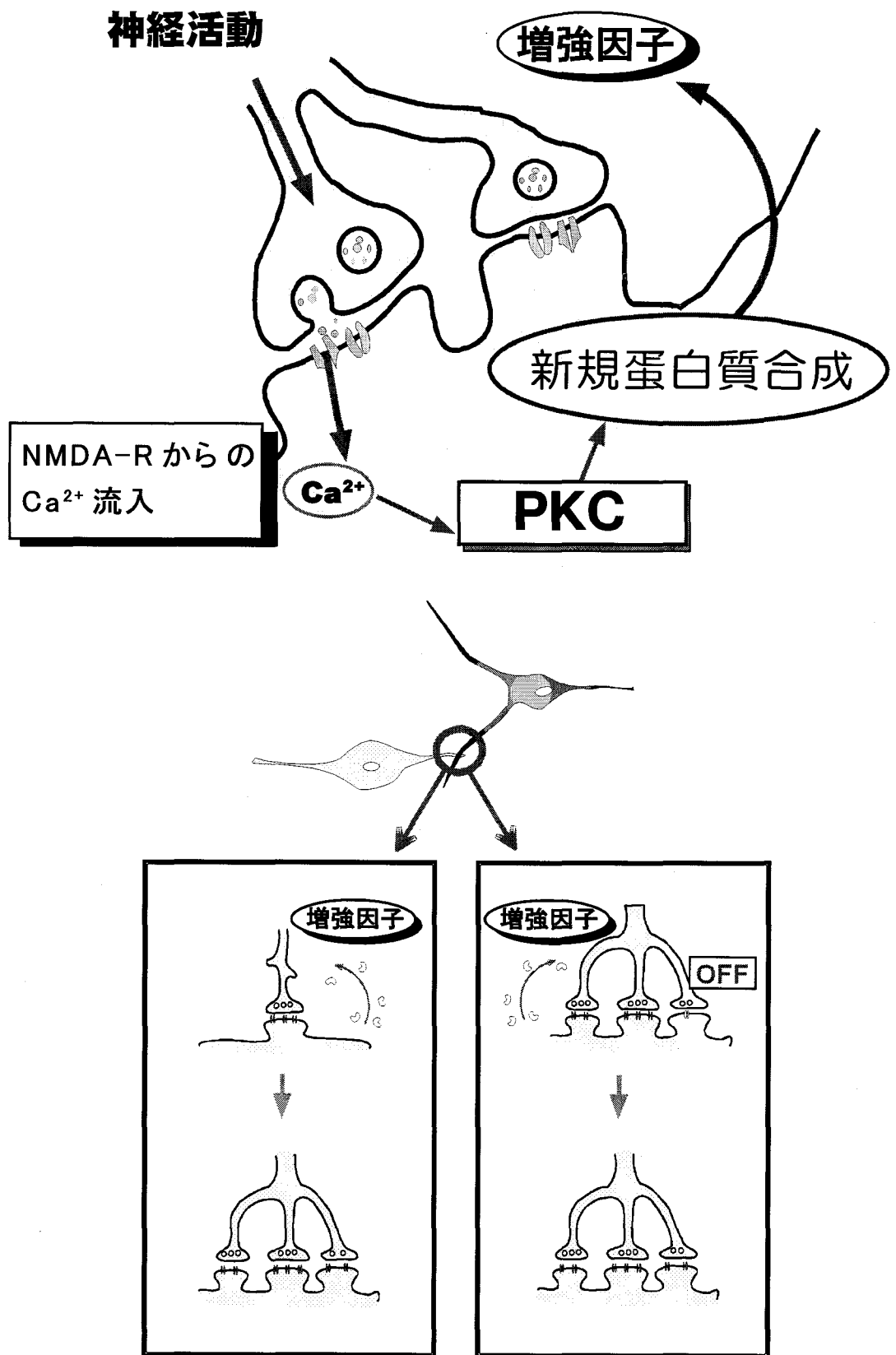


図 25 SEPSCs 増強の分子機構の考察

謝辞

本研究を行うに当たり、様々な方々にお世話になりました。ここに厚く御礼申し上げます。

葛西道生教授には、研究の思想から論文の作成に至るまで様々な面で、ご指導、ご鞭撻を賜り、心から感謝致します。また、研究を直接御指導下さいました工業技術院大阪工業技術研究所有機機能材料部の田口隆久先生は、考え方から実践まで研究の全ての面にわたり懇切にご指導下さり、未熟な私を導いて下さいました。言い尽くせぬ感謝の意を捧げます。本当に有り難うございました。副査をしていただきました藤田一郎教授、村上富士夫教授には、有益なディスカッションを頂き、大変感謝しております。神経生理学研究室の小田洋一助教授、葛西研究室の井出徹先生には主に技術的な面に於いて様々なご助言を頂き、誠に有り難うございます。私の議論につきあって下さいました岡本賢一先生、また多くの先輩諸兄に感謝いたします。特に清末和之先生には、大学院時代から5年間にわたり、兄弟子として学界の動向から技術的方面の全てにわたり、研究の細かい点に至るまで教えて下さり、心から感謝いたします。この研究を行うに当たり、実験の準備や議論につきあってくれた後輩達に感謝します。試料の調整などを手伝ってくれた永井里奈君に感謝します。また、私の混乱しがちな議論につきあってくれ、ときおり軌道修正してくれた同期の石本哲也氏に感謝します。最後に 5 年半にわたり並々ならぬお世話になりました葛西研究室の皆様方に感謝いたします。

参考文献

Abraham WC, Mason SE (1988) Effects of the NMDA receptor/channel antagonists CPP and MK801 on hippocampal field potentials and long-term potentiation in anesthetized rats. *Brain-Res* 462:40-6

Aiba A, Chen C, Herrup K, Rosenmund C, Stevens CF and Tonegawa S. (1994) Reduced hippocampal long-term potentiation and context-specific deficit in associative learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* 79, 365-75.

Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81:905-15

Barinaga M (1997) NGF signals ride a trolley to nucleus. *Science* 277:1037

Barnes CA (1995) Involvement of LTP in memory: are we "searching under the street light"? *Neuron* 15:751-4

Barnes CA, Jung MW, McNaughton BL, Korol DL, Andreasson K, Worley PF (1994) LTP saturation and spatial learning disruption: effects of task variables and saturation levels. *J Neurosci.* 14:5793-806

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-5

Berry SD, Thompson RF (1978) Prediction of learning rate from the hippocampal electroencephalogram. *Science* 200:1298-300

Bradley PM, Burns BD, King TM, Webb AC (1993) NMDA-receptors and potentiation in an area of avian brain essential for learning. *NeuroReport* 5:313-6

Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-56

Bolshakov VY, Golan H, Kandel ER, Siegelbaum SA (1997) Recruitment of new sites of synaptic transmission during the cAMP- dependent late phase of LTP at CA3-CA1 synapses in the hippocampus. *Neuron* 19:635-51

Chen W, Wieraszko A, Hogan MV, Yang HA, Kornecki E, Ehrlich YH (1996) Surface protein phosphorylation by ecto-protein kinase is required for the maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8688-93

Chub N, MJ OD (1998) Blockade and recovery of spontaneous rhythmic activity after application of neurotransmitter antagonists to spinal networks of the chick embryo. *J Neurosci.* 18:294-306

Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER (1991) cAmp response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAmp-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5061-5

Ehrlich YH (1996) Extracellular protein kinases [letter; comment]. *Science* 271:278-9

Eichenbaum H, Wiener SI, Shapiro ML, Cohen NJ (1989) The organization of spatial coding in the hippocampus: a study of neural ensemble activity. *J Neurosci.* 9:2764-75

Fitzsimonds RM, Song HJ, Poo MM (1997) Propagation of activity-dependent synaptic depression in simple neural networks. *Nature* 388:439-48

Frey U, Morris RG (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation . *Nature* 385:533-6

Gerstner W, Kreiter AK, Markram H, Herz AV (1997) Neural codes: firing rates and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12740-1

Hartell NA (1996) Inhibition of cGMP breakdown promotes the induction of cerebellar long-term depression. *J Neurosci.* 16:2881-90

Hartell NA (1996) Strong activation of parallel fibers produces localized calcium transients and a form of LTD that spreads to distant synapses. *Neuron* 16:601-10

Hjelmstand GO, Malenka RC, Nicoll RA (1997) Synaptic refractory period provides a measure of probability of release in the hippocampus. *Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract: 753.8*

Holland LL, Wagner JJ (1998) Primed facilitation of homosynaptic long-term depression and depotentiation in rat hippocampus. *J Neurosci.* 18:887-94

Hrabetova S, Sacktor TC (1996) Bidirectional regulation of protein kinase M zeta in the maintenance of long-term potentiation and long-term depression. *J Neurosci.* 16:5324-33

Huang YY, Colley PA, Routtenberg A (1992) Postsynaptic then presynaptic protein kinase C activity may be necessary for long-term potentiation. *Neuroscience* 49:819-27

Huang YY, Kandel ER (1996) Modulation of both the early and the late phase of mossy fiber LTP by the activation of beta-adrenergic receptors. *Neuron* 16:611-7

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1995) Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-34

Ito M, Sakurai M, Tongroach P (1982) Climbing fibre induced depression of both mossy fibre responsiveness and glutamate sensitivity of cerebellar Purkinje cells. *J Physiol (Lond)* 324:113-34

Ito M (1986) Long-term depression as a memory process in the cerebellum. *Neurosci-Res* 3:531-9

Kang H, Schuman EM (1995a) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science* 267:1658-62

Kang HJ, Schuman EM (1995b) Neurotrophin-induced modulation of synaptic transmission in the adult hippocampus. *J Physiol Paris* 89:11-22

Kang H, Schuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-6

Kang H, Welcher AA, Shelton D, Schuman EM (1997) Neurotrophins and time: different roles for TrkB signaling in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 19:653-64

Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA (1988) NMDA application potentiates synaptic transmission in the hippocampus. *Nature* 334:250-2

Kemp N, Bashir ZI (1997) NMDA receptor-dependent and -independent long-term depression in the CA1 region of the adult rat hippocampus *in vitro*. *Neuropharmacology* 36:397-9

Kiyosue K, Kasai M, Taguchi T (1996) Two modes of activity-dependent synaptogenesis of cerebral neurons *in vitro*. *NeuroReport* 7:701-4

Kiyosue K, Kasai M, Taguchi T (1997) Selective formation of silent synapses on immature postsynaptic cells in cocultures of chick neurons of different ages. *Brain Res Dev Brain Res* 99:201-7

Kudoh SN, Matsuo A, Kiyosue K, Kasai M, Taguchi T (1997) Long-lasting enhancement of synaptic activity in dissociated cerebral neurons induced by brief exposure to Mg²⁺-free conditions. *Neurosci Res* 28:337-44

Kullmann DM, Asztely F (1998) Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci* 21:8-14

Kullmann DM, Erdemli G, Asztely F (1996) LTP of AMPA and NMDA receptor-mediated signals: evidence for presynaptic expression and extrasynaptic glutamate spill-over. *Neuron* 17:461-74

Larkman A, Stratford K, Jack J (1991) Quantal analysis of excitatory synaptic action and depression in hippocampal slices. *Nature* 350:344-7

Liao D, Hessler NA, Malinow R (1995) Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375:400-4

Linden DJ, Wong KL, Sheu FS, Routtenberg A (1988) NMDA receptor blockade prevents the increase in protein kinase C substrate (protein F1) phosphorylation produced by long-term potentiation. *Brain-Res* 458:142-6

Linden DJ, Connor JA (1991) Participation of postsynaptic PKC in cerebellar long-term depression in culture. *Science* 254:1656-9

Linden DJ (1997) Long-term potentiation of glial synaptic currents in cerebellar culture. *Neuron* 18:983-94

Lisman JE, Harris KM (1993) Quantal analysis and synaptic anatomy--integrating two views of hippocampal plasticity. *Trends Neurosci* 16:141-7

Liu G, Tsien RW (1997) Variable size of synaptic events at single hippocampal synapse is due to variation of transmitter concentration in the synaptic cleft. *Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract: 892.7*

Lovinger DM, Colley PA, Akers RF, Nelson RB, Routtenberg A (1986) Direct relation of long-term synaptic potentiation to phosphorylation of membrane protein F1, a substrate for membrane protein kinase C. *Brain-Res* 399:205-11

Lynch MA, Errington ML, Bliss TV (1989) Nordihydroguaiaretic acid blocks the synaptic component of long-term potentiation and the associated increases in release of glutamate and arachidonate: an in vivo study in the dentate gyrus of the rat. *Neuroscience* 30:693-701

Mainen ZF, Malinow R (1997) Measurement of release probability by use-dependent block of AMPA-R mediated synaptic transmission in GluR2 knockout mice.. Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract: 53.10

Malenka RC (1991) Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 6:53-60

Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA (1986) Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321:175-7

Malinow R, Madison DV, Tsien RW (1988) Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation. *Nature* 335:820-4

Margrie TW, Rostas JA, Sah P (1998) Long-term potentiation of synaptic transmission in the avian hippocampus. *J Neurosci.* 18:1207-16

Markram H, Wang Y (1977) Differential synaptic signals of neocortical pyramidal neurons and interneurons via the same axon from a pyramidal neuron. Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract: 753.6

Meberg PJ, Barnes CA, McNaughton BL, Routtenberg A (1993) Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12050-4

Meberg PJ, Kinney WR, Valcourt EG, Routtenberg A (1996) Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity. *Brain Res Mol Brain Res* 38:179-90

Mendelson B (1994) Chronic embryonic MK-801 exposure disrupts the somatotopic organization of cutaneous nerve projections in the chick spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res* 82:152-66

Mennerick S, Zorumski CF (1994) Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* 368:59-62

Muller D, Hefft S, Figurov A (1995) Heterosynaptic interactions between LTP and LTD in CA1 hippocampal slices. *Neuron* 14:599-605

Nayak AS, Moore CI, Browning MD (1996) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of the presynaptic protein synapsin I is persistently increased during long-

term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:15451-6

Neuman R, Cherubini E, Ben Ari Y (1987) Is activation of N-methyl-D-aspartate receptor gated channels sufficient to induce long term potentiation? *Neurosci. Lett* 80:283-8

Nguyen PV, Kandel ER (1996) A macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation requiring cAMP in the medial perforant pathway of rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 16:3189-98

Otmakhov N, Griffith LC, Lisman JE (1997) Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci.* 17:5357-65

Pfriegeer FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277:1684-7

Psarropoulou C, Kostopoulos G (1991) Long-term increase in excitability induced by Mg²⁺-free medium in the absence of afferent stimulation in CA1 area of mouse hippocampal slices. *Neurosci Lett* 132:207-11

Reymann KG, Schulzeck K, Kase H, Matthies H (1988) Phorbol ester-induced hippocampal long-term potentiation is counteracted by inhibitors of protein kinase C. *Exp Brain Res* 71:227-30

Rusakov DA, Stewart MG, Korogod SM (1996) Branching of active dendritic spines as a mechanism for controlling synaptic efficacy. *Neuroscience* 75:315-23

Rusakov DA, Richter-Levin G, Stewart MG, Bliss TV (1997) Reduction in spine density associated with long-term potentiation in the dentate gyrus suggests a spine fusion-and-branching model of potentiation. *Hippocampus* 7:489-500

Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E (1993) Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8342-6

Sastry BR, Goh JW, May PB, Chirwa SS (1988) The involvement of nonspiking cells in long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 66:841-4

Schulz PE, Fitzgibbons JC (1997) Differing mechanisms of expression for short- and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 78:321-34

Sharp PE, McNaughton BL, Barnes CA (1985) Enhancement of hippocampal field potentials in rats exposed to a novel, complex environment. *Brain Res* 339:361-5

Singer WTI (1997) Involvement of silent synapses in the induction of long term potentiation/long term depression in, neocortical hippocampal neurons. *La, EngMH AnimalMH Cerebral Cortex physiology* 74jc

Son H, Madelian V, Carpenter DO (1996) The translocation and involvement of protein kinase C in mossy fiber- CA3 long-term potentiation in hippocampus of the rat brain. *Brain Res* 739:282-92

Southam E, Garthwaite J (1991) Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *NeuroReport* 2:658-60

Taguchi T, Bo X-X, Taniguchi H, Kiyosue K, Kudoh K, Yumoto Y, Tatsu Y, Yamamoto H, Kasai M, Yoshikawa S (1995) Analysis of synaptogenesis in vitro by peptides relating to cell adhesion. *Peptide Chemistry* :145-148

Tokioka R, Matsuo A, Kiyosue K, Kasai M, Taguchi T (1993) Synapse formation in dissociated cell cultures of embryonic chick cerebral neurons. *Dev Brain Res* 74:146-50

von Kitzing E, Jonas P, Sakmann B (1994) Quantal analysis of excitatory postsynaptic currents at the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramidal cell synapse. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 29:235-60

Voronin LL, Kuhnt U, Gusev AG, Hess G (1992) Quantal analysis of long-term potentiation of "minimal" excitatory postsynaptic potentials in guinea pig hippocampal slices: binomial approach. *Exp Brain Res* 89:275-87

Weeks ACW, Petit TL (1997) A profile of synaptic structure during the intermediate maintenance of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. *Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract*: 263.11

Wigstrom H, Gustafsson B (1986) Postsynaptic control of hippocampal long-term potentiation. *J Physiol Paris* 81:228-36

Winder DG, Mansuy IM, Osman M, Moallem TM, Kandel ER (1998) Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* 92:25-37

Xie H, Rothstein TL (1995) Protein kinase C mediates activation of nuclear cAMP response element-binding protein (CREB) in B lymphocytes stimulated through surface Ig. *J Immunol* 154:1717-23

Xie Z, Morishita W, Kam T, Maretic H, Sastry BR (1991) Studies on substances that induce long-term potentiation in guinea-pig hippocampal slices. *Neuroscience* 43:11-20

Yamamoto T, Taguchi T (1992) A muscle-derived factor antagonizes the neurotoxicity of glutamate in dissociated cell cultures of chick telencephalic neurons. *Neurosci Lett* 139:205-8

Yeckel MF, Berger TW (1998) Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: dependence on cellular mechanisms and network properties. *J Neurosci.* 18:438-50

Zastrow DJ, Browning (1997) Long-term potentiation induces cAMP-dependent increase in glutamate receptor subunit synthesis. Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract: 47.5

論文発表及び学会発表

学会誌等における発表論文

- 1 T. Taguchi, X-X. Bo, H. Taniguchi, K. Kiyosue, S. Kudoh, N. Yumoto, Y. Tatsu, H. Yamamoto, M. Kasai, S. Yoshikawa:
Analysis of synaptogenesis in vitro by peptides relating to cell adhesion.
peptide chemistry (1995) 1994 145-148
- 2 田口 隆久、清末 和之、工藤 卓
培養大脳神経細胞のシナプス形成・可塑性のメカニズム
第11回 生体・生理工学シンポジウム論文集 (1996) 249-252
- 3 田口 隆久、清末 和之、工藤 卓
大脳皮質ニューロン -シナプス形成・可塑性アッセイ系
ニューロサイエンスラボマニュアル 1 神経細胞培養法
シュプリンガー・フェアラーク東京 (1997) p153-165
- 4 S. N. Kudoh, A. Matsuo, K. Kiyosue, M. Kasai and T. Taguchi:
Long-lasting enhancement of synaptic activity in dissociated cerebral
neurons induced by brief exposure to Mg²⁺-free conditions.
Neurosci Res 1997 Aug;28(4):337-344
- 5 T. Taguchi, K. Kiyosue, S. N. Kudoh:
Chick cerebral neurons; The neuron in tissue culture, IBRO hand
book series.
Wiley (London) (1997)
- 6 S. N. Kudoh, K. Kiyosue, M. Kasai and T. Taguchi:
Synaptic potentiation induced by a protein factor in cultured cerebral
neurons (submitted).
- 7 S. N. Kudoh, K. Kiyosue, M. Kasai and T. Taguchi:
Calphostin C-sensitive synaptic potentiation in cultured cerebral
neurons (submitted).

国際学会における発表

- 1 T.Taguchi, K.Kiyosue, S.Kudo, M.Kasai,:
Synaptogenesis and synaptic plasticity in dissociated chick cerebral neurons.
Society for Neuroscience 24th annual meeting (1994)
- 2 S.Kudoh, K.Kiyosue, M.Kasai, T.Taguchi:
Long-term enhancement of synchronous spontaneous post synaptic currents in dissociated chick cerebral culture.
The second joint meeting of the physiological societies of Japan and U.K. and EIRE OKAZAKI NAGOYA Symposium (1995)
- 3 S.Kudoh, K.Kiyosue, M.Kasai, T.Taguchi:
Long-term increase in synaptic activity of dissociated chick cerebral neurons induced by Mg^{2+} -free solution.
Forth IBRO World Congress of Neuroscience B3.48
- 4 S.Kudoh, K.Kiyosue, M.Kasai, T.Taguchi:
Synaptic plasticity in dissociated chick cerebral neurons induced by Mg^{2+} -free medium.
- 5 Society for Neuroscience 25th annual meeting (1995) 523.3
S.Kudoh, K.Kiyosue, M.Kasai, T.Taguchi:
Synaptogenesis and synaptic plasticity in dissociated chick cerebral neurons.
Society for Neuroscience 26th annual meeting (1996) 135.4
- 6 S.Kudoh, K.Kiyosue, M.Kasai, T.Taguchi:
Long-term potentiation induced by factor(s) released during the induction of the enhancement of SEPSCs.
Society for Neuroscience 27th annual meeting abstract (1997) 264.14

国内学会における発表

- 1 田口 隆久、工藤 卓、松尾 明、清末 和之、葛西 道生
培養神経細胞系におけるシナプス伝達効率の長期変化
第17回 日本神経科学大会 (1993) 名古屋
- 2 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
 Mg^{2+} -free 溶液により誘導される培養大脳神経細胞の長期増強現象
日本生物物理学会 第32回 年会 (1994) 横浜

- 3 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
Mg²⁺-free 溶液によって誘導される長期増強現象のメカニズム—ニワトリ胚大
脳解離培養系による解析—
日本生物物理学会 第33回 年会 (1995) 札幌
- 4 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
シナプス伝達効率の長期的増強—解離培養系による単一ニューロンの解
析
第19回 神経科学大会 (1996) 神戸
- 5 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
解離培養系における長期増強現象の解析
日本生物物理学会 第34回 年会 (1996) 筑波
- 6 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
自発性シナプス後電流増強に伴って放出される因子によるシナプス伝達の
長期的増強
第20回 神経科学大会 (1997) 仙台
- 7 工藤 卓、清末 和之、葛西 道生、田口 隆久
自発性シナプス後電流増強に伴う拡散因子による長期増強現象
日本生物物理学会 第35回 年会 (1997) 京都
- 8 田口 隆久、清末 和之、工藤 卓、葛西 道生
大脳神経細胞培養標本におけるシナプス形成と可塑性の解析
日本生理学会大会 第75回 (1998) 金沢