

there was no difference between groups in the ACC activation in response to a happy face. These results also suggest that "decoupling" occurs in relation to negative emotion but not to positive emotion. If so, when brain activations differ between HDA and LDA subjects during happy imagery, subjective ratings should also differ between HDA and LDA subjects. In this study, however, no significant differences were found in subjective ratings of intensity of emotion during the happy imagery conditions. This might have been influenced by the difference in effect size between brain activation and subjective rating. Neuroimaging is a much more powerful tool than traditional behavior methods for detecting subtle relationships between two variables (Canli and Amin 2002). In fact, in spite of the small sample size, subjective ratings of the intensity of emotion tended to be higher in the LDA group than in the HDA for PH and FH, although not significantly.

On the other hand, to our surprise, there was no significant difference in the activation of the ACC/MPFC region between the groups for which we had an a priori hypothesis. The small sample size may explain the absence of such a difference. In fact, a qualitative comparison of brain activation by the one-sample t-test suggested that the LDA group had significantly greater activity than the HDA in the ACC/MPFC region during PS imagery. Second, if the subjects with HDA had poorer imaginal capacity than those with LDA, the activation of this area during the control condition, that is REST condition (during which free recall could occur) and the neutral imagery condition, could be greater in the LDA group. In fact, ACC activation in the LDA group was significantly greater in PN than in REST in this study, while no ACC activation was found in the HDA group during PN. Furthermore, the brain activity detected by the one-sample t-test was poorer than it was in George et al (1995), which showed bilateral limbic and paralimbic activation including that of the ACC/MPFC. We considered that factors such as the shorter time interval among tasks, which may have resulted in mutual influence, or the shorter duration of imagery generation in this study than in the PET study of George et al (1995), may have influenced these differences in results between the two studies. Next, no difference between the groups was observed in the limbic structure (i.e., the amygdala, the hippocampal formation, and the hypothalamus), which plays a central role in emotional responses to simple perceptual aspects of stimuli. This finding is consistent with previous studies that found that the limbic area is not associated with alexithymia (Berthoz et al 2002, Kano et al 2003). Furthermore, no difference between the groups was observed in the insular cortex or in the orbitofrontal cortex; these cortices have been discussed in numerous neuroimaging studies about emotional recall/imagery (Phan et al 2002) and general emotional processing (Bechara et al 2000), respectively. This absence of activity may be attributable to the imaging method used. While activation of these regions has been reported mainly in PET studies, it is known to be difficult to detect the activation of these areas by fMRI for susceptibility artifact (Ojemann et al 1997). Thus, our study can't conclude that there is no relationship between emotional imagery disturbance related to alexithymia and these important brain regions, except for the PCC. Further studies considering these points are needed.

There are some limitations to this study. First, because of the small sample size, we may have failed to identify activation differences between HDA and LDA in other imagery conditions. Second, the sensory modalities of imagery (auditory, olfactory, etc.) involved in each event, in addition to visual sensation, differed not only between subjects but within each subject. This may have been a confounding factor. However, it is difficult to control these factors because autobiographical memory is usually multi-modal, and because imagery, in which sensory modality is restricted, is different from daily experiences, especially emotional ones. Third, the subjects' retrospective ratings of their imagery and intensity of emotion may have been inaccurate, especially if the subjects with HDA had trouble with episodic memory. Finally, some subjects may have been unable to refrain from imagery and emotion or other cognitive activity during the rest periods. The level of each subject's cognitive activity during these rest periods may also be a confounding factor. Further studies considering these points are needed.

In conclusion, the present study revealed that the reduced activation of PCC in subjects with HDA was associated with the disturbance of FH imagery. The disturbance of FH imagery can reduce motivation and hope, and it may be an important factor in the construction of deficits in the emotional regulation of alexithymia. We suggest that PCC may play a crucial role in alexithymia-related imagery disturbance. Although this study has several limitations, the present results are meaningful as the first report to demonstrate neural correlates of imagery disturbance in alexithymia.

This study was supported by the Research on Psychiatric and Neurological Diseases and Mental Health program of the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. We are grateful to Kazutaka Ueda Ph.D. and Shuji Asahi M.D., Ph.D. for their contributions to the project.

References

- Allen G, Buxton RB, Wong EC, Courchesne E (1997): Attentional activation of the cerebellum independent of motor involvement. *Science* 275:1940-1943.
- Andreassen NC, O'Leary DS, Cizadlo T, Arndt S, Rezaei K, Watkins GL, et al. 1995: Remembering the past: Two facets of episodic memory explored with positron emission tomography. *Am J Psychiatry* 152:1576-1585.
- Bagby RM, Parker JDA, Taylor GJ 1994a: The twenty-item toronto alexithymia scale-I. Item selection and cross validation of the factor structure. *J Psychosom Res* 38:23-32.
- Bagby RM, Taylor GJ, Parker JDA 1994b: The twenty-item toronto alexithymia scale-II. Convergent, discriminant, and concurrent validity. *J Psychosom Res* 38:33-40.
- Bechara A, Damasio H, Damasio AR (2000): Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10:295-307.
- Bentovoglio M, Kultas-Ikinsky K, Ilinsky I (1993): Limbic thalamus: structure, intrinsic organization, and connections. In: Vogt BA, Gabriel M editors, *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*, Cambridge: Birkhäuser, pp71-122.
- Berthoz S, Artiges E, Van De Moortele PF, Poline JB, Rouquette S,

- Consoli SM, Martinot JL (2002): Effect of impaired recognition and expression of emotions on frontocingulate cortices: an fMRI study of men with alexithymia. *Am J Psychiatry* 159:961-967.
- Cabeza R, Nyberg L (2000): Imaging cognition II: An empirical review of 275 PET and fMRI studies. *J Cogn Neurosci* 12:1-47.
- Canli T, Amin Z (2002): Neuroimaging of emotion and personality: scientific evidence and ethical considerations. *Brain Cogn* 50:414-31.
- Chen W, Kato T, Zhu X-H, Ogawa S, Tank DW, Ugurbil K (1998): Human primary visual cortex and lateral geniculate nucleus activation during visual imagery. *Neuroreport* 9:3669-3674.
- Conway MA, Turk DJ, Miller SL, Logan J, Nebes RD, Meltzer CC, Becker JT (1999): A positron emission tomography (PET) study of autobiographical memory retrieval. *Memory* 7:679-702.
- Cox BJ, Kuch K, Parker JDA, Shulman ID, Evans RJ (1994): Alexithymia in somatoform disorder patients with chronic pain. *J Psychosom Res* 38:523-527.
- Elliot R, Friston KJ, Dolan RJ (2000): Dissociable neural responses in human reward systems. *Journal of Neuroscience* 20:6159-6165.
- Frankel FH, Apfel-Savitz R, Nemiah JC, Sifneos PE (1977): The relationship between hypnotizability and alexithymia. *Psychotherapy and Psychosomatics* 28:172-178.
- Friedlander L, Lumley M A, Farchione T, Doyal G (1997): Testing the alexithymia hypothesis: physiological and subjective response during relaxation and stress. *J Nerv Ment Dis* 185:233-239.
- Friston KJ (1997): Testing for anatomically specified regional effects. *Hum Brain Mapp* 5:133-136.
- Friston KJ, Holmes AP, Worsley KJ (1999): How many subjects constitute a study? *Neuroimage* 10:1-5.
- Fukunishi I, Nakagawa T, Nakamura H, Kikuchi M, Takubo M (1997): Is alexithymic construct a culture-bound? Validity and reliability of the Japanese version of the 20-item Toronto Alexithymia Scale, TAS-20 and modified Beth Israel Hospital Psychosomatic Questionnaire BIQ. *Psychol Rep* 80:787-799.
- Ghaem O, Mellet E, Crivello F, Tzourio N, Mazoyer B, Berthoz A et al (1997): Mental navigation along memorized routes activates the hippocampus, precuneus, and insula. *Neuroreport* 8:739-744.
- George MS, Ketter TA, Parekh PI, Horwitz BAB, Herscovitch P, Post RM (1995): Brain activity during transient sadness and happiness in healthy women. *Am J Psychiatry* 152:341-351.
- Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML (1984): Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* 12:719-743.
- Grasby PM, Frith CD, Friston KJ, Bench C, Frackowiak RSJ, Dolan RJ (1993): Functional mapping of brain areas implicated in auditory-verbal memory function. *Brain* 116:1-20.
- Greicius MD, Krasnow B, Reiss AL, Menon V (2003): Functional connectivity in the resting brain: a network analysis of the default mode hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:253-258.
- Halpern AR (2001): Cerebral substrates of musical imagery. *Ann NY Acad Sci* 930:179-192.
- Henson RNA, Rugg MD, Shallice T, Josephs O, Dolan RJ (1999): Recollection and familiarity in recognition memory: An event-related functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 19:3962-3972.
- Honkalampi K, Hintikka J, Tanskanen A, Lehtonen J, Viinamaki H (2004): Depression is strongly associated with alexithymia in the general population. *J Psychosom Res* 48:99-104.
- Hyer L, Woods MG, Summers MN, Boudewyns P, Harrison WR (1990): Alexithymia among Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 51:243-7.
- Kano M, Fukudo S, Gyoba J, Kamachi M, Tagawa M, Mochizuki H, Itoh M, Hongo M, Yanai K (2003): Specific brain processing of facial expressions in people with alexithymia: an H215O-PET study. *Brain* 126:1474-1484.
- Kosaka H, Omori M, Iidaka T, Murata T, Shimoyama T, Okada T et al (2003): Neural substrates participating in acquisition of facial familiarity: an fMRI study. *Neuroimage* 20:1734-1742.
- Kosslyn SM, Alpert NM, Thompson WL, Chabris CF, Rauch SL, Buonanno FS (1993): Visual mental imagery activates topographically organized visual cortex: PET investigation. *J Cognit Neurosci* 5:263-287.
- Krystal H (1988): *Integration and self-healing: affect, trauma, alexithymia*. Hillsdale, NJ: Analytic Press.
- Lancaster JL, Woldorff MG, Parsons LM, Liotti M, Freitas CS, Rainey L, et al. (2000): Automated Talairach atlas labels for functional brain mapping. *Hum Brain Mapp* 10:120-131.
- Lane RD, Ahern GL, Schwartz GE, Kaszniak AW (1997): Is alexithymia the emotional equivalent of blindsight? *Biol Psychiatry* 42:834-844.
- Le Bihan D, Turner R, Zeffiro A, Cuenod CA, Jezzard P, Bonnerot V (1993): Activation of human primary visual cortex during visual recall: A magnetic resonance imaging study. *Proc Natl Acad Sci* 90:11802-11805.
- Maddock RJ (1999): Retrosplenial cortex and emotion: New insights from functional imaging studies of the human brain. *Trends Neurosci* 22:310-316.
- Maddock RJ, Garrett AS, Buonocore MH (2001): Remembering familiar people: the posterior cingulate cortex and autobiographical memory retrieval. *Neuroscience* 104: 667-676.
- Maguire EA (2001): Neuroimaging studies of autobiographical event memory. *Phil Trans R Soc Lond B* 356:1441-1451.
- Maguire EA, Mummery CJ (1999): Differential modulation of a common memory retrieval network revealed by PET. *Hippocampus* 10:475-482.
- Mangun GR, Buonocore MH, Girelli M, Jha AP (1998): ERP and fMRI measures of visual spatial selective attention. *Hum Brain Mapp* 6:383-9.
- Markowitsch HJ, Thiel A, Kessler J, von Stockhausen KM, Heiss WD (1997): Ecphorizing semi-conscious information via the right temporopolar cortex — a PET study. *Neurocase* 3:445-449.
- Martin JB, Pihl RO (1986): Influence of alexithymic characteristics on physiological and subjective stress responses in normal individuals. *Psychother Psychosom* 45:66-77.
- Marty P, de M'Uzan M (1963): La "pensee operatorie." *Revue Francaise de Psychanalyse* [Suppl] 27:1345-1356.
- Mayer LC, Cohen DJ (1992): The development of a capacity for imagination in early childhood. *Psychoanalytic Study of the Child* 47: 23-47.

- Mellet E, Petit L, Mazoyer B, Denis M, Tzourio N (1998): Reopening the mental imagery debate: lessons from functional anatomy. *NeuroImage* 8:129-139
- Mellet E, Tzourio N, Denis M, Mazoyer B (1995): A positron emission tomography study of visual and mental spatial exploration. *J Cogn Neurosci* 7:433-445.
- Musil SY, Olsen CR (1993): The role of cat cingulate cortex in sensorimotor integration. In: Vogt BA, Gabriel M editors, *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*, Cambridge: Birkhäuser, pp345-365.
- Nemiah JC, Freyberger H, Sifneos PE (1976): Alexithymia: a view of the psychosomatic process. In: Hill OW editors, *Modern trends in psychosomatic medicine*. Volume 3. London: Butterworths, pp26-34.
- Nemiah JC, Sifneos PE, Apfel-Savitz R (1977): A comparison of the oxygen consumption of normal and alexithymic subjects in response to affect-provoking thoughts. *Psychother Psychosom* 28:167-71.
- Ojemann JG, Akbudak E, Snyder AZ, McKinstry RC, Raichle ME, Conturo TE (1997): Anatomic localization and quantitative analysis of gradient refocused echo-planar fMRI susceptibility artifacts. *Neuroimage* 6:156-167.
- Oldfield RC (1971): The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* 9:97-113.
- Papciak AS, Feuerstein M, Spiegel JA (1985): Stress reactivity in alexithymia: decoupling of physiological and cognitive responses. *Journal of Human Stress* 11: 135-142.
- Parker JD, Taylor GJ, Bagby RM, Acklin MW (1993): Alexithymia in panic disorder and simple phobia: a comparative study. *Am J Psychiatry* 150:1106-1107.
- Phan KL, Wager T, Taylor SF, Liberzon I (2002): Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage* 16:331-48.
- Piefke M, Weiss PH, Zilles K, Markowitsch HJ, Fink GR (2003): Differential remoteness and emotional tone modulate the neural correlates of autobiographical memory. *Brain* 126:650-668.
- Pratto F (1994): Consciousness and automatic evaluation. In: Niedenthal PM, Kitayama S, editors. *The Heart's Eye: Emotional Influences in Perception and Attention*, San Diego: Academic Press, pp115-143.
- Raichle ME, MacLeod AM, Snyder AZ, Powers WJ, Gusnard DA, Shulman GL (2001): A default mode of brain function. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 676-682
- Roland PE, Gulyas B (1995): Visual memory, visual imagery, and visual recognition of large field patterns by human brain: Functional anatomy by positron emission tomography. *Cereb Cortex* 1:79-93.
- Rubin DC (1998): Beginnings of a theory of autobiographical memory. In: Thompson CP, Herrmann DJ, Bruce D, Read JD, Payne DG, Togli MP, editors. *Autobiographical Memory: Theoretical and Applied Perspectives*. London: Erlbaum, pp47-67.
- Ryan L, Nadel L, Keil K, Putnam K, Schnyer D, Trouard R et al (2001): Hippocampal complex and retrieval of recent and very remote autobiographical memories: evidence from functional magnetic resonance imaging in neurologically intact people. *Hippocampus* 11:707-714.
- Salminen JK, Saarijärvi S, Aarela E, Toikka T, Kauhanen J (1999): Prevalence of alexithymia and its association with sociodemographic variables in the general population of Finland. *J Psychosom Res* 46:75-82.
- Shergill SS, Bullmore ET, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK (2001): A functional study of auditory verbal imagery. *Psychol Med* 31:241-253.
- Shipko S, Alvarez WA, Novicko N (1983): Towards a teleological model of alexithymia: alexithymia and post-traumatic stress disorder. *Psychother Psychosom* 39:122-126.
- Suzuki WA, Amaral DG (1994): Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* 350:497-533.
- Talairach P, Tournoux J (1988): *Co-Planar Stereotaxic Atlas of the Human Brain*. Stuttgart: Thieme
- Taylor GJ, Parker JDA, Bagby RM (1990): Preliminary investigation of alexithymia in men with psychoactive substance dependence. *Am J Psychiatry* 147:1228-1230
- Taylor GJ, Bagby RM, Pauker JDA (1997): *Disorders of affect regulation: alexithymia in medical and psychiatric illness*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Taylor GJ (2000): Recent developments in alexithymia theory and research. *Can J Psychiatry* 45:134-142.
- Tulving E (1983): *Elements of episodic memory*. Oxford Sci., Oxford.
- Van Hoesen GW, Morecraft RJ, Vogt BA (1993): Connections of the Monkey Cingulate Cortex. In: Vogt BA, Gabriel M editors, *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*, Cambridge: Birkhäuser, pp249-284.
- Varga K, Jozsa E, Banyai EI, Gosi-Greguss AC, Kumar VK (2001): Phenomenological experiences associated with hypnotic susceptibility. *Int J Clin Exp Hypn* 49:19-29.
- Yoo SS, Freeman DK, McCarthy JJ 3rd, Jolesz FA (2003): Neural substrates of tactile imagery: a functional MRI study. *Neuroreport* 14:581-585.
- Zigmond AS, Snaith RP (1983): The Hospital Anxiety and Depression Scale. *Acta Psychiatr Scand* 67:361-370.
- Zigmond AS, Snaith RP, Kitamura T (1993): Hospital Anxiety and Depression Scale. *Seishinka-shindangaku* 4:371-372, in Japanese

スパインアクチンの動態とシナプス形態の可塑性

井ノ口 馨・斎藤喜人

アクチン細胞骨格系が、LTPなどのシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。特にアクチン骨格のダイナミックな動きによる樹状突起スパインの形態変化、すなわち“シナプス形態の可塑性”がシナプス可塑性を支える重要な機構のひとつであることが明らかになってきた。本稿では、スパインアクチンの動態制御に焦点をあて、アクチン動態とシナプス可塑性の関係を論じる。最近の研究により、シナプスの構造変化やシナプス結合の新生を伴う神経回路のハードウェアの再編成が、学習・記憶を支えている可能性がクローズアップされてきた。

Key Words

アクチン LTP 海馬歯状回 シナプス可塑性

● はじめに

脳がコンピュータと根本的に異なる点、すなわち脳を脳たらしめているものは何だろうか？ それは、外からのさまざまな入力、すなわち経験に的確に応じてハードウェアそのものを再構築する能力であろう。どのように優れたコンピュータでも、しよせん人間によりデザインされたハードウェアをそのまま用いて情報を処理しているにすぎず、自身のハードウェアをつなぎ変えて外界に対応していくなどという大それたことはしていない。脳はその大それたことをあたり前のように行なっている。胎児から思春期にかけて神経回路が形成される時、脳はまず結節点であるシナプスを過剰に作った後、使用されているシナプスは残し使用頻度の低いものは除去し、神経回路網を完成させるという戦略をとっている。実は大人の脳においても、情報を処理する際に同じ戦略をとっているという興味深い仮説が提唱されている。たとえば、記憶を形成し保持するときには、脳内で新たなシナプス結合が形成されたり除去されるといったハードウェア構造にダイナミックな可塑的变化が生じ、これが数日から何十年にも及ぶ長期間の記憶保持を支えているという魅力的な考え方である。本稿ではこの仮説の妥当性を示唆する最近の研究を紹介する。

I. シナプス形態の可塑性

実は、学習や記憶の際に新しいシナプスができたり消失したりする可能性は20年以上前から提唱されていたが、真剣に検討されるようになったのは比較的最近になってからである。ただし自由に行動している動物の脳内でそのことが生じていることを実験的に裏づけるのは容易なことではない。そこで、長期増強 (long-term potentiation ; LTP) などのシナプス可塑性を学習・記憶のモデル系として用い、LTPの誘導の際にシナプス新生が観察されるかどうかを調べる戦略がとられた。LTPをはじめとする長時間にわたるシナプス伝達効率の変化であるシナプス可塑性は、学習や記憶などの脳高次機能の基礎である。記憶などを司る興奮性シナプスの受け手側の樹状突起にはスパイン (棘) とよばれる小さな突起が存在する。培養した海馬スライスに比較的長時間持続するLTPを誘導する高頻度電気刺激 (テタヌス刺激) を加えたところ、LTPが生じた部位特異的にシナプス後部の樹状突起上に新しく形成されたとみられるスパインや糸状仮足 (filopodia) 構造が出現することが示された^{1,2)}。

シナプス可塑性が形態的变化を伴って生じる様式とし

Kaoru Inokuchi, Yoshito Saitoh, 三菱化学生命科学研究所 (MITILS) E-mail: kaoru@libra.lsm-kagaku.co.jp
Spine actin dynamics and morphological plasticity

ては、新規のシナプス結合が生じる場合と、既存のシナプス結合が強化される場合が考えられる。後者の一例として、既存のシナプス後部が分割されて独立の複数シナプスを形成する (synaptic splitting) か、新たなシナプス後部構造が既存のシナプスに加わることによる結合強化が提唱されている³⁴⁾。ともに可塑的变化が生じる際に、特にシナプス後部の増加によるシナプス結合の強化を認めてはいるものの、synaptic splittingが生じたためであるか否かについては、いまだ決着がつかない。いずれにせよ、シナプス伝達効率が可塑的に変化する要因のひとつとして、シナプス後部における形態的变化、あるいは新規構造の形成、すなわち“シナプス形態の可塑性”が生じることはコンセンサスが得られつつあると思われる。

II. アクチン分子とシナプス構造のダイナミックな変化

細胞骨格を構成する主要成分の1つアクチンは、真核細胞で最も量の多い蛋白質で、全細胞蛋白質の5%以上を占める。生体内では単分子のアクチン (Gアクチン) と、重合して繊維状態にあるアクチン (アクチンフィラメント, Fアクチン) の2つの状態をとり、定常的な重合・脱重合の結果、それぞれの部位に応じた動的な平衡状態にある。アクチンフィラメントは細胞内で安定な構造と不安定な構造をとりうる。安定なアクチンフィラメントはミオシンフィラメントとともに筋細胞の収縮装置を構成している。一方、細胞の運動などはアクチンフィラメントの不安定さによっている。アクチンフィラメントは、学習や記憶などの脳の高次機能を直接支える分子として、近年とみに注目を集めている。

樹状突起スパインはシナプス可塑性に重要な働きをしている⁵⁻⁷⁾。スパインがアクチン分子に富むことは古くからわかっていたが^{8,9)}、スパイン内のアクチンフィラメント構造は比較的安定であると考えられていた。ところが近年、スパインのアクチンフィラメントはダイナミックに重合・脱重合しており、想定されていた以上に不安定であることが明らかになってきた⁵⁻⁷⁾。スパインのアクチンフィラメントはおもにシナプス後肥厚部 (PSD) やスパイン装置に豊富に存在している¹⁰⁾。

1998年にMatusのグループがGFPを付したアクチンを用いた巧妙な実験から、海馬ニューロンのスパイン内

アクチンフィラメントが数秒という速さで形を変え、スパインの形態変化をひき起こしていることを明らかにした¹¹⁾。グルタミン酸受容体の活性化により、スパイン頭部の可動性が低下しスパイン形態が安定化する¹²⁾。海馬の初代培養ニューロンでは、スパイン内のアクチン分子の80%以上が数十秒で入れ替わっており、この変化がアクチンフィラメントの急速な重合・脱重合によるものであることが示された¹³⁾。驚くことに、安定なアクチンフィラメントを構成するアクチン分子は数%にすぎなかったという。長期抑圧 (long-term depression ; LTD) をひき起こすような低頻度の電気刺激を与えると、安定なアクチンが大幅に増大した。スパインのアクチンフィラメント動態がシナプス可塑性を調節、あるいは担っていることを示唆する結果である。

また、テタヌス刺激に伴うアクチン動態のダイナミックな制御はシナプス後部のスパインのみでなく、シナプス前終末でも生じていることが示された¹⁴⁾。この実験ではシリコンの電気伝導度が照射により変化する性質を巧みに利用している。シリコンチップの上に培養した海馬ニューロンに対してシリコンの上下から電場をかけてテタヌス刺激を与え、同時にニューロンの一部分に光を照射すると、照射された部位のみに電流が流れてテタヌス刺激が与えられる。あらかじめ前シナプス側に蛍光蛋白質YFPを付したアクチンを、後シナプス側に蛍光蛋白質CFPを付したアクチンを導入しておき、1つのシナプスの前側 (前終末) と後側 (スパイン) を同定できる状態でアクチン動態をビデオ観察したところ、テタヌス刺激が与えられたシナプスのみで前側のアクチン分子と後側のアクチン分子の両方がダイナミックな挙動を示すことが明らかにされた。

これらのアクチン分子の動態がシナプス可塑性に重要な役割を担っていることは、アクチン重合阻害剤が海馬LTPの成立や初期の持続性を抑制することから示されている^{15,16)}。

III. スパインアクチンの動態とシナプス可塑性

1. LTPに伴うスパイン内のFアクチンの増加

これまで紹介してきた報告は、すべて培養ニューロンや海馬スライス標本などの*in vitro*の実験系を用いて、数分オーダーの比較的短時間でのシナプス形態変化を観

察した結果に基づくものである。シナプス形態やスパインアクチン制御にはより長いもの、数時間から数週間に及び、より長期の脳機能にかかわるものも想定されよう。長期間の観察のために、筆者らは生きたラットの脳海馬にLTPを誘導し、シナプス領域におけるアクチン分子の長期間にわたる動態の変化、変化の分子カスケード、変化とLTPの持続性の関係などを検討した¹⁷⁾。

海馬の歯状回分子層は内・中・外の3層より構成され、外層には外側嗅内野からの、中層には内側嗅内野からの貫通線維が投射しシナプス層を形成している(図1 a)。投射線維に強いテタヌス刺激、あるいは弱いテタヌス刺激を与えることにより、それぞれのシナプス層に長期・短期持続性のLTPを起こすことができる。筆者らは、無麻酔下で自由に行動している個体に強いテタヌス刺激を与えて長期持続性のLTPをひき起こした。その海馬切片をファロイジン染色することにより、LTPが誘導されたシナプス部位に特異的にFアクチンが増加することを見いだした(図1)。LTPが生じたシナプス層をレーザーマイクロダイセクション法で採取し、不溶性画分のアクチン量、すなわちFアクチン量が確かに増加していることを生化学的に確認した。

電顕観察からファロイジンに強く染まる部位はスパインであること、対照側と比較してLTP側ではファロイ

ジンに強陽性部位を含むスパインの比率が増加していることがわかった(図2 a)。さらに、前シナプスと後シナプスの接触面の長さがLTP側で約2倍になっていた(図2 b)。すなわち、LTP誘導に伴いスパイン内のFアクチン量が増え、それと並行してスパインが大きくなっていることが明らかとなった。

無麻酔自由行動下の動物では、強いテタヌス刺激を与えることにより数週間にわたってシナプス伝達の増強が持続するLTPが生じる。これらの動物の海馬では、LTPが生じたシナプスでのFアクチンの増加が少なくとも5週間は持続していた。一方、弱いテタヌス刺激を与え7日以内に減衰する短期持続型のLTPをひき起こしたときには、LTPの持続と同様にシナプス部位でのFアクチンの増加も7日後には元のレベルに戻っていた。

2. スパインアクチンの動態とLTPの持続

前項までの結果は、スパイン内のFアクチン増加がLTPの持続に何らかの役割を果たしていることを示唆している。そこで、LTP持続に対するアクチン重合阻害剤の効果を検討した(図3)¹⁷⁾。この目的のために、麻酔下のラット歯状回LTP実験系を採用した。この系では強いテタヌス刺激により12時間以上持続するLTPが生じるが、アクチン重合阻害剤のラトランキュリンA

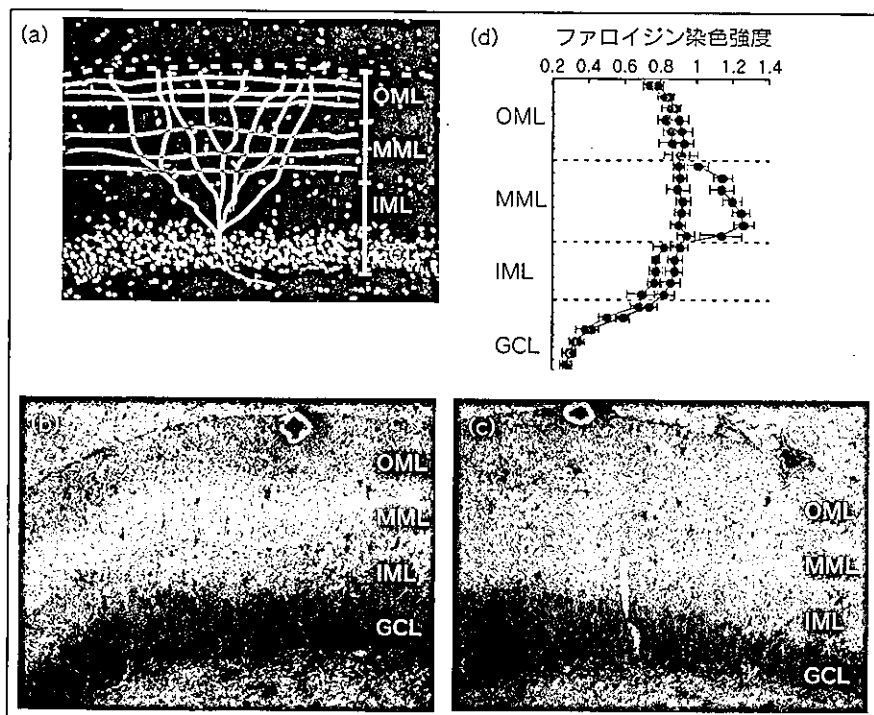


図1 LTPに伴うシナプス層のFアクチンの増加

(a) 海馬歯状回の模式図。1つの顆粒細胞の細胞体と樹状突起を白で示した。GCL: 顆粒細胞層, IML: 内分子層, MML: 中間分子層, OML: 外分子層。(b) LTP誘導45分後のファロイジン染色像。貫通線維に2,400パルスのテタヌス刺激を与え、歯状回MMLにLTPを誘導した。MML特異的にファロイジン染色性(=Fアクチン)の増大が認められる。(c) 対照歯状回のファロイジン染色像。(d) ファロイジン染色強度を定量した。灰色がLTPを誘導した歯状回、黒が対照歯状回を表す。【図3 (p.194) 参照】

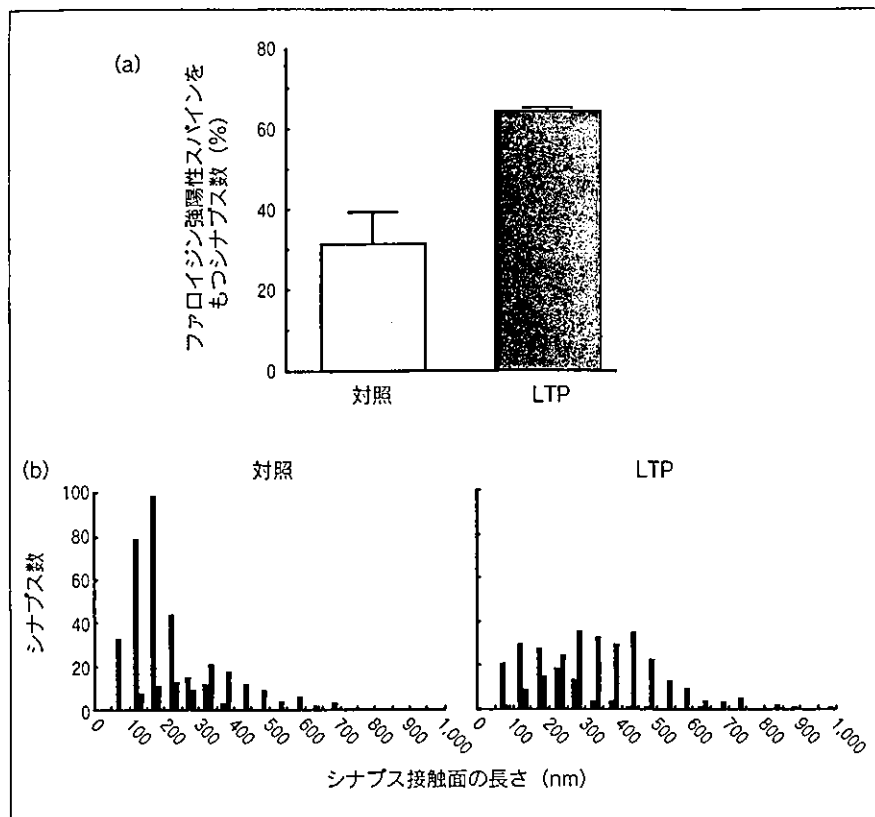


図2 LTPの誘導によりFアクチン量が増加したスパイン数の増加とシナプス形態の変化

(a) フェロイジンに強く染まるスパインの数を電顕観察により定量した。(b) シナプスの前側と後側の接触面 (synaptic apposition) の長さを測定し、ヒストグラムにした。黒：フェロイジンに強く染まるスパインをもつシナプス。灰色：フェロイジンに弱く染まる、あるいは染まらないスパインをもつシナプス。

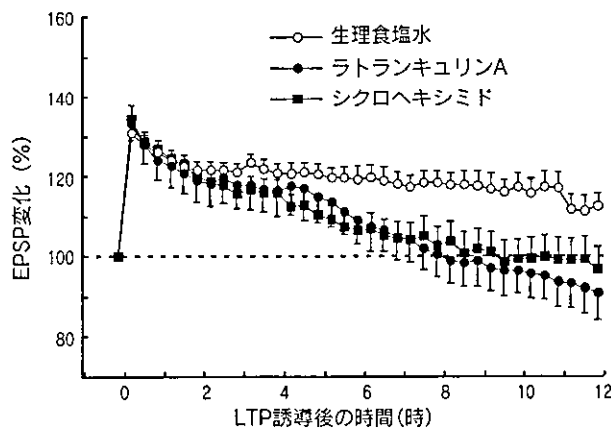


図3 アクチン重合の阻害によるLTP持続の短縮
麻酔下のラット海馬歯状回に強いテタヌス刺激を与えると12時間以上持続するLTPがひき起こされる。記録電極からアクチン重合阻害剤のラトランキュリンAを注入すると、LTPは8時間で元のレベルに戻った。

存在下ではテタヌス直後の増強レベルが対照群とまったく等しかったにもかかわらず、LTPの減衰が加速されており、8時間でテタヌス前のレベルに復帰した。興味深いことに、蛋白質合成阻害剤のシクロヘキシミド存在下のLTPの減衰がこれとほぼ同様の推移を示した。蛋白質合成阻害剤がLTPの持続性を低下させることは既

知であり、また、フェロイジン染色性の変化は阻害しないことをあわせて考えると、Fアクチンの増加は蛋白質合成とは別の側面でLTPの持続性を支持していると推測される。ラトランキュリンAもシクロヘキシミドも、通常のシナプス伝達には影響を与えなかった。

3. スパインアクチン動態の制御シグナル

スパインのアクチン動態の制御には、Rhoファミリー低分子量G蛋白質が関与している^{18,19}。このファミリーに属するRacはスパイン構造の形成・維持を促進し、Rhoはスパイン形成を阻害するとともにスパイン退縮を促進する。これらのG蛋白質の下流にあるLIMキナーゼはADF/コフィリンのリン酸化を通じてアクチン重合を制御している。LIMキナーゼ-1のノックアウトマウスでは、樹状突起スパインの形態が異常になるとともに海馬LTPや学習行動に影響が認められる²⁰。ADF/コフィリンによるアクチン脱重合活性はリン酸化によって負に制御されている。そこで、筆者らはLTPに伴うADF/コフィリンのリン酸化状態の変化を調べた¹⁷。ADF/コフィリンのリン酸化はLTPが誘導されたシナプス層で増加した。さらに、コフィリンリン酸化阻害ベ

ブチドは、麻酔下LTPの持続性を顕著ではないながらも減弱させた。これらの結果は、LTPに伴うスパインのFアクチンの増大の少なくとも一部がADF/コフィリンにより制御されていることを示している。

4. アクチン関連蛋白質の挙動

さて、樹状突起スパインでFアクチン集積が生じるのであれば、スパイン内でのアクチン関連の機能蛋白質や構成蛋白質の分布にも変化が生じることが期待される。実際に、スパインに局在するアクチン関連蛋白質のドレブリンおよびシナプトポーデインの免疫染色性はいずれもLTPが生じているシナプス層で増加していることが示された。一方、微小管関連蛋白質のMAP-2、神経特異的 β チューブリンの免疫染色性はLTP側と対照側のシナプス層の間で差がなかった。すなわち、LTPを誘導するテタヌス刺激の入力があった歯状回分子層において、アクチン細胞骨格のみならずその関連蛋白質もその挙動を大きく変化させていることが明らかとなった¹⁷⁾。

● おわりに

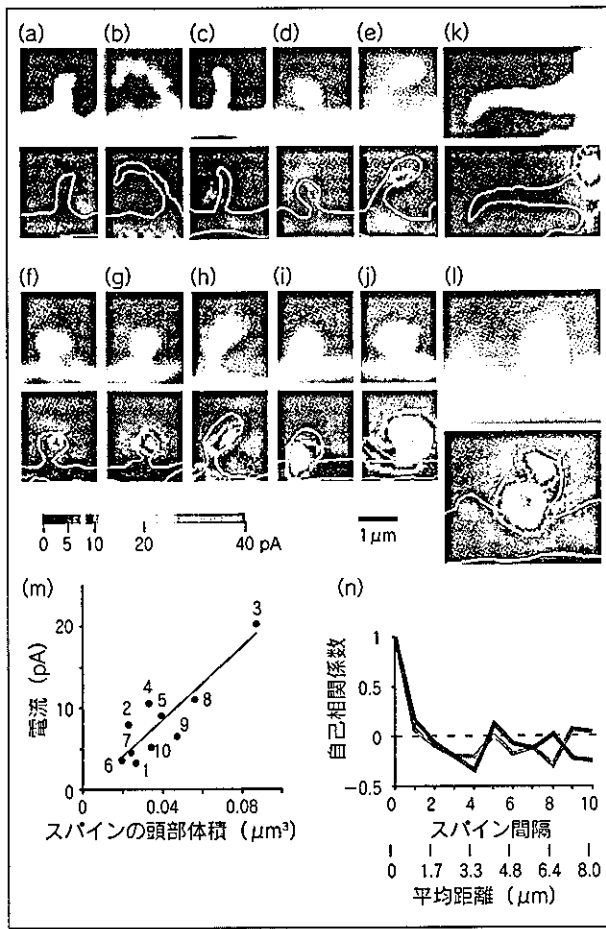
本稿では、LTPなどのシナプス可塑性に伴いシナプスの形態がダイナミックに変化すること、そしてシナプス形態の可塑性がLTPの誘導や持続に重要な役割を果たしていること、さらにスパイン形態の可塑性にはスパインアクチンの動態が重要であり、その制御の分子機構の一端が明らかにされつつあることなどを述べてきた。このようにシナプス可塑性に伴って、シナプス形態の変化といった神経回路網を形作る部品（ハードウェア）の構造変化が生じていることが明らかになってきている。

さて、ここで冒頭に述べた問題に戻りたい。学習・記憶の際にシナプスの形成や除去を伴った神経回路網のハードウェアの再編成が本当に生じているのだろうか？最近になって、生きた動物の脳皮質ニューロンの同じ樹状突起スパイン群の形態変化を数週間以上にわたって観察できる画期的な方法が開発された^{21,22)}。学習・記憶の際にシナプスが形成されたり既存のシナプスが除去されて、新たに形成された回路が長期間持続する記憶を担

っているのかどうか、その分子機構はどのようになっているのか？ 答えが出る日もそう遠くない将来であると期待される。

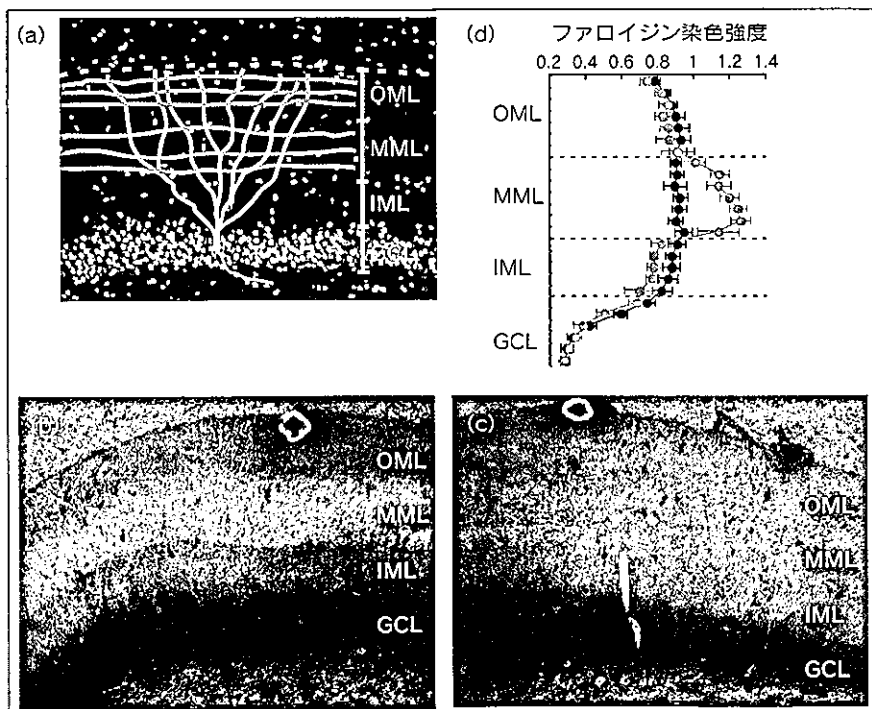
文献

- 1) Maletic-Savatic, M., Malinow, R., Svoboda, K. : *Science*, 283, 1923-1927 (1999)
- 2) Engert, F., Bonhoeffer, T. : *Nature*, 399, 66-70 (1999)
- 3) Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., Muller, D. : *Nature*, 402, 421-425 (1999)
- 4) Fiala, J.C., Allwardt, B., Harris, K.M. : *Nature Neurosci.*, 5, 297-298 (2002)
- 5) van Rossum, D., Hanisch, U.K. : *Trends Neurosci.*, 22, 290-295 (1999)
- 6) Halpain, S. : *Trends Neurosci.*, 23, 141-146 (2000)
- 7) Matus, A. : *Science*, 290, 754-758 (2000)
- 8) Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R., Fujiwara, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7590-7594 (1982)
- 9) Fifkova, E., Morales, M. : *Int. Rev. Cytol.*, 139, 267-307 (1992)
- 10) Capani, F., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. : *J. Comp. Neurol.*, 435, 156-170 (2001)
- 11) Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., Matus, A. : *Neuron*, 20, 847-854 (1998)
- 12) Fischer, M., Kaech, S., Wagner, U., Brinkhaus, H., Matus, A. : *Nature Neurosci.*, 3, 887-894 (2000)
- 13) Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., Murthy, V.N. : *Nature Neurosci.*, 5, 239-246 (2002)
- 14) Colicos, M.A., Collins, B.E., Sailor, M.J., Goda, Y. : *Cell*, 107, 605-616 (2001)
- 15) Kim, C.H., Lisman, J.E. : *J. Neurosci.*, 19, 4314-4324 (1999)
- 16) Krucker, T., Siggins, G.R., Halpain, S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6856-6861 (2000)
- 17) Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., Inokuchi, K. : *Neuron*, 38, 447-460 (2003)
- 18) Nakayama, A.Y., Harms, M.B., Luo, L. : *J. Neurosci.*, 20, 5329-5338 (2000)
- 19) Tashiro, A., Minden, A., Yuste, R. : *Cereb. Cortex*, 10, 927-938 (2000)
- 20) Meng, Y. *et al.* : *Neuron*, 35, 121-133 (2002)
- 21) Grutzendler, J., Kasthuri, N., Gan, W.B. : *Nature*, 420, 812-816 (2002)
- 22) Trachtenberg, J.T., Chen, B.E., Knott, G.W., Feng, G., Sanes, J.R., Welker, E., Svoboda, K. : *Nature*, 420, 788-794 (2002)



口絵2 スパインの構造・機能連関

(a~l) スパインの蛍光像(上)とグルタミン酸感受性(下)。下の図ではグルタミン酸電流は色表示してある。(k) 樹状突起糸状仮足には感受性がほとんどない。(l) 幼弱樹状突起では、点在する太いスパインにのみグルタミン酸感受性がみられる。(m) スパイン頭部の体積とグルタミン酸電流の関係。(n) スパイン頭部の体積(赤)とグルタミン酸電流(青)の樹状突起にそっての自己相関係数。(文献7より改変) [河西春郎・松崎政紀・野口潤・安松信明・本蔵直樹, p.278参照]



口絵3 LTPに伴うシナプス層のFアクチンの増加

(a) 海馬歯状回の模式図。1つの顆粒細胞の細胞体と樹状突起を白で示した。GCL: 顆粒細胞層, IML: 内分子層, MML: 中間分子層, OML: 外分子層。(b) LTP誘導45分後のファロイジン染色像。貫通線維に2,400パルスのテタヌス刺激を与え、歯状回MMLにLTPを誘導した。MML特異的にファロイジン染色性(=Fアクチン)の増大が認められる。(c) 対照歯状回のファロイジン染色像。(d) ファロイジン染色強度を定量した。赤がLTPを誘導した歯状回、黒が対照歯状回を表わす。[井ノ口 馨・斎藤喜人, p.284参照]

シナプス活動による遺伝子発現調節

奥野浩行・竹本-木村さやか・大前彰吾・岡村理子・石原奈津実・尾藤晴彦

神経回路網に長期記憶が保持されるためには、神経活動依存的遺伝子発現が必須である。CREBを中心とするいくつかの転写因子がその過程で重要な役割を果たすことがこの10年間で明らかになってきたが、詳細な制御機構と関与する分子の全貌は残念ながらいまだ解明されていない。本稿では、今日までにCREBの上流と下流のシグナル伝達機構について明らかにされた知見を整理し紹介したい。

Key Words CREB カルシウム CaMキナーゼ LTP

● はじめに：シナプス活動による遺伝子発現調節の重要性

脳神経系は1,000億以上の神経細胞によって構成されている。海馬CA1錐体細胞の場合、数万個のシナプス入力を受けるにもかかわらず、出力となる軸索は通常1ないし2本である¹⁾。このことは、1個1個の神経細胞が、脳の数多くの部位から入ってくる情報を刻一刻と処理し続け、特定の(ごく少数の)神経細胞へその処理結果を活動電位の伝播という形で出力するプロセッサであることを示唆している。神経細胞がこのような性質をもち、1,000億個の神経細胞間で複雑なネットワークを形成しているとしたら、脳はいかなる情報処理のロジックによって周囲環境からの感覚情報を生存に適した形で正しく処理できるのだろうか。

脳実質の神経細胞のほとんどは、胎児期あるいは生後直後に分裂停止し、最終的な分化・形態変化・シナプス形成を遂げ、“hard wiring”を完成する。このプロセスは個体間の差がほとんどなく、時空間的に非常に正確に遂行されるがゆえに、個体間をこえて共通性のある知覚情報処理や認知が可能となるのであろう。ところが、知覚・認知された事象の意味・価値というものは個体の置かれた文脈によってまったく異なってしまふ。これは、個体が生きていく過程で遭遇した経験のデータベースを

“記憶”として長期間神経回路網の中に維持できるため、好ましい体験をより強化し、忌まわしい経験をより忌避するを行なってきたからだと考えられる。

長期記憶形成は、短期記憶を阻害しない転写阻害剤や蛋白質合成阻害剤の脳室内投与により特異的障害が見いだされるため²⁾、神経活動依存的転写・翻訳機構の活性化がその基盤であることが明らかとなった。最近では長期シナプス可塑性³⁾、神経形態制御⁴⁾などにも同様の機構の関与が示唆されている。このような長期的情報処理の分子機構を解明するためには、具体的に神経活動が、どのように、どの転写因子を活性化し、どのような遺伝子産物群の誘導するのかを明らかにせねばならない。

本稿においては、数ある転写因子の中でも特にCREB(cAMP-responsive element-binding protein)⁵⁾を中心として、この10年において明らかになってきた神経活動依存的遺伝子発現調節機構について概説してみたい。

I. 神経活動による転写調節：シナプスでのカルシウム流入によって引き起こされる多様なシグナル伝達

海馬における主細胞である錐体細胞はグルタミン酸性興奮性神経細胞で、その興奮性シナプスでは、100 Hz、1秒間というテタヌス刺激によってシナプス伝達効率が

Hiroyuki Okuno¹⁾, Sayaka Takemoto-Kimura¹⁾, Shogo Ohmae²⁾, Michiko Okamura¹⁾, Natsumi Ishihara¹⁾, Haruhiko Bito^{1,3)}, ¹東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室, ²京都大学大学院医学研究科神経細胞薬理学教室, ³SORST-JST E-mail: okuno@m.u-tokyo.ac.jp, hbito@m.u-tokyo.ac.jp

Synaptic activity-dependent regulation of neuronal gene expression

長時間上昇する長期増強(long-term potentiation ; LTP)というシナプス可塑性が起こることが知られている⁶⁾。テタヌ刺激時にNMDA受容体を阻害すると、LTPは起こらなくなるし、個体レベルでの空間記憶や、海馬の場所細胞(place cell)の機能にも著しい異常が認められた。このような知見から、NMDA型グルタミン酸受容体を介したカルシウム流入が、細胞レベルの神経可塑性のみならず、個体レベルの空間記憶のメカニズムにとって必要な引き金である可能性が強く示唆されている⁷⁾。それではシナプス可塑性や空間記憶が発生する状況ではたして遺伝子発現誘導が起こるのであろうか。1980年代後半にNMDA刺激により、*c-fos*, *zif 268*などの前初期遺伝子群が誘導されることが証明され^{8,9)}、さらに1991年頃、Greenbergら¹⁰⁾ならびにKandelら¹¹⁾によってほぼ同時期に、Ca²⁺流入によりCREBリン酸化ならびにCRE依存的転写活性が亢進することが示された。

転写因子CREB⁵⁾は、bZIP型の転写制御因子であり、その構造は線虫、ショウジョウバエ、哺乳類の間でよく

保存されている。特徴的なのは、CRE領域を認識するDNA結合部位以外にも、いわゆるSer133残基を中心とするKID(キナーゼ誘導領域)が種をこえて保存しているところである(図1)。CREBのSer133残基が特異的リン酸化を受けると、コアクチベーターであるCREB-binding protein(CBP)上のKID-interacting(KIX)ドメインへの親和性が飛躍的に増大する⁵⁾。このCREB-CBP結合の安定性こそがCREB転写活性化のための最も重要なステップであり、これを促進する律速段階がCREB Ser133残基リン酸化である。

数多くある転写因子の中で、CREBの活動依存的転写調節における役割が特に注目されたのは3つの理由からである¹²⁾。1つ目の理由は、CREBが種をこえて保存されている転写制御因子で、神経細胞に高レベルで発現しており、しかも*c-fos*を含む数多くの前初期遺伝子群のプロモーター配列に典型的なCRE配列が認められたからである。2つ目の理由は、CREB活性化にはSer133残基のリン酸化が必要かつ十分であり、比較的容易にそ

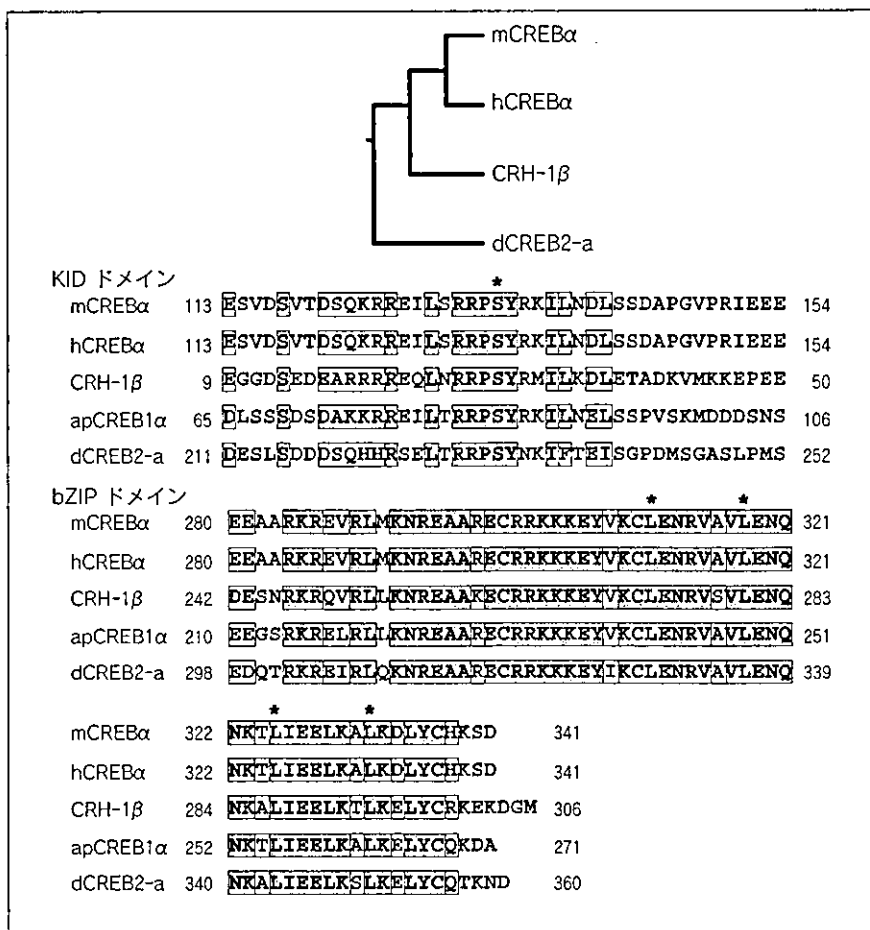


図1 CREBのKIDおよびbZIP領域におけるアミノ酸配列の相同性系統樹により異なる種間でのCREBの相同性を上部に示した。KIDおよびbZIP領域は種間で非常によく保存されている(下図)。KID領域における星印は(哺乳類CREBの)Ser133残基を、bZIP領域においてはジッパー構造形成にかかわるロイシン残基を示す。灰色の枠はアミノ酸配列が同一である領域を、白枠は相同領域を示す。なお、mCREBαはマウス、hCREBαはヒト、CRH-1βは線虫、apCREB1αはアメフラシ、dCREB2-aはショウジョウバエのCREBを表わす。

の活性測定が可能であったことである。3つ目の理由は、アメフラシ、ショウジョウバエ、マウスにおいて、CREB活性化の阻害により、短期記憶は正常のまま、長期記憶のみが特異的に障害されることが示されたことである。

CREBは多くの神経細胞で強く発現しているが、当然CREB以外の転制御因子も神経活動依存的、カルシウム依存的転写調節の標的となりうる。たとえば、NFAT (nuclear factor of activated T cell) の神経アイソフォームは神経活動によって活性化され^{13,14}、さらに発生途上の軸索誘導¹⁵にも関与することが明らかにされている。また、DREAM¹⁶、CaRF¹⁷、SRF¹⁸、NF κ B¹⁹、USF^{20,21}、MeCP^{22,23}など多くの転写制御因子の機能解明が進み、これらが神経細胞に発現し、カルシウム上昇に伴い活性化され、特異的遺伝子誘導に関与していることが明らかにされつつある。

このように、神経活動によって活性化されている転写制御因子は決して少なくなく、これらを協調的に制御するために非常に複雑なシグナル伝達機構が存在していることが明らかになった²⁴。しかしながら、どのような神経活動のパターンにどのような転写制御因子・誘導遺伝子のセットが対応するのか、また多種多様な転写制御因子群の活性化により、どのような遺伝子発現プロフィールの変化が1個1個の神経細胞レベルで実現されるのか、という点に対する解答は依然見いだされていない。

II. CREB活性化の意義

転写制御因子CREBは、長期記憶にとって必要なばかりでなく、CREB依存性転写の亢進そのものによって、一部の長期記憶や神経可塑性の後期相を誘導促進するために十分であることも証明された^{12,25,26}。その一方で、CRE-lacZレポーター遺伝子を構成的に染色体に挿入させたマウスを用いた個体レベルの実験により、CREB転写系が、海馬長期記憶以外にも、長期的な恐怖条件づけ、視覚野可塑性、バレル野可塑性、条件的味覚忌避、報償系における依存形成などの脳高次機構に深く関与している可能性が報告されている。すなわち、CREB依存的遺伝子産物が、海馬長期記憶以外にも、多岐にわたる神経可塑性において中核的役割を果たしている。また、脳特異的CREB欠損マウスでは、神経細胞のアポトーシスや神経変性所見が有意に増強していることが発見され、

CREB活性が神経生存にとって重要な役割を果たしていることが明らかとなっている²⁷。さらにポリグルタミン病早期における病態のひとつは、CREB依存的転写の阻害である可能性が指摘されている²⁸。

このような発生過程、神経回路形成過程におけるCREB関与と成熟脳におけるCREB関与の表現型を区別する目的で、誘導型のCREBドミナントネガティブ体を神経細胞特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製することが最近試みられた。その結果、恐怖記憶における条件づけの各ステップでドミナントネガティブCREB活性を顕在化させる薬物処理を行ない、どのステップにCREB依存的転写調節が必須であるかと探索することが初めて可能となった。このような実験により、CREBは長期記憶の形成・固定化のみならず、実は後に想起された長期記憶の再固定化にも大きく関与することが証明された²⁹。

III. CREB活性化の機序

CREBの長期可塑性・長期記憶における役割を解明するためには、どのような神経活動によって、どのような分子がCREBのリン酸化状態を制御しているのかということ明らかにする必要がある。筆者らは、神経可塑性を誘導するパターン刺激によって海馬の長期記憶を担う興奮性錐体細胞のCREBリン酸化が亢進することを示し、さらにこの反応がPKAでなく、CaMKK/CaMK IV依存的に起こることを示した³⁰。そして、こうした一連の研究の結果、リン酸化制御機構の重要な役割のひとつは、一過性でなく、持続的なCREBリン酸化状態を神経細胞の核内でひき起こすことにあることを明らかにした^{30,31}。

それでは、CaMK IVによるCREBの持続的リン酸化は個体のどのような長期可塑性に関与しているのだろうか。最近CaMK IV欠損マウスやCaMK IV変異体発現マウスが作製され、その解析の結果、CaMK IVによるCREBリン酸化は、海馬神経可塑性以外の場、すなわち小脳プルキンエ細胞の後期LTD発現や扁桃体の長期恐怖記憶などにも深く関与している可能性が浮き彫りにされた^{32~35}。また線虫におけるCaMKK/CaMK/CREB経路の重要性も証明されている³⁶。さらにCaMKK- β 欠損マウスにおいても海馬長期可塑性・空間学習の障害が認められること³⁷から、CaMKK/CaMK IV/CREB経

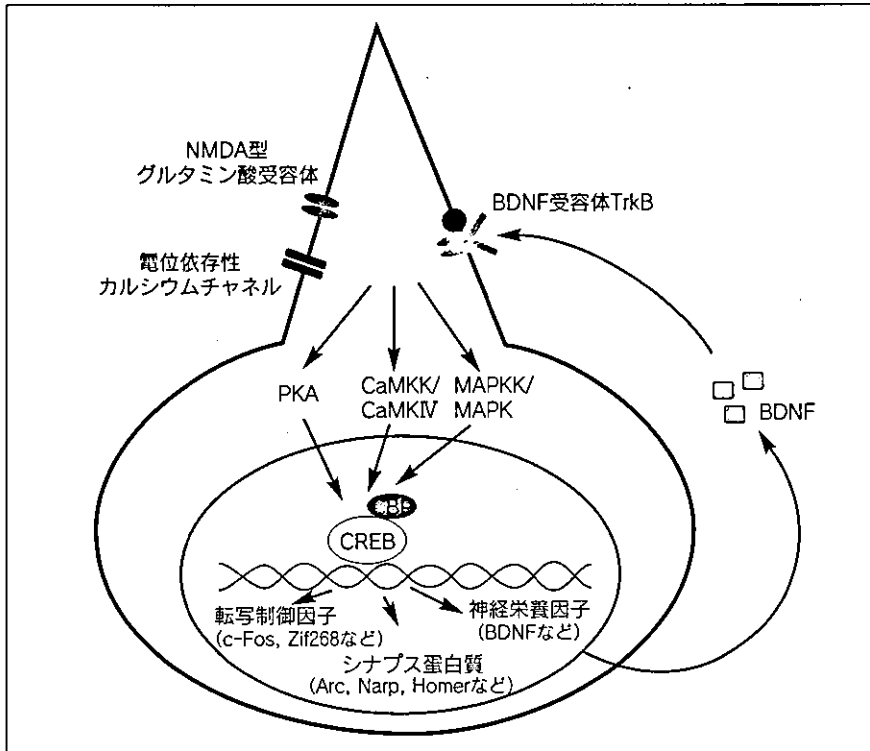


図2 CREBの活性化経路とフィードバック機構

CREBはCaMKK/CaMKIV系、PKA系、MAPKK/MAPK系などの複数のシグナル伝達経路からの制御を受け、核内においてさまざまな遺伝子の転写を活性化する。CREBの標的の1つである脳由来神経栄養因子 (BDNF) は翻訳・修飾後、細胞外に放出された後、特異的受容体であるTrkBを介して再びシグナル伝達系を活性化させてCREB依存的遺伝子発現に対して正のフィードバック機構として働く可能性がある。

路の生体内における意義は、確固たるものとして確立したといえよう。加えて、ある種の神経細胞においては、恒常的な生存シグナルの生成にもCaMKIV-CREB経路が関与していることが示唆されている³⁸⁾。ただし、海馬CA1錐体細胞においてこの経路はシナプスから核への主要なシグナル伝達経路であるといえるが、他の細胞種、神経核でどのようなリン酸化カスケードが関与しているかについては、今後明らかにしていく必要がある。脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 放出を伴う回路では、MAPK経路の関与が明らかとなっており、ドーパミン系ではドーパミンによりPKA依存的CREBリン酸化が報告されている (図2)。

IV. CREB標的遺伝子

それでは、CREB自身は転写制御因子としてどのような遺伝子発現に寄与して、上記のような生理的意義を有しているのだろうか。CREBが*in vitro*で結合するDNA配列 [cAMP response element (CRE): コンセンサス配列は5'-TGACGTCA-3'] をプロモーター領域にもつ遺伝子は現在までに100種以上も報告されている (表1)。以下にその中で特に神経系において重要であると思われるいくつかの遺伝子について生理学的な機能を

紹介する。

1. 脳由来神経栄養因子 (BDNF)

BDNFは成熟大脳皮質に発現の多い神経栄養因子であり、樹状突起・軸索の形態形成や神経回路形成に作用する^{39,40)}。神経活動依存的に樹状突起および軸索から放出され、活動依存的な神経回路の変化に関与している可能性が高い。BDNF欠損マウスでは、感覚神経細胞の形成障害があり、BDNFの神経細胞の分化・生存への関与も示唆される。BDNF欠損マウスでの海馬LTP障害は、ウイルスベクターや再添加によるBDNF補充により回復することから、BDNFが直接LTP誘導にもかかわっている可能性もある^{41,42)}。

近年、BDNFによる神経細胞脱分極活性が⁴³⁾、TrkBと複合体を作るNav1.9によるものであることが示された⁴⁴⁾。このことはBDNFがTrkB・MAPK系の活性化に加え、脱分極によるCa²⁺流入によってCaMKK/CaMKIV系およびアデニル酸シクラーゼ活性化を介したPKA系を活性化することを示している。これら複数の経路を介したCREBの活性化により、BDNFの発現がさらに促進される正のフィードバック機構が存在する可能性が示唆され興味深い (図2)。また、BDNFの重要な生理活性のひとつとしては、mTORなどを介した

表1 CREBの標的遺伝子産物

転写制御因子
ATF-3, C/EBP- β , c-Fos, c-Maf, CREB, CREM-ICER, Egr-1/Krox24/zif268, Jun-D, Krox20, mPer1, mPer2, Nurr1, Pit-1/GHF, Stat3, グルココルチコイド受容体
成長因子
Amphiregulin, BDNF, cardiotrophin, FGF-6, Flt-1, IGF-1, TGF- β 2, TNF- α , イヒピン α , インターロイキン2, インターロイキン6, レプチン
シグナル伝達関連
Cdk5, Glucose-regulated protein 78, iNOS, Mitogen-activated protein kinase kinase phosphatase (MKP-1), Neurofibromatosis 1 (NF1), nNOS, Non-muscle myosin heavy chain, Retinoblastoma (Rb), Serum and glucocorticoid inducible kinase, TrkB, サイクリンA, サイクリンD1, プロスタグランジンシンターゼ2 (PGS2)
神経ペプチド・神経伝達物質関連
Cardiotrophin-1, Calcitonin gene-related peptide, Cholecystokinin, Chromogranin A, Chorionic gonadotropin- α , Chromogranin B, Dopamine β -hydroxylase, α 1-GABA _A 受容体, Glycoprotein hormone α subunit, Murine gastrin-releasing peptide 受容体 (mGRP-R), Neurotensin/Neuromedin N, Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide, Preprotachykinin A, Prodynorphin, Proenkephalin, Proglucagon, アセチルコリンエステラーゼ (AChE), β 1-アドレナリン受容体, β 2-アドレナリン受容体, エンケファリン, ガラニン, ガラニン受容体1 (GalR1), シナプシンI, パソプレッシン, ソマトスタチン, ソマトスタチン受容体2, サブスタンスP受容体, パソアクチブインテスティナルポリペプチド (VIP), 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH), 性腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体
代謝関連
Amino levulinate, Arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT), Bcl-2, Carnitine palmitoyl transferase, Hemeoxygenase-1 (HO-1), HMG-CoA シンターゼ, Type II deiodinase, Uncoupling protein-1 (UCP1), UCP2, UCP3, グルタミンシンターゼ, グルタチオン-S-トランスフェラーゼA3, シトクロムc, シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2), ヘキサキナーゼ2, 乳酸デヒドロゲナーゼ, 神経特異的エノラーゼ (NSE), オルニチンデカルボキシラーゼ, ビルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ4, スーパーオキシドジスムターゼ2 (SOD2), チロシンアミノトランスフェラーゼ, ホスホエノールビルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK), ユビキチン結合酵素
構造蛋白質・接着因子
ICAM-1, α A-クリスタリン, E-カドヘリン, フィブロネクチン, ニューロフィラメント68 kDa (NF-L)
チャネル・トランスポーター
Chromogranin A, Kv3.1, Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α , Secretogranin, Secretogranin II, Vesicular monoamine トランスポーター, アクアポリン-2, 囊胞性繊維症膜貫通調節蛋白質 (CFTR), グルコーストランスポーター2 (GLUT2), ノルエピネフリントランスポーター
CREをプロモーター領域に含む遺伝子によりコードされる蛋白質をカテゴリーごとにまとめた。この表ですべての標的遺伝子産物が網羅されているわけではない。

mRNA 翻訳機構の活性化もよく知られている。

記憶・学習との関連に関しては、ラットの文脈依存学習において海馬でのBDNF mRNAの発現が亢進することが、またBDNFのアンチセンス注入により空間学習が障害されることが報告されている^{45,46)}。ニホンザルを用いた研究では認知的長期記憶課題である対連合課題により、嗅周皮質(36野)とよばれる領野でBDNF mRNA発現が上昇することが見いだされている⁴⁷⁾。さらに最近、ヒトにおけるBDNFの多系性が報告され、BDNF前駆体(プロBDNF)の1アミノ酸変異(Val66Met)の場合、ある種の記憶(エピソード記憶)の成績が有意に低下した⁴⁸⁾。

2. 誘導型転写制御因子

前初期遺伝子群産物の代表である誘導型の転写制御因

子の多くはプロモーター領域にCREをもつ。その典型例は*c-fos*と*zif268*(または*egr1/krox24/NGFI-A*)である。

Zif268の欠損マウスでは海馬歯状回*in vivo*後期LTP(誘導後24時間以降)に障害がみられ、味覚や匂い弁別課題における長期記憶障害もみられた⁴⁹⁾。また、海馬CA1領域*in vitro*後期LTP(誘導後1時間以降)も障害されていた⁵⁰⁾。さらに、先述したニホンザルを用いた認知長期記憶課題においては、BDNF同様、*zif268* mRNAが嗅周皮質に特徴的なパッチ状に発現誘導されることも見いだされている(図3)⁵¹⁾。

一方、最近、*Cre-loxP*を用いた*c-Fos*の海馬特異的欠損マウスが作製され、カイニン酸による神経の興奮性や興奮毒性に対する脆弱性が亢進していることが示された⁵²⁾。このマウスでは海馬におけるカイニン酸受容体

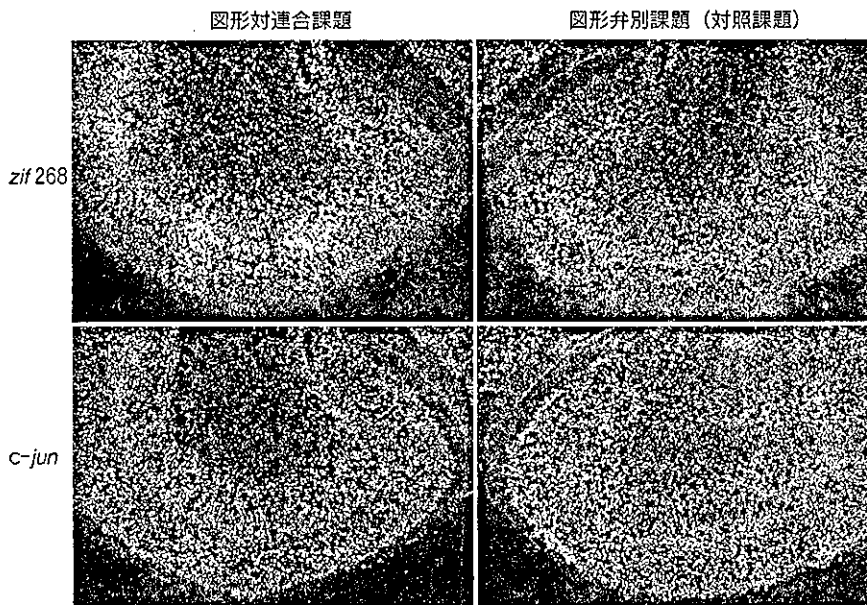


図3 サル側頭葉皮質における長期記憶形成時の *zif 268* mRNA の発現
ニホンザルに図形対連合課題を行なわせ、長期記憶形成時の前初期遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で検出した。*zif 268* mRNA は、長期記憶形成に重要な領野である側頭葉嗅皮質において強いパッチ状の発現を示したが、対照課題ではそのようなパッチ状の発現はみられなかった。また、別の前初期遺伝子 *c-jun* の mRNA ではパッチ状の発現はみられず、図形対連合と図形弁別の両課題間で差は認められなかった。(文献51より改変)

GluR6の発現が増加しており、神経興奮性充進との関連が示唆される。類似の転写制御因子 FosBには選択的スプライシングにより全長型 (FL-FosB) と欠損型 (Δ FosB) が存在するが、線状体 Δ FosB 発現とドーパミン系ネットワークの可塑性との関係が示唆されており、薬物依存機構解明への手掛かりとして注目されている。

また、C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) は、CREB 標的遺伝子としてアメフラシにおいて最初に着目された転写制御因子であるが、マウスにおいても記憶・学習への関与が示唆されている⁵³⁾。アメフラシ同様、哺乳類においても、C/EBPのいくつかのサブタイプ (β や δ など) が神経細胞において活動依存的な発現誘導を示し、特にC/EBP β は CRE をその遺伝子のプロモーター領域を有する⁵⁴⁾。

3. シナプス関連蛋白質

シナプス刺激後に発現誘導される遺伝子群の中には、転写・翻訳後、シナプスでの発現増強が示唆される分子の存在も明らかになっている。その例として、機能解析が最も進んでいる *Arc*, *Narp*, *Homer* について述べる。

A. Arc

Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) 遺伝子はきわめて高い発現誘導性を示し、細胞核で合成された *Arc* mRNA は樹状突起へ能動的に移行して活性化したシナプス部位に蓄積するという特徴をもつ。また *Arc* 遺伝子産物も活性化シナプス部位に蓄積することか

ら、局所蛋白質合成による産物分布制御の可能性も指摘されており、シナプス伝達効率変化の入力特異性を説明する上で魅力的な性質を備えている。ラット脳室内アンチセンス投与で *Arc* 発現を抑えると、海馬 *in vivo* LTP の保持が特異的に障害され、さらに水迷路空間学習の成立は正常だが、記憶の固定化の障害が示された⁵⁵⁾。 *Arc* 欠損マウスにおいては、LTP の異常および空間記憶課題における障害がみられるとの報告もある (Kuhlら; 北米神経科学大会発表)。さらに *Arc* はシナプス後肥厚部 (PSD) に存在し、アクチンフィラメントとの結合能をもつことから、後シナプスの活動依存的可塑性、特にスパインの形態変化などへの関与が示唆されている。

B. Narp

Narp は誘導型 pentraxin でありシナプス分泌蛋白質である。*Narp* には AMPA 受容体を凝集させる活性があることが知られており、刺激後の受容体の再配置などによるシナプス伝達変化やシナプスの新規形成などに関与している可能性が示唆されている^{56,57)}。また、*Narp* はファミリー蛋白質である NP-1 (neuronal pentraxin-1) と複合体を形成し、*Narp*/NP-1 の比により AMPA 受容体のクラスターサイズを制御している可能性が示唆されている⁵⁸⁾。

C. Homer1a/Vesl-1s

Homer/Vesl 遺伝子群は3つの関連遺伝子からなるファミリーを形成しているが、このうち神経活動により発現が調節されているのは1型遺伝子の選択的スプライシ

ング型である *Homer1a/Ves1-1s* のみである。 *Homer/Ves1* 遺伝子産物は mGluR1 または 5 に結合し、また IP₃ 受容体とも結合能をもつことから、mGluR による Ca²⁺ シグナルの調節に関与している可能性がある⁵⁹⁾。また *Homer/Ves1* は Shank との結合能も有するが、Shank は GKAP を介して PSD-95 と結合、また Cortactin を介してアクチンフィラメントと結合することから、Homer は PSD における足場ネットワークの重要な構成要員であると考えられる⁶⁰⁾。誘導型の *Homer1a/Ves1-1s* は、これらの複合体を再編成することにより神経可塑性にかかわっている可能性がある⁶¹⁾。また最近では、*Homer/Ves1* は TrpC チャンネルと結合すると結果も得られており、*Homer/Ves1* がこのカチオンチャンネルによる Ca²⁺ 流入の調節にも関与していることが示唆される⁶²⁾。

● おわりに：今後の課題

CREB は従来ホモダイマーとしての機能のみが知られていたが、最近他の転写制御因子と結合して CRE 転写活性が調節されている可能性が指摘されている。このような転写因子間の組合せにより、同じ活性化機構の意義が、たとえば細胞種特異的に、異なる場合などが容易に想定される。このような転写因子間相互作用の問題は、プロテオーム全盛の時代の新たなチャレンジであり、今後の研究の進展が大いに期待される。また最近、CREB が複数の細胞機能を支配していることが徐々に明らかになってきているが、これが CREB 下流の CBP の HAT 活性やクロマチン・リモデリング機構の状態とどのように相関しているのかも明らかにしていかなければならない。

CREB の標的候補分子は多岐にわたり、しかもその 1 つが欠けてもシナプス伝達制御に大きな支障を伴う表現型が現われる場合が多い。ところが生理的な刺激の場合、活性化された個々の神経細胞は標本内において、常に少数である。この生理的に活性化された細胞でどのような遺伝子発現が行なわれているかを突き詰めていくことが今後ますます必要であろう。

文 献

- 1) Amaral, D.G. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, 3, 225-229 (1993)
- 2) Davis, H.P., Squire, L.R. : *Psychol. Bull.*, 96, 518-559 (1984)
- 3) Steward, O., Schuman, E.M. : *Annu. Rev. Neurosci.*, 24, 299-325 (2001)
- 4) Harris, K.M., Fiala, J.C., Ostroff, L. : *Philos. Trans. R Soc.*

Lond. B Biol. Sci., 358, 745-748 (2003)

- 5) Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. : *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 821-861 (1999)
- 6) Bliss, T.V., Collingridge, G.L. : *Nature*, 361, 31-39 (1993)
- 7) Wilson, M.A., Tonegawa, S. : *Trends Neurosci.*, 20, 102-106 (1997)
- 8) Saffen, D.W., Cole, A.J., Worley, P.F., Christy, B.A., Ryder, K., Baraban, J.M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7795-7799 (1988)
- 9) Cole, A.J., Saffen, D.W., Baraban, J.M., Worley, P.F. : *Nature*, 340, 474-476 (1989)
- 10) Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E. : *Science*, 252, 1427-1430 (1991)
- 11) Dash, P.K., Karl, K.A., Colicos, M.A., Prywes, R., Kandel, E.R. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 5061-5065 (1991)
- 12) Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., Kida, S. : *Annu. Rev. Neurosci.*, 21, 127-148 (1998)
- 13) Graef, I.A., Mermelstein, P.G., Stankunas, K., Neilson, J.R., Deisseroth, K., Tsien, R.W., Crabtree, G.R. : *Nature*, 401, 703-708 (1999)
- 14) Groth, R.D., Mermelstein, P.G. : *J. Neurosci.*, 23, 8125-8134 (2003)
- 15) Graef, I.A., Wang, F., Charron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M., Crabtree, G.R. : *Cell*, 113, 657-670 (2003)
- 16) Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B., Naranjo, J.R. : *Nature*, 398, 80-84 (1999)
- 17) Tao, X., West, A.E., Chen, W.G., Corfas, G., Greenberg, M.E. : *Neuron*, 33, 383-395 (2002)
- 18) Johnson, C.M., Hill, C.S., Chawla, S., Treisman, R., Bading, H. : *J. Neurosci.*, 17, 6189-6202 (1997)
- 19) Meffert, M.K., Chang, J.M., Wiltgen, B.J., Fanselow, M.S., Baltimore, D. : *Nature Neurosci.*, 6, 1072-1078 (2003)
- 20) Tabuchi, A., Sakaya, H., Kisukeda, T., Fushiki, H., Tsuda, M. : *J. Biol. Chem.*, 277, 35920-35931 (2002)
- 21) Chen, W.G., West, A.E., Tao, X., Corfas, G., Szentirmai, M.N., Sawadogo, M., Vinson, C., Greenberg, M.E. : *J. Neurosci.*, 23, 2572-2581 (2003)
- 22) Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., Greenberg, M.E. : *Science*, 302, 885-889 (2003)
- 23) Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., Sun, Y.E. : *Science*, 302, 890-893 (2003)
- 24) Deisseroth, K., Mermelstein, P.G., Xia, H., Tsien, R.W. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, 13, 354-365 (2003)
- 25) Yin, J.C., Tully, T. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, 6, 264-268 (1996)
- 26) Chen, A., Muzzio, I.A., Malleret, G., Bartsch, D., Verbitsky, M., Pavlidis, P., Yonan, A.L., Vronskaya, S., Grody, M.B., Cepeda, I., Gilliam, T.C., Kandel, E.R. : *Neuron*, 39, 655-669 (2003)
- 27) Mantamadiotis, T., Lemberger, T., Bleckmann, S.C., Kern, H., Kretz, O., Villalba, A.M., Tronche, F., Kellendonk, C., Gau, D., Kapfhammer, J., Otto, C., Schmid, W., Schutz, G. :

- Nature Genet.*, 31, 47-54(2002)
- 28) Bito, H., Takemoto-Kimura, S. : *Cell Calcium*, 34, 425-430 (2003)
 - 29) Kida, S., Josselyn, S.A., de Ortiz, S.P., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S., Silva, A.J. : *Nature Neurosci.*, 5, 348-355 (2002)
 - 30) Bito, H., Deisseroth, K., Tsien, R.W. : *Cell*, 87, 1203-1214 (1996)
 - 31) Bito, H. : *Cell Calcium*, 23, 143-150(1998)
 - 32) Ho, N., Liauw, J.A., Blaeser, F., Wei, F., Hanissian, S., Muglia, L.M., Wozniak, D.F., Nardi, A., Arvin, K.L., Holtzman, D.M., Linden, D.J., Zhuo, M., Muglia L.J., Chatila. T.A. : *J. Neurosci.*, 20, 6459-6472(2000)
 - 33) Ribar, T.J., Rodriguiz, R.M., Khiroug, L., Wetsel, W.C., Augustine, G.J., Means, A.R. : *J. Neurosci.*, 20, RC107 (2000)
 - 34) Kang, H., Sun, L.D., Atkins, C.M., Soderling, T.R., Wilson, M.A., Tonegawa, S. : *Cell*, 106, 771-783(2001)
 - 35) Wei, F., Qiu, C.S., Liauw, J., Robinson, D.A., Ho, N., Chatila, T., Zhuo, M. : *Nature Neurosci.*, 5, 573-579(2002)
 - 36) Kimura, Y., Corcoran, E.E., Eto, K., Gengyo-Ando, K., Muramatsu, M.A., Kobayashi, R., Freedman, J.H., Mitani, S., Hagiwara, M., Means, A.R., Tokumitsu, H. : *EMBO Rep.*, 3, 962-966(2002)
 - 37) Peters, M., Mizuno, K., Ris, L., Angelo, M., Godaux, E., Giese, K.P. : *J. Neurosci.*, 23, 9752-9760(2003)
 - 38) See, V., Boutillier, A.L., Bito, H., Loeffler, J.P. : *FASEB J.*, 15, 134-144(2001)
 - 39) Alsina, B., Vu, T., Cohen-Cory, S. : *Nature Neurosci.*, 4, 1093-1101(2001)
 - 40) Hanover, J.L., Huang, Z.J., Tonegawa, S., Stryker, M.P. : *J. Neurosci.*, 19, RC40(1999)
 - 41) Korte, M., Griesbeck, O., Gravel, C., Carroll, P., Staiger, V., Thoenen, H., Bonhoeffer, T. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 12547-12552(1996)
 - 42) Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C., Kandel, E.R. : *Neuron*, 16, 1137-1145(1996)
 - 43) Kafitz, K.W., Rose, C.R., Thoenen, H., Konnerth, A. : *Nature*, 401, 918-921(1999)
 - 44) Blum, R., Kafitz, K.W., Konnerth, A. : *Nature*, 17, 687-693 (2002)
 - 45) Hall, J., Thomas, K.L., Everitt, B.J. : *Nature Neurosci.*, 3, 533-535(2000)
 - 46) Mizuno, M., Yamada, K., Olariu, A., Nawa, H., Nabeshima, T. : *J. Neurosci.*, 15, 7116-7121(2000)
 - 47) Tokuyama, W., Okuno, H., Hashimoto, T., Li, Y.X., Miyashita, Y. : *Nature Neurosci.*, 3, 1134-1142(2000)
 - 48) Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R. : *Cell*, 112, 257-269(2003)
 - 49) Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., Davis, S. : *Nature Neurosci.*, 4, 289-296(2001)
 - 50) Wei, F., Xu, Z.C., Qu, Z., Milbrandt, J., Zhuo, M. : *J. Cell Biol.*, 149, 1325-1334(2000)
 - 51) Tokuyama, W., Okuno, H., Hashimoto, T., Li, Y.X., Miyashita, Y. : *J. Neurochem.*, 81, 60-70(2002)
 - 52) Zhang, J., Zhang, D., McQuade, J.S., Behbehani, M., Tsien, J.Z., Xu, M. : *Nature Genet.*, 30, 416-420(2002)
 - 53) Taubenfeld, S.M., Wiig, K.A., Monti, B., Dolan, B., Pollonini, G., Alberini, C.M. : *J. Neurosci.*, 21, 84-91(2001)
 - 54) Niehof, M., Manns, M.P., Trautwein, C. : *Mol. Cell. Biol.*, 17, 3600-3613(1997)
 - 55) Guzowski, J.F., Lyford, G.L., Stevenson, G.D., Houston, F.P., McLaugh, J.L., Worley, P.F., Barnes, C.A. : *J. Neurosci.*, 20, 3993-4001(2000)
 - 56) O'Brien, R.J., Xu, D., Petralia, R.S., Steward, O., Haganir, R.L., Worley, P. : *Neuron*, 23, 309-323(1999)
 - 57) O'Brien, R., Xu, D., Mi, R., Tang, X., Hopf, C., Worley, P. : *J. Neurosci.*, 22, 4487-4498(2002)
 - 58) Xu, D., Hopf, C., Reddy, R., Cho, R.W., Guo, L., Lanahan, A., Petralia, R.S., Wenthold, R.J., O'Brien, R.J., Worley, P. : *Neuron*, 39, 513-528(2003)
 - 59) Xiao, B., Tu, J.C., Worley, P.F. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 370-374(2000)
 - 60) Sala, C., Piech, V., Wilson, N.R., Passafaro, M., Liu, G., Sheng, M. : *Neuron*, 31, 115-130(2001)
 - 61) Sala, C., Futai, K., Yamamoto, K., Worley, P.F., Hayashi, Y., Sheng, M. : *J. Neurosci.*, 23, 6327-6337(2003)
 - 62) Yuan, J.P., Kiselyov, K., Shin, D.M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S.H., Dehoff, M.H., Schwarz, M.K., Seeburg, P.H., Muallem, S., Worley, P.F. : *Cell*, 114, 777-789(2003)

ROCK インヒビター

—神経再生ならびに神経変性防止におけるあらたな創薬標的

ROCK inhibitors : a new drug target for nerve regeneration and for prevention of neurodegeneration



尾藤 晴彦

Haruhiko Brro

東京大学大学院医学系研究科神経生化学教室, SORST-JST

◎今日までに得られた脳神経系に関する知見を総動員して脳の機能修復・再建に結びつけようとする努力が近年めざましい。その結果、個々の神経細胞の分子治療により神経回路網損傷や神経変性による脳高次機能低下から回復する、という夢のシナリオが実現可能なレベルまで徐々に到達しつつある。本稿ではその一例として神経再生と神経変性防止のためのあらたな創薬標的として最近急速に注目を浴びつつある ROCK インヒビターを取り上げる。まず、そもそも ROCK が中枢神経系の神経形態構築においてどのような役割を果たすのかについて最近の知見を紹介する。さらに、ROCK インヒビターが、脊髄損傷モデルにおける神経再生に有効であるばかりか、Alzheimer 病モデルマウスならびにポリグルタミン凝集モデル動物における神経変性をも回復させるポテンシャルをもつという最新の知見を概説する。



Key Word Rho, ROCK, アクチン, 神経再生, 神経変性

Rho シグナル伝達系の脳高次機能における重要性

哺乳類中枢神経系における神経回路網構築はどのような制御を受けているのであろうか。ごく最近まで、この種の研究は、電子顕微鏡を用いた微細形態学¹⁾か、軸索輸送における微小管動態の解析²⁾を中心として進んできた。シナプス活動が正常に機能している生きた哺乳類中枢神経系における神経回路網再構築を調べた報告はほとんど皆無であった。

ところが、近年、ヒトにおける遺伝性の脳高次機能異常(精神遅滞、特異的認知障害など)の家系研究から、さまざまな原因候補遺伝子が同定されるようになり、これらの原因遺伝子のうちの少なからずが、神経アクチン細胞骨格制御にとって重要と考えられる分子をコードすることが示された。すなわち、*in vitro* における初代培養神経細胞におけるアクチンダイナミクスの探索こそが、実は神経回路網再編成のメカニズム解明に有効であることが示唆されたわけである。

その結果、多くのシナプス発現分子の機能解析が初代培養系で行われ、われわれのシナプス動態ならびにシナプス近傍のアクチン細胞骨格に対する理解は飛躍的に増進した。GFP-融合蛋白(たとえば GFP-アクチン)を神経細胞へ遺伝子導入する方法論が確立され、成熟した神経細胞のライブでのアクチン動態を解析することが可能となった³⁾。さらに、培養細胞技術の改良⁴⁾や cDNA 導入技術の向上など⁵⁾も加わり生きた神経細胞における細胞骨格ダイナミクス解析が飛躍的に進んだ。

それでは脳高次機能異常の原因遺伝子の蛋白質産物と目される分子は具体的にどのような神経回路網構築過程に関与するのであろうか。

知覚異常症の例としては無症候性遺伝性難聴 DFNA1 があげられる。この原因遺伝子として Rho エフェクターの mDia1 が同定されたが、疾患の発症は mDia1-C 末端スプライシング異常によることが明らかになっている⁶⁾。すなわち、内耳 Corti 器官の有毛細胞などの機能・形態に mDia1 の制御機構が関与している可能性が示されている。

また、伴性遺伝性精神遅滞の候補原因遺伝子として RhoGAP (GTPase activating protein) 活性の知られている分子である oligophrenin-1, Cdc42/Rac の下流のエフェクターである Pak3 (p21-activated kinase 3), RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor) である ARHGEF6 など同定されている⁷⁻⁹⁾。これら遺伝子の変異は明らかな身体症状をきたすことなく、おもな兆候として精神遅滞を生じる伴性遺伝の疾患である。同様に、Williams 症候群は多くの発達段階にかかわる遺伝子群の欠失により生じるが、とくに Rho 結合キナーゼ ROCK の基質となる LIMK1 遺伝子産物の欠損を含む hemizygote の患者では、視空間形成認知機能の特異的な障害が生じる^{10,11)}。この症候群ではマクロの神経回路網形成に明らかな異常を認めていない。しかし、LIMK-1 ノックアウトマウスにおいては樹状突起形成異常と神経可塑性異常が報告されている¹²⁾。

ごく最近、家族性自閉症の発症がシナプスに局在するアダプター蛋白 Neuroligin 3/4 の locus とリンケージがあることが示された¹³⁾。また、家族性統合失調症の患者で DISC-1 蛋白の欠失が報告されており、その結果、DISC-1 と種々の細胞骨格制御因子の結合が消失すると考えられている¹⁴⁾。DISC-1 と結合する因子のひとつとして樹状突起スパインに局在する Rho 結合蛋白 Citron¹⁵⁾が上げられる。

このような知見を総合すると、神経回路網がマクロ的にもミクロ的にも正しく形成され、正常な高次機能が伴うためには Rho シグナリングによる神経細胞骨格修飾・シナプス形態制御がきわめて重要な役割を果たしていることが考えられる。

Rho・ROCK シグナル伝達系の神経突起形成・伸展における役割

ここでは Rho シグナリングは具体的にどのような細胞骨格修飾のプロセスを経て神経回路網形成に関与しているのでしょうか。著者らは、最近、中枢神経細胞でありながら突起形成過程に関する細胞生物学的考察が比較的進んでいる初代培養小脳顆粒細胞を材料に、低分子 G 蛋白質 Rho に焦点を絞り、その直下のエフェクター ROCK について

軸索形成・伸展に対する関与を詳細に調べた。

神経発生初期に ROCK は中枢・末梢神経系の多くの部位に発現している。また、ROCK は、NIE-115 神経芽細胞腫細胞や PC-12 副腎褐色細胞腫細胞など神経系細胞で働き、Rho 活性化による神経突起退縮を主として担うことが確認されていた。しかし、中枢神経系の回路網形成に役立っているという証拠はまだなかった。そこで、軸索形成・軸索進展の過程に Rho あるいは ROCK シグナル伝達系の意義を解明することを試みた⁵⁾。

GFP cDNA とともに、Rho あるいは ROCK の活性変異体(ドミナントアクティブ体またはドミナントネガティブ体)を小脳顆粒細胞に培養開始と同時に強制発現させたところ、図 1 のとおりの結果が得られた。すなわち、Rho および ROCK のいずれのドミナントアクティブ体を発現しても軸索形成が有意に阻害阻害された(図 1-A)。また、Rho および ROCK のいずれのドミナントネガティブ体を発現しても軸索形成が有意に促進されて突起数が正常の 2 本から有意に増加し、双極性ニューロンの典型である小脳顆粒細胞に 3 本以上の軸索を形成させることに成功した(図 1-B)。

同様の結果は、Rho 特異的阻害活性のある C3 菌体外酵素を作用させても、また ROCK 特異的キナーゼインヒビター Y-27632¹⁶⁾を投与して再現できた。このような解析をさらに ROCK のキナーゼ基質についても行ったところ、LIM キナーゼの関与が大きいことが示唆された。

一方、神経突起形成に伴い成長円錐という突起先端の先導部分も形成される。神経突起は成長円錐を先頭に位置した形で伸展する。ROCK インヒビター Y27632 を用いて ROCK の抑制をかけると成長円錐はダイナミックに運動性を増す⁵⁾。すなわち、成長円錐の運動性は ROCK により抑制的な制御を受けていることを明らかにした。そこで、ROCK の抑制をかけ、成長円錐の運動性は増すことにより突起伸展が誘導されるか調べた。予想に反し、突起伸展が有意に増大しないことから、突起伸展には他のメカニズムが作用していることが考えられた。

そこで著者らは、Rho の別の標的分子が突起伸展に正の制御をかける可能性を探索したところ、

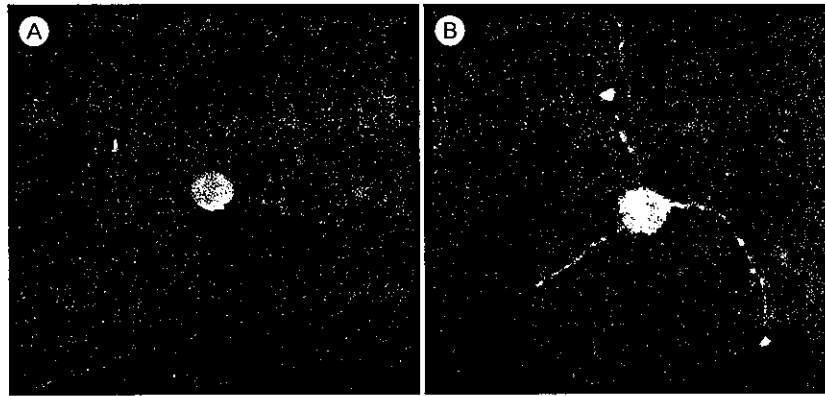


図 1 神経突起形成における ROCK の役割
A : ROCK 活性化型変異体, B : ROCK 抑制型変異体

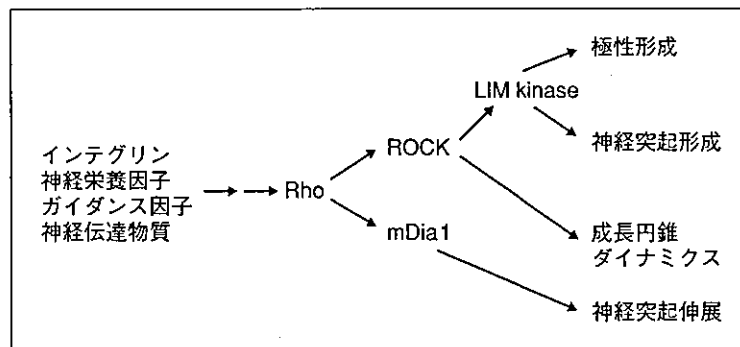


図 2 Rho/ROCK 伝達系による神経細胞形態制御

mDia1 という標的分子が突起伸展の正の制御因子となることを裏づける知見を得た¹⁷⁾。このような知見から神経突起形成のステップに引き続き、神経突起伸展が着実に制御されるメカニズムが存在し、低分子 G 蛋白 Rho ファミリーの活性の on-off とこれに伴う ROCK 活性の緻密な制御がこれらの移り代りに不可欠であることが推察される(図 2)。

Rho シグナル伝達系制御に基づく 神経再生への応用

これらの実験事実を総合すると、神経回路網形成の初期に、ある種の神経細胞では Rho/ROCK シグナル伝達系と Rho/mDia1 シグナル伝達系とが協調して突起形成・伸展の制御に関与しているといえる。これらの事実は Rho シグナルの人為的修飾により突起伸展を障害後に誘導・制御するというあらたなアプローチの可能性を示唆するものである。そのような試みはすでにアメリカでは実際にはじまりつつある。

McKerracher らは、脊髄損傷後に脊髄における低分子量 G 蛋白 Rho の活性が持続的に上昇することを見出した¹⁸⁾。この上昇は MAG や Nogo-66 など神経損傷後の軸索再生を抑制する諸因子が p75NGFR を介して引き起こされると現在考えられている¹⁹⁾。そこで McKerracher らはマウス胸髄損傷モデルを用い、脊髄切断後早期に Rho 活性の持続相を遮断するため、ボツリヌス由来菌体外酵素 C3 の誘導体を *in vivo* 投与し Rho 活性を低下させた。すると、投与後 1 カ月後、再生軸索長の著しい延長を認めた。非投与群では再生線維の最大長が 0.3 mm 未満であったのに対し投与群では平均 6 mm、最大 12 mm までの軸索再生を得た。また、同じ系で ROCK インヒビター Y-27632 を局所投与したところ、やはり平均 2 mm 程度の軸索再生を得ることに成功した²⁰⁾。さらに、これと並行して行った行動テストにおいて運動能の著しい回復が観察された。

一方、ラット胸髄切断モデルを用いた Strittmatter らは、C3 持続投与時には切断部位の創傷治癒