

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 小脳プルキンエ細胞の長期抑圧とカルシウムシグナル関連因子に関する研究

指導教官 飯野正光教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月進学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 藤原明子

背景

小脳プルキンエ細胞には登上線維と平行線維が興奮性シナプスを作っており、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率が長期間にわたって抑制される現象-長期抑圧(LTD)-は、運動学習のシナプスレベルでの基礎過程であると考えられている。LTD はプルキンエ細胞の AMPA 受容体を介する電流が低下することで表現され、LTD 形成にはプルキンエ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が必須であることが知られている。LTD は登上線維入力と平行線維入力の同時入力を受けたときにのみ生じるが、2 種類の線維の入力を必要とする理由や、プルキンエ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が AMPA 受容体を介する電流を低下させる機構も不明である。登上線維の活動はプルキンエ細胞内へ Ca^{2+} の流入を引き起こし、平行線維の活動はシナプス後膜の代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)を活性化し、ホスホライペース C(PLC β)を介して IP_3 の産生を引き起こす。プルキンエ細胞は、 Ca^{2+} と IP_3 の両因子によって活性化される IP_3 受容体が大量に発現している細胞であり、細胞内 Ca^{2+} ストア（小胞体）からの IP_3 受容体を介する Ca^{2+} 放出が LTD に関与するという仮説が提唱されている。そこで、本研究では 1:「プルキンエ細胞における IP_3 受容体の基本性質の解析」、2:「細胞内 Ca^{2+} が AMPA 受容体を介する電流を低下させるメカニズムの解析」を行った。

第一章 「プルキンエ細胞における IP₃ 受容体の基本性質の解析」

プルキンエ細胞には IP₃ 受容体(1型)が高密度で発現しているにもかかわらず、Ca²⁺放出のために高濃度の IP₃ が必要であることが示唆されていた。しかし、その原因については明らかではなかった。そこで私は、プルキンエ細胞の細胞膜を透過性にし、制御された細胞質環境における小胞体内腔の Ca²⁺濃度をリアルタイムイメージングすることで IP₃ 受容体の性質をより正確に調べることにした。

材料は ICR マウスの胎児小脳から調製したプルキンエ細胞初代培養系(培養3週目)を用いた。低親和性 Ca²⁺蛍光指示薬 (Fura2/AM) を細胞質および小胞体に負荷し、次に、細胞膜を界面活性剤で透過性にして、細胞質の色素を除去すると共に、細胞質の Ca²⁺および IP₃ 濃度を制御できるようにした。このように制御した細胞質濃度条件下において、Fura2/AM の蛍光強度変化を CCD カメラでイメージングすることによって小胞体内腔の Ca²⁺濃度変化をリアルタイムで測定できるようにした。この手法を用い、小胞体からの Ca²⁺放出がどのような外的条件によって制御されているのかを解析した。

その結果、小脳プルキンエ細胞における IP₃ 受容体の IP₃ に対する感受性は、他の組織に発現している同じサブタイプの受容体や、精製した小脳由来の受容体よりも約 20 倍低い(EC₅₀ = 25.8 μM)が、Ca²⁺感受性については差がない、ということが分かった。また、IP₃ 受容体の密度は細胞体よりも樹状突起のほうが 1.5 倍高いことも分かった。以上のような性質は、拡散性の高いシグナル分子である IP₃ の効果を局所に限ることができ、シナプス可塑性に局所性を持たせることに貢献していると考えられる。

第二章 「細胞内 Ca²⁺が AMPA 受容体を介する電流を低下させるメカニズムの解析」

登上線維入力と平行線維入力によって誘導されたプルキンエ細胞内 Ca²⁺濃度上昇がどのように作用して LTD を形成するのかは未だに明らかになっていない。近年、小脳 LTD にはクラスリン依存性エンドサイトーシスによる AMPA 受容体の細胞体内への取り込みが関与することを示唆する報告があった。クラスリン依存性エンドサイトーシスを誘導する分子メカニズムは未だに不明な部分が多いが、脱リン酸化酵素の働きによって促進されるという報告もある。そこで私は、Ca²⁺依存的に活性化され、かつ、プルキンエ細胞に多く発

現している脱リン酸化酵素カルシニューリンに注目した。カルシニューリンの LTD に対する役割を明らかにすることで、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と LTD を結びつけることができると考えたからである。

実験には、マウス(C57BL/6, 生後 18-25 日目)から傍矢状断小脳スライス標本を作製してホールセルパッチクランプ法によりプルキンエ細胞の電気生理学的記録を行い、カルシニューリンを抑制することが LTD 形成にどのような効果を与えるかを調べた。

はじめにカルシニューリン抑制薬であるサイクロスポリン A が平行線維-プルキンエ細胞シナプスの興奮性後シナプス電流(EPSC)に与える影響を調べた。通常の細胞外液中で EPSC を測定し、その振幅が 10 分間以上安定したことを確認した後、細胞外液を $1 \mu\text{M}$ サイクロスポリン A を含む細胞外液と置換した。EPSC の振幅はサイクロスポリン A を入れた前後で変化せず、その振幅の安定は置換後少なくとも 1 時間は持続した。従って、この薬物が平行線維-プルキンエ細胞間の EPSC の振幅に直接の影響は及ぼさないことが確認できた。

次に、 $1 \mu\text{M}$ サイクロスポリン A を含む細胞外液に 1 時間以上浸しておいた小脳スライス標本上で、平行線維刺激とプルキンエ細胞の脱分極(登上線維刺激の代用)が同期した反復刺激を 1Hz, 300 秒間(以下, LTD 誘導刺激)行った。この刺激を行ってから 20-30 分後において、薬物なしの対照実験では EPSC が約 30%低下する LTD が観測されたが、サイクロスポリン A 中では EPSC の低下は約 15%にとどまり、LTD の形成が有意に抑制された。また、別のカルシニューリン阻害薬である FK506 を用いても実験をおこなったが、全く同じ結果が得られ、FK506 でも LTD 形成が抑制された。

カルシニューリン阻害薬を細胞外液中に入れたことで LTD 形成が抑えられる原因には、(1)シナプス前終末(平行線維側)からのグルタミン酸放出が薬物により増強されたため、後膜側(プルキンエ細胞側)のグルタミン酸に対する応答の低下が打ち消されたこと、(2)シナプス後膜側での LTD 形成経路が妨げられたこと、の 2 点が考えられる。(1)の可能性を確かめるため、次のような実験を行った。パッチ電極内に BAPTA 20 mM を入れ、プルキンエ細胞内 Ca^{2+} をキレートしてシナプス後膜側で LTD が起きない状態にし、LTD 誘導刺激をサイクロスポリン A 投与群と非投与群に対して行った。刺激後の EPSC の振幅は両群ともに刺激の前後で有意な変化はみられず、両群間にも有意な

差は見られなかった。この結果は、カルシニューリンを抑制した条件下における LTD 誘導刺激がシナプス前終末からのグルタミン酸放出を増強させないことを示し、(2)の機序の関与を示唆している。(2)の可能性をさらに確かめるため、今度はカルシニューリン阻害ペプチドを含んだパッチ電極内液でプルキンエ細胞をパッチクランプし、シナプス後膜側のみでカルシニューリンを阻害した条件下にて LTD 誘導刺激を行った。この実験の対照実験には、阻害ペプチドの特異的配列をスクランブルしたペプチドをパッチ電極内液に含んだものを用いた。

対照実験では EPSC が約 30%低下する LTD が観察されたのに対し、カルシニューリン阻害ペプチド入りの内液でパッチクランプした細胞では刺激前のものに比べて EPSC がむしろ数%上昇し、LTD 形成が有意に抑えられた。

以上の結果は、LTD 誘導刺激に引き続くプルキンエ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が少なくともカルシニューリンを活性化することで LTD を形成していることを強く示唆している。

第一章ではこれまでにない精度の高い方法を用い、プルキンエ細胞における IP_3 受容体の IP_3 に対する感度が非常に低いことを明らかにし、第二章では脱分極・平行線維同時入力に引き続くプルキンエ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と LTD を結びつける因子を初めて同定した。これらの結果は運動学習の基礎過程である LTD 形成を解明するための研究に新たな糸口を提供すると考えられる。