

遺伝子ツールとして脳のはたらきを知る

小島 正己

■研究のねらい

脳の分子生物学的研究から「脳機能」の基盤となる多くの遺伝子が単離され、神経細胞、神経回路、個体レベルで、遺伝子機能と脳機能の関係が少しずつ理解されてきた。しかし、脳の生理学的研究からは、脳は特定領域をつかって特徴的な情報表現を行うことが示されている。課題名にある「遺伝子ツールとして」とは、このような脳内表現の中での遺伝子の機能の実際を理解したいということの意味している。もう少し具体的にいうと、脳の特徴的な情報表現を遺伝子発現や遺伝子産物のリアルタイムなダイナミクスによって表現すること、脳領域特異的な遺伝子発現系を構築することを、本研究では目指したい。

■研究成果

研究1 「クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 GFP を用いて、成熟神経細胞のシナプス構造や特定蛋白質の動態をリアルタイムに観察する。」

クラゲ由来の緑色蛍光蛋白質 Green Fluorescent Protein (GFP) は、生きた細胞の遺伝的レポーターになりうる有効な分子である。GFP の特徴はその蛋白質自体が蛍光を発することなので、我々が興味を持っている蛋白質を GFP に結合させることによって、その蛋白質の動態をリアルタイムに観察できる。図1では、3種類の GFP 遺伝子を海馬神経細胞に導入し、3週間以上培養している。単独の GFP を導入した場合は(図1A)、成熟した神経細胞全体の形態が可視化される。骨格蛋白質の一つである β -actin と GFP の融合蛋白質を発現させた場合は、「スパイン」というシナプス可塑性の基本骨格(図1Bの矢印)が可視化される。脳の重要な分泌性蛋白質である BDNF と GFP の融合蛋白質を導入した場合は(図1C)、BDNF-GFP が細胞表面上で粒状のクラスターをつくる。このような自由自在な遺伝子導入は、次に述べる新しい遺伝子導入法「サスペンション法」によって行った。

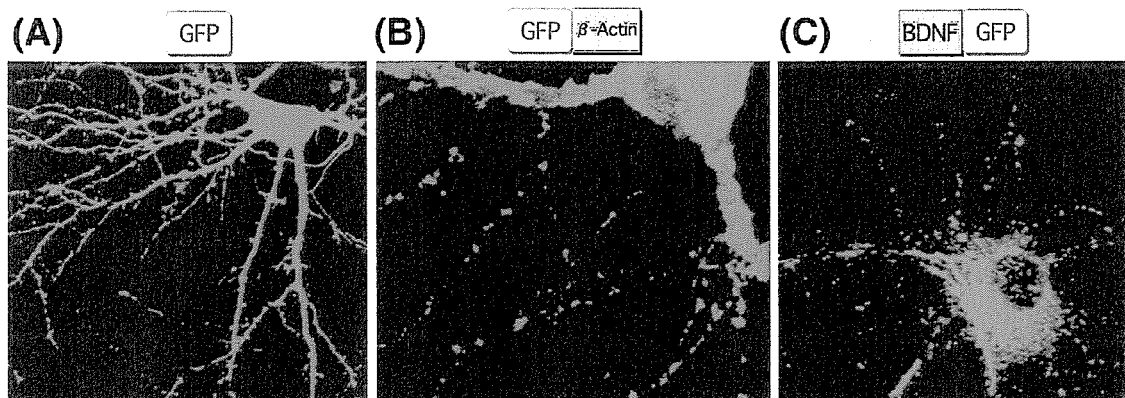


図1 結合させた蛋白質が変わると緑色蛍光蛋白質 GFP の局在もかわる。 β -actin-GFP (矢印) は、スパイン(グルタミン酸受容体をはじめとしたシナプス機能蛋白質が集まる重要な微細構造)を可視化させる。

研究2 「調整段階をねらった神経細胞への新しい遺伝子導入法：サスペンション法」

神経細胞への遺伝子導入は、神経細胞への化学的・物理的ショックのために難しい実験と云われてきた。しかし、神経細胞の調整段階に注目するとこのような問題が解決できることがわかった。

培養神経細胞は、切り出した脳の特定領域（例えば、海馬）のパパイン等による酵素処理とピペットチップを用いた懸濁によって調整できる（図2）。この時の神経細胞を観察すると、調整直後は神経突起を失った球状細胞（図2A）になっているが、培養翌日には神経細胞の形状（図2B）に回復していることがわかる。つまり、調整時の神経細胞は、著しい再生能力をもっているように思われた。私は、この再生能力の高い段階をねらって遺伝子導入をおこなえば、ダメージを少なく遺伝子導入できるのではないかと考えた。ここでは実験条件の記述は省略するが、この原理に基づいた遺伝子導入法を「サスペンション法」と名付けた。サスペンション法の特色をまとめると、

(1) ウイルス法、リン酸カルシウム法といった従来法に比べて、毒性がなく簡便に遺伝子導入ができる。そのため、遺伝子導入後の長期にわたる実験が可能になる。(2) 培養可能なあらゆる領域の脳神経細胞に遺伝子導入ができる。(3) 「簡便さ」ゆえに、調べたい遺伝子数が多くても苦勞が少ない。例えば、脳特異的遺伝子の検索のようなスクリーニング的研究に応用できる。

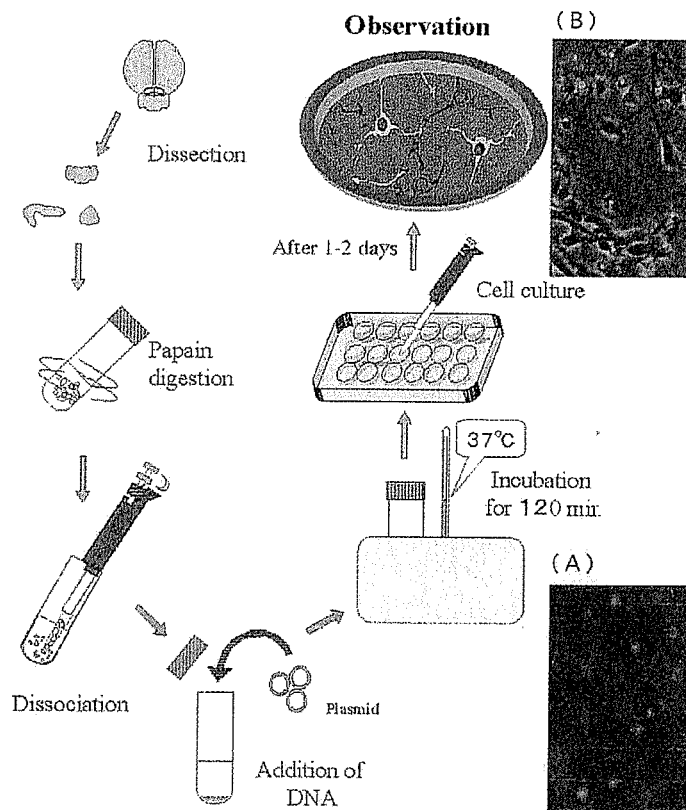


図2 サスペンション法の原理 Dissociation の直後には (A) のように神経細胞は突起を失っているが、翌日には (After 1-2days)、神経細胞の形状に回復している。サスペンション法は (A) の状態をねらって遺伝子導入を行う。

研究3 「可塑性調節因子としての BDNF は、シナプスの近傍に局在し、神経活動依存的に局所的に放出される。」

脳には多種多様な遺伝子産物が存在し、脳の機能発現を支えている。脳の分泌性蛋白質の一つである BDNF（脳由来神経栄養因子）は、発達期の神経細胞には生存維持・分化促進作用を行うが、成熟した神経細胞には神経活動依存的にシナプス機能の亢進を行うと云われている。つまり、脳の発達に応じて BDNF の生理機能は変わっていくわけで、一生を通じて BDNF 分子はうまく使い回わされていることになる。

私は、シナプス機能の亢進に関わるような BDNF の発現様式を知るために、GFP をつないだ BDNF 遺伝子 (BDNF-GFP) を作成し（ここでは省略するが BDNF-GFP は BDNF と同様の生物活性を示した。）、海馬神経細胞に「サスペンション法」で導入した。図3Aのように、BDNF-GFP は、幼弱細胞では細かい顆粒になって細胞全体に分布するが、成熟細胞では神経突起上に大きなクラスターを形成することがわかった。さらに、二重染色の実験によって、BDNF-GFP のクラスターは、ポストシナプスのマーカーである PSD-95 の分布によく一致することがわかった（図3B）。つまり、成熟海馬神経細胞において BDNF は、シナプスの近傍に局在することが示唆された。

次に、シナプス近傍に局在した BDNF-GFP の神経活動に伴う動態を高時間分解能の共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。図4の神経細胞では、「スパイン (Spine)」という微細構造に BDNF-GFP が局在しており、100 μ M のグルタミン酸を投与すると、BDNF-GFP はすみやかにその蛍光を減少した（図4右）。つまり、スパインに濃縮された BDNF 分子が神経活動依存的に局所的に放出されることがわかった。（図4左）。

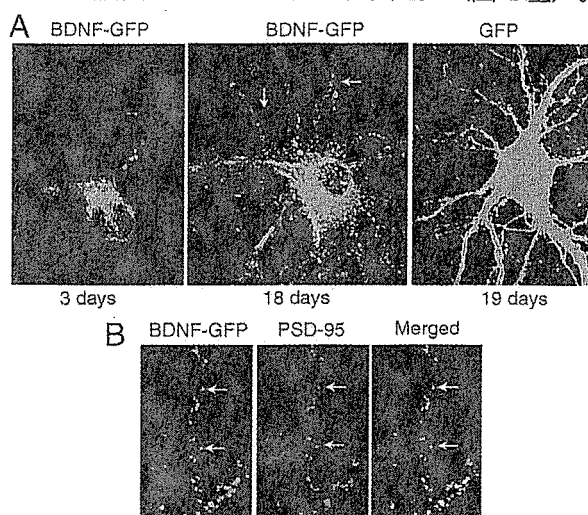


図3 GFPをつないだ BDNF (BDNF-GFP) を導入した海馬神経細胞 (A) BDNF-GFP は、未成熟期 (3days) では細かい顆粒状に神経突起に分布するが、成熟すると (18days)、はっきりとしたクラスター (矢印) を形成する。コントロールの GFP は細胞全体に均一に分布する。(B) BDNF-GFP クラスターはポストシナプスマーカー PSD-95 の染色シグナルに一致した (Merged では黄色のシグナル)。矢印はスパイン構造に局在したシグナルである。

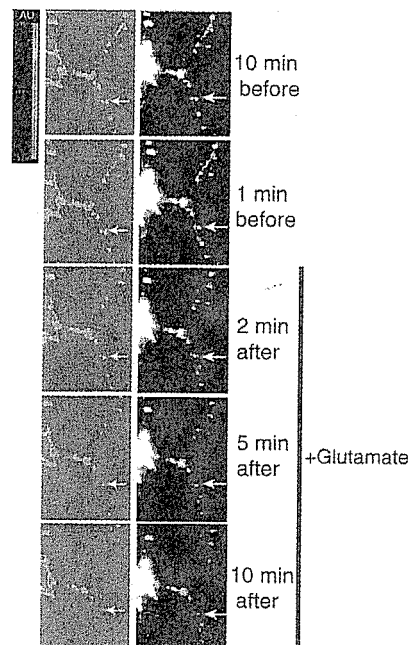


図4 グルタミン酸刺激を与えるとスパイン様構造 (矢印) に濃縮されていた BDNF-GFP のシグナルはすみやかに減少していく。左側は右側の疑似カラーイメージである。

研究4 「BDNF 分子のもう一つの動態：神経活動をきっかけにつくられる BDNF プール」

BDNF-GFP をツールとすることで、BDNF 分子のもう一つの動態が観察できた (図5)。BDNF-GFP を導入した海馬神経細胞にグルタミン酸刺激を与えると、BDNF-GFP の放出現象に続いて (図5の1~3の星印)、 dendライトのところどころに BDNF-GFP が濃縮されていった (図5の3~5の矢印)。しかも、一旦プールされた BDNF-GFP は、2回目の活動によって、1回目と同様に放出されることがわかった (図5の5~6)。

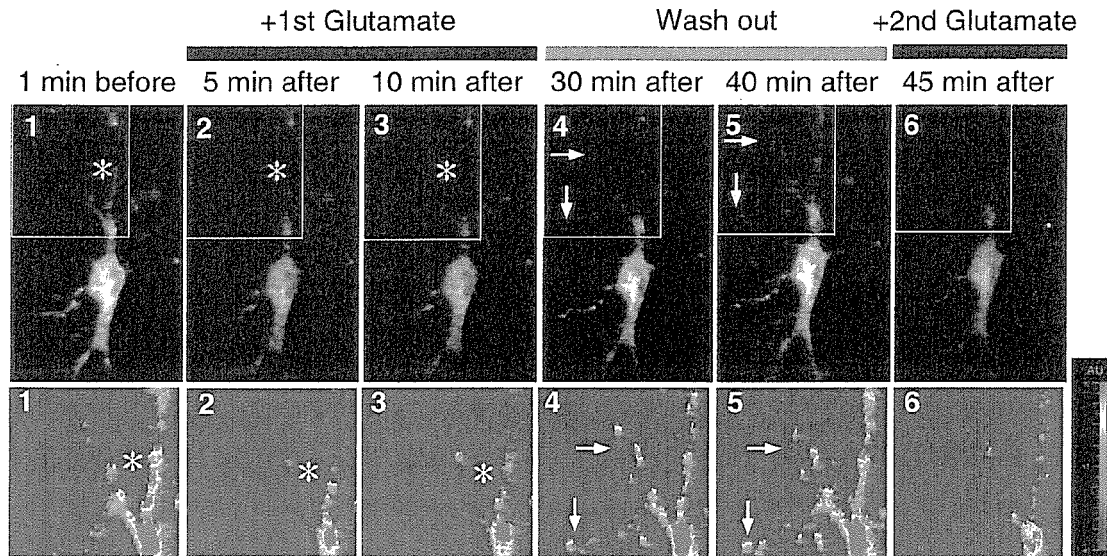


図5 BDNF-GFP のシグナルは、放出 (1-3 の星印) に続いて、 dendライトの所々に新たなクラスターとして蓄積されてくる (3-5 の矢印)。これらのシグナルは 2 回目の刺激によって再放出される。下図は、上の共焦点イメージの囲み部分に疑似カラー図である。

「Pooled BDNF 仮説」

図6では、研究3、4の結果をまとめた。神経活動が起こると、シナプス近傍に局在し BDNF-GFP は速やかに放出され、BDNF がシナプス機能の亢進に積極的に参加している可能性が示唆された。もう一つの重要なダイナミクスは、BDNF-GFP が神経活動依存的に dendライト上にプールされるというものであった。可塑性調節因子としての BDNF は、活動依存的に新たに合成され、放出されることがこれまでの生化学的研究から知られていたが、BDNF-GFP を用いた本研究は、BDNF 分子は活動依存的に dendライトにプールされる可能性を新しく示すことができた。今後は、この「Pooled BDNF」が特定シナプスの機能の亢進や神経回路レベルのリモデリングに関与する可能性を調べていきたい。

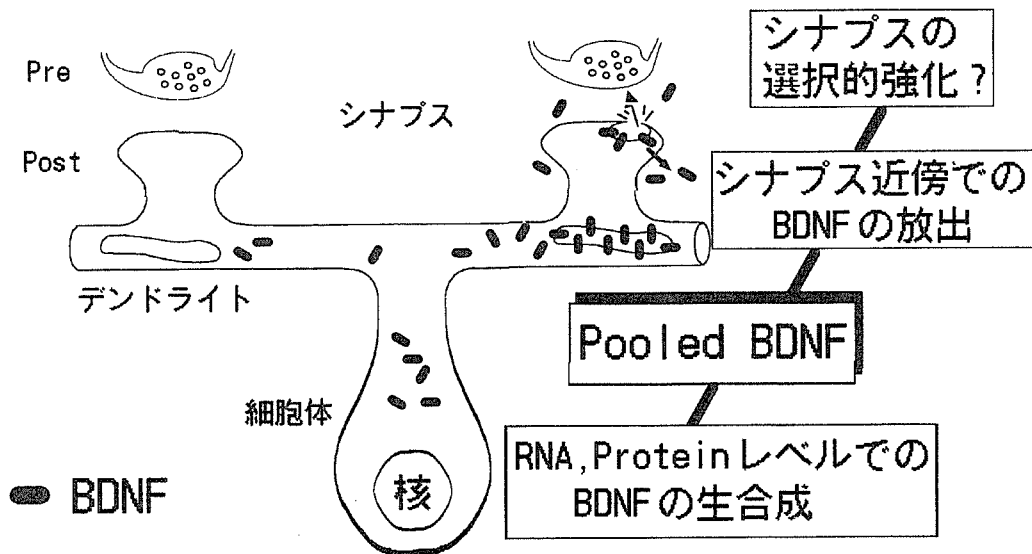


図6 Pooled BDNF は、情報のプールか？ 神経活動依存的に起こる BDNF イベントを四角で囲んだ。これまでの生化学的研究から、可塑性調節因子 BDNF は活動依存的に合成されることが知られていた。本研究から、その放出はシナプス近傍で起こることがわかった。加えて、デンドライトの特定場所に放出に備えてプールされている BDNF を見出した。そこで、Pooled BDNF に近いシナプスはより選択的に強化されるのではないかと想定し、今後この Pooled BDNF の構造と機能を明らかにしていきたい。また、各イベントの関係を明らかにすることもこれから重要である。

研究5 「サスペンション法の遺伝子スクリーニングへの応用；海馬特異的遺伝子発現カセットの単離に向けての研究」

「サスペンション法」の簡便さを利用した、遺伝子スクリーニング系の確立を準備している。最初に、すでに報告されている BDNF プロモーターを用いたコントロール実験を行った。BDNF プロモーターは4種類あることが知られているがサスペンション法で導入したプロモーターが報告通りの活性を示した。また、共同研究であるが、神経細胞死関連遺伝子を導入することによって、その細胞死を特異的に誘導する系の確立に成功している。さらに、本研究計画に提案した海馬特異的遺伝子発現カセットの単離に向けて（図7）、海馬特異的に発現したマーカー遺伝子 lacZ の周辺約 140kb の遺伝子の単離とその遺伝子の数 kb レベルへの断片化を進め、マーカー遺伝子 GFP を各断片につないだ。この遺伝子プールの中から海馬特異的遺伝子発現カセットになりうる遺伝子断片を単離すべく、現在サスペンション法を用いたスクリーニングを進めている。また、海馬特異的遺伝子発現に必要な配列の有無を確認するために、先に単離した 140kb 全体を導入したトランスジェニックマウスの試作もすすめている。

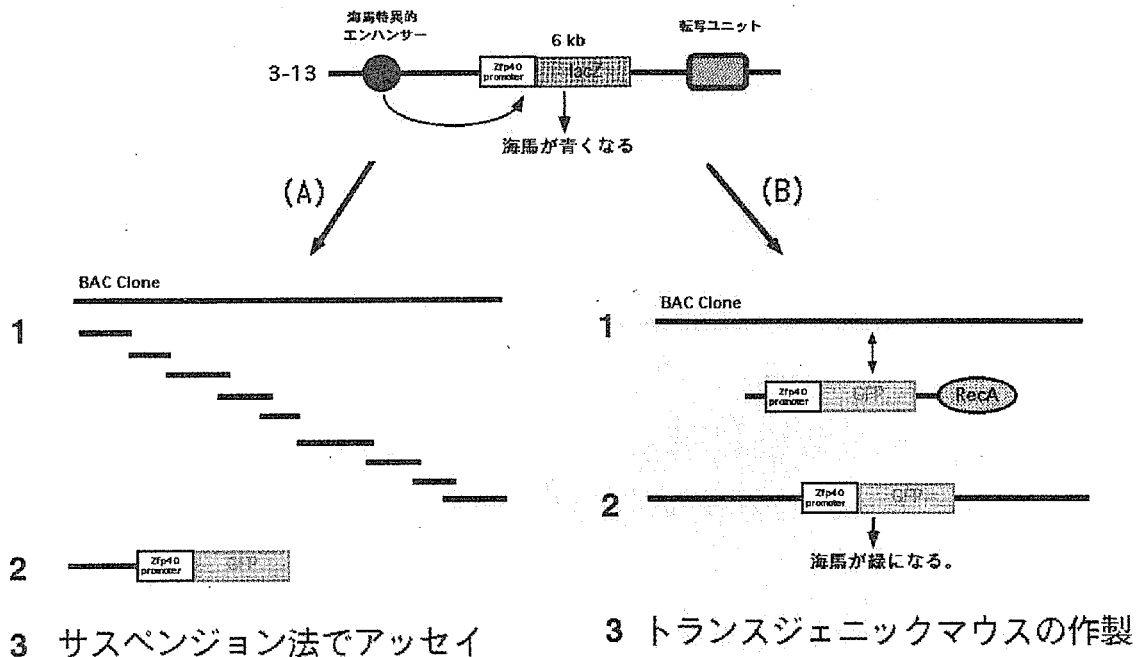


図7 (A) 海馬特異的遺伝子発現カセットを含む可能性のある140kbのBAC genomic cloneを断片化しマーカー遺伝子につなぐ(1-2)。サスペンション法で各コンストラクトを海馬、小脳の神経細胞に導入しアッセイを行う(3)。(B) 同時に、BAC genomic cloneに対してGFPマーカー遺伝子を相同組み替え法で導入したクローン(1-2)を用いて(方法は既報による。)トランスジェニックマウスを作成し(3)、海馬特異的遺伝子発現領域の有無を確認している。

■今後の展開

分子レベルでの知の解読に有効な遺伝子ツールを見だし、その遺伝子導入を試みてきた。BDNF-GFPは、可塑性調節因子としてのBDNFのダイナミクスを可視化できる有効なツールであることがわかった。そこで、神経回路、個体といったより大きな時空間レベルでの解析に向けてこのツールの改変を予定している。「サスペンション法」という新たな遺伝子導入法については、細胞レベルでの遺伝子産物の解析系から、脳領域特異的な遺伝子やプロモーターなどの1stスクリーニングといったより汎用性のある実験系に改変していきたい。この3年間で得られた成果を基礎にして、これからも分子レベルでの知の解読を進めていきたい。

■成果リスト

(論文)

・Kojima M. and Suzuki S. (1999) A brief method for gene transfer: Suspension method. Brain Sci. in press.

- Kojima M, Takei N, Numakawa T, Ishikawa Y, Suzuki S, Matsumoto T, Katoh-Semba R, Nawa, Hatanaka H. (1999) Dendritic clustering and activity-dependent dynamics of GFP-tagged BDNF in living hippocampal neurons. Submitted.
- Kojima M, Suzuki S, Numakawa T, Ishikawa Y, Hatanaka H, (1999) A novel and applicable method for gene transfection into cultured CNS neurons. submitted.
- Kojima M, Noce T, Saito F, Yokoyama M, Shibata H, Hayasizaki Y, Inokuchi K, (1997) An enhancer-trap mice (HXZ3-13) that expresses a reporter gene specifically in hippocampus. in preparation.

(口頭発表)

- Kojima M, Noce T, Saito F, Yokoyama M, Shibata H, Hayasizaki Y, Inokuchi K, (1997) Genomic analysis of enhancer-trap mice (HXZ3-13) that express a reporter gene specifically in hippocampal neurons. 第20回日本神経科学大会
- Kojima M, Noce T, Saito F, Yokoyama M, Shibata H, Hayasizaki Y, Inokuchi K, (1997) Genomic analysis of enhancer-trap mice that express a reporter gene specifically in hippocampal neurons. EMBO Conference, Mouse molecular genetics.
- Kojima M, Matsui K, Inokuchi K, (1997) Genomic analysis of enhancer-trap mice that express a reporter gene specifically in hippocampus. 6th Conference on the Neurobiology of learning and memory.
- Kojima M, Noce T, Saito F, Yokoyama M, Shibata H, Hayasizaki Y, Inokuchi K, (1997) Enhancer-trap mouse line that expresses a reporter gene specifically in hippocampus. Society for Neuroscience Annual Meeting.
- Kojima M, Matsui K, Inokuchi K, (1998) Hippocampus-specific enhancer trap mouse line (HXZ3-13) showed the disrupted expression of a transcriptional unit (C1-5). Keystone symposia.
- Kojima M, (1999) Neurotrophins and neural plasticity. Seminar of Recent Developments in neural network.
- Kojima M, Numakawa T, Suzuki S, Matsumoto, Yamada M, Hatanaka H, (1999) A novel method for gene transfection into CNS neurons. 第22回日本神経科学大会
- Kojima M, Numakawa T, Matsumoto T, Suzuki S, Hatanaka H, (1999) Subcellular localization and regulated disappearance of GFP-tagged BDNF in hippocampal neurons. Society for Neuroscience Annual Meeting.