

However, no clear transport activities associated with these proteins have been demonstrated. It should be noted that although not related to an intrinsic function of SV2s, they have been shown to function as a protein receptor for botulinum neurotoxin A.

### Proteins for Membrane Trafficking

Neural exocytosis is a tightly regulated process elicited by a rapid increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Since  $\text{Ca}^{2+}$  ions induce neurotransmitter release within 100  $\mu\text{s}$ , a series of complex enzymatic reactions could not be expected for exocytosis within the short time frame. Thus, SVs that undergo exocytosis not only should be docked but also primed for membrane fusion, waiting for the final stimulus for exocytosis. Two abundant integral membrane proteins on SVs, synaptobrevin (also referred as to VAMP2) and synaptotagmin 1, have been established as the most important players in  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis. Furthermore, SVs contain two abundant peripheral protein families, rab-GTPases and synapsins, which are implicated in the modulation of vesicle pools.

Synaptobrevin is a small integral membrane protein that contains a SNARE motif and is thus called a v-SNARE (vesicular SNARE, also referred to as R-SNARE because of a conserved arginine in the middle of the SNARE motif). Synaptobrevin forms a tight four-helix bundle, the SNARE complex, with two other SNARE proteins at the plasma membrane – syntaxin 1 and SNAP-25 (t-SNAREs named after target-SNAREs; also referred as to Q-SNARE, which has a conserved glutamine in the middle of the SNARE motif). The SNARE hypothesis regarding membrane fusion in general proposes that the assembly and tight complex formation of appropriate pairs of SNARE proteins pulls the two membranes close together so that the two membranes become competent for fusion. Analogously, SVs become ‘primed’ when synaptobrevin forms the SNARE complex with syntaxin 1 and SNAP-25. The importance of SNARE proteins in neuronal exocytosis is emphasized by the fact that the clostridial neurotoxins, a family of metalloproteases which specifically cleave the neuronal SNARE proteins, abolish  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent neurotransmitter release while the docked vesicles remain unchanged by the toxin treatment. The formation of the SNARE complex is affected by other binding factors of the SNARE proteins. For instance, it has been proposed that Munc18 protein binds to syntaxin, keeping the syntaxin molecule in a close conformation and thereby preventing syntaxin from forming the SNARE complex. Biochemical experiments using the SNARE-reconstituted proteoliposomes suggest that the SNARE complex indeed mediates

membrane fusion. However, the liposome fusion with SNAREs alone is slow and spontaneously occurs without any regulation, indicating that other factors might play a role in synchronizing the fusion reaction.

Synaptotagmin 1 is known as a vesicular  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for exocytosis that accomplishes rapid membrane fusion in response to  $\text{Ca}^{2+}$  ions. It has an N-terminal highly glycosylated intravesicular domain and two cytoplasmic  $\text{C}_2$  domains that interact with  $\text{Ca}^{2+}$  ions.  $\text{Ca}^{2+}$ -triggered exocytosis in synaptotagmin 1-deficient neurons is severely impaired, indicating its role as the  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for exocytosis. The affinity of  $\text{C}_2$  domains of synaptotagmin 1 for  $\text{Ca}^{2+}$  ions is very low, but it increases dramatically (up to 0.5–5.0  $\mu\text{M}$ ) when the  $\text{C}_2$  domains bind to phospholipids. Its apparent affinity to  $\text{Ca}^{2+}$  meets the requirement that it should have a  $\text{Ca}^{2+}$  concentration sufficient for triggering exocytosis *in vivo* (in the calyx of Held or in chromaffin cells). However, investigations of synaptotagmin 1-deficient neurons and chromaffin cells have suggested that synaptotagmin 1 is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor only for the fast, synchronous exocytosis and not for the slow, asynchronous component. It is not clear if other synaptotagmin isoforms (at least 15 members in mammals which differ in affinity to  $\text{Ca}^{2+}$  and subcellular localizations) function as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for the latter.

Rab proteins are known to be involved in a variety of intracellular membrane trafficking events. Among the Rabs, Rab3A, Rab5, and Rab11 are abundant isoforms on SVs. They associate with SVs in the GTP-bound forms, whereas they dissociate from SVs in the GDP-bound state. The association and dissociation cycle of Rab3A occurs in parallel with SV exocytosis, although Rab proteins are not directly involved in exocytosis or membrane fusion. In Rab3A-deficient neurons, some forms of synaptic plasticity, such as long-term potentiation in hippocampal mossy fibers, are affected, indicating that Rab3A modulates the efficacy of neurotransmission, probably by changing the vesicle pools available for exocytosis.

In addition to Rab proteins, the synapsin family represents abundant peripheral membrane proteins which may interact with SVs in an activity-dependent manner. The synapsin family consists of five isoforms (I/IIA, IIB, IIIA, and IIIB) and they form homo- or heterodimer on the surface of SVs. Originally, it was discovered as a neuron-specific abundant protein substrate for the cyclic AMP-dependent protein kinase (protein kinase A) at presynaptic terminals. Their function in synaptic transmission remains unclear. It has been proposed that synapsins function as an anchoring protein to cytoskeleton components to make a portion of vesicles immobile because they exhibit a binding property to actin, tubulin, and spectrin. Such a view is partially supported by the fact that although

Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis is intact, short-term synaptic plasticity is impaired in the absence of synapsin 1 and 2. Therefore, synapsins might play a modulating role in controlling the vesicle pools at the terminals.

### Conclusion

Although significant progress has been made in understanding molecular mechanisms of neurotransmitter release, a mechanistic understanding of SVs is yet to be achieved. Until recently, even elementary quantitative information about SV components was lacking. Quantitative analyses of SV proteins and lipids have allowed, for the first time, the proposal of a structural model of an average SV shown in Figure 3(b). The model demonstrates that SVs are highly decorated with proteins. Numerous copies of the essential proteins for exocytosis, such as synaptobrevin and synaptotagmin, are present on a vesicle indicating that the surface densities of these proteins are not rate limiting for fusion. Furthermore, SVs contain large numbers of the neurotransmitter transporter, supporting a high-speed refilling of the vesicles upon strong repetitive stimulations. One exception among the essential proteins is the V-ATPase, which is estimated to have one or two copies per vesicle, further indicating that the retrieval of SV constituents by endocytosis has to be guaranteed by precise processes.

More studies are needed to explore the structure–function relationships of each SV constituent to understand the function of this intriguing organelle.

*See also:* Active Zone; Endocytosis: Kiss and Run; Exocytosis: Ca<sup>2+</sup>-Sensitivity; Fusion Pore; Large Dense Core Vesicles (LDCVs); NSF and SNAPs; Rab3; SNAREs; Synapsins; Synaptotagmins; Vesicle Pools; Vesicular Neurotransmitter Transporters.

### Further Reading

- Becherer U and Rettig J (2006) Vesicle pools, docking, priming and release. *Cell and Tissue Research* 326: 393–407.
- Bononomi D, Benfenati F, and Valtorta F (2006) Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle. *Progress in Neurobiology* 80: 177–217.
- Fernandez-Chacon R and Sudhof TC (1999) Genetics of synaptic vesicle function: Toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annual Review of Physiology* 61: 753–776.
- Jahn R (2004) Principles of exocytosis and membrane fusion. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1014: 170–178.
- Montecucco C, Schiavo G, and Pantano S (2005) SNARE complexes and neuroexocytosis: How many, how close? *Trends in Biochemical Sciences* 30: 367–372.
- Rissoli SO and Betz WJ (2005) Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 57–69.
- Sudhof TC (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* 27: 509–547.
- Takamori S, Holt M, Stenius K, et al. (2006) Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831–846.

**PNE**  
PROTEIN,  
NUCLEIC ACID  
AND ENZYME  
**蛋白質核酸酵素**

別刷

「蛋白質 核酸 酵素」編集部

共立出版株式会社

〒112-8700 東京都文京区小日向 4-6-19

Tel.03-3947-2515 FAX 03-3944-8182

E-mail : pne@kyoritsu-pub.co.jp

<http://www.kyoritsu-pub.co.jp/>

# SNARE 蛋白質が媒介するシナプス小胞エキソサイトーシスの分子メカニズム

Molecular mechanisms of SNARE-mediated synaptic vesicle exocytosis

高森茂雄

シナプス前終末からの神経伝達物質の放出は、シナプス小胞膜と細胞膜の膜融合—エキソサイトーシス—によって起こる。この過程は、時間的かつ空間的に精密な制御のもとで行われており、生体膜融合の基本原理解やその調節機構を理解するための格好のモデルとして研究されてきた。実際、膜融合の基本素子である SNARE 蛋白質群が初めて同定されたのもシナプスであり、近年の研究の発展により、SNARE 蛋白質とその相互作用分子群が体现するシナプス小胞エキソサイトーシスの分子メカニズムが徐々に明らかになってきた。

**Key words** ○シナプス小胞 ○神経伝達 ○SNARE ○Ca<sup>2+</sup>センサー

## はじめに

神経細胞のシナプス終末からの神経伝達物質の放出—シナプス小胞のエキソサイトーシス—は、時間的にも空間的にも厳密に制御された反応である。電気的な信号がシナプス終末に到達すると、神経伝達物質を含むシナプス小胞膜と細胞膜の融合が 1 ms 以内に起こり、小胞に蓄えられた神経伝達物質が放出される。シナプス小胞のエキソサイトーシスは、シナプス前細胞膜のなかでも非常に限られたアクティブゾーンとよばれる領域でのみ起こるといふ特徴をもつ。あらゆる細胞膜融合反応のなかで最も迅速な「刺激-反応カップリング」を実現するためには、エキソサイトーシスの最終段階において、比較的時間を要する酵素反応あるいは複雑な蛋白質間相互作用のカスケードの存在は想定し難い。エキソサイトーシスに動員されるシナプス小胞は、前もって細胞膜と物理的に接着した融合可能な状態（プライミングとよばれる）で刺激の到達に備えていることが予想され、膜融合装置の核となる SNARE 蛋白質複合体がすでに形成されていると考えるのが妥当であろう。エキソサイトーシスを最終的に喚起するのは、電気刺激の到達に伴う細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇である。流入した Ca<sup>2+</sup>は、シナプス小胞膜に存在する Ca<sup>2+</sup>センサーであるシナプトタグミンに作用する

ことで、エキソサイトーシスを促す（図 1）。本稿では、エキソサイトーシスの迅速かつ緻密な制御過程における SNARE 蛋白質および SNARE 結合蛋白質の機能に関して、最近の知見を含めて概説する。

## I SNARE 蛋白質による膜融合の原理

Rothman は、ゴルジ装置膜間の小胞輸送に必須な細胞質蛋白質として、*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) と soluble NSF attachment protein (SNAP) を同定した<sup>1)</sup>。一連の研究結果から、これらの可溶性蛋白質は、2つの対峙した生体膜上に存在する受容体である SNARE (SNAP receptor) 蛋白質と相互作用することで、膜の融合を促すと考えた。そこで、Rothman らはウシ脳を生体材料とした SNARE 蛋白質の精製を試みた結果、意外にもわずか4つの蛋白質のみが同定された<sup>2)</sup>（図 2a）。興味深いことに、同定された蛋白質4つはすべてシナプス終末に豊富に存在する蛋白質で、その内訳は、シナプス小胞膜に存在するシナプトプレビン2、シナプス終末の細胞膜に存在するシンタキシン1（2つのイソ型）と SNAP-25であった（図 2a）。これより Rothman は、SNARE 蛋白質が融合する双方の膜表面に分かれた状態で存在し、これらの蛋白質が複合体を形成することにより、相対した膜間の距離を縮め、その結果として膜融合を促すとする、いわゆる「膜融合の SNARE 仮説」を提唱した<sup>2)</sup>。この仮説では、2つの膜の一方を小胞 (vesicle)、他方を平坦な細胞膜 (target) と想定し、それらの膜に存在する

Shigeo Takamori

東京医科歯科大学 脳統合機能研究センター

E-mail: taknuro@tmd.ac.jp

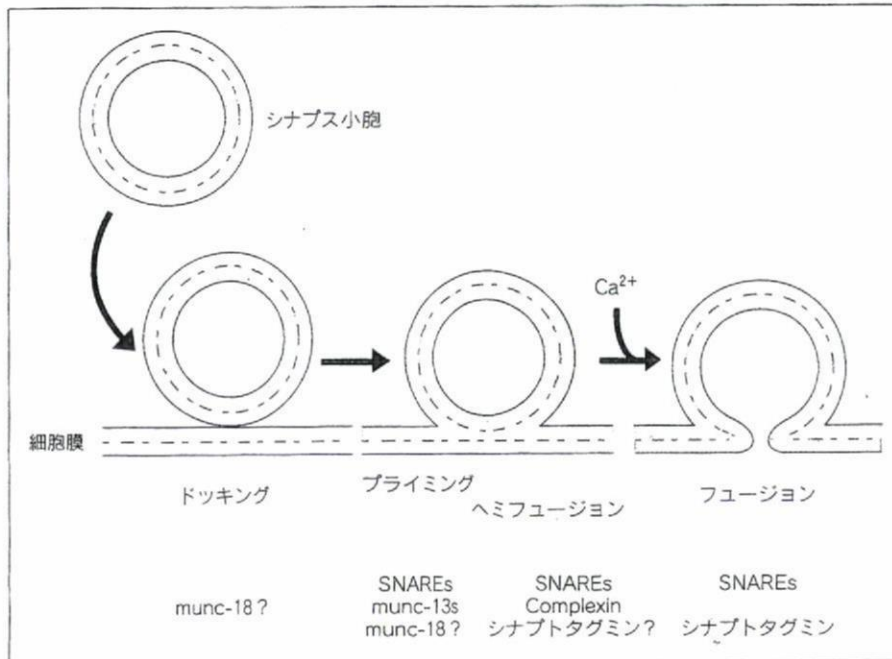


図1 シナプス小胞のエキソサイトーシス

神経伝達物質を充填したシナプス小胞は、細胞膜へと移動し、物理的に接着する(ドッキング)。次に、シナプス小胞膜と細胞膜が  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に即座に反応できる状態(プライミングおよびヘミフュージョン)になる。活動電位に伴う  $Ca^{2+}$  チャンネルの開口により、細胞外  $Ca^{2+}$  が細胞内に流入し、小胞膜と細胞膜の融合(フュージョン)を促し、シナプス小胞内腔に蓄えられた神経伝達物質が細胞外に放出される。

SNARE 蛋白質をそれぞれ、v-SNARE, t-SNARE と名づけた。ほとんど同時期に、これらシナプスの SNARE 蛋白質群は、シナプスからの神経伝達物質放出を阻害する神経毒であるボツリヌス菌毒素や破傷風毒素の標的基質であることがわかり<sup>3-5)</sup>、神経伝達物質放出過程における神経 SNARE 蛋白質群の機能的な重要性がさらに明確になった。後の研究で、細胞内膜系の小器官は、神経 SNARE 蛋白質に類似した異なる SNARE 蛋白質のセットをもっており、SNARE 蛋白質は機能的膜融合に必須の分子装置として機能していることが示唆されている<sup>6)</sup>。

シナプス小胞のエキソサイトーシスにおける SNARE 仮説の検証を加速させたのは、SNARE コア複合体の蛋白質結晶構造解析の結果である<sup>7)</sup>。解かれた結晶構造から、シナプトプレビン、シタキシンが、それぞれ1つの SNARE モチーフを、SNAP-25 は2つの SNARE モチーフをもっており、合計4つの SNARE モチーフの  $\alpha$  ヘリックスが束状になって、更なるヘリックス構造を形成することが明らかにされた(図2b)。また、4つの SNARE モチーフが形成する束状構造の中央(0-layer)には、シナプトプレビンのアルギニン残基(R)が、シタキシン、SNAP-25 のグルタミン残基(Q)が存在し、これらの0-layer に存在する残基は、SNARE ファミリー蛋白質を通じて保存されていることから、v-SNARE, t-SNARE という分類に加えて、SNARE 複合体構造に基づいた R-SNARE, Q-SNARE という分類が提唱された<sup>8)</sup>。実際、

SNARE 依存的な膜融合過程において、SNARE 複合体中の R-SNARE と Q-SNARE の構成比が重要であることを示唆する報告もある<sup>9)</sup>。これらの構造から、膜融合にかかわる SNARE 蛋白質は、それぞれの N 末端側を同側に位置させ、複合体形成時には N 末端から C 末端にかけて、ちょうどファスナーを閉じるような格好で強固な複合体を形成することによって、両側の膜を近づけ、膜融合を喚起すると考えられている(zippering モデル: 図2c)<sup>6)</sup>。

Rothman らは、SNARE 複合体の形成が膜融合自体を媒介しているかどうかを検証するために、SNARE 蛋白質を人工脂質二重膜に再構成し、膜融合を継時的に計測する実験法を確立した<sup>10)</sup>。すなわち、濃度依存的に蛍光を発する色素を一方のリボソームにのみ加え、もう一方のリボソームと混合させ、膜融合進行に伴うシグナル変化を検出できる実験系である。その結果、一方に v-SNARE、他方に t-SNARE を再構成した組合せのみで、膜融合の顕著な促進が観察された<sup>10)</sup>。しかしながら、この実験系から得られた結果より、2つの重大な疑問が示された。第一に、この実験系における膜融合反応が非常に遅いことである。シナプス小胞のエキソサイトーシスがミリ秒の間に起こる迅速な反応であるのに対して、SNARE 蛋白質のみの再構成で観測される膜融合反応は、分単位で起こる遅い反応として観測され、しかもプラトーに達しない。第二に、この反応が  $Ca^{2+}$  の影響を受けないことである(後述 II, III 項参照)。要するに SNARE 複合体は、膜融合を促進す

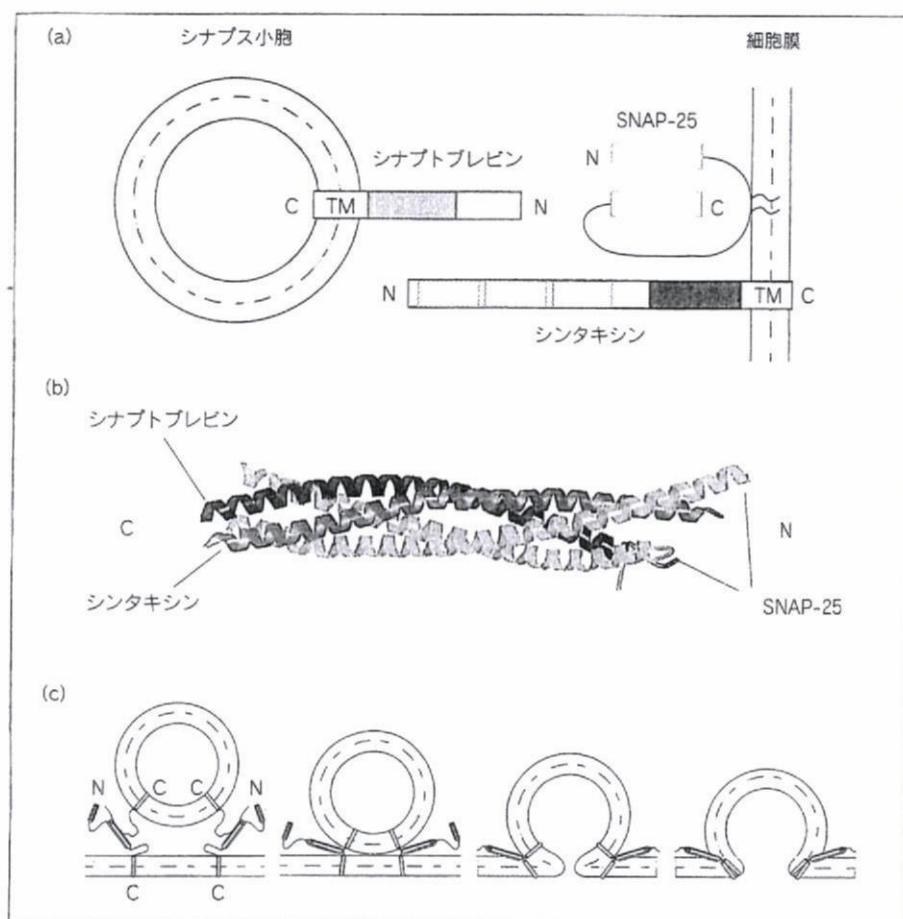


図2 シナプス小胞エキソサイトーシスを支える SNARE 蛋白質

(a) 神経エキソサイトーシスをつかさどる SNARE 蛋白質。シナプス小胞に v-SNARE (シナプトプレビン2)、細胞膜に t-SNARE (シンタキシン1と SNAP-25)が発現している。  
 (b) SNARE 複合体の蛋白質構造。  
 (c) SNARE 依存的膜融合の zippering モデル。

ることができるが、SNARE 複合体の形成だけでは、シナプス小胞のエキソサイトーシスに見られるスピードと制御機構を説明できないというわけである。

最近、SNARE 依存的膜融合アッセイにおけるスピードの問題に関して、SNARE 複合体の形成速度自体が律速段階であることを示唆する興味深い実験結果が示された<sup>11)</sup>。以前より、3つの SNARE 蛋白質が複合体を形成するときには、まず t-SNARE であるシンタキシン1/SNAP-25=2:1 複合体が中間体として存在し、1つのシンタキシン1が v-SNARE であるシナプトプレビン2によって置換されることにより、SNARE 複合体が形成されると考えられていた<sup>12)</sup>。Pobbatiらによれば、このシンタキシン1/SNAP-25/シナプトプレビン C 末端 (アミノ酸 60-96) 複合体を形成させ、その状態にシナプトプレビン2を添加すると、SNARE 複合体形成速度が大幅にアップするという。また、この状態をリボソーム融合測定系で再現させると、通常の t-SNARE リボソームと v-SNARE リボソームの組合せに比べて、20 倍速い膜融合反応が観察された<sup>11)</sup>。この結果は、シナプスで起こると同程度の速いエキソサイトー

ーシスを SNARE 蛋白質複合体のみで媒介できることを示すのみならず、生体内での迅速な SNARE 蛋白質複合体形成が可能となるためにはシンタキシン1/SNAP-25が1:1の割合で結合した中間体複合体を保持するような、何らかの分子メカニズムが存在することをも示唆している。別のいい方をすれば、生体内にはシンタキシン1/SNAP-25=2:1 複合体の形成を阻害する因子が存在することを示唆するともいえる。シナプス小胞エキソサイトーシスにおけるプライミング因子、あるいは、ドッキング因子と考えられている munc18/munc13 や、SNARE 結合蛋白質である Complexin が、このような役割を果たしているのかもしれない (Ⅲ項参照)。

SNARE 仮説については、線虫、ショウジョウバエ、マウスの欠損動物を用いた *in vivo* での検証も盛んに行われており、SNARE 蛋白質群が、シナプス小胞のドッキング以降の膜融合に必須であることが大方受け入れられている<sup>6)</sup>。しかしながら、シナプトプレビン2ノックアウト (KO) マウス (Syb-2 KO) や SNAP-25 KO マウスでは、Ca<sup>2+</sup> 依存的な神経伝達物質の放出は顕著に阻害される

が<sup>13-16</sup>、自発的シナプス放出は残存する (Syb-2KO)<sup>13-15</sup>か、もしくは促進される (SNAP-25KO)<sup>16</sup>ことがわかっている。さらに、シナプキシン1KOマウスでは、シナプス伝達に目立った変化がない<sup>17</sup>。これらのKOマウスでの不可解な実験結果は、おそらく他のSNARE蛋白質イソ型が機能補填している状況を反映していると考えられる。事実、Syb-2KOマウス由来のクロマフィン顆粒細胞からのドーパミン放出は、Syb-2KOでは野生型と区別がつかないが、シナプトプレビン-3 (セルプレビン) とのダブルKOマウスでは、ドーパミンの放出はほぼすべて消失するという実験結果がそれを支持している<sup>18</sup>。KOマウスを用いたSNARE機能解析は、このようなイソ型によるコンペーンション機構を無視できず、単純かつ明快な結論に至らないケースが多々ある。

最近、シナプトプレビン2/セルプレビンダブルKOマウス由来のクロマフィン顆粒細胞のエキソサイトーシスを用いたレスキュー実験から、SNAREモチーフと膜間の距離がエキソサイトーシス時の膜融合ダイナミクスに直接影響を与えることが示された<sup>19</sup>。

以上に挙げた研究成果から、SNAREコア蛋白質複合体が、シナプスでのエキソサイトーシスに中心的かつ必須な役割を果たすことは明白であるが、個々のSNARE蛋白質やSNARE複合体に相互作用するさまざまな蛋白質群がいかに関与しているのかは、いまだ不明な点が多い。

## II シナプトタグミン:エキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>センサー

シナプス小胞のエキソサイトーシスが、他の膜融合反応と最も異なる点は、そのスピード以外に、「厳密なCa<sup>2+</sup>依存性」が挙げられる。上記のように、精製SNARE蛋白質を再構成したりボソーム融合アッセイにおける膜融合反応はCa<sup>2+</sup>非依存的な反応であることから、エキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>依存性をつかさどる分子はSNARE蛋白質以外に存在する。エキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>センサー分子として古くから候補に挙げられている小胞膜蛋白質が、シナプトタグミンである<sup>20,21</sup>。哺乳類には、少なくとも15種類のイソ型の存在が知られているが、中枢神経系で最も豊富に存在するのは、シナプトタグミン1とシナプトタグミン2である<sup>22</sup>。シナプトタグミンは、N末端側のN型糖鎖を含めて、分子量約65Kの膜1回貫通

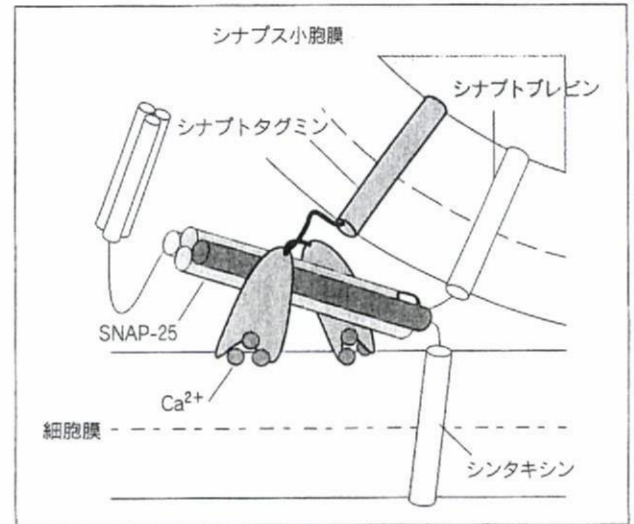


図3 シナプス小胞エキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>センサー: シナプトタグミンの機能の概念図

型蛋白質で、C末端側にCa<sup>2+</sup>結合能を有する2つのC2部位 (C2A, C2B 部位) をもっている。また、シナプトタグミン1の細胞質側部分は、Ca<sup>2+</sup>依存的に酸性リン脂質 (ホスファチジルセリンなど) を含む脂質二重膜に結合し、脂質二重膜のdeformationを促すことが知られている<sup>23,24</sup> (図3)。

シナプトタグミンがシナプス小胞のエキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>センサーであることを示唆する最たる証拠は、シナプトタグミン欠損動物で、Ca<sup>2+</sup>に反応する速いエキソサイトーシス (同調成分) が消失することである<sup>25</sup>。しかしながら、シナプトタグミン1KOマウス由来の海馬神経初代培養細胞では、遅いエキソサイトーシス成分 (非同調成分) が残存するのみならず、Ca<sup>2+</sup>に反応するグルタミン酸の総放出量は野生型との間に有意な差が認められないことから、シナプトタグミン1はエキソサイトーシスのCa<sup>2+</sup>センサーというよりも、エキソサイトーシスをCa<sup>2+</sup>刺激に同期させる因子にすぎないとする見解が生まれており<sup>26,27</sup>、Ca<sup>2+</sup>センサーの定義の問題も含めて熱い議論が展開中である。

シナプトタグミンがCa<sup>2+</sup>依存的エキソサイトーシス過程に重要な役割を果たしているのは、上記のように明らかであるが、一方で、同じくシナプトタグミン欠損動物を用いた研究から、シナプトタグミンがSNARE依存的膜融合反応に阻害的にはたらく「留め金役」を担っている可能性も示唆されている<sup>28-30</sup>。このモデルは、ショウジョウバエのシナプトタグミン変異体の神経-筋接合部で

は、自発的神経伝達物質放出の頻度が亢進しているという実験結果に基づいているが、用いる変異体種や実験対象とするシナプスにより結果が異なることもあり<sup>31,32</sup>、結論は出ていない。この点に関しては、次項に概説する Complexin という蛋白質の機能も加味した巧妙な分子メカニズムも提唱されている。

「シナプトタグミン=エキソサイトーシスの  $Ca^{2+}$  センサー説」は、再構成系を用いた SNARE 依存的膜融合アッセイによっても支持されている。初期の実験では、膜貫通部位を含むシナプトタグミンをシナプトプレビンとともにリボソームに再構成すると、確かに膜融合の促進が見られるものの、驚いたことに、この促進作用は  $Ca^{2+}$  非存在下でも起きた<sup>33</sup>。その後、膜貫通部位を欠いた組換えシナプトタグミン IC2 部位を添加すると、 $Ca^{2+}$  非存在下では SNARE 依存的膜融合を抑制し、 $Ca^{2+}$  存在下では顕著に膜融合反応を促進することが明らかになった<sup>34</sup>。この2つの効果は、シナプトタグミン1 変異ショウジョウバエで観察された自発的放出頻度の亢進と、 $Ca^{2+}$  応答性の低下という現象を反映していると考えられる。今後、再構成実験を含めたさまざまなアッセイ系を組み合わせることにより、シナプトタグミン・ $Ca^{2+}$ /脂質二重膜/SNARE 蛋白質の相互作用が、いかにして迅速なエキソサイトーシスを可能にしているのか、また、他の蛋白質や  $Ca^{2+}$  以外の因子がかかわっているのかが明らかになってくると期待される。

### III Complexin : SNARE 依存的膜融合反応の留め金役?

定常状態で SNARE 依存的膜融合反応を阻害する因子として、最近脚光を浴びているのが Complexin である。Complexin は、シタキシン1 抗体の免疫沈降産物として同定され、SNARE コア複合体と 1:1 で強く結合する分子として知られていた<sup>35,36</sup>。SNARE コア複合体、すなわち Complexin の 1:1 複合体の構造が解かれ、Complexin は、SNARE コア複合体の4ヘリックス束の一部に埋め込まれる形で結合している様子がとらえ

られた<sup>37</sup>。Complexin の生理機能は、いまだに判然としていない。たとえば、Complexin を PC12 細胞に過剰発現させると、 $Ca^{2+}$  依存性のエキソサイトーシスが阻害されることから<sup>38,39</sup>、Complexin は SNARE 依存的開口放出のネガティブ制御因子であると考えられる。一方で、Complexin I / II ダブル KO 由来の海馬神経細胞でも、 $Ca^{2+}$  濃度依存的にエキソサイトーシスの低下が見られることから、ポジティブ因子の可能性もあり、Complexin のエキソサイトーシスにおける機能は相矛盾する結果を抱えたままであった<sup>40</sup>。最近になって、Complexin が SNARE 依存的膜融合反応の「留め金」の役割をしているとともに、この留め金はシナプトタグミン1・ $Ca^{2+}$  の作用で解除される可能性を示唆する報告が相次いでなされた<sup>41-43</sup> (図4)。Schaub らは、人工脂質二重膜の外層と内層の混合度を個別に感知できるように改良された SNARE 依存的リボソーム膜融合アッセイ系に Complexin を加えると、内層の膜融合のみが特異的に阻害されることを報告した。つまり、Complexin は、すでに形成された SNARE 複合体に結合することで、膜の外側のみが融合している状態に保つ役割を果たしている (ヘミフュージョン状態とよぶ)。興味深いことに、Complexin によってヘミフュージョンに保持された状態に、シナプトタグミンの可溶性部位を加えると、カルシウム依存的に急速な二重膜の完全融合が引き起こされることが示された<sup>41</sup>。また、Giraudo らは、細胞表面に SNARE 蛋白質を発現させた細胞融合アッセイ系を用いて、Complexin による SNARE 依存的膜融合の阻害と、シナプトタグミン可溶部位・ $Ca^{2+}$  添加による Complexin の阻害解除を見いだした<sup>42</sup>。Tang らは、同様のコンセプトで神経細胞における Complexin の機能に迫り、SNARE コア複合体への Complexin の結

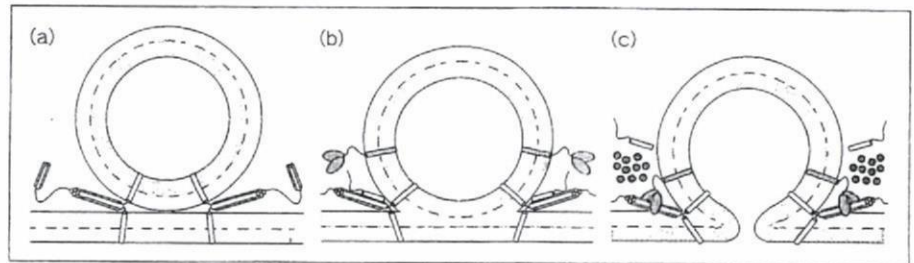


図4 Complexin による SNARE 依存的膜融合の阻害とシナプトタグミン・ $Ca^{2+}$  による解除

シナプス小胞と細胞膜の間で SNARE 複合体が形成される (a) と、複合体に Complexin が結合し、ヘミフュージョンの状態が維持される (b)。この状態で  $Ca^{2+}$  濃度が上昇すると、シナプトタグミンが Complexin と置換され (c)、シナプトタグミンによる膜融合が促進される。



合には、Ca<sup>2+</sup>依存的にシナプトグミンが競合する (Complexin と置換する) ことのみならず、シナプトプレビン-Complexin 融合蛋白質を神経細胞に過剰発現させると、同調放出が選択的に阻害されることを発見した<sup>43)</sup>。この現象は、シナプトグミン1KO 神経細胞で見られる特徴と似ていることは興味深い。よって、Tangらは、Complexin はSNARE コア複合体に結合することにより、SNARE 依存的膜融合を「準安定化」状態に留める役割を果たし、その状態にCa<sup>2+</sup>が作用すると、シナプトグミンがComplexin をSNARE コア複合体から排除し、速いエキソサイトosisが喚起されるとするモデルを提唱した<sup>43)</sup>。詳細な分子メカニズムは、今後の更なる研究を待たなければならないが、このモデルにより、神経細胞におけるSNARE 蛋白質依存的膜融合の厳密なCa<sup>2+</sup>依存性と、Ca<sup>2+</sup>即応性を実現する分子メカニズムを説明できるので、大変興味深い。

## おわりに

膜融合のSNARE 仮説の提唱から、現在までに明らかになったシナプスにおけるエキソサイトosis研究の主要な発見を概説した。SNARE を取り巻く周辺環境は、非常に混雑しており、本稿で紹介しきれなかったさまざまな分子 (munc18, tomosyn, アクティブゾーン蛋白質など) が相互作用することで、エキソサイトosisを修飾している。この領域の研究は、他の分野に漏れず、すでにポストゲノム時代に突入している。エキソサイトosisの分子メカニズムの全貌解明のためには、分子生物学・生化学手法を基盤として、生物物理学的測定法や最新のイメージング技術など、さまざまなアプローチを組み合わせた学際領域の創成が不可欠である。今後とも、メンブレントラフィックコミュニティーの存在が、分野を跨いだ研究者間の交流を促進するものであることを期待したい。

## 文 献

1) Clary, D. O. *et al.* : *Cell*, 61, 709-721 (1990)  
 2) Sollner, T. *et al.* : *Nature*, 362, 318-324 (1993)  
 3) Jahn, R., Niemann, H. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 733, 245-255 (1994)

4) Yamasaki, S. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200, 829-835 (1994)  
 5) Montecucco, C., Schiavo, G. : *Trends Biochem. Sci.*, 18, 324-327 (1993)  
 6) Jahn, R., Scheller, R. H. : *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 631-643 (2006)  
 7) Sutton, R. B. *et al.* : *Nature*, 395, 347-353 (1998)  
 8) Fasshauer, D. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15781-15786 (1998)  
 9) Ossig, R. *et al.* : *EMBO J.*, 19, 6000-6010 (2000)  
 10) Weber, T. *et al.* : *Cell*, 92, 759-772 (1998)  
 11) Pobbati, A. V. *et al.* : *Science*, 313, 673-676 (2006)  
 12) Fasshauer, D., Margittai, M. : *J. Biol. Chem.*, 279, 7613-7621 (2004)  
 13) Sweeney, S. T. *et al.* : *Neuron*, 14, 341-351 (1995)  
 14) Deitcher, D. L. *et al.* : *J. Neurosci.*, 18, 2028-2039 (1998)  
 15) Schoch, S. *et al.* : *Science*, 294, 1117-1122 (2001)  
 16) Washbourne, P. *et al.* : *Nat. Neurosci.*, 5, 19-26 (2002)  
 17) Fujiwara, T. *et al.* : *J. Neurosci.*, 26, 5767-5776 (2006)  
 18) Borisovska, M. *et al.* : *EMBO J.*, 24, 2114-2126 (2005)  
 19) Kesavan, J. *et al.* : *Cell*, 131, 351-363 (2007)  
 20) Perin, M. S. *et al.* : *Nature*, 345, 260-263 (1990)  
 21) Brose, N. *et al.* : *Science*, 256, 1021-1025 (1992)  
 22) Sudhof, T. C. : *J. Biol. Chem.*, 277, 7629-7632 (2002)  
 23) Bai, J. *et al.* : *Neuron*, 41, 929-942 (2004)  
 24) Martens, S. *et al.* : *Science*, 316, 1205-1208 (2007)  
 25) Geppert, M. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 266, 13548-13552 (1991)  
 26) Yoshihara, M., Littleton, J. T. : *Neuron*, 36, 897-908 (2002)  
 27) Nishiki, T., Augustine, G. J. : *J. Neurosci.*, 24, 6127-6132 (2004)  
 28) Popov, S. V., Poo, M. M. : *Cell*, 73, 1247-1249 (1993)  
 29) Littleton, J. T. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10888-10892 (1994)  
 30) DiAntonio, A., Schwarz, T. L. : *Neuron*, 12, 909-920 (1994)  
 31) Broadie, K. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10727-10731 (1994)  
 32) Okamoto, T. *et al.* : *J. Neurophysiol.*, 94, 1574-1586 (2005)  
 33) Mahal, L. K. *et al.* : *J. Cell Biol.*, 158, 273-282 (2002)  
 34) Tucker, W. C. *et al.* : *Science*, 304, 435-438 (2004)  
 35) McMahon, H. T., Sudhof, T. C. : *J. Biol. Chem.*, 270, 2213-2217 (1995)  
 36) Pabst, S. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 275, 19808-19818 (2000)  
 37) Chen, X. *et al.* : *Neuron*, 33, 397-409 (2002)  
 38) Itakura, M. *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 265, 691-696 (1999)  
 39) Archer, D. A. *et al.* : *J. Biol. Chem.*, 277, 18249-18252 (2002)  
 40) Reim, K. *et al.* : *Cell*, 104, 71-81 (2001)  
 41) Schaub, J. R. *et al.* : *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 748-750 (2006)  
 42) Giraud, C. G. *et al.* : *Science*, 313, 676-680 (2006)  
 43) Tang, J. *et al.* : *Cell*, 126, 1175-1187 (2006)

# 小胞型グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の機能

高森茂雄 塩原靖幸

**Clinical Neuroscience** 別冊

Vol. 26 No. 10 2008年10月1日発行

中外医学社

# 小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT)の機能

高森 茂雄 塩原 靖幸

## はじめに

グルタミン酸は、哺乳類中枢神経系の主要な興奮性神経伝達物質である。ニューロンが、エキソサイトシスによりグルタミン酸を放出するためには、グルタミン酸をシナプス小胞内腔に輸送する「小胞型グルタミン酸トランスポーター(VGLUT: vesicular glutamate transporter)」の存在が必要不可欠である<sup>1,2)</sup>。シナプス小胞のグルタミン酸取込活性は、生体脳から高度に精製されたシナプス小胞画分を用いて検出された。形質膜型のグルタミン酸輸送系がナトリウムの濃度勾配を駆動力としてグルタミン酸を輸送する高親和性の輸送体であるのに対して、シナプス小胞のグルタミン酸輸送系は、液胞型プロトンATPaseによって形成されるプロトン電気化学勾配を駆動力とする低親和性の輸送体である(図1)<sup>3)</sup>。その分子同定は長らく達成されない時期が続いたが、2000年のVGLUT1の発見を契機に、哺乳類中枢神経系に発現する3つのVGLUTイソ型が同定された<sup>4,5)</sup>。VGLUTの同定は、グルタミン酸神経回路の解剖学的同定に最も信頼できる分子マーカーを提供したのみならず、グルタミン酸放出に関わる分子操作を可能にしたことにより、今日までにグルタミン酸神経回路の様々な機能的側面に新しい知見をもたらした。本総説では、VGLUT分子同定が切り開いたグルタミン酸神経伝達研究の潮流について概説する。

## 3つのVGLUTイソ型

哺乳類中枢神経系には3つのVGLUTイソ型の存在が知られており、同定された順に、VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3と命名され<sup>1,2)</sup>、後にアミノ酸配列相同性を元に、Solute Carrier Protein(SLC)17ファミリーに分類された。シナプス小胞に存在する他の神経伝達物質トランスポー

ーター(VGAT, VMAT2, VACHT)もプロトン電気化学勾配を駆動力とするが、アミノ酸配列の相同性は殆どない。それに対して、SLC17ファミリーに属する他のトランスポーターは、リン酸や塩素イオン、シアル酸など、陰イオン性の物質を透過するトランスポーターに相同性を持っている。このことは、基質特異性を規定する部分の構造の方が、駆動力を規定する部分の構造よりも広範囲に渡ることを示唆していると思われる。

VGLUT1-3は、アミノ酸配列で70%以上の相同性を持つ。特に10~12個の存在が知られている膜貫通部位の相同性は極めて高く、これまで3つのイソ型によるグルタミン酸輸送活性に大きな差異が見出されていないことを裏付けている。VGLUT2の変異体解析から、第1膜貫通部位にある88番目のアルギニン、第2膜貫通部位にある128番目のヒスチジン、第4膜貫通部位にある191番目のグルタミン酸が、VGLUTのグルタミン酸認識および輸送に必須であることが提唱されている<sup>6)</sup>。

現在のところ、VGLUTに特異的な阻害剤は見つかっていない。エバンスブルーやトリパンブルーといった色素がVGLUTの輸送機能を阻害することは知られているが、現状では利用価値は低いといわざるを得ない<sup>7)</sup>。*C. elegans*やショウジョウバエでも、主に神経-筋接合部でVGLUTが機能しており(それぞれ*eat-4*, DVGLUTと呼ばれる)、VGLUT特異的阻害薬開発のためのハイスループットスクリーニング系として有用であろう。

## VGLUTイソ型の発現部位の違い

3つのVGLUTイソ型の脳内における発現パターンは大きく異なっている<sup>1)</sup>(図2)。VGLUT1は、大脳皮質、海馬、嗅球に強い発現が認められる。それに対してVGLUT2は、間脳、視床に多く存在する。VGLUT3はVGLUT1, VGLUT2に比べて脳内における発現細胞は少なく、散在した発現パターンを示す。興味深いことに、VGLUT3発

たかもり しげお 東京医科歯科大学准教授/脳統合機能研究センター  
しおばら やすゆき 東京医科歯科大学大学院特任助教/疾患生命科学研究所分子神経科学分野

現細胞は、従来非グルタミン酸作動性であると考えられていた細胞に限定されている。VGLUT 3が、GABA、セロトニン、アセチルコリン作動性神経細胞の一部に発現している事実は、グルタミン酸シナプス伝達の新たな機能を示唆している。

これらのVGLUT イソ型の発現はシナプスレベルでも、ほとんど重ならないことが知られている。このような発現分布の違いから、VGLUT イソ型の間には、何らかの機能的な違いがある可能性が指摘されている。

### VGLUT イソ型の機能的差異

なぜ哺乳類には3つのVGLUT イソ型が必要なのだろうか。C. elegans やショウジョウバエでは、1種類のVGLUT しか存在していないと予想されており、進化の過程でVGLUT イソ型の多様性が生まれることが、高等動物の神経系の機能的多様性を生む一因であったのだろう。3つのVGLUT のアミノ酸配列を比べると、膜貫通部位における相同性が非常に高いのに対して、N末端部位やC末端部位の配列は大きく異なる。特に、VGLUT 1のC末端部位には、タンパク質間相互作用に関わることが知られている proline rich domain (PRD) が存在している。近年、このPRD にエンドサイトーシス関連タンパク質であるエンドフィリンが結合することが報告された<sup>8-10)</sup>。エンドフィリンは分子内にSH3(src-homology 3)部位を持ち、この部分でVGLUT 1 C末端のPRD に結合する。エンドフィリンに結合できないVGLUT 1 変異体のニューロンでの動態を観察した結果、長時間の高頻度刺激が持続すると、VGLUT 1 が形質膜に留まる時間が延長することが示された<sup>8)</sup>。このVGLUT 1 特異的な分子間相互作用が、シナプス伝達効率や脳高次機能の発現に対して、どのような影響を及ぼすのか興味深い。

### VGLUT 欠損マウスからみた脳機能への寄与

グルタミン酸受容体は多くのサブユニットから構成されるため、一つの遺伝子をノックアウトしても、他のサブユニットが機能を補完する可能性がある。それに対し、哺乳類中枢神経系に存在する3つのVGLUT イソ型は、互いに相補的な発現パターンを示すため、単一のノックアウトマウスで、そのイソ型が支配するグルタミン酸神経回路を選

択的に機能停止させることが出来る。現在までに、3つのVGLUT イソ型のノックアウトマウスが作成され、様々な新しい知見が報告された。

**VGLUT 1:** VGLUT 1 は哺乳類脳内で最も豊富なVGLUT である。シナプス小胞レベルでは、全脳の約65%のシナプス小胞がVGLUT 1 を持つ<sup>11)</sup>。VGLUT 1 を欠損したマウスは、意外にもメンデルの法則に則り誕生し、見かけは生後3週間程まで野生型と区別がつかない。しかしながら、3週齢を境に急激に食餌が減退し、1週間以内に死に至る<sup>12,13)</sup>。それでも、この時期に人工的に食餌と水を与え、この時期を乗り切れば、脳の大部分のグルタミン酸神経回路が停止した状態でも生き続ける<sup>13)</sup>。VGLUT 1 ヘテロマウスは、野生型に比べVGLUT 1 の発現量が約半分に低下しているにも関わらず、神経培養細胞や海馬スライスを用いた電気生理学的な解析では、野生型と差が認められていない。この結果は、一見VGLUT の相対的発現量は、シナプス機能に大きな影響を及ぼさないことを示しているように見えるが、最近、VGLUT 1 ヘテロマウスの行動実験では、不安の亢進・うつ症状・長期記憶の障害がみられるなど、VGLUT 1 発現量の減少によるグルタミン酸神経伝達の減衰を示唆する結果が報告された<sup>14)</sup>。これら神経系での表現型に加え、VGLUT 1 欠損マウスにおける骨量の低下が報告されており、現段階では、末梢系におけるグルタミン酸シグナリングの生理学的意義を裏付ける唯一の *in vivo* データとして注目に値する<sup>15,16)</sup>。

**VGLUT 2:** VGLUT 2 欠損マウスは、生誕直後に死に至る<sup>17,18)</sup>。胚齢18日目では、既に野生型に比べて体躯が小さく、背骨の歪曲が顕著(hunched posture)になる。出産直後にはチアノーゼを呈し死亡する。死後胎子の病理所見では、脳の構造には大きな変化がみられないが、肺胞が極端に小さいのが特徴である。VGLUT 2 欠損マウス胚では、脊髄のpre-Bötzingerにおける呼吸中枢のパルスジェネレーターが全く機能していないことから、胎仔期における呼吸中枢のグルタミン酸神経回路で中心的な役割を果たしているのは、VGLUT 2 を発現している神経細胞であることが明らかとなった<sup>18)</sup>。また、VGLUT 2 ヘテロマウスでは、運動系・記憶学習・侵襲性疼痛・炎症性疼痛に関しては野生型と変わらないが、神経障害性疼痛や味覚嫌悪学習の低下や強迫性障害傾向の減少がみられるなど、これら

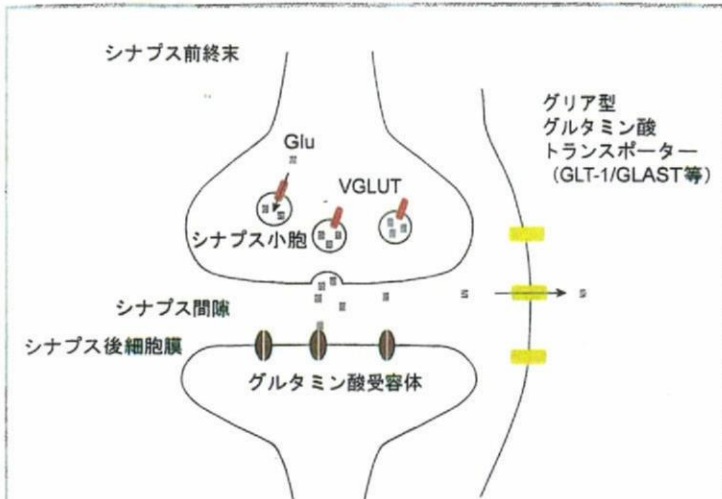


図1 シナプス周囲のグルタミン酸トランスポーター

神経伝達物質は、シナプス前終末に存在するシナプス小胞に蓄えられている。VGLUTは、グルタミン酸作動性ニューロン終末のシナプス小胞膜上に存在し、プロトン電気化学勾配を利用して細胞質のグルタミン酸を小胞内へと輸送する。シナプス間隙に放出されたグルタミン酸は、後シナプス膜のグルタミン酸受容体に結合することでシグナルを伝搬する。シナプス周囲は、グリア細胞が取り囲んでおり、細胞表面のナトリウム勾配依存性の高親和性グルタミン酸トランスポーター(GLT-1, GLAST等)がグルタミン酸を細胞内に取り込むことにより、シグナル伝達が終結する。

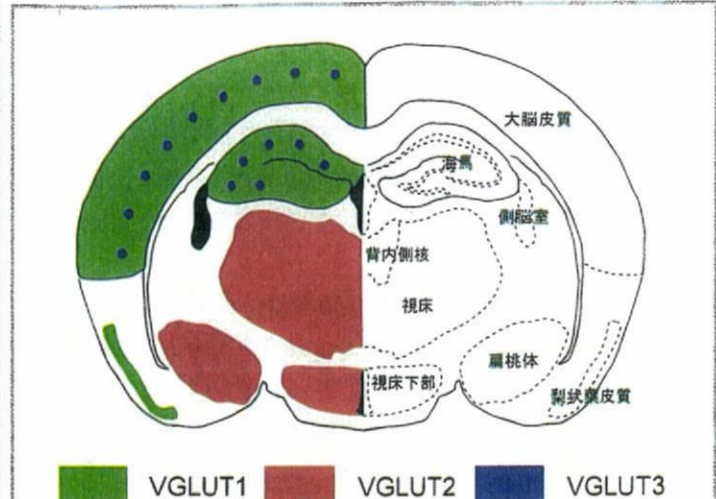


図2 3つのVGLUTイソ型の脳内における発現分布  
マウス脳冠状断面の模式図。3つのVGLUTイソ型は脳内で相補的に分布する。

idol 誘発性の catalepsy の減少傾向が観察された<sup>19)</sup>。このように、VGLUT 3の発現は、ごく一部のしかも非グルタミン酸作動性ニューロンとされていたニューロンに限定しているものの、VGLUT 3欠損マウスの表現型から様々な興味深い生理機能が明らかになってきた。

#### VGLUT 発現量とシナプス伝達強度/ 神経疾患との関係

もともと VGLUT 1 や VGLUT 2 は、神経細胞や内分泌細胞をアゴニストやホルモン等で刺激した時に、発現が亢進する遺伝子としてクローニングされた<sup>21, 22)</sup>。では、VGLUT 発現量とシナプス伝達強度に、果たして相関関係があるのだろうか。野生型のマウス海馬神経初代培養細胞に VGLUT 1 を過剰発現させると、一つのシナプス小胞内のグルタミン酸量の指標となる miniature EPSC の振幅が増大する<sup>12)</sup>。また、VGLUT 1 欠損マウス由来の海馬神経細胞に残存する mEPSC (微量な VGLUT 2 発現によると考えられる) は、野生型に比べて小さい<sup>12)</sup>。更に、ショウジョウバエの VGLUT 過剰発現体の神経-筋接合部における miniature EPSP も同様に増大する<sup>23)</sup>。これらの結果から、おそらく 1 シナプス小胞上の VGLUT 発現量は小胞内のグルタミン酸量と正の相関関係があると考えられる。一方で、ショウジョウバエの VGLUT 過剰発現体における evoked EPSP (刺激に応答したグルタミン酸神経伝達強度

の現象に関わるグルタミン酸神経回路への VGLUT 2 の寄与が示唆されている<sup>17)</sup>。

**VGLUT 3:** VGLUT 3 欠損マウスは、前記の VGLUT 1-, VGLUT 2-欠損マウスに比べて、劇的な表現型を示さず、生誕率・生存率とも野生型と変わらない<sup>19, 20)</sup>。しかしながら、VGLUT 3 欠損マウスは重篤な難聴を呈する<sup>20)</sup>。これは、内耳コルチ器にある内有毛細胞(inner hair cell: IHC)がグルタミン酸作動性ニューロンであり、シナプス小胞へのグルタミン酸濃縮に VGLUT 3 を用いていることを示している。興味深いことに、VGLUT 3 欠損マウスの脳波をモニターすると、野生型では認められない、痙攣を伴わないてんかん様発作の所見がみられた<sup>20)</sup>。この発作の直接の原因は不明であるが、海馬の介在性 GABA 作動性ニューロンに VGLUT 3 が発現していることから、VGLUT 3 を介した抑制性ニューロンからのグルタミン酸放出が、何らかのメカニズムで興奮/抑制バランスの調節をしている可能性が示唆された。また、VGLUT 3 欠損マウスでは、線条体におけるアセチルコリン放出の減少がみられ、野生型に比べて、コカイン反応性の亢進や haloper-

を反映)は野生型と同レベルであることから, 何らかの補填作用が働き, VGLUT 発現量に対応した恒常性メカニズムの存在も提唱されている<sup>23)</sup>. VGLUT 発現量変化の生理学的意義, 特に長期に渡る発現量変化の影響は, これからの研究課題の一つであろう.

一方, VGLUT 発現量と神経病態形成や薬物投与の影響の相関が指摘されている. 例えば, 抗うつ剤の長期投与により大脳皮質や海馬の VGLUT 1 が増大する<sup>24, 25)</sup>. また, 統合失調症患者の死後脳では, 海馬や前頭前野背側頭部での VGLUT 1 発現が顕著に減少し, 視床における VGLUT 2 発現が上昇していた<sup>26, 27)</sup>. このように, 脳部位, 神経回路特異的に VGLUT イソ型の発現量が変化することが, 神経

疾患の成因あるいは症状の形成に寄与している可能性が示唆されてきている.

## むすび

哺乳類中枢神経系の興奮性シナプス伝達の大部分を担うグルタミン酸神経伝達において, 重要な働きを司る機能分子である VGLUT の分子同定, 分子性状, 欠損マウスからみた生理機能について概説した. VGLUT 分子同定により, 飛躍的に進んだグルタミン酸神経回路の解剖学的理解は, 近年特筆に値する進歩である. 今後は, VGLUT イソ型間の機能的差異や, 生体内での VGLUT 発現量変化の生理機能への影響の更なる解明が待たれる.

## 文 献

- 1) Fremeau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, et al. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* 2004; 27: 98-103.
- 2) Takamori S. VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res.* 2006; 55: 343-51.
- 3) Edwards RH. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron.* 2007; 55: 835-58.
- 4) Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT Jr, et al. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science.* 2000; 289: 957-60.
- 5) Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature.* 2000; 407: 189-94.
- 6) Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, et al. Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem.* 2006; 281: 39499-506.
- 7) Roseth S, Fykse EM, Fonnum F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J Neurochem.* 1995; 65: 96-103.
- 8) Voglmaier SM, Kam K, Yang H, et al. Distinct endocytic pathways control the rate and extent of synaptic vesicle protein recycling. *Neuron.* 2006; 51: 71-84.
- 9) De Gois S, Jeanclous E, Morris M, et al. Identification of endophilins 1 and 3 as selective binding partners for VGLUT 1 and their co-localization in neocortical glutamatergic synapses: implications for vesicular glutamate transporter trafficking and excitatory vesicle formation. *Cell Mol Neurobiol.* 2006; 26: 679-93.
- 10) Vinatier J, Herzog E, Plamont MA, et al. Interaction between the vesicular glutamate transporter type 1 and endophilin A 1, a protein essential for endocytosis. *J Neurochem.* 2006; 97: 1111-25.
- 11) Takamori S, Holt M, Stenius K, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell.* 2006; 127: 831-46.
- 12) Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, et al. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT 1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 7158-63.
- 13) Fremeau RT Jr, Kam K, Qureshi T, et al. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science.* 2004; 304: 1815-9.
- 14) Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, et al. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT 1). *Eur J Neurosci.* 2007; 25: 281-90.
- 15) Morimoto R, Uehara S, Yatsushiro S, et al. Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis. *EMBO J.* 2006; 25: 4175-86.
- 16) Moriyama Y, Yamamoto A. Glutamatergic chemical transmission: look! here, there, and anywhere. *J Biochem.* 2004; 135: 155-63.
- 17) Moechars D, Weston MC, Leo S, et al. Vesicular glutamate transporter VGLUT 2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci.* 2006; 26: 12055-66.
- 18) Wallen-Mackenzie A, Gezelius H, Thoby-Brisson M, et al. Vesicular glutamate transporter 2 is required for central respiratory rhythm generation but not for locomotor central pattern generation. *J Neurosci.* 2006; 26: 12294-307.
- 19) Gras C, Amilhon B, Lepicard EM, et al. The vesicular glutamate transporter VGLUT 3 synergizes striatal acetylcholine tone. *Nat Neurosci.* 2008; 11: 292-300.
- 20) Seal RP, Akil O, Yi E, et al. Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron.* 2008; 57: 263-75.
- 21) Ni B, Rosteck PR Jr, Nadi NS, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 5607-11.
- 22) Aihara Y, Mashima H, Onda H, et al. Molecular cloning of a novel brain-type Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem.* 2000; 74: 2622-5.
- 23) Daniels RW, Collins CA, Gelfand MV, et al. Increased expression of the Drosophila vesicular glutamate transporter leads to excess glutamate release and a compensatory decrease in quantal content. *J Neurosci.* 2004; 24: 10466-74.
- 24) Moutsimilli L, Farley S, Dumas S, et al. Selective cortical VGLUT 1 increase as a marker for antidepressant activity. *Neuropharmacology.* 2005; 49: 890-900.
- 25) Tordera RM, Pei Q, Sharp T. Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT 1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem.* 2005; 94: 875-83.
- 26) Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, et al. Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia. *NeuroReport.* 2001; 12: 2885-7.
- 27) Eastwood SL, Harrison PJ. Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophr Res.* 2005; 73: 159-72.

# Reduction in memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and synaptic plasticity in mice with a spontaneous deletion in the ubiquitin C-terminal hydrolase L1 gene

Mikako Sakurai,<sup>1,\*</sup> Masayuki Sekiguchi,<sup>1,2,\*</sup> Ko Zushida,<sup>1,2</sup> Kazuyuki Yamada,<sup>3</sup> Satoshi Nagamine,<sup>1</sup> Tomohiro Kabuta<sup>1</sup> and Keiji Wada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187–8502, Japan

<sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 322–0012, Japan

<sup>3</sup>Support Unit for Animal Experiments, Brain Science Institute, RIKEN, 2–1 Hirosawa, Wako, Saitama 351–0198, Japan

**Keywords:** Alzheimer's disease, CREB, hippocampus, LTP, transcription

## Abstract

Overexpression of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) in mice rescues amyloid  $\beta$ -protein-induced decreases in synaptic plasticity and memory. However, the physiological role of UCH-L1 in the brain is not fully understood. In the present study, we investigated the role of UCH-L1 in the brain by utilizing gracile axonal dystrophy (*gad*) mice with a spontaneous deletion in the gene *Uch-l1* as a loss-of-function model. Although *gad* mice exhibit motor paresis beginning at ~12 weeks of age, it is possible to analyse their brain phenotypes at a younger age when no motor paresis is evident. Maintenance of memory in a passive avoidance test and exploratory behaviour in an open field test were reduced in 6-week-old *gad* mice. The maintenance of theta-burst stimulation-induced long-term potentiation (LTP) of field synaptic responses from Schaffer collaterals to CA1 pyramidal cells in hippocampal slices was also impaired in *gad* mice. The LTP in *gad* mice was insensitive to actinomycin D, suggesting that a transcription-dependent component of the LTP is impaired. Phosphorylation of cyclic AMP response element binding protein (CREB) in the CA1 region of hippocampal slices from *gad* mice occurred earlier than in the slices from wild-type mice and was transient, suggesting that CREB phosphorylation is altered in *gad* mice. These results suggest that memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and hippocampal CA1 LTP are reduced in *gad* mice. We propose that UCH-L1-mediated maintenance of the temporal integrity and persistence of CREB phosphorylation underlies these impairments.

## Introduction

Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) is a deubiquitinating enzyme (Wilkinson *et al.*, 1989) that is exclusively expressed in the brain and testis, and its expression is neuron-specific in the brain (Wilkinson *et al.*, 1989). Several lines of evidence suggest that UCH-L1 is involved in idiopathic Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD): (i) UCH-L1 is down-regulated in idiopathic AD and PD (Choi *et al.*, 2004), and in an AD model mouse (Gong *et al.*, 2006); and (ii) UCH-L1 is oxidatively modified in AD brains (Castegna *et al.*, 2002). Substitution of tyrosine for serine at codon 18 (S18Y polymorphism) in the *Uch-l1* gene exerts a protective effect against sporadic AD (Xue & Jia, 2006) and PD (Maraganore *et al.*, 1999). Furthermore, substitution of methionine for isoleucine at codon 93 (I93M mutation) reduces hydrolase activity of UCH-L1 and is linked to a rare autosomal dominant form of familial PD in a German family (Leroy *et al.*, 1998). Although these findings point to a role for

UCH-L1 in AD and PD, the physiological role of UCH-L1 in the normal mammalian brain is not fully understood.

UCH-L1 has multiple functions *in vitro*. UCH-L1 removes small adducts or unfolded polypeptides from ubiquitin's C-terminus via hydrolysis (Larsen *et al.*, 1998). In addition, UCH-L1 has ubiquitin-ligase activity on  $\alpha$ -synuclein-ubiquitin conjugates (Liu *et al.*, 2002). Apart from enzymatic activity, UCH-L1 acts as a stabilizer of monoubiquitin (Osaka *et al.*, 2003). UCH-L1 is thought to be a therapeutic target for AD; specifically, overexpression of UCH-L1 rescues amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ )-induced decreases in synaptic plasticity and contextual memory in mice (Gong *et al.*, 2006). Pharmacological suppression of UCH-L1 hydrolase activity (by 70%) is associated with impairment of synaptic transmission, tetanus-induced long-term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1 field, and contextual fear memory in mice (Gong *et al.*, 2006). The nonmammalian *Aplysia* UCH has been identified as an immediate-early gene essential for long-term synaptic facilitation in the nervous system (Hedge *et al.*, 1997).

The aim of the present study was to further characterize the role of UCH-L1 in the mammalian brain. To this end, we utilized the UCH-L1-deficient *gracile axonal dystrophy* (*gad*) mouse, which is a spontaneous mutant with an in-frame deletion in exons 7 and 8 of *Uch-l1* (Saigoh *et al.*, 1999). Expression of the UCH-L1 protein is

Correspondence: Dr Keiji Wada, <sup>1</sup>Department of Degenerative Neurological Diseases, as above.

E-mail: wada@ncnp.go.jp

\*M. Sakurai and M. Sekiguchi contributed equally to this study

Received 12 July 2007, revised 10 December 2007, accepted 12 December 2007

undetectable in the central nervous system of *gad* mice (Osaka *et al.*, 2003). In addition, recent analysis in our laboratory suggests that truncated products from the mutant *Uch-11* are not detected in the *gad* mouse brain (T. Kabuta, unpublished observation). Although *gad* mice exhibit motor paresis beginning at ~12 weeks of age due to axonal degeneration of spinal cord neurons and subsequent degeneration of the spinocerebellar tract (Kikuchi *et al.*, 1990), it is possible to analyse the brain phenotypes of *gad* mice at younger ages when no motor paresis is evident. We found that memory in passive avoidance learning, exploratory behaviour and hippocampal synaptic plasticity are reduced in young *gad* mice (6 weeks of age).

## Materials and Methods

### Animals

*Gad* mice were bred at the Experimental Animal Center of the National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo. The original genetic background of *gad* mice was a hybrid of the CBA and RFM strains (Kikuchi *et al.*, 1990). However, *gad* mice were backcrossed to C57BL/6J strain mice 6–18 times before use in the present study. Six-week-old male *gad* mice and wild-type mice generated from heterozygous *gad* mating pairs were used for the experiments. Genotyping was carried out using PCR with the following three primers:

- F1, 5'- agcttgagcctgtgtttcaactc-3';
- R1, 5'- tggcagcatcctgaaaaggagagtg-3';
- R2, 5'- tacagatggcctgcacgttga-3'

The reaction conditions were 35 cycles of 94 °C for 20 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 60 s. The wild-type allele produced an 891-bp PCR product, and the *gad* allele produced a 446-bp PCR product. Three to five mice were housed per cage under controlled temperature (25 ± 1 °C) and lighting (12-h light-dark cycle) conditions and provided with food and water *ad libitum*. The experiments were performed in strict accordance with the National Institute of Neuroscience's regulations for animal experimentation, and were approved by the Animal Investigation Committee of the Institute.

### Histology

Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed as reported (Kikuchi *et al.*, 1990). For immunohistochemistry, 4-µm-thick paraffin sections were de-paraffinized and pretreated in a microwave oven with 10 mM citrate-NaOH buffer (pH 6.0). After blocking with phosphate-buffered saline containing 1% heat-inactivated normal goat serum and 0.1% [(v/v)] Triton X-100, slides were incubated with an anti-Aβ monoclonal antibody (clone 4G8, 1 : 100 dilution; Signet Laboratories, Dedham, MA, USA) or an antisynaptophysin monoclonal antibody (MAB5258, 1 : 500 dilution; Chemicon, Temecula, CA, USA) and then with Envision+horseradish peroxidase-labelled anti-mouse IgG (DakoCytomation Inc., Carpinteria, CA, USA). Chromogenic detection was performed using the DAB Substrate kit (DakoCytomation Inc.). Sections were examined with a BX51 microscope (Olympus).

### Behavioural tests

One-trial passive avoidance tests were performed as described (Yamada *et al.*, 2003). Briefly, a single mouse was introduced into a light compartment of a light-dark box (Muromachi-kikai, Tokyo, Japan). During habituation, mice were allowed to freely explore the box for 5 min with the sliding door between the light and dark compartments open; after that, the mice were returned to their home

cage. For conditioning, which was carried out 2 h after habituation, the mice were introduced into the light compartment, the sliding door was closed when both hindlimbs had entered into the dark box, and an electrical footshock was delivered via the floor grid in the dark compartment (300 µA, 3 s duration, using a shock generator-scrambler; Muromachi-kikai). The mice were left in the light-dark box for 5 min and then returned to their home cage. Tests were carried out 2 or 24 h after the conditioning by re-introducing the mice into the light compartment of the light-dark box. The latency time for mice to enter the dark compartment was measured (light-dark latency, with a 5 min cut-off). The tests at 2 and 24 h postconditioning were carried out using different groups of mice.

The pain sensitivity of mice was tested as described (Yamada *et al.*, 2003). Briefly, a series of footshocks of ascending (20, 40, 60, 80, 100 and 130 µA, 1 s duration) and descending (130, 100, 80, 60, 40 and 20 µA, 1 s duration) current were serially delivered to the mice via the floor grid. The input current that induced hindlimb withdrawal was recorded. The interfootshock interval was 15 s. This trial was performed six times, and the data were averaged.

Open field tests were performed as we described (Zushida *et al.*, 2007). Briefly, the test was carried out in an arena (a 50 × 50 cm white field surrounded by a 40-cm-high white wall, illuminated with 80 lx) placed in a soundproof box. Mice were placed at the periphery of the arena, and for 5 min the behaviour of the mice was recorded using a digital video camera linked to a computer. Locomotor activity was calculated from this record by Image OF (O'Hara & Co., Ltd, Tokyo, Japan), modified software based on the public domain NIH Image program. Rearing was manually counted.

The light-dark box test was performed as described (Yamada *et al.*, 2002). Briefly, mice were placed into the dark compartment of the light-dark box and were allowed to explore both sides of the light-dark box for 5 min. During these 5 min, three parameters were measured: latency to enter the light compartment, number of entries into the light compartment, and duration in the light compartment.

### Electrophysiology

Each 6-week-old male mouse was anaesthetized with halothane, and the brain was quickly removed. Preparation of hippocampal slices for electrophysiology was carried out as reported (Takamatsu *et al.*, 2005; Zushida *et al.*, 2007). Briefly, the hippocampus was isolated from the brain, and transverse slices (400 µm thick) were prepared using a Vibratome 3000 microtome (Vibratome Company, St Louis, MO, USA) in a sucrose-based cutting solution (in mM: sucrose, 234; KCl, 25; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.25; MgSO<sub>4</sub>, 10; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glucose, 11; and CaCl<sub>2</sub>, 0.5). The slices were maintained at room temperature in artificial cerebrospinal fluid (ACSF; in mM: NaCl, 125; KCl, 4.4; MgSO<sub>4</sub>, 1.5; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; NaHCO<sub>3</sub>, 26; glucose, 10; and CaCl<sub>2</sub>, 2.5; pH 7.4, 290–300 mOsm/L) continuously bubbled with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. A slice was then transferred to the recording chamber and was continuously superfused at 3 mL/min with ACSF maintained at 28–32 °C.

Extracellular field recordings were carried out as reported (Takamatsu *et al.*, 2005). Briefly, field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded from CA1 stratum radiatum of the hippocampus using a glass micropipette (1–2 MΩ) filled with ACSF. The electrical signals were amplified using a MultiClamp 700B amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA, USA), filtered at 10 kHz, digitized at 10 kHz and acquired with Clampex (ver. 9.2). A bipolar stainless steel stimulating electrode was placed in stratum radiatum at the border between CA2 and CA3 to stimulate the Schaffer collateral pathway. The pulse intensity was adjusted to give 40% of the maximum amplitude in all experiments. Stimulation was carried out in



constant current mode (100  $\mu$ s duration). The fEPSPs for which the 40% amplitude was  $> 1$  mV were used for data analysis. The strength of synaptic transmission was determined by measuring the rising phase (20–60%) of the fEPSP slope. The average fEPSP slope during the 10 min prior to LTP induction was taken as the baseline, and all values were normalized to this baseline. The baseline stimulation frequency was 0.033 Hz. LTP was induced by applying theta-burst stimulation (TBS; 15 bursts of four pulses at 100 Hz, delivered at an interburst interval of 200 ms) or tetanic stimulation (100 Hz, 1 s, three times with a 20 s interval). Paired-pulse facilitation was induced by delivering two consecutive pulses with a 20-, 50-, 100-, 200- or 400-ms interpulse interval.

Somatic whole-cell patch-clamp recordings were made with a MultiClamp 700B amplifier (Zushida *et al.*, 2007). Pyramidal-shaped neurons in the CA1 pyramidal layer visually identified with differential contrast video microscopy (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) on an upright microscope (Axioscope, Zeiss, Oberkochen, Germany) were selected for recording. The patch electrodes were 6–10 M $\Omega$  when filled with a solution containing (in mM): K gluconate, 132; KCl, 3; HEPES, 10; EGTA, 0.5; MgCl<sub>2</sub>, 1; sodium phosphocreatine, 12; ATP-Mg, 3; and GTP, 0.5 (pH 7.4 with KOH, 285–290 mOsm/L). We used this solution when measuring membrane potential and input resistance. The input resistance was calculated by injecting a square current pulse (–10 pA) in current-clamp mode. For comparison of synaptic currents at –70 and +40 mV, an internal solution containing (in mM): CsOH, 105; CsCl, 30; HEPES, 10; EGTA, 0.5; MgCl<sub>2</sub>, 1; sodium phosphocreatine, 12; ATP-Mg, 3; and GTP, 0.5 (pH 7.3 with gluconic acid, 295 mOsm/L) was used. The signal was digitized at one point per 50  $\mu$ s and stored using Clampex. The resting membrane potential of the cells used in the analysis ranged from –57 to –67 mV, and the series resistance was 3–20 M $\Omega$ . Synaptic responses were elicited by electrical stimulation as described for extracellular recording. The pulse intensity was adjusted to elicit excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) 40% of the amplitude required for action potential generation in current-clamp mode.

All chemicals and drugs used for electrophysiology were purchased from Sigma with the exception of actinomycin D, which was obtained from Wako Pure Chemicals (Tokyo, Japan). Actinomycin D was dissolved in dimethylsulfoxide at 40 mM, added to ACSF just prior to application at 40  $\mu$ M, and bath-applied with perfusion. Therefore, the final dimethylsulfoxide concentration was 0.1%.

#### Western blotting

For analysis of A $\beta$ , the hippocampus was isolated from the brain and snap-frozen in liquid nitrogen. The tissue was homogenized in ice-cold buffer (Tris-HCl, 50 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 5 mM; and Triton X-100, 1%; pH 7.5) containing proteinase inhibitors (Complete, EDTA-free; Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) and phosphatase inhibitors (Halt phosphatase inhibitor cocktail; Pierce, Rockford, IL, USA), and the homogenate was subjected to SDS-PAGE. Western blotting was carried out as we reported (Kabuta *et al.*, 2006) using anti-A $\beta$  (clone 4G8; Signet Laboratories), anti-UCH-L1 (UltraClone Ltd, UK) and anti- $\beta$ -actin (Sigma) antibodies. Briefly, immunoreactive signals were visualized with SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce) or SuperSignal West Dura extended duration substrate (Pierce) and detected with a chemiluminescence imaging system (FluorChem; Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Human A $\beta$  1–42 from Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan served as the positive control.

Following extracellular recording, hippocampal slices were retrieved for Western blotting. The dentate gyrus and CA3 region of

the slices were cut off, and the remaining CA1 region was snap-frozen in liquid nitrogen. Tissue samples from each slice were homogenized in the same buffer as used for the A $\beta$  analysis, and the homogenate was subjected to SDS-PAGE. The antibodies used were anti-phospho-CREB (serine 133), anti-CREB (Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), anti-cAMP-dependent protein kinase (protein kinase A; PKA) regulatory subunit RI $\alpha$  and RII $\alpha$  (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-UCH-L1 (UltraClone Ltd) and anti- $\beta$ -actin (Sigma). Immunoreactive signals were visualized as described for the A $\beta$  analysis. The signal intensity was quantified by densitometry using FluoChem software (Alpha Innotech).

#### Data and statistical analysis

Numerical data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. The two-tailed Student's *t*-test was used for comparison between wild-type mice and *gad* mice. Repeated-measures one-way ANOVA was used to analyse whether footshock and exposure to an open field arena had significant effects within a genotype in passive avoidance and open field tests, respectively. ANOVA with the Bonferroni–Dunn test was used to compare the three data groups in the pCREB analysis.

## Results

#### Structural abnormalities were not detected in the cerebrum and hippocampus of young *gad* mice

Before behavioural analysis, we first examined whether there were any histological abnormalities in the cerebral cortex and hippocampus of 6-week-old *gad* mice. It has been reported that the thalamus is not impaired in *gad* mice (Kikuchi *et al.*, 1990), but there is no report on the cortex and limbic system. Figure 1A–D shows H&E staining of coronal brain sections (at bregma level –1.7 mm) from a wild-type mouse (Fig. 1A and C) and *gad* mouse (Fig. 1B and D; 6 weeks of age). We could not detect any visible abnormalities, such as atrophy or lack of cells, in the hippocampus or cortex of *gad* mice ( $n = 2$ ). One anatomical characteristic of *gad* mice is spheroid structures in the medulla and spinal cord that are thought to be degenerating axons (Kikuchi *et al.*, 1990). We did not find this aberration in the hippocampus or cortex of *gad* mice (Fig. 1A–D). We also examined other brain regions in sections cut at bregma levels 2.5, 1.0, –3.0 and –6.0 mm, and no outstanding abnormalities were evident in the *gad* mice (data not shown). In addition, we carried out immunohistochemical staining using antisynaptophysin. This antibody stains presynaptic sites and thus the staining pattern would be expected to be different in *gad* mice if there was noticeable axonal degeneration. Typical punctate synaptophysin staining was obtained in both wild-type (Fig. 1E and G) and *gad* (Fig. 1F and H) mice. We could not detect any visible differences in the staining of the hippocampus between wild-type and *gad* mice. These results suggest that structural impairment of the brain at a macroanatomical level is not evident in 6-week-old *gad* mice.

Axonal degeneration promotes accumulation of A $\beta$  in the medulla and spinal cord of *gad* mice (Ichihara *et al.*, 1995). Consistent with the lack of spheroid structures in the cortex and hippocampus, we did not find abnormal accumulation of A $\beta$  in these brain regions in *gad* mice up to 12 weeks of age (immunohistochemical analysis using an antibody to A $\beta$ ; data not shown). Furthermore, we examined nonfibrillar A $\beta$  by Western blotting. We could not detect any significant bands in the samples from wild-type and *gad* mouse hippocampi when blotting with anti-A $\beta$  (Fig. 1I, upper panel). Authentic human A $\beta$  (the right two lanes, a positive control) blotted

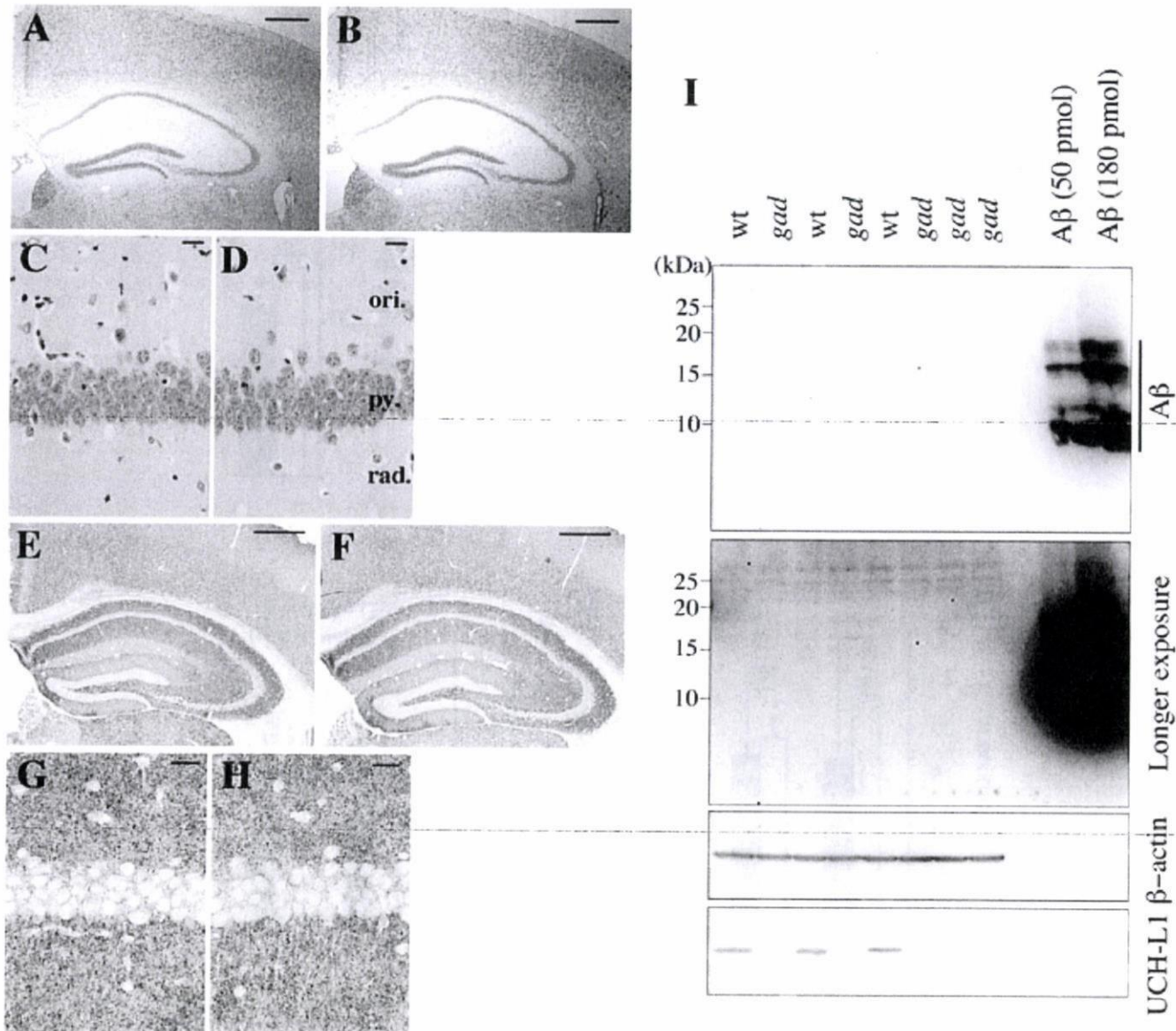


FIG. 1. Six-week-old *gad* mice have normal brain histology. (A–D) H&E staining of coronal brain sections from (A and C) a 6-week-old wild-type (wt) mouse and (B and D) a 6-week-old *gad* mouse. (C and D) A higher magnification of the hippocampal CA1 field. ori., stratum oriens; py., pyramidal cell layer; rad., stratum radiatum. (E–H) Synaptophysin immunohistochemistry in coronal brain sections from a six-week-old wt mouse (E and G) and a six-week-old *gad* mouse (F and H). (G and H) A higher magnification of the hippocampal CA1 field. (I) Western blotting of samples prepared from the hippocampi of three wt and five *gad* mice. Antibodies against A $\beta$ ,  $\beta$ -actin and UCH-L1 were used. Authentic A $\beta$  was used as a positive control. A short exposure is shown in the upper panel; a longer exposure is shown below. Molecular size markers (kDa) are shown on the left. Scale bars, 500  $\mu$ m (A, B, E and F), 20  $\mu$ m (C, D, G and H).

densely on the same membrane. After a longer exposure (Fig. 1I) we could detect certain bands, but there was no band that was significantly increased in *gad* mice compared with wild-type mice. Blots using anti $\beta$ -actin and anti-UCH-L1 were carried out to confirm the sample load and genotype, respectively (Fig. 1I).

#### Lack of UCH-L1 in mice impaired memory maintenance in the passive avoidance test and exploratory behaviour for a novel environment

Next, we examined whether lack of UCH-L1 had a detectable impact on mouse behaviour. For this purpose, we carried out one-trial passive

avoidance tests. Figure 2A shows the performance of wild-type and *gad* mice in this test. After habituation to the light–dark box, mice were conditioned with an electrical footshock when they entered the dark compartment. We then tested their ability to avoid the dark compartment 24 h after the conditioning footshock. The footshock significantly prolonged the light–dark latency in wild-type mice (comparison of the conditioning and test sessions  $P = 0.003$ ,  $F = 14.6$ ,  $n = 12$ ; repeated-measures ANOVA). In contrast, the light–dark latency was not significantly affected in *gad* mice (comparison of the conditioning and test sessions using repeated-measures ANOVA,  $P = 0.2437$ ,  $F = 1.556$ ,  $n = 10$ ), suggesting that memory function, as assessed by this test, is impaired in *gad* mice. In

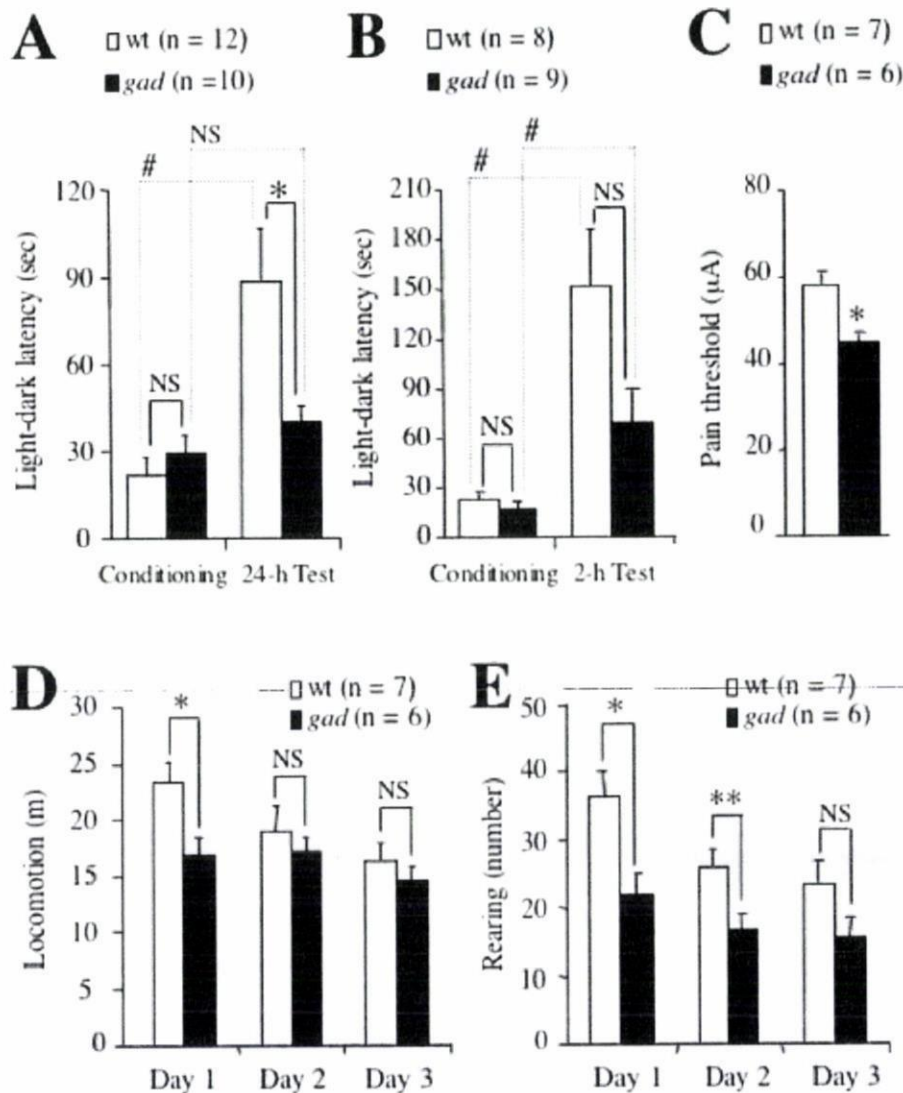


FIG. 2. Impairment of memory maintenance and exploratory behaviour in *gad* mice. (A and B) Light-dark latency of mice in a one-trial passive avoidance test. After habituation to a light-dark box, mice were conditioned with an electrical footshock when they entered the dark compartment (Conditioning). At (A) 24 h or (B) 2 h after the footshock, the mice were reintroduced into the light-dark box and the time for mice to enter the dark compartment (light-dark latency) was measured (Test). \* $P = 0.028$ ; NS, not significant; two-tailed Student's *t*-test (solid lines). # $P < 0.020$ ; NS, not significant, repeated-measures one-way ANOVA (dotted lines). (C) Pain sensitivity of the mice was measured by applying a series of electrical footshocks. \* $P = 0.002$ , two-tailed Student's *t*-test. (D) Locomotor activity of wild-type and *gad* mice in an open field arena. The mice were introduced into the arena for the first time on day 1. \* $P = 0.023$ , two-tailed Student's *t*-test. (E) Rearing frequency of wild-type and *gad* mice in an open field arena. \* $P = 0.014$ , \*\* $P = 0.021$ ; two-tailed Student's *t*-test.

addition, the light-dark latency in the 24-h test session differed significantly between the wild-type and *gad* mice ( $P = 0.028$ ; two-tailed Student's *t*-test). We next conducted a test session 2 h after conditioning to test whether learning ability was impaired in *gad* mice shortly after conditioning. In the test 2 h after conditioning (Fig. 2B), the footshock had a significant effect on the light-dark latency in both wild-type and *gad* mice ( $P = 0.0147$ ,  $F = 10.356$ ,  $n = 8$  for wild-type mice;  $P = 0.0199$ ,  $F = 8.407$ ,  $n = 9$  for *gad* mice; repeated-measures ANOVA). The average latency in the 2-h test session did not differ significantly between the wild-type and *gad* mice ( $P = 0.074$ ; two-tailed Student's *t*-test). These results suggest that *gad* mice are able to learn but maintenance of memory is reduced. Because the pain sensitivity of *gad* mice was greater than that of wild-type mice (Fig. 2C;  $P = 0.002$  with two-tailed Student's *t*-test), the

footshock used for conditioning was indeed an aversive stimulus in *gad* mice.

Next, we carried out the open field test. Mice were exposed to an open field arena for the first time on day 1 (Fig. 2D). The wild-type mice explored the novel environment and showed high locomotor activity (Fig. 2D). Locomotor activity was reduced upon re-exposure of wild-type mice to the same arena on days 2 and 3 because they remembered the arena, and thus the novelty was reduced ( $P = 0.024$ ,  $F = 12.928$ ,  $n = 7$ ; repeated-measures ANOVA). In contrast, locomotor activity was not significantly decreased in *gad* mice ( $P = 0.392$ ,  $F = 1.030$ ,  $n = 6$ ; repeated-measures ANOVA). The locomotor activity on day 1 differed significantly between wild-type and *gad* mice ( $P = 0.023$ ; two-tailed Student's *t*-test), but the activity on day 2 or 3 did not ( $P = 0.500$  and  $0.446$  for days 2 and

3, respectively). To determine whether the difference in locomotor activity on day 1 was due to reduced exploratory behaviour in *gad* mice, we measured the frequency of rearing, a typical exploratory behaviour (Lever *et al.*, 2006; Fig. 2E). Similar to locomotor activity, upon re-exposure rearing frequency decreased in wild-type mice ( $P = 0.009$ ,  $F = 14.257$ ,  $n = 7$ ; repeated-measures ANOVA) but not in *gad* mice ( $P = 0.131$ ,  $F = 2.503$ ,  $n = 6$ ; repeated-measures ANOVA). The rearing frequency on days 1 and 2 differed significantly between wild-type and *gad* mice ( $P = 0.014$  and  $0.021$  for days 1 and 2, respectively; two-tailed Student's *t*-test), but the activity on day 3 did not ( $P = 0.093$ ). These results suggest that exploratory behaviour in a novel environment is reduced in *gad* mice.

Although these data apparently suggest that memory in passive avoidance learning and exploratory behaviour are reduced in young *gad* mice, there is a possibility that the anxiety state of *gad* mice is altered. Alterations in the anxiety state can affect memory (Bouton *et al.*, 1990) and the response to novel environments. To measure anxiety, we performed a light–dark box test. In this test, mice usually avoid the light compartment. Therefore, the level of anxiety can be measured as the latency to move into the light compartment and the duration of time in the light compartment (Yamada *et al.*, 2002). Because the passive avoidance test also utilizes these properties, performance in the light–dark test is important for interpreting the results from the passive avoidance test. The time required for the mice to step into the light compartment when introduced into the dark compartment (dark–light latency; Fig. 3A), the time the mice spent in the light compartment (Fig. 3A) and the number of times the mice crossed between compartments (Fig. 3B) did not differ significantly between wild-type and *gad* mice ( $P = 0.834$ ,  $0.417$  and  $0.109$ , respectively; two-tailed Student's *t*-test). These results suggest that anxiety state, as assessed by this test, was not obviously altered in *gad* mice. Therefore we concluded that the impairments in passive avoidance learning and exploratory behaviour were not due to alterations in the anxiety state.

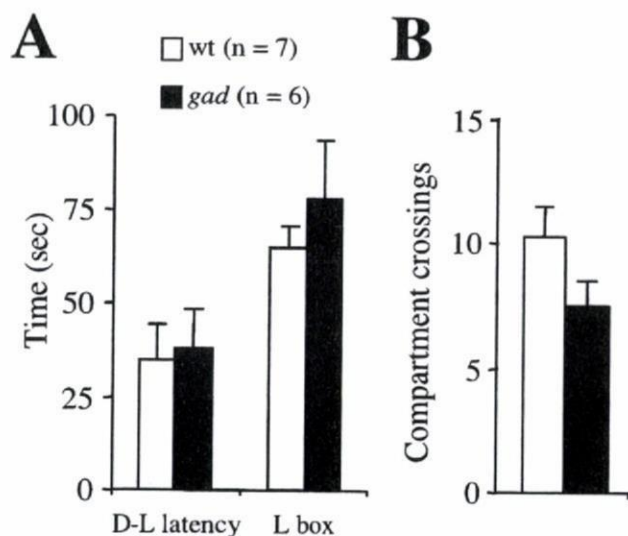


FIG. 3. Wild-type and *gad* mice performed similarly in the light–dark box test. (A) Dark–light (D–L) latency and duration of time in the light compartment (L box). (B) Number of crossings between the two compartments.

### Impairment of a transcription-dependent component of LTP in *gad* mice

We tested whether the lack of UCH-L1 affects neuronal function by measuring LTP at Schaffer collateral synapses onto CA1 pyramidal neurons in hippocampal slice preparations. LTP is believed to be a synaptic mechanism underlying memory and learning (Bliss & Collingridge, 1993). The CA1 synapse was selected because this brain region is involved in spatial memory (Morris *et al.*, 1982) and passive avoidance memory (Bevilaqua *et al.*, 1997; Impey *et al.*, 1998). In wild-type slices, TBS induced robust LTP at CA1 synapses (Fig. 4A), as reported for C57BL/6J mice (Nguyen & Kandel, 1997; Nguyen *et al.*, 2000). In contrast, TBS-induced LTP was attenuated in *gad* mice beginning ~20 min post-TBS (Fig. 4A). At 45 min post-TBS, normalized synaptic responses were significantly greater in wild-type slices ( $1.87 \pm 0.08$ ,  $n = 7$ ) than in *gad* slices ( $1.36 \pm 0.07$ ,  $n = 6$ ;  $P = 0.001$ , two-tailed Student's *t*-test). Impairment of LTP in *gad* mice depended on the stimulation pattern. Tetanus-induced LTP was identical in wild-type and *gad* mice (Fig. 4B; normalized fEPSP slopes at 45 min post-tetanus: wild-type,  $1.81 \pm 0.16$ ,  $n = 5$ ; *gad*,  $1.86 \pm 0.25$ ,  $n = 5$ ).

Stimulus–output curves (Fig. 5A) and paired-pulse facilitation (Fig. 5B) of CA1 synapses were essentially identical in wild-type and *gad* mice. The latter result suggests that a postsynaptic, rather than presynaptic, mechanism is involved in impairment of TBS-induced LTP in *gad* mice. LTP at this synapse is dependent on postsynaptic NMDA receptors (Harris *et al.*, 1984; Larson & Lynch, 1988). Therefore, we tested whether NMDA receptor activity was reduced in *gad* mice using patch-clamp recordings. For this purpose, we recorded Schaffer collateral–CA1 synaptic responses in neurons voltage-clamped to  $-70$  and  $+40$  mV in the presence of picrotoxin ( $50 \mu\text{M}$ ). The amplitude of the synaptic response recorded at  $+40$  mV at 100 ms poststimulation was normalized to the peak amplitude of the response at  $-70$  mV to estimate the ratio of NMDA-mediated to non-NMDA-mediated currents (Fig. 5D). Because superfusion of the slices with picrotoxin frequently elicited epileptiform activity (data not shown), three to five synaptic responses without epileptiform activity were selected and averaged. The ratio was identical in wild-type and *gad* mice ( $0.45 \pm 0.05$ ,  $n = 5$  and  $0.43 \pm 0.05$ ,  $n = 7$  for wild-type and *gad* mice, respectively; two-tailed Student's *t*-test). Therefore, attenuation of synaptic NMDA receptor activity does not account for reduced LTP in *gad* mice. Resting membrane potential and input resistance of CA1 pyramidal neurons did not differ substantially between wild-type and *gad* mice [resting membrane potential,  $-60.1 \pm 0.4$  mV for wild-type mice ( $n = 20$ ) and  $-60.0 \pm 0.6$  mV for *gad* mice ( $n = 20$ ); input resistance,  $163 \pm 9.6$  for wild-type mice ( $n = 16$ ) and  $175 \pm 10.8$  for *gad* mice ( $n = 13$ ); results obtained from the records using potassium–gluconate pipette solution].

CA1 LTP is composed of early and late temporal phases (Nguyen *et al.*, 1994; Abel *et al.*, 1997; Nguyen & Kandel, 1997). The former is induced mainly by an increase in the number of AMPA-type glutamate receptors at the synapse (reviewed in Malinow & Malenka, 2002) whereas the latter is induced by new protein synthesis from transcription of new mRNA (Nguyen *et al.*, 1994) and/or local protein synthesis from previously expressed mRNA (Bradshaw *et al.*, 2003). Because no obvious changes in the early phase of LTP (up to ~20 min post-TBS) were observed in *gad* mice, we tested whether the late phase is occluded in *gad* mice. For this purpose, we applied actinomycin D, a transcription inhibitor, to the slices and compared suppression of TBS-induced LTP in wild-type and *gad* mice. In wild-type mice, the maintenance of TBS-induced LTP was suppressed by actinomycin D (Fig. 6A). The normalized fEPSP slope at 45 min