総 説

脳 の 発 生 と 可 塑 性†

小幡邦彦

岡崎国立共同研究機構生理学研究所

444 岡崎市明大寺町西郷中 38

Key Words: plasticity, nervous system, protein phosphorylation, molecular cloning

1. 神経化学の発展

神経化学すなわち脳の生化学的研究も他の動物組織の場合と同じく、化学的分析から始った。とくに19世紀後半、ロンドンの Thudichum は脳の特徴的成分である脂質の分析に大きな業績をあげた。彼はまた、うつ病をはじめとする精神神経疾患を脳の特殊な化学的变化によるものとみなした。ついで生化学で物質代謝の研究が主流になるとともに、脳でも代謝系の特徴が明らかにされていった。

1950年代にシナプス伝達の化学説が確立され、その電気生理学的機構の解明が進むとともに、そこで機能する神経伝達物質の合成、分解、結合、取込み等の神経化学的研究に重点がおかれるようになった。アセチルコリン系、カテコールアミン系、GABAなどのアミノ酸、さらには1970年代になって登場した神経ペプチド類についてである。このような神経伝達物質の作用や神経細胞膜でのイオン電流を説明するために考え出された実体のない概念であったレセプターやチャネルも、分子生物学的技術の進歩によりつぎつぎと分子クローニングされているのが現状である。また、神経伝達物質やホルモンが作用して活性化される細胞内情報伝達系の各ステップや蛋白質リン酸化の研究がさかんに行われている。

脳ではこのような速い情報伝達の他に、発生段階での神経成長やシナプス形成のような過程、また、学習、記憶や訓練で起こると考えられる脳内変化（可塑性, plasticity）と総称される）、老化に伴う変化などでゆっくり進行し、それが維持される分子機構が重要な役割を果たしている。その実体はまだあまり分かってい

ないが、たとえばある種の細胞からNGF(nerve growth factor)という蛋白分子が出され、これが神経細胞のなかでレセプターを持つ交感神経、感覚神経などに作用し、さまざまな遺伝子の発現を調節してその神経の生存や成長を助けることなどである。

ここでは発生、可塑性におけるいくつかの局面の神経化学的研究を、ラジオアイソトープ実験の若干の経験もまじえて紹介したい。

2. 神経細胞の分化

神経細胞を化学的に特徴づけるのは神経伝達物質である。ノルアドレナリンが神経伝達物質の神経細胞にはノルアドレナリンを持つのはもちろんであるが、これをチロシンから合成するための3種の酵素とカテコールアミンの選択的取込み機構を持つ。一方、アセチルコリンを伝達物質とする神経細胞にはこれらはなく、アセチルコリンの合成酵素と前駆体コリンの高親和性取込み機構がある。

発生過程でのこの伝達物質の分化は興味ある問題である。たとえば、小脳でGABAを伝達物質とする抑制性ニューロンのプルキンエ細胞と非GABA性興奮性の小脳核細胞とは、同じ第4脳室壁の細胞から同じ頃発生する。神経冠細胞からはノルアドレナリン性の交感神経節細胞、アセチルコリン性の副交感神経節細胞、神経ペプチドが伝達物質である後根神経節細胞などが分化する。

20年も前になるが筆者は留学先の研究室で、本来ノルアドレナリン性の交感神経節細胞を培養すると、ある条件ではアセチルコリン性のシナプスを作ることになることを電気生理学的に見出した¹⁾。神経細胞中の伝達物質を検出するには現在の特異抗体を用いた免疫組織化学によることが多く、アミン等の小分子についてはそれを直接ではなく、その合成酵素を調べる。

† Development and Plasticity of the Brain, Kunihiro OBATA: National Institute for Physiological Sciences, Myodaiji-cho, Okazaki-shi 444.

培養した交感神経細胞の場合には定量性があり簡便でもあるつぎのアイソトープ法を用いた。これは当時、Hildebrandら²⁾によってイセエビの1個の神経細胞など微量のサンプルについて伝達物質を決定するために開発された方法で、ラベルされた前駆物質で標本を数時間インキュベートした後、合成された伝達物質を高圧ペーパークロマトグラフィで分離し定量する。その最初のデータを表1に示すが、アセチルコリンとカテコールアミン（この場合ノルアドレナリンとドーパミンを合わせたもの）の前駆物質には、それぞれ $[^3\text{H}]$ コリンと $[^3\text{H}]$ チロシンを用いた。電気生理学的にアセチルコリン性シナプスがみられない培養条件（L-15液、3週間）では予想どおりカテコールアミン合成は活発であるが、アセチルコリン合成はほとんどなかった。一方、アセチルコリン性シナプスが作られる培養ではアセチルコリン合成がきわめて活発であることが分かった。この問題は Patterson がひきつぎ、最近の因子の同定にまでいたっている。表1では両方の合成が見られるが、神経細胞1個だけを培養するマイクロカルチャーで調べると、両方を合成している細胞はきわめて例外的で、50-90%の細胞はアセチルコリンだけを、残りはカテコールアミンだけを合成した³⁾。前者がカテコールアミン性からアセチルコリン性へ分化の転換を起こしたことになる。この転換因子は培養中に神経細胞と混在するグリア性細胞や心臓細胞が産生することがまもなく明らかにされた。ただちに心臓細胞の培養液中に分泌される微量のアセチルコリン性転換因子の精製が、上記の交感神経節細胞マイクロカルチャー系でのカテコールアミン/アセチルコリン合成能をバイオアッセイに使用して企てられた。最近ようやくそれ

表 1 培養交感神経節細胞のアセチルコリンとカテコールアミンの合成
同数の細胞を3週間培養した後、 $[^3\text{H}]$ コリンと $[^3\text{H}]$ チロシンを加えて8時間インキュベートし、二次元ペーパークロマトグラフィで分離後カウントした。エゼリンはコリンエステラーゼによるアセチルコリンの分解を阻害する (Obata, K. and Mains, R.E.)

培養条件	インキュベート中のエゼリン	アセチルコリン (cpm)	カテコールアミン (cpm)	アセチルコリン/カテコールアミン比
MEM液で	なし	27 500	18 400	1.5
3週間	あり	111 000	6 800	16.3
L-15液で	なし	10以下	25-30 000	0.001以下
3週間	あり	300-1 000	25-30 000	0.033

が完成し、その構造を見ると、血液細胞の分化の研究から見いだされた白血病抑制因子（D因子）と同じ分子であることが判明した⁴⁾。最近しばしば明らかになる一つの因子が異なる部位異なる時期に発現し作用する場合の一例となったが、この因子が神経伝達物質分化の遺伝子機構にどのように関わっているのか、解明が期待される。

3. 脳発生関連蛋白質

神経が伸びて行って標的を正しく見つけ、シナプス結合するのにどのような因子が関与するのか、まだ充分には分かっていない。1980年頃 O'Farrell の二次元電気泳動法が確立されると、神経発生の研究にも用いられるようになった。Skene はgammaの視神経が挫滅されても再生する場合に、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを注入しておいて再生中の神経でそれを使って合成される蛋白質を二次元電気泳動/フルオログラフィで分析した⁵⁾。再生中に増加する蛋白として、4種のGAP (growth associated protein) が見いだされたが、そのうち分子量43 kDaのGAP 43についてはとくに研究が進んだ。GAP 43は細胞内で形質膜に付着し、いくつかのリン酸化部位を持ち、カルモジュリン・スポンジともいわれるようにカルモジュリンのストアになる。成長する神経の先端である成長円錐に多いとともに、シナプス可塑性の代表例である海馬の長期増強のさい、リン酸化が促進される。しかしこのGAP 43の神経成長や、ことにシナプス可塑性における生理的役割はまだ不明であり、今後の研究がまたれる。

われわれは発生過程の脳に特異的な蛋白質を知るために、ニワトリ脳で特徴的な部位の視蓋に存在する蛋白質を、ふ卵4日目の胚からふ化後のヒヨコまで、二次元電気泳動で分離して解析した⁶⁾。当然のことながら、大部分の蛋白質の量は発生中変化しなかった。残りは、①最初から存在するが、しだいに減って消失する、②最初はないが、しだいに増加して成熟しても保たれる、③途中で一時的に出現し、のち消失する、のどれかであった。③のグループに着目して実験を続けたところ、3分子種からなる蛋白質を見つけ、ドレブリン (drebrin: developmentally regulated brain protein) と名づけた。

その3型E1, E2, Aは分子量がそれぞれ95, 100, 110 kDaで、等電点は4.5付近で少しずつずれている。マトリックス細胞（ニューロブラスト）が最終分裂を終えて神経細胞に分化すると初めてE1が出現し、細胞移動を行い神経突起を伸ばし始めると、E1

図1 ドレブリン遺伝子の構造(A)とサザンプロット解析(B)⁷⁾

Aの説明は本文。B、ニワトリの遺伝子DNAを制限酵素の *Hind* III(H)と *Bam* HI(B)で消化したものを電気泳動/ブロットした後、³²PラベルしたドレブリンcDNAのE1, E2, Aに共通な部分(左)とE2, Aのみに含まれる部分(右)とハイブリダイズさせた。バンド1本だけが検出される場合があり、他の実験とも合わせて、遺伝子は1種と結論される。

が消失してE2が出現する。さらに成熟が進むとE2も消失してAが現れ、成体でもAは樹状突起に、とくにそのシナプス部に集積して残る。それぞれを精製して分析や抗体作成に用いた。3型はV8プロテアーゼで限定分解してできたペプチドのパターンが酷似していること、抗体が3型、たがいに交差反応することから、類似の蛋白とみなされたが、つぎの分子生物学的解析から、一つの遺伝子からオールタナティブスプライシングで作られるものであることが分かった。

すなわち、発現ベクター λ gt 11で作製したニワトリ胚のcDNAライブラリーをドレブリンの抗体でスクリーニングして、クローニングした。またニワトリの遺伝子DNAのクローニングも行った。この成果を利用して実験し、ラットについても同様な結果が得ら

れた⁷⁾。図1Aは遺伝子クローンの構造を示し、そのうちのエクソンをボックスで示している。白ボックス9個はE1, E2, Aに共通で、E1はそれだけで、E2はins1が加わり、Aはins2を加えてすべてのエクソンで作られる。図1Bはサザンプロット解析の結果を示しており、ドレブリンの遺伝子は一種であり、しかもバンドの強さから1コピーであることが判明した。

このオールタナティブスプライシングの機構は解析していないが、とくにこれがどのようにして発生段階に応じて調整されるのか興味深く、今後の研究課題である。また既知の蛋白質でドレブリンに似たものはないので、ドレブリンの機能については独自に研究を進める必要があるが、その一つとしてラットドレブリンcDNAを、ドレブリンを発現していない線維芽細胞に

導入して強制発現させる実験を行った⁹⁾。各細胞での発現量は抗ドレブリン抗体を用いた免疫組織化学で評価した。発現が軽度の場合は線維芽細胞の形のままであったが、強く発現する場合、神経細胞のような形になった。細胞は丸く厚みを持ち、太く長い突起を1-3本伸ばしていた。先端は成長円錐のように膨らみ、培養した神経細胞によくみられるマイクロスパイクが先端や途中から多数出ている。GAP 43 のトランスフェクションでは、マイクロスパイクは一時的に増えるが神経様突起は出ない、と報告されており、他の神経特異的分子の遺伝子導入も行われているが、神経細胞様の形態変化が起こったのはドレブリンが初めてである。

4. 海馬の可塑性と蛋白質リン酸化

脳の可塑性をあらわす現象で最も広く研究されているのは、海馬の切片標本についての長期増強である。シナプスを高頻度で数秒間だけ電気刺激すると、その後30分から数時間、シナプス伝達が増強される。この電気生理実験に薬物投与を組み合わせ、プロテインカイネース C, Ca^{2+} /カルモジュリンカイネース II (CaMK II), PI レスポンス等々が関与すると主張されている。しかし、小さい標本で部分的に起こした反応であるため化学分析には不適当であり、ではリン酸化される基質は何かといっても分からないのである。海馬の長期増強は丸ごとの動物でも起こすことができ、この場合は増強が数日から数週間続く。この場合に前記の GAP 43 のリン酸化の促進が見られる。しかし、この GAP 43 リン酸化とシナプス増強の間には、今後明らかにされなければならないステップがいくつも存在する。

われわれは海馬の可塑性のうち、キンドリングを研究している。キンドリングは海馬以外や海馬でもさまざまな入力を刺激して起こすことができるが、われわれはラットで海馬への主要な入力の一つ、内側中隔を刺激している。1日1回、高頻度の電気刺激を1秒間だけ与えるが、初めは海馬にわずかな後発射（刺激後同期して反復する電気活動）が見られるだけで、行動の変化は起こらない。しかし、この刺激を2-3週間続けると、後発射が発作波となって脳全体に拡がり、全身けいれんが起こる。いったんこうなると刺激を止めて何日たっても、同じ刺激で同様なけいれんが起こる（この状況は一生保持されるという）。脳に永続的な変化が起こっていると考えられるが、化学的には何であろう。

そこでキンドリング状態のラットとコントロールの

ラットから海馬と大脳皮質を取り出して分析している。二次元電気泳動で検出されるほどの蛋白質の量的変化はなかったが、そのリン酸化に差が見られた⁹⁾。リン酸化反応は標品に γ - ^{32}P ATP と活性化因子（サイクリック AMP など）だけを加えて行わせてみる内蔵性基質のリン酸化であり、また、基質蛋白質の量が同じとき (CaMK II については抗体を用いたウェスタンブロットや同じ分子量バンドのカルモジュリン結合によって確かめた)、試験管内でのリン酸化が多いときは標品を取り出す前の動物体内でリン酸化が進んでおらず、脱リン酸型が多いとみなされる。可溶性画分 (S_2) では差がないが、シナプトソーム/ミトコンドリア画分 (P_2) および P_2 から精製した PSD 画分 (post-synaptic density) では CaMK II の自己リン酸化がキンドリングで低下した。すなわち、 P_2 や PSD の内在性蛋白質リン酸化はサイクリック AMP や Ca^{2+} /フォスファチジルセリン添加では影響されないが、 Ca^{2+} /カルモジュリンで著しく促進され、その状態でキンドリングとコントロールを比べると、CaMK II の α , β サブユニットに相当する 50, 60 kDa のバンドのリン酸化がキンドリングで低かった。CaMK II は他の蛋白質を基質とするとともに自己をもリン酸化し、自己リン酸化されると Ca^{2+} /カルモジュリン依存性がなくなることが知られている。また、CaMK II はとくに PSD に多い蛋白で、その意味は不明であるがレセプターの活性やシナプス後構造の維持に関係しているのかもしれない。キンドリングでの低下（体内でリン酸化促進）は Wasterlain のグループによっても報告され¹⁰⁾、これまで報告されたさまざまな生化学的変化のうち最も確かなものであろう。

5. 可塑性と遺伝子発現

可塑性のさいの分子変化として従来、蛋白質のリン酸化が重視されてきたが、これだけでは数日以上長期変化は説明できないと考えられ、新たな蛋白質合成や mRNA の検索が行われるようになった。1960年代前半に記憶の分子説として mRNA の塩基組成の変化が注目され、やがてかえりみられなくなったが、分子生物学的技術の進歩とともにその説がリバイバルしたともいえる。たとえば、Alkon らは軟体動物ウミウシについて、回転と光を組み合わせる訓練により光刺激に反応して体を縮める条件反射が成立した後で（本来は回転刺激で体を縮める）、その微量の神経組織中の mRNA を分析した。条件づけしたウミウシからの mRNA は [^3H] 無水酢酸を結合させ、コントロー

図2 ラット脳の蛋白質リン酸化⁹⁾

A, コントロール (レーン1, 3, 5) およびキンドリグ (2, 4, 6) の海馬 P₂ 画分 (0.2 mg 蛋白) を [³²P]ATP を加えてリン酸化させたオートラジオグラム。1 と 2, 無添加。3 と 4, Ca²⁺ 添加。5 と 6, Ca²⁺ およびカルモジュリン添加。左の数字は分子量 (kDa), 右の矢印はキンドリグで減少したバンド。B はデンストメータ解析。Con, コントロール。Kin, キンドリグ。

ルの mRNA は [1-¹⁴C] 無水酢酸でラベルした後, 60 cm のゲル上で電気泳動的に分離し, 各ピークの ¹⁴C と ³H の比率を求めた。65 のピークのうち 20 は条件づけで増加し, なかには 10 倍以上増加するものもあった¹¹⁾。これらが何の mRNA であるかは分からないが, 今後クローニングが進められるものと期待される。

また, 別の軟体動物アメフラシの場合は可塑的变化を起こした感覚神経細胞を取り出し, その RNA を PCR 法で増幅した後 cDNA ライブラリーを作り, 特異的クローンをクローニングする企てがなされている (Kandel, E.K. と Iino, Y. 私信)。

われわれは前述のキンドリグを起こしたラットの海馬で, 新たに発現または発現が増大する mRNA があるとの想定の下に, この cDNA クローニングを試みている¹²⁾。キンドリグとコントロールでほとんどの mRNA は共通と考えられるので, この共通部分を除去する目的で, キンドリグ海馬 cDNA を過剰のコントロール mRNA とハイブリダイズさせた後の差し引き cDNA ライブラリーを作り, これについてキンドリグとコントロールのプロープでディファレンシャル・ハイブリダイゼーションを行って, キンドリン

グ海馬で増加している cDNA クローン数十個を得た。これらを始めとする候補から, 可塑性に關与するクローンを選り出す道はまだ険しい。

6. おわりに

脳の機能を理解するためには発生や可塑性また老化などゆっくり進行し, 維持される現象の細胞生物学的分子生物学的研究が重要である。

われわれの研究でも, DNA の塩基配列決定には蛍光ラベル方式のシーケンサーを用い, mRNA の *in situ* ハイブリダイゼーションにはジゴキシンゲン標識プロープを用いるなど, アイストープ代替法の導入を進めている。また DNA や蛋白質などのオートラジオグラフィの必要性は増加する一方であるが, イメージングプレート (富士写真フイルム (株) 等) の高感度法を利用して実験時間の短縮とアイストープ使用量の低減を図っている。このような流れのなかでも, 広い応用性からアイストープの利用が発展途上にある脳研究にとってますます重要になることは確かである。

文 献

- 1) 小幡邦彦: 代謝, **12**, 155-163 (1975)
 - 2) Hildebrand, J.G., Barker, D.J., Herbert, H. and Kravitz, E.: *J. Neurobiol.*, **2**, 231-246 (1971)
 - 3) Reichardt, L.F. and Patterson, P.H.: *Nature*, **270**, 147-151 (1977)
 - 4) Yamamori, T., Fukada, K., Aebersold, R., Korsching, S., Fann, M.-J. and Patterson, P. H.: *Science*, **246**, 1412-1416 (1989)
 - 5) Skene, J.H.P. and Willard, M.: *J. Cell Biol.*, **89**, 86-95 (1981)
 - 6) 小幡邦彦, 白尾智明, 児島伸彦: 蛋白質・核酸・酵素, **33**, 1688-1695 (1988)
 - 7) Shirao, T., Kojima, N., Terada, S. and Obata, K.: *Neurosci. Res.*, Suppl. 13, 106-111 (1990)
 - 8) Shirao, T. and Obata, K.: 投稿中
 - 9) Obata, K., Nabeta, Y. and Yamamoto, T.: In "Senile Neurodegeneration and Neurotransmitters" (ed. by Nagatsu, T.), pp. 3-12, Excerpta Medica, Tokyo (1990)
 - 10) Wu, K., Wasterlain, C., Sachs, L. and Siekevitz, P.: *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5298-5302 (1990)
 - 11) Nelson, T.J. and Alkon, D.L.: *ibid.*, **87**, 269-273 (1990)
 - 12) Kojima, N. and Obata, K.: Proc. 3rd IBRO World Congress, in press.
-