

## 論文の内容の要旨

論文題目 電位依存性カルシウムチャネルの活性化による非 Hebb 型長期増強の誘導

指導教員 真鍋 俊也 教授

東京大学大学院医学系研究科

2004 年 4 月入学

医学博士課程

脳神経医学専攻

加藤 紘之

我々の脳にいかにして情報が蓄積されるのかを解明することは、神経科学における重要な課題のひとつである。個体における記憶・学習の分子的基盤は神経細胞間のシナプス伝達効率の可塑性であると考えられている。こうした神経回路の可塑性が有する特性として 20 世紀前半に予測された仮説に、Hebb の法則がある。これは「2つの神経細胞が同時に発火したならばその細胞間の神経伝達は強化される」というシナプス前/後細胞の協働性と、「神経伝達の強化はシナプスごとに独立しており、同じ細胞上のシナプスでも互いに影響は及ぼさない」という入力特異性の2つの性質として記述されており、このような性質を持つ可塑性のことを Hebb 型の可塑性と呼ぶ。現在までに、Hebb 型の可塑性は哺乳類の中樞神経系のさまざまな領域で観察されており、Hebb の法則は個体における記憶・学習の中心的な原理として位置付けられてきた。

シナプス伝達の長期可塑性には、長期増強 (long-term potentiation, LTP) と長期抑圧

(long-term depression, LTD) が存在する。LTP の誘導機構には未だ解明されていない部分が多いが、これまでの多くの報告からカルシウムイオンの必要性が示唆されてきた。カルシウムイオンはリン酸化酵素や脱リン酸化酵素の活性化を介して、神経伝達物質受容体や転写因子の調節、さらにはシナプスの形態変化を引き起こすことにより LTP を誘導すると考えられている。

細胞へのカルシウムイオンの流入経路としては、主に NMDA 受容体、電位依存性カルシウムチャネル (voltage-dependent calcium channel, VDCC)、細胞内小器官からの流出という 3 つの経路が知られている。これらの経路の中で最もよく調べられているものが NMDA 受容体である。NMDA 受容体は、シナプス前細胞から放出されたグルタミン酸の結合と、シナプス後細胞の脱分極の両者が同時に起こったときにカルシウムの流入を引き起こす。こうした性質により、NMDA 受容体からのカルシウム流入は LTP におけるシナプス前/後細胞の協働性と入力特異性を説明することが容易であるため、Hebb の法則の分子的基盤として広く受け入れられてきた。

一方、NMDA 受容体と比較して VDCC や細胞内小器官からのカルシウムイオンが LTP に有する役割は十分な検討を受けてこなかった。VDCC の LTP への関与については、支持する報告と否定する報告の双方が存在し、意見の一致が得られていない。さらに、関与を支持する報告においても、VDCC からのカルシウムイオン流入だけでなく、シナプス前細胞から放出される因子が必要である可能性が論じられてきた。しかし、仮に VDCC からのカルシウムイオンだけで LTP が誘導されるならば、活動電位の発生により十分に VDCC が活性化した細胞においては、入力の有無に関わらず細胞上の広範なシナプスに LTP が誘導される可能性がある。このような LTP が実際に存在するならば、Hebb の法則に従わない新たな可塑性の原理となることが期待される。

本研究においては、成体マウスの海馬 CA1 領域錐体細胞を標本として用い、VDCC から流入するカルシウムイオンにより LTP を誘導する実験手法を検討した。その結果、パッチクランプ法を用いて細胞を電位固定し、細胞体を脱分極させるパルスを間隔をあけて繰り返し与えることにより、シナプス前細胞からの入力線維を刺激することなく LTP が誘導されることを見出した。

この LTP の分子機構を検討するため薬理的な実験を行なった。最初に、L 型 VDCC の阻害剤である nifedipine の存在下で実験を行なったところ LTP の誘導が抑制された。この結果から、脱分極パルスを用いた LTP の誘導には L 型 VDCC から流入するカルシウムイオンが必要であることが示された。次に、LTP の細胞内機構を検討するため CaMKII 阻害剤である KN-93 の存在下で実験を行なったところ、LTP の減弱が観察された。この結果から、VDCC 依存的 LTP (以下、VDCC-LTP) の誘導には、CaMKII の活性化が必要であることが明らかとなった。また、シナプス前細胞から放出されるグルタミン酸の必要性を検討するために、NMDA 受容体の阻害剤である D-APV と代謝型グルタミン酸受容体の阻害剤である MPEP を投与して実験を行なった。その結果、阻害剤の存在下でも LTP が誘導されたことから、NMDA 受容体や代謝型グルタミン酸受容体の活性化は VDCC-LTP には必要ないことが示唆された。

次に、VDCC-LTP が Hebb の法則を満たさない LTP であるのかを検討した。最初に、その入力特異性について詳細に検討するために、シナプス前細胞からの入力線維を刺激することなく観察される自発的シナプス後電流 (spontaneous excitatory post-synaptic current, sEPSC) の解析を行なった。その結果、脱分極パルスを与えた後では sEPSC の振幅の増大が観察された。この結果は、VDCC-LTP が、入力の有無にかかわらず細胞上の広範なシナプスで誘導されることを示唆している。比較のために、ペアリングプロト

コルを用いて NMDA 受容体依存的 LTP (以下、NMDA-LTP) を誘導して、その入力特異性を検討した。その結果、NMDA-LTP においては、入力を与えたシナプスだけで増強が誘導され、sEPSC の振幅には変化が無いことが確認された。この実験から、これまで広く研究されてきた NMDA-LTP とは異なり、VDCC-LTP は入力特異性を持たないことが明らかとなった。次に、シナプス前/後細胞の協働性について検討するため、電位依存性ナトリウムチャネルの阻害剤である TTX を投与し、その条件で観察される微小シナプス後電流 (miniature excitatory post-synaptic current, mEPSC) の解析を行なった。その結果、TTX によってシナプス前細胞の発火を阻害した条件下でも、脱分極パルスにより mEPSC の LTP が誘導された。従って、VDCC-LTP の誘導にはシナプス前細胞の発火は必要ないことが明らかとなった。以上の結果から VDCC-LTP は、入力特異性、シナプス前/後細胞の協働性という Hebb の法則の性質をいずれも持たないことが明らかとなった。さらに、VDCC-LTP について、細胞上におけるシナプスの位置が LTP に影響を与えるかどうかを検討するため、mEPSC を rise time により分類し、LTP の大きさとその相関を検討した。その結果、rise time の短い mEPSC 分画ほど、脱分極パルス後の増強が大きいことが判明した。この結果は、細胞体に近いシナプスほど脱分極パルスによる LTP が誘導されやすいことを示唆するものである。

以上の結果は、VDCC からのカルシウムイオンの流入だけで LTP の誘導には十分であることを明らかにするとともに、入力特異性とシナプス前/後細胞の協働性を満たさない LTP が条件によっては誘導可能であることを示すものである。これは、記憶・学習の中心的な原理と考えられてきた Hebb の法則に従わない、新たな可塑性の存在を支持するものである。このような可塑性の発見は、神経細胞のネットワークがいかにして情報を蓄えるかという理論に対して新たな原理を提供するとともに、われわれの脳の中

で起こっている、記憶の形成という複雑な機構に関する理解を深めることにつながると考えられる。