

GFP-actin を用いた活動依存性 ニューロン細胞骨格再構成の可視化 Visualization of activity-dependent neuronal cytoskeletal rearrangement using GFP-actin

研究代表者 京都大学医学研究科神経細胞薬理学教室 講師 尾藤 晴彦
Lecturer, Dept. of Pharmacology, Kyoto University Faculty of Medicine
Haruhiko BITO

In order to visualize activity-dependent neuronal cytoskeletal rearrangement, an adenovirus expressing GFP-fused actin was engineered and introduced into synaptically connected, primary cultured hippocampal neurons. Several patterns of stimuli were applied to this preparation and remarkably distinct and site-specific alteration in actin distribution was demonstrated, dependent upon the Ca^{2+} -entry sources activated by the stimuli. These results clarify for the first time some of the rules that govern activity-dependent control of neuronal morphology within an active network system.

1. 研究目的

細胞骨格は、細胞膜を内側から支持し、細胞の形を決めている。また、細胞外刺激に応じて細胞が細胞内器官を動員したり、形の変化を遂げる過程でも不可欠な働きをする。特にアクチンは普遍的に存在し、「早い動き」を担当する細胞骨格分子である。

神経系でも、脳発生途上で長い神経突起が出来、離れた細胞同士の接触を可能にする。また記憶・学習の過程で、海馬という領域ではシナプスのミクロ形態的再編成が生じる。このような神経形態変化においてもアクチンが関与している。

そこで本研究で我々は、分子生物学的手法を用い、アクチンに蛍光分子 GFP を融合させ、アクチンの動きを生細胞で観察出来る方法論の確立を試

みる。本研究では、この GFP-actin 分子を基盤に、シナプス活動を含む様々なシグナル活性化の下流で引き起こされる、活動依存性ニューロン細胞骨格動態を定量的に解析する技術を開発した。具体的には、1) 神経プロモーターとアデノウィルスベクターを応用した、神経特異的にアクチンを染める技術の開発、2) 1) を応用した生細胞でのアクチン動態の定量法の応用に成功した。このような基盤技術の開発により、1) 記憶形成の最も初期に誘導されるアクチン再編成や、2) 神経変性・神経細胞死に際し、最も初期に起こる細胞骨格異常、などが可視化可能になると期待される。

2. 研究経過

2. 1. 方法

2. 1. 1. GFP-actin 発現アデノウィルスの作成

GFP-actin cDNA を東京大学医科学研究所の齊藤泉教授が開発した COS-TPC 法を用いて、2種類の GFP-actin 発現アデノウィルスを作成した。一つは、GFP-actin を CMV プロモータの下流に結合させたもの、もう一つは NSE(neuron-specific enolase)の下流に結合させたものである。常法により、リコンビナントアデノウィルスを HEK293 細胞内で作成し、3回 passage することにより、高い力価のウィルス液が得られた。同液を用いたところ、マウス初代培養神経細胞への感染・GFP-actin の発現が認められた。

2. 1. 2. GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

尾藤らが以前開発したマウス海馬初代培養法を用い、シナプス形成期以降の神経アクチン細胞骨格の動態を観察した。real-time imaging は Bio-Rad MRC1024 レーザー共焦点顕微鏡システムに、カスタムのステージアダプター・カスタムチェンバーを用い、室温条件下で生きた海馬細胞のタイムラプス GFP 蛍光計測を行った。刺激条件は 1)Na⁺チャンネル阻害薬 tetrodotoxin 除去後、K⁺チャンネル阻害薬 4-aminopyridine 添加、2) 90 mM 細胞外 K⁺負荷、3) 0 mM Mg²⁺/100 μM NMDA 負荷を用いて

行った。

また、同時にカルシウムイメージングを行うために、CCD カメラを用いたビデオ測定システムの構築を行った。

2. 2. 結果および考察

2. 2. 1. GFP-actin 発現アデノウィルスの作成

Adex-NSE-GFP-actin と Adex-CMV-GFP-actin とを、ともに初代培養神経細胞に感染させたところ、ともに神経細胞に GFP-actin の発現を認めた。前者は予定通り、発現細胞が神経細胞に限局していたが、一細胞当たりの発現が低いため、高空間分解能・長時間の GFP-actin 蛍光測定が不可能であった。これに対して、Adex-CMV-GFP-actin は、神経細胞のみならずグリア細胞にも非常に高い発現量を認めた。同ウィルスのタイターを下げた状態で神経培養を感染させると、視野の中で互いに離れた細胞（神経細胞であれ、グリアであれ）のみが散発的に GFP-actin を発現するという条件が確立できた。このような条件は、一つの神経細胞の突起に焦点を絞ってタイムラプス観察するのに非常に適しているので、以降同条件を用いて以下の実験を行った。

2. 2. 2. GFP-actin 発現アデノウィルスを用いた過剰神経興奮状態における樹状突起アクチン動態の解析

上記ウィルスを用い、神経活動依存的に制御される神経細胞骨格動態の可視化を、海馬錐体細胞の初代培養系にて試みた。血清存在下で、あるいは

は、血清非存在下の内在性神経活動負荷時において、シナプス形成後の海馬神経細胞では、樹状突起上の GFP-actin の点状構造は部位によって異なった動きを示し、アクチン制御の多様性が示唆された。さらに GFP-actin は過剰な神経活動により速やかな分布の変化を示した。すなわち、過剰な NMDA 受容体刺激を介した Ca^{2+} 流入によって、一部の樹状突起スパイン内アクチン集積が増強され、形態変化も伴う可能性が示唆された。また、過剰な電位依存性 Ca^{2+} チャンネル刺激による Ca^{2+} 流入は、樹状突起内アクチンには大きな影響を与えなかったが、細胞体辺縁部アクチン骨格を強く増強させた。

本成果は現在論文投稿中である。

2. 2. 3. 本研究と関連した共同研究の成果

神経活動依存性のアクチン細胞骨格制御は、多岐にわたる。生理的なアクチン細胞骨格再編成の例として、神経発生初期の成長円錐、軸索伸長制御を京大成宮研究室と共同で取り上げたところ、本研究を通じて立ち上げた蛍光観察系をもちいて、Rho 依存性シグナリングの極性誘導に対する負の制御が明らかとなった。現在この詳細を分子レベルで追及しているところである。

2. 3. まとめ

我々の実験データは、シナプス活動がおこるとき、シナプスを含む樹状突起スパイン内のアクチン細胞骨格が非常にダイナミックに再編成されて

いることを世界で初めて明らかにしたものである。

3. 研究成果

本研究による、GFP-actin 分子を用いて、樹状突起や成長円錐内のダイナミックなアクチン細胞骨格再編成を可視化できるようになった。今後、この技術を用い、生理的、あるいは病理的神経興奮時に、神経アクチン細胞骨格がどのような挙動をとるのかを観察し、その詳細な分子機序を解析することにより、新たな病態機構の解明と新規治療戦略の探索が期待される。

4. 今後の課題と発展

本研究によって、全くあらたな、神経細胞内樹状突起のアクチン細胞骨格可視化法を開発し、基礎検討を行った。GFP-actin を用いることにより、初代培養細胞レベルでは、異なるカルシウム流入の過剰負荷が、アクチン動態に対して全く異なる作用を及ぼすことが明らかになった。これらの実験データは、神経活動、とくにストレス等にみられる過剰神経活動などにおいて、発生するカルシウム流入源の組み合わせによって、細胞骨格再構築の分布が制御されている可能性を示唆している。今後、このような可能性を検証していくとともに、このような知見の実際の病態における意義を、トランスジェニックマウスを用いたストレスモデル実験によって確認していく予定である。

5. 発表論文リスト

5-1. 論文発表

1) Activity-Dependent Enhancement of Multiple Types of Actin Microdomains in Hippocampal Neurons: a Novel Role for NMDA Receptors and Voltage-Gated Ca^{2+} Channels in Cytoskeletal Signaling. Furuyashiki T., Bito H., et al. (submitted)

2) Growth cone regulation by Rho-signaling. Arakawa Y., Bito H. et al. (in preparation)

5-2. 学会発表

1) Furuyashiki T; **Bito H**; Narumiya S. Multiplicity in activity-dependent actin regulation in hippocampal neurons. *Neurosci. Res. Suppl.* 24, S42, O-164, 2000

2) Furuyashiki T; Narumiya S; **Bito H**. Patterned synaptic activity induces actin

reorganization in synaptically connected hippocampal neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 26, 562, 213.3, 2000.

3) 尾藤晴彦。神経初代培養細胞を用いた神経シグナリングの解析. 第23回日本神経科学学会大会プログラム・抄録集, p.286, L10-2, 2000.

4) 尾藤晴彦、古屋敷智之、成宮周。カルシウムシグナリングの神経活動依存的転写調節とアクチン動態制御における役割。生化学 72, 614, S18-2, 2000.

5) 古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周。海馬神経細胞における神経活動依存的なアクチン細胞骨格制御。生化学 72, 1018, 3P-229, 2000