

3) シナプスタグ仮説の意義と問題点

さて、シナプスタグとは上記SやWのような刺激を受けたシナプスで活性化され、輸送されてきたタンパク質のシナプス機能を可能にする仮想的な生化学活性である。シナプスタグ仮説は二経路実験の連合性L-LTPをうまく説明したので広く認められており、現在では後期可塑性の成立には、

- ① 先行する初期可塑性を起こす刺激
- ② シナプスタグ活性化
- ③ 強い刺激で起こる新規遺伝子発現の誘導
- ④ 新規合成タンパク質のシナプス機能

の4つの基幹過程が必要であると考えられている(図2)。しかし、これについても未解決の問題は多い。たとえば、①の初期可塑性を起こす刺激はシナプスタグを活性化するために必要であるが、初期可塑性が起こること、

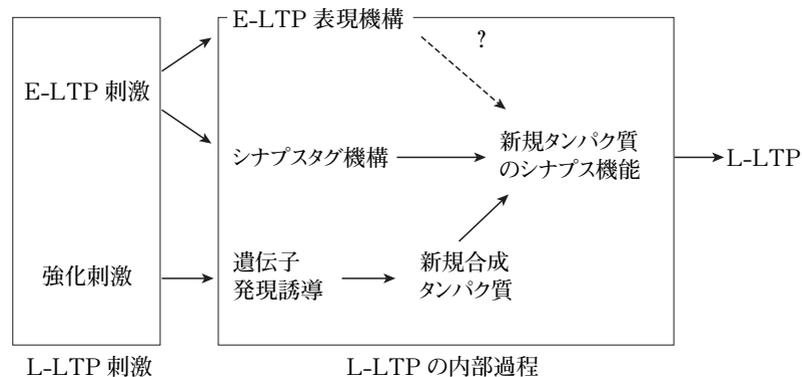


図2 L-LTPの内部過程

L-LTPおよび長期記憶成立には遺伝子発現誘導が必要である。L-LTP成立にはシナプスタグ機構が必要であると推定される。新規タンパク質のシナプス機能がL-LTPの表現機構であると想定できる。これらの少なくとも一部はE-LTP刺激や強化刺激に含まれるNMDA受容体活性が起点となって活性化する。したがって、E-LTPを起こす刺激はL-LTPを起こす刺激に内包されるが、E-LTPの表現機構がL-LTPに必要なかどうかは不明である。強化刺激にはドーパミンなどの伝達物質も関与する可能性がある。

すなわち初期可塑性に伴って起こるシナプスの再構築が新規合成タンパク質のシナプス機能に必要な舞台設定なのかどうかは不明である。③についてはcyclic AMP responsive element (CRE)の活性が重要であることがわかっているがそれ以上は未解決である。④についてはまったくわかっておらず、後期可塑性が新規合成タンパク質に依存するから、これらのタンパク質の機能が表現機構に直結すると思われているが、具体的なことはよくわかっていない。そして、本稿の主題である②シナプスタグについても、仮説自体には異議はないものの、この活性が実在するのか、具体的に何を実行するのか、ということもまったくわかっていなかったのである。

上記基幹過程がすべてそろってはじめて連合性後期可塑性が起こるということをも認めたでしょう。二経路実験で検出できるのは最終結果の連合性後期可塑性の有無であるが、複数の内部過程からなる現象の最終結果だけをみて内部過程のどれが阻害されているかを知ることは不可能である。したがって、連合性後期可塑性に必要な分子はNMDA受容体¹⁾、PKM ζ ⁷⁾、PKA⁸⁾、MAPK⁹⁾、CaMK II⁹⁾、neurosin¹⁰⁾などさまざまがあげられるが、シナプスタグ仮説の分子機構ははっきりとしたことがわかっていない。さらに、二経路実験から想定されるシナプスタグ仮説では、細胞体で合成された新規合成タンパク質は、あらかじめ目的地を知らずに輸送されているが、タグのついたシナプスでだけ機能できるという挙動を仮定している。この仮説に合致する挙動をするタンパク質例は知られておらず、このためシナプスタグは仮説にとどまっていた。

シナプスタグは、可塑性の分子機構研究にとっては懸案の後期可塑性の入力特異性問題の回答であるが、細胞生物学的には、シナプス部の機能的分子集合が神経入力によって構築される仕組みである。ハウスキーピングのための構成的発現は常に存在している。シナプスタグがかかわるのは入力依存的発現誘導で起こるタンパク質合成である。両者を単純にアニソマイシンの有無で区別することはできないので慎重な実験計画が必要である。

では、シナプスタグは記憶にとってどのような意義があるのだろうか。二経路実験で検出される連合性可塑性は行動レベルでは、強い刺激と弱い

刺激の連合により、通常長くは記憶されない経験内容が長く覚え続けられること、すなわち、連合性長期記憶に相当すると思われる。例をあげれば、筆者は東日本大震災の日に昼食に食べた「定食の付け合せ」まで覚えている、といったことである。したがって、シナプスタグは持続的に覚え続ける記憶内容を選択する仕組みであるといえる。シナプスタグの仕組みを解明することは、経験時の記憶を長く覚え続けるための仕組みの解明である。さらに、シナプスタグがはたらいた入力どうしが強く相互作用して連合が起ることになるから、記憶の連合の仕組みの解明にもつながると考えられる。

2. シナプスタグ仮説の実証

1) 作業仮説

シナプスタグ仮説が独特の輸送挙動を前提としていることから、シナプスタグが具体的に何をするのかを考える際に輸送系に注目した。樹状突起内の小胞輸送系は微小管・キネシン系が幹線であるが、興奮性シナプスを擁するスパイン内にはこの輸送系はなく、Fアクチン・ミオシンV系が輸送を請け負っている。したがって、輸送物資がスパインに入るには輸送系の乗り換えが必要になる。細胞体で合成された可塑性関連シナプスタグタンパク質はスパインのなかにはいって初めて機能できるので、輸送系の乗り換えなどスパインへの輸送がシナプス入力で制御されれば、この制御がシナプスタグといえる¹¹⁾。このような制御活性が検出されれば、それがシナプスタグの既知の性質を持つかどうかを調べることでシナプスタグとは具体的に何を執行するものなのかを解明できると考えた。

スパインという限局した部位への輸送活性は、蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いれば容易に計測が可能である。細胞体で新規合成され、後期可塑性にかかわるタンパク質が、シナプスタグ機構によってスパインに輸送されれば、シナプスタグ仮説に合致する挙動を観察することができるだろう。そのような例証ができるタンパク質がわかればシナプスタグは仮説ではなく機構として実在すると主張できる。

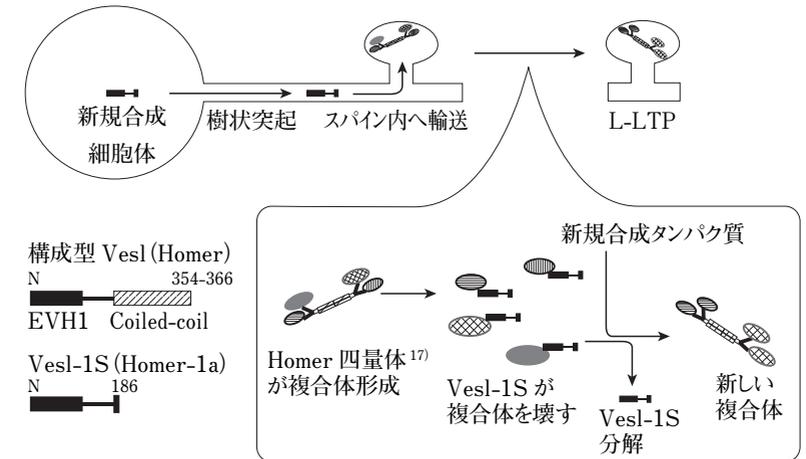


図3 Vesl-1Sタンパク質がL-LTP成立時にはたと推定される機能

構成型Vesl (Homer) タンパク質は、N末のEVH1ドメインなどでmGluR1/5やIP3受容体などの標的タンパク質と結合し、C末のcoiled coilドメインで並行する4量体を形成することにより、複数の標的タンパク質を複合体として連結する機能を持つ。Vesl-1Sタンパク質はC末を欠くので標的タンパク質を複合体から奪って解離させる dominant negative としてはたらくと考えられる。この作用により、L-LTPに伴い新規合成されたタンパク質を含む複合体が再構成され、シナプス後部が再構築されると考えられる。

Homer-1a (Vesl-1S) は後期可塑性で発現誘導される最初期遺伝子産物で、細胞体で翻訳が完了し、mRNAは樹状突起には見いだされない¹²⁾。このタンパク質の構成型アイソフォームHomer-1c (Vesl-1L) はC末の自己会合ドメインにより会合し、N末でmGluR1/5やIP3受容体などと結合するため、シナプス後部の足場タンパク質としてこれらのシグナル伝達構成因子を互いに近傍に局在させる役割をはたす。Vesl-1SはC末ドメインを欠き自己会合しないため、シグナル伝達複合体のドミナントネガティブとしてはたらく。Vesl-1Sは後期可塑性においてシナプス後部にあるVesl-1L複合体を壊すことで、シナプス後部の再構築を可能にする(図3)¹³⁾。実際、Vesl-1S選択的欠損マウスでは長期記憶に欠陥がある¹⁴⁾。そこで、我々は

Vesl-1S・EGFP融合タンパク質（VEと略）をラット海馬分散初代培養神経細胞に発現させ、シナプスタグ仮説を検証した。VEプラスミドにはVesl-1遺伝子のプロモータ部分を用いたので適正な量での発現とcyclic AMP responsive element（CRE）依存的誘導が可能である。

2) 実験結果

培養神経細胞にDIV7近辺でVEプラスミドをリポフェクションにより導入し、スパインが成熟するDIV15-21で蛍光を観察した。高密度分散培養系では神経細胞どうしがランダムにシナプスをつくり、自発発火による活動がみられる。このため、VEタンパク質も実験前から十分に発現しており、蛍光は小さなスパイン内まで均一にみえる。一方でこの自発発火を利用すれば、細胞外液をMg²⁺イオンを含まないものに替えるだけでシナプス部のNMDA受容体のみを活性化することが可能である。この刺激を10分間与えることで、その後4時間かけてスパイン内のVE蛍光強度が増加することがわかった（図4A）。この蛍光増加はスパインのサイズ変化を伴わないので形態学的可塑性は起こっていない。また、タンパク質の分解や合成の影響を受けず、EGFPだけの場合はスパイン進入は刺激に依存して起こらなかった。これらのことから、Vesl-1Sタンパク質が樹状突起からスパインに進入したと結論された。

樹状突起内のVE蛍光強度はforskolinでVE発現を誘導すると増加するが、スパイン内の蛍光には変化がなく、これを増やすにはシナプス部NMDA受容体活性化が必要であった（図4B）。このことから、Vesl-1Sタンパク質の樹状突起部からスパイン内への輸送はシナプス活動で制御されると結論した。

では、この輸送活性は入力特異的だろうか。これを知るために、微小灌流法を開発し、限定した領域のスパインだけを刺激した。スパインへのVE蛍光進入はNMDA受容体刺激を行った領域のスパインでのみ起こった（図4C）。スパインへのVE進入はNMDA受容体の非可逆的ブロッカーMK501存在下では起こらなかった。MK501を局所微小灌流で与えた後、細胞外液

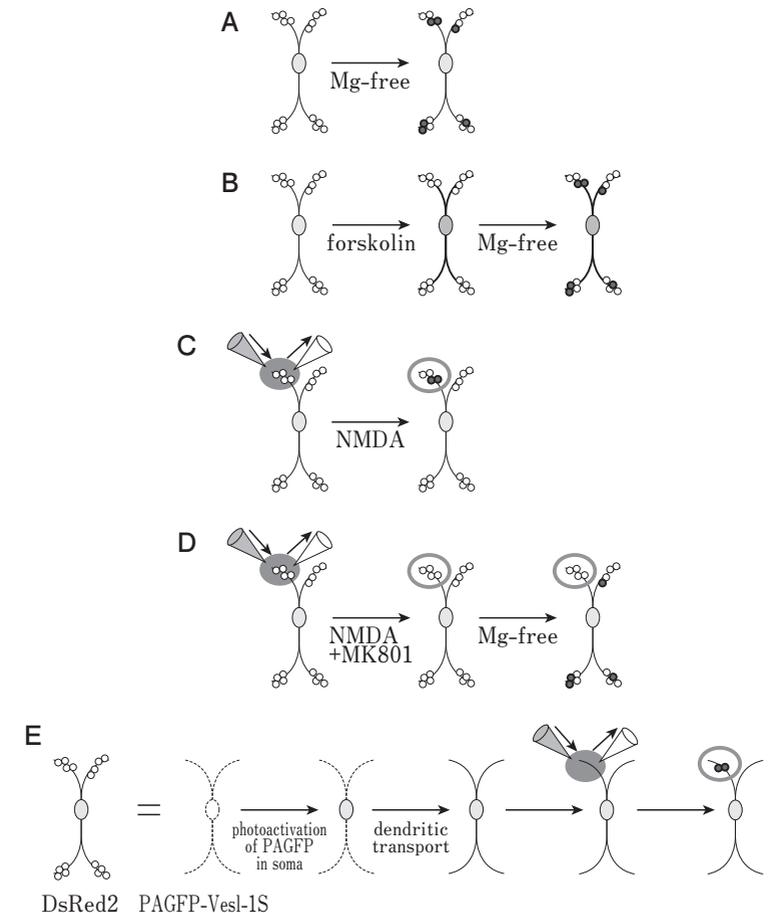


図4 我々の実験の方法と結果を示す模式図

神経細胞の細胞体（楕円）、樹状突起（曲線）とスパイン（小円）を模式的に示す。樹状突起の太さは発現・輸送されるVEまたはPVA量を表す。白スパインは内部のVEまたはPAV蛍光強度が弱く、黒スパインでは強いことを示す。詳細は本文参照。

C～E：微小灌流を受ける領域を灰色の楕円で示す。

E：最初はPAVが蛍光を持たないのでDsRed2蛍光で細胞の位置と構造を確認する。細胞体に400 nmのレーザー光を照射すると、はじめは細胞体のみPAV蛍光がみられるが、次第に樹状突起全体に広がっていく。微小灌流による刺激部位内のスパインにのみPVAがはいる。

の Mg^{2+} イオンを抜くと、微小灌流領域以外ではNMDA受容体が活性化するのでVE蛍光進入がみられたが、領域内には影響せず蛍光進入はみられなかった(図4D)。これらの結果から、VEのスパイン進入はNMDA受容体に依存して入力特異的に活性化されることがわかった。

この活性は細胞体で合成されたVEをスパインに取り込むのだろうか、それとも近くにたまたまいたVEを取り込んだのだろうか。VEのかわりにPAGFP融合Ves1-1S(PAV)をDsRed2と共発現させ、細胞体全域に400nmのレーザー光を照射してPAGFPを活性化した。現れた緑蛍光は、はじめは細胞体に限局されているが、約90分ですべての樹状突起に広がったがスパインにははいらなかった。ここで局所微小灌流により刺激を与えると、PAV蛍光は刺激領域内のスパインにのみ進入した(図4E)。細胞体からスパインへのVes1-1Sタンパク質の輸送がこの活性で制御されていることがわかった。

コルヒチンにより樹状突起の微小管を壊すとPVAはシナプスNMDA受容体刺激をしてもスパインにははいらなかった。また、mGluR1/5に結合できないVes1-1Sの変異体ではNMDA受容体刺激でスパイン進入は起こらなかった。Ves1-1Sタンパク質はmGluR1/5を含む小胞に結合して樹状突起を運ばれ、この小胞を認識する分子の介在によりスパインに取り込まれると考えられる。

VEタンパク質のスパイン進入のシグナル伝達経路を解析したところ、シナプス後部ではNMDA受容体下流に一酸化窒素、グアニル酸シクラーゼを経てプロテインキナーゼG(PKG)がかかわることがわかった。Mgを含まない細胞外液のかわりにPKG活性化薬である8-bromo cGMP(BrcG)を用いて刺激するとVEのスパイン進入が起こった(図5A)。BrcG刺激は $1\mu M$ テトロドトキシン(TTX)存在下ではVE進入を起こせなかったが、TTXを洗い流すと徐々に回復することがわかった(図5B)。これはBrcGにより活性化されるシナプス後部シグナルとは別に、シナプス前性の活動に依存したシグナルが共役する必要があることを示唆した。この知見を利用して、シナプス後部活性の寿命を測定したところ約3時間であった。すなわち、

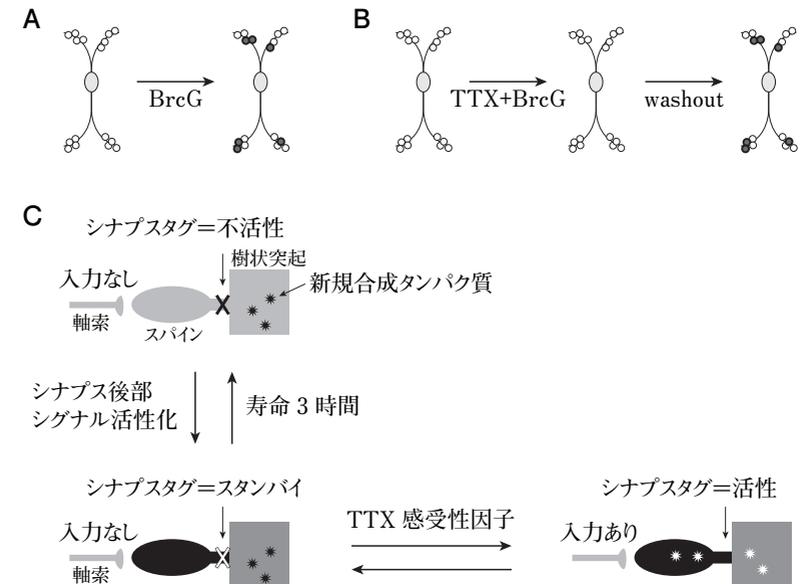


図5

A, B: 我々の実験の方法と結果を示す概念図 図4を参照。

C: シナプスタグ機構のシナプス前後シグナルの共同作用。入力のない状態では樹状突起からスパイン内への新規合成タンパク質の輸送は行われぬ。シナプス後部シグナルの活性化でシナプスタグがスタンバイ状態になり3時間程度持続する。このあいだにシナプス前部活動に依存するTTX感受性因子が作用すると、その都度シナプスタグ活性が樹状突起からスパインへ新規合成タンパク質を輸送する。

PKGの下流にあるシグナル系は約3時間の間活性を保ちVEの取り込み活性はスタンバイ状態になるが、これだけでは新規合成タンパク質はスパインには入れない。このあいだにシナプス前性のTTX感受性因子が作用すればその都度VEタンパク質をスパイン内に引き込むと考えられる(図5C)。海馬切片を用いた二経路実験でシナプスタグの寿命は2時間前後といわれていたが、試料・測定対象や温度の違いを考えるとほぼ同程度の寿命だと思われる。

こうして、VEタンパク質のスパイン進入活性は、①初期可塑性を起こす刺激のひとつであるNMDA受容体活性化で活性化され、②タンパク質合成