

研 究 報 告 書

「小脳長期抑制を発現・維持する分子機構の時間的・空間的制御」

研究期間：平成20年1月～平成23年3月

研究者：田中 敬子

1. 研究のねらい

神経細胞間の連絡をつかさどるシナプスにおいて、特定の刺激が与えられた後に神経伝達効率が長期(数時間～数日)にわたって増強(long-term potentiation, LTP)、あるいは抑制(long-term depression, LTD)される現象が見られ、シナプス可塑性と呼ばれている。このシナプス長期可塑性は、脳の様々なシナプスにおいて見られ、記憶や学習との関連が報告されている。したがって、シナプス可塑性の分子機構を解明することは、これに関連した脳機能の分子レベルでの機構解明に重要である。

小脳LTDは、プルキンエ細胞に入力している2種類の興奮性神経線維(平行線維(PF)と登上線維(CF))が、数分間、同調して繰り返し刺激された後、PFシナプスにおいて生じる現象であり、小脳の運動学習を成立させる上で重要な役割を果たしていると考えられている。この小脳LTDとは、シナプス刺激後に、シナプス後膜のAMPA型グルタミン酸受容体が細胞内に取り込まれ、その結果、神経伝達効率が減少するもので、プロテインキナーゼC(PKC)による受容体のリン酸化に依存する。この分子機構として、PKC以外にも様々なシグナル分子の関与が報告されている。中でも、多くのシナプス可塑性と同様、細胞内カルシウム(Ca^{2+})の重要性は疑う余地がない。しかし、 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)上昇は数分間のLTD誘導刺激中のみに限定されるのに対し、LTDはその後数十分かけて徐々に誘発され、さらに数時間維持される。このような、短時間の刺激によって引き起こされる一過性のシグナル活性化から、LTPやLTDといった長期的なシナプス調節が起こることは、ほとんどの長期的シナプス可塑性に共通した重要な特徴であるが、なぜこのような時間変換がなされるのか不明である。

一般に神経細胞は形態的に特殊化した巨大な細胞であることから、一つの神経細胞であってもその中で区画化(compartmentalization)されており、細胞内シグナルは空間的に制御されていると考えられている。小脳LTDは刺激を受けたシナプスとその周辺にのみ限定されているが、一方で、広範囲な細胞内シグナル、たとえば、シナプスと核を結ぶシグナルも必要とされると考えられている。このようなLTDの空間的特徴は、学習における特異性を考える上で重要である。しかしながら、LTDの分子機構に関する空間的な情報は乏しいのが現状である。

本研究課題のねらいは、小脳LTDに、どのような分子が関わっているか、という静的な問いではなく、短時間の誘発刺激後、どのような分子がどのように働くことによって長期的、かつ特異的なLTDという現象が引き起こされるのか、という動的な疑問に答えることにより、小脳LTDの脳機能への役割を考える上で重要な時間的・空間的特性のカギを解いていこうというものである。

2. 研究成果

上述のように、LTDを引き起こすために一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が必ず必要なシグナルであることは、多くの研究により示され、また、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす様々な機構についても明らかになっている。従って、一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降にどのような機構がどのように働くかを知ることが重要となる。本研究課題に取り組む前に我々は、以下に述べる研究により、PKC、MAPキナーゼ(MAPK)、ホスホリパーゼA2(PLA2)を含むポジティブフィードバック機構が、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降に働く重要な機構である可能性を示してきた。

- $[Ca^{2+}]_i$ 上昇以降に働く機構の特性に関して、我々は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とLTDとの関係を調べることにより、正の協同作用を生み出すことのできるもの、かつ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間成分を蓄積するLeaky integratorの性質を持つことを示した。

- 以前に、上述のポジティブフィードバック機構が、LTDを維持するために働くという理論モデルが提唱されていた。この理論モデルを利用して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とLTDとの関係を調べたところ、実験結果を見事に再現することに成功した。
 - さらに、ポジティブフィードバック機構を止める処置を行うと、理論モデル、実験、いずれの場合にもLTDの Ca^{2+} に対する感受性が低下することがわかった。
- そこで、本研究課題では、ポジティブフィードバック機構が実際に働くこと、いつ、どのように働くか、さらにはこのポジティブフィードバック機構が働く機構の詳細について調べてきた。

(1) PKC, MAPK を含むポジティブフィードバック機構が小脳 LTD のシグナルとして働く。

ポジティブフィードバック機構が働くということは、PKCとMAPKがお互いに上流でも下流でも働くということになる。このことを示すため、<a> PKCはMAPKの上流で働く、 MAPKもPKCの上流で働く(図1A)、

という二つを示すための実験を行った。LTDを誘導する刺激を与えた際にプルキンエ細胞内で見られるMAPK活性化は、PKC抑制剤(bisindolylmaleimide I)によって抑えられ(図1B)、また、PKC活性化物質であるホルポールエステル(TPA)投与により引き起こされるLTDは、MAPK経路抑制剤(U0126)により抑えられた(図1C)。これらのことから、

MAPKはPKCを介して活性化され、このPKCによるMAPK活性化はLTDに必要なことがわかった。つまり、PKCがMAPKの上流で働くという<a>経路を示したことになる。一方、LTD刺激によりプルキンエ細胞で見られるPKC活性化はU0126により抑えられ(図1D)、MAPKを直接活性化した際(下記参照)に引き起こされるLTDはPKC抑制ペプチドにより抑えられた(図1E)。これらの結果により、MAPKもPKCの上流で働くという経路を示すことができた。

このように、LTD誘発におけるPKCとMAPKの相互活性化が明らかになり、したがって、ポジティブフィードバック機構がLTDを引き起こすために働くという結論を得た。

この研究において、TPAを用いることでPKCを直接活性化することは可能であったが、MAPKを直接活性化するためのツールが必要であった。そこで、ケージ恒常的活性型MEK(MEK-CA)蛋白を作製した。MEKはMAPKの上流のリン酸化酵素であり、定常状態の細胞ではMEKのMAPK結合部位を介してMAPKと結合している。MAPK結合部位には、その結合に重要な3つのリジン残基が存在する。細胞にMEKを活性化する刺激が加わると、活性化したMEKは結合しているMAPKをリン酸化し、MAPKは活性化される。MEK-CAとは、MEKのキナーゼ部位に変異を入れたもので、刺激がなくても恒常的に活性化する。このMEK-CAの活性を光照射で調節することを目的とし、精製したMEK-CA蛋白をNVOCという光感受性物質で標識(ケージ)した。NVOCは、塩基性アミノ酸を特異的に標識する物質なので、MAPK結合部位のリジンも標識されるであろう。従って、ケージMEK-CAは、MAPKと結合できないためにMAPKを活性化できないが、光照射後には活性が回復する

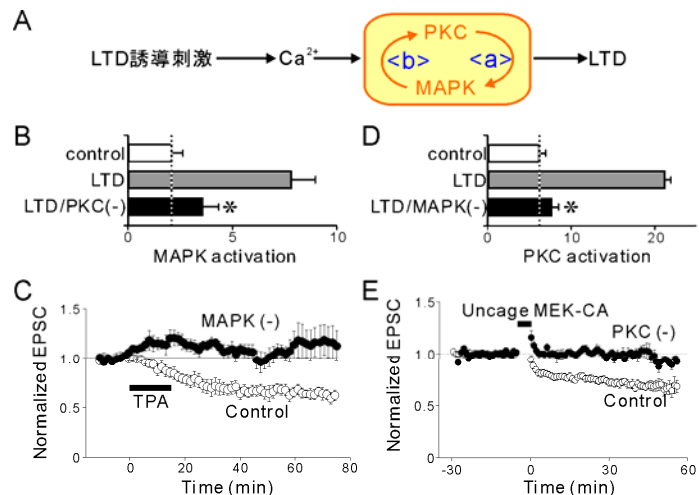


図1. PKCとMAPKの相互活性化はLTDに必要な。A: ポジティブフィードバック機構の簡略図。図中<a>との経路をそれぞれ結果B, Cと結果D, Eにより明らかにした。B: LTD誘導刺激によって見られるMAPK活性化はPKCを抑制することにより抑えられる。C: TPAによってPKCを直接活性化した際に見られるLTDは、MAPK経路を抑制することにより起こらなくなる。D: LTD誘導刺激によって見られるPKC活性化はMAPK経路を抑制することにより抑えられる。E: ケージ恒常的活性型MEKによってMAPKを直接活性化した際に見られるLTDは、PKCを抑制することにより起こらなくなる。

のではないかと考えた。そして実際に *in vitro* で、作製したケージ MEK-CA と、これに UV 照射を施したアンケージ MEK-CA との MAPK リン酸化活性を調べたところ(図2A)、アンケージ MEK-CA は約10倍高濃度のケージ MEK-CA と同程度の活性を示した(図2B)。不活性型の MEK(MEK-KD)を使用した場合、ケージを入れたものでもアンケージしたものでも全く活性は見られなかった(図2C)、これは MEK による特異的な MAPK の活性を見たものであり、UV 照射による副次的な活性ではないことも確かめられた。また上述のように、ケージ MEK-CA を投与した細胞では、UV 照射によって LTD が観察されたのに対し、ケージ MEK-KD を投与した細胞では、LTD は引き起こされなかった(図2D)、アンケージ MEK-CA による LTD は MAPK 活性に依存したものであると考えられる。

(2) ポジティブフィードバック機構は LTD 発現に必要

上述の研究から、ポジティブフィードバック機構が LTD を引き起こす上で働いていることがわかったが、LTD の誘導に必要であるのか、あるいはその後の発現・維持にも働くのか明らかではない。以前提唱された理論モデルでは、誘導後60-90分間の発現・維持において必要であると予測された。そこで、実際にいつポジティブフィードバック機構が働くのか、LTD 誘導後の様々な時間に PKC 抑制剤を投与することにより検討した。

図3Aに誘導直後、10分後、30分後に PKC 抑制剤を加えた場合の結果を示す。刺激終了直後に加えると、LTD はほぼ完全に抑制される。LTD が発現し始めた10分後に PKC 抑制剤を投与した際には、LTD の発現が抑制されるのみではなく、神経伝達効率が元のレベルに回復する傾向が見られた。一方、30分後に加えた場合、コントロールと同様の LTD が観察された。まとめとして、PKC 抑制剤を加えた時間とその際に見られる LTD 量との関係を図3B に示す。これらの結果から、PKC は誘導刺激後20-30分まで必要であることがわかった。このような長期間必要とされる PKC 活性がポジティブフィードバック機構によって維持されていることを確かめるため、ポジティブフィードバック機構に含まれる別の分子、PLA2 の抑制剤を用いて同様の実験を行った。その結果、PLA2 抑制剤も PKC 抑制剤と同様の効果を持つことがわかった(図3C)。すなわち、LTD 誘導刺激後、ポジティブフィードバック機構が働くことによって PKC 活性を20-30分間維持し、これにより LTD が成立すると結論付けることができた。

この LTD 誘導刺激後20-30分という時間は、LTD が徐々に発現する時間である。従って、以上の研究によりポジティブフィードバック機構は LTD の発現相で働くことが明らかになった(図4)。

(3) Raf キナーゼ抑制蛋白は PKC による MAPK 活性化を仲介する

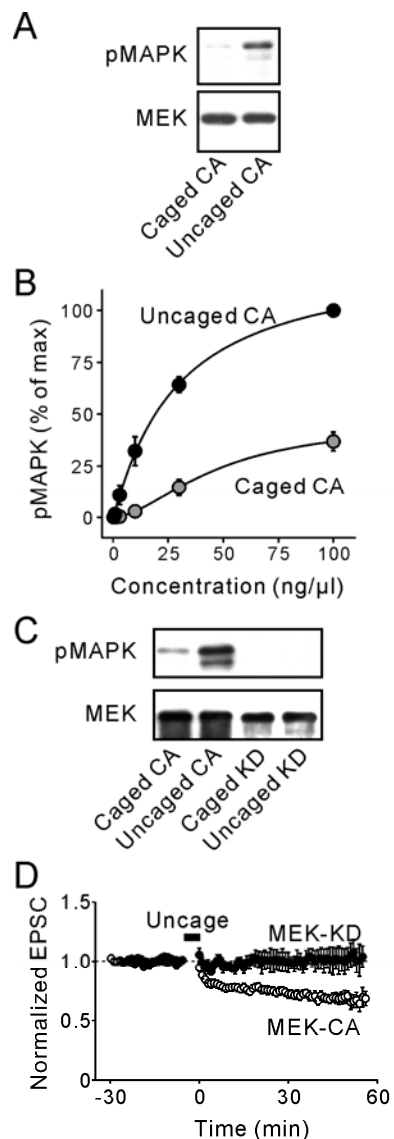


図2. ケージ MEK-CAは UV 照射後に MAPK 活性化を引き起こす。A: MEKによる MAPK リン酸化の *in vitro*での解析。作製したケージ MEK-CAに UVを照射してアンケージすると MAPK を強くリン酸化する。B: MEK-CAによる MAPK リン酸化の容量反応曲線。C: MEK-KD をアンケージしても MAPK リン酸化は見られない。D: ケージ MEK-CA を細胞内に投与したときのアンケージにより LTD が観察される。従って、この LTD は MAPK 活性化によるものである。

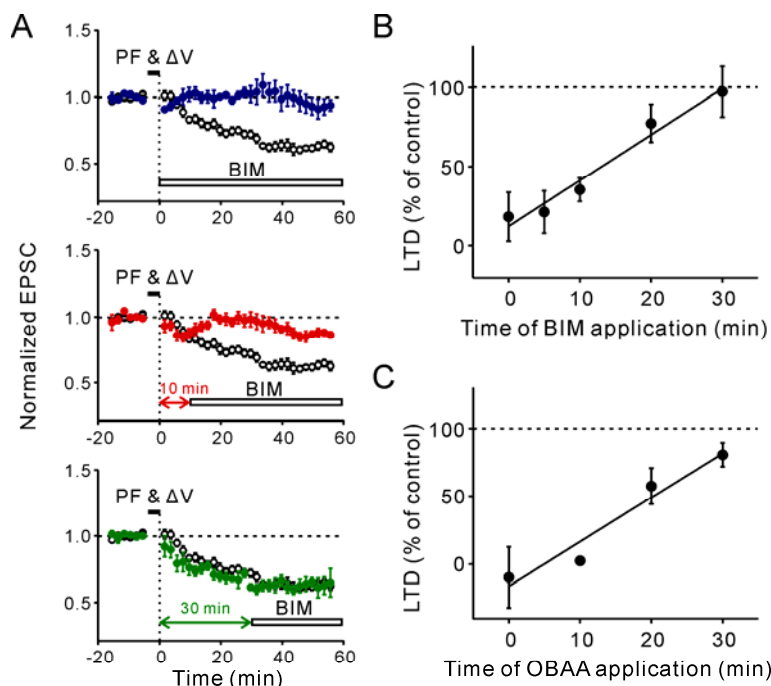


図3. ポジティブフィードバック機構により維持される持続的PKC活性はLTD発現に必要である。A: LTD誘発直後、あるいは10分後にPKC抑制剤を投与するとLTDは抑制されるが、30分後に加えた場合には影響を受けない。B: PKC抑制剤を加えたLTD誘発後の時間と、その際に見られるLTD量との関係。LTD量は、コントロールを100%とした場合の相対値を示す。C: PKC抑制剤の代わりにPLA2抑制剤を用いて、Bと同様の関係をとった図。

直接 PLA2 をリン酸化して活性化すること、活性化した PLA2 が産生するアラキドン酸 (AA) が PKC に結合して活性化させること、が示されている。PKC 依存性に MAPK が活性化されることに関しては、古くから多くの細胞で示されてきているし、我々の研究(1)で示したように、プルキンエ細胞でも LTD 刺激をした際に起こっている。しかしながら、PKC は MAPK、その上流の Raf や MEK を直接活性化することができない。したがって、何らかの分子が PKC 依存性の MAPK 活性化を仲介しているはずであるが、一般的な知見はない。そこで、プルキンエ細胞で LTD を引き起こす際に働くポジティブフィードバック機構の全体像を明らかにするため、PKC と MAPK をつなぐ分子について検討を行った。

そこで着目したのが、Raf キナーゼ抑制蛋白 (RKIP) である。RKIP は、その名の通り、定常状態において Raf と結合して Raf の活性を抑制している蛋白である。この RKIP が PKC によってリン酸化を受けると、Raf から離れて Raf が活性化できる状況になる、ということが培養細胞系で示された。RKIP に着目した理由は、RKIP がプルキンエ細胞に多量に発現しているからである。小脳スライスで RKIP 抗体で染色すると、多くの部分はプルキンエ細胞のマーカーであるカルビンディン抗体のシグナルと一致して、鮮明にプルキンエ細胞が染色される。

まず、RKIP が LTD を引き起こす機構に含まれるかを調べた。RKIP の PKC によるリン酸化を受けない変異体は、PKC 活性に関わらず Raf を抑制することが知られている。そこで、この変異

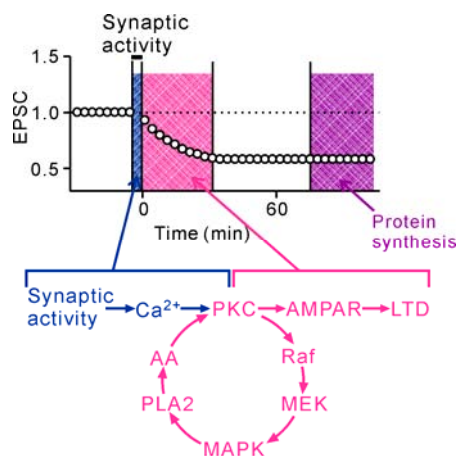


図4. LTDの経過に沿って変化するシグナル経路。LTDを誘導する数分間のシナプス刺激により一過性の $[Ca^{2+}]$ 上昇が引き起こされる。この一過性の $[Ca^{2+}]$ 上昇によりPKC活性が誘導され、ポジティブフィードバック機構が働き始める。したがって、 $[Ca^{2+}]$ がもとのレベルに戻った後も、ポジティブフィードバック機構によりPKC活性化が持続するので、LTDが徐々に発現する。その後何らかの機構により、新たな平衡状態、すなわち維持相が保たれると考えられる。

ポジティブフィードバック機構は、短時間の誘導刺激中に引き起こされる一過性のシグナルから、長期的なLTDという現象を実際に成立させるために必要な時間変換を担うシステムである。このポジティブフィードバック機構に含まれる分子の詳細を図4に示している。これら個々の分子がLTDを引き起こす機構に含まれることは、様々な研究により明らかになっている。また、培養細胞などを用いたシグナル経路の研究により、MAPKが

体(RKIP-TV)蛋白と野生型の RKIP(RKIP-WT)蛋白を in vitro で精製し、プルキンエ細胞に導入後 LTD を観察した。その結果、RKIP-WT を導入した際には、LTD はコントロールと同程度に引き起こされたが、RKIP-TV を導入した際には LTD は抑制された。この結果は、in vitro で精製した蛋白を導入する代わりに、ウィルスベクターを用いてプルキンエ細胞内で発現させた場合にも再現された。したがって、RKIP のリン酸化が LTD に必要であると結論付けられる。免疫沈降実験において、実際に RKIP と Raf との結合が LTD 刺激により減少する結果を得ており、RKIP がリン酸化されて Raf から解離するという経路が LTD を引き起こすために働いていると考えられる。

さらに、本当に RKIP が PKC から MAPK を活性化する経路で働いているかを検討するため、PKC を直接活性化した際に見られる LTD(PKC-LTD)と、MAPK を直接活性化した際に見られる LTD(MAPK-LTD)に対する RKIP-TV の効果を調べた。MAPK-LTD は RKIP-TV 存在下でもコントロールと同様に引き起こされるが、PKC-LTD は抑制された。この結果から RKIP は PKC の下流、かつ MAPK の上流で働くと言いうことができる。したがって、RKIP は PKC 依存性の MAPK 活性化を仲介する、ポジティブフィードバック機構の一員であると結論付けることができる。

3. 今後の展開

はじめに述べたように、短時間の刺激によって引き起こされる一過性のシグナル活性化から長期的なシナプス調節が引き起こされることは、長期的シナプス可塑性に共通した重要な特徴である。それにもかかわらず、この時間変換機構についてはほとんどわかっていなかった。我々の研究によりポジティブフィードバック機構という興味深い機構が小脳 LTD において時間変換機構として働くことがわかったが、なぜこのような性質を生み出すことができるのかは不明である。そこで今後、ポジティブフィードバック機構活性の時空間的特性を調べることによりこの疑問を解明していこうと考えている。さらに、このポジティブフィードバック機構は、LTD が徐々に発現する際に働くこともわかった。その後の維持には直接は関わっていないようであるが、発現相が成立してはじめて維持相に入るので、ポジティブフィードバック機構の下流の分子が維持に関与する可能性もある。今後の研究により、どのような機構により、LTD が維持されるのか、検討していく予定である。

4. 自己評価

まず、LTD を引き起こすためにポジティブフィードバック機構が働くこと、また、この機構を必要とする時間、に関しては、初めの段階で一部の予備データがあったこともあり、当初の目標通りに検討を進めることができ、実際に早い段階で論文に仕上げることができた。また、RKIP の役割についての検討については、予定していたより時間はかかってしまったが、ほぼ終了し、論文を近い将来に投稿することができるであろう。一方、LTD の空間的情報に関する検討と維持相の機構に関する検討は、準備段階で終了した。しかし、これらの検討は、新しい技術や挑戦的な実験を必要とするものなので、さきがけ研究期間中に準備が整ってきたことは、今後の研究を考える上で大きな成果であると考えている。

5. 研究総括の見解

ケージ恒常的活性型 MEK 蛋白の作製システムを構築し、プルキンエ細胞の PKC,MAPK の feed-forward activation に関して、確実に研究を遂行している点を評価する。今後、LTD の新しい生理機能など、LTD に対する新しい知見を積み重ねて新しい研究の展開がなされることを期待する。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Tanaka, K., Augustine, G. J., "A positive feedback signal transduction loop determines timing of cerebellar long-term depression." *Neuron* 59: 608-620, 2008

(2)特許出願
なし。

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表

- ・脳と心のメカニズム 第 8 回冬のワークショップにて招待講演, “小脳長期抑制の持続相を決定するポジティブフィードバックメカニズム” 2008.1.11
- ・第 33 回日本神経科学会(神戸市), シンポジウム“小脳回路:発達と可塑性の最前線”にて発表。“Molecular mechanisms regulating temporal aspects of cerebellar long-term depression” 2010. 9. 4

受賞

- ・2008 年度日本神経回路学会論文賞 2008.9
(受賞論文; Tanaka, K., Khiroug, L., Santamaria, F., Doi, T., Ogasawara, H., Ellis-Davies, G., Kawato, M., Augustine, G. J. (2007) Ca²⁺ requirements for cerebellar long-term synaptic depression: role for a postsynaptic leaky integrator. Neuron 54; 787-800)

著作物

- ・田中(山本)敬子, 黒田真也 “シナプス可塑性における Raf と Raf キナーゼ抑制蛋白の役割”生体の科学, 61 巻, 5 号, 2010
- ・田中 敬子, George J. Augustine, 「ポジティブフィードバック機構が小脳長期抑圧の時間変換スイッチとして機能する」実験医学 Vol. 27, No. 1, 2009