

新制

理

1417

小脳抑制性シナプス可塑性の制御機構

川口 真也

主論文

小脳抑制性シナプス可塑性の制御機構

京都大学大学院理学研究科

生物科学専攻

生物物理学系

機能統合学講座機能構造認識分野

川口 真也

要旨

小脳抑制性シナプス可塑性の制御機構

京都大学大学院理学研究科生物科学専攻生物物理学系 川口 真也

神経細胞はシナプスを介して化学的に情報伝達を行う。神経活動依存的にシナプスにおける伝達効率に変化する現象であるシナプス可塑性が中枢神経系の様々な部位において観察されており、それらは学習や記憶の細胞レベルでの基礎過程と考えられている。小脳の抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のGABAを伝達物質とする抑制性シナプスにおいては、プルキンエ細胞の強い脱分極により、GABA_A受容体を介するシナプス伝達が増強され、この増強はrebound potentiation (RP)と呼ばれている。ほとんどのシナプス可塑性はそのシナプスの活性に依存して誘導されるが、RPは入力非依存的に引き起こされる。私はこのRPの発現がどのように制御されているかを解析した。

プルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前抑制性介在ニューロンが活性化すると、そのシナプス前終末よりGABAが放出されて、シナプス後プルキンエ細胞のGABA_B受容体が活性化し、RP誘導を抑制することが分かった。このシナプス活動による可塑性誘導の抑制は、これまでに報告されていない新たな可塑性制御機構であり、入力依存的に神経伝達を調節することを可能にしている。

次に、RP誘導とその抑制を調節する細胞内情報伝達経路を解析した。その結果、GABA_B受容体はGi/Goタンパク質を介するアデニルシクラーゼ抑制により細胞内cAMP濃度を低下させ、その結果PKA活性が低下することによりRP誘導が抑制されることが明らかになった。また、このGABA_B受容体によるPKA活性低下が、calcineurin/DARPP-32/PP-1という脱リン酸化の分子経路を活性化することにより、CaMKII活性が抑制されてRP誘導が抑えられることも明らかにした。

さらに、プルキンエ細胞で脱分極とGABA_B受容体活性化が同時に起こると、細胞接着分子であるインテグリン α 3サブユニットが新規の遺伝子発現を介して増加することが分かった。このプルキンエ細胞における神経活動依存性のインテグリン増加により、Src型チロシンキナーゼ活性を介してRP誘導が4日間以上にわたり抑制されることも明らかにした。

以上のように、脱分極とGABA_B受容体活性化が起こると、それは直ちに可塑性誘導を抑制するとともに、遺伝子発現を介して細胞接着分子の活性を変化させることにより数日間以上にわたって可塑性を起こらなくして、シナプス伝達を安定化することが明らかになった。

目次

要旨	2
目次	3
はじめに	4-7
第一章	
シナプス前神経細胞活性によるプルキンエ細胞GABA _B 受容体 を介した抑制性シナプス増強の抑制	8-21
序論	8-10
結果	10-19
考察	19-21
第二章	
GABA _B 受容体による増強誘導抑制の 細胞内情報伝達経路	22-39
序論	22-23
結果	23-35
考察	35-39
第三章	
インテグリンによるGABA性シナプス伝達の 活動依存的長期安定化機構	40-57
序論	40-41
結果	41-53
考察	54-57
方法と材料	58-62
謝辞	63
参考文献	64-77

本学位申請論文は便宜上三章構成とし、全体として小脳における抑制性シナプス伝達の可塑性誘導がどのように調節されているかを明らかにするものである。

はじめに

動物は外界の状況を認識して、適切な判断を下しながら行動する。そして、動物は環境の変化に適応し、また経験に基づいて新しい行動様式を獲得するという適応・記憶・学習能力を有している。感覚器により得られた情報を統合して何らかの対応を決断し、運動などの行動指令を作り出す器官が脳である。そして、情報の統合・分析と意思決定を行う脳が、生物の記憶や学習を可能にしている。では、脳の中でどのようにして記憶や学習が獲得されるのだろうか？

脳では千数百億個もの神経細胞が複雑なネットワークを形成しており、その中で情報が処理される。神経細胞は樹状突起と軸索という性質の異なる二種類の突起を有し、主に樹状突起において他の細胞からの情報伝達を受けて、軸索から情報を次の細胞に伝える。その神経細胞同士の情報伝達を化学的に行う機能構造がシナプスである。ある神経細胞の軸索で興奮が伝導してその終末が電氣的に脱分極すると、グルタミン酸、GABAやグリシンなどの伝達物質が細胞外へ放出されて、それらが隣接する神経細胞樹状突起の細胞膜に存在する受容体に結合する。そして、活性化された伝達物質受容体は細胞膜のイオンコンダクタンスを変化させることにより、樹状突起で電氣的応答を誘発してシナプス伝達が起こる。

中枢神経系の様々な部位において、シナプスの情報伝達効率が増加する”シナプス可塑性”と呼ばれる現象が観察されている。多くのシナプス可塑性は、そのシナプス活動履歴に依存してそのシナプス特異的に誘導され、その変化が長時間維持され得る。これら活動依存性・入力特異性・長期持続性という三つの特徴は、経験に依存してその内容についての情報を長い時間保持するという動物の記憶・学習確立の特徴と一致することから、神経細胞同士の情報伝達効率がシナプス可塑性により変化することが、記憶・学習を可能にするのではないかと考えられてきた。近年の研究により、シナプス可塑性制御に異常をもつ動物が記憶・学習障害を示す例が報告されてきており、シナプス可塑性が動物の記憶や学習に寄与している可能性が高いと思われる。

シナプス可塑性についての研究はこれまで国内外で精力的に行われてきており、中でも海馬CA1領野でのグルタミン酸性シナプスにおける長期増強・長期抑圧に関しては、その制御機構について多くの報告がなされている。シャッフアー側枝と呼ばれる神経線維（軸索）とCA1錐体細胞間の興奮性シナプスにおいて、シナプス前シャッフアー側枝を100 Hz程度の高頻度で刺激すると、その後長時間シナプス伝達が増強する。この現象が海馬の長期増強(LTP)である。一方、シナプス前線維を数ヘルツ程度の低頻度で刺激し続けると、シナプス伝達が増強する長期抑圧(LTD)が起こる。LTP, LTDともにNMDA型グルタミン酸受容

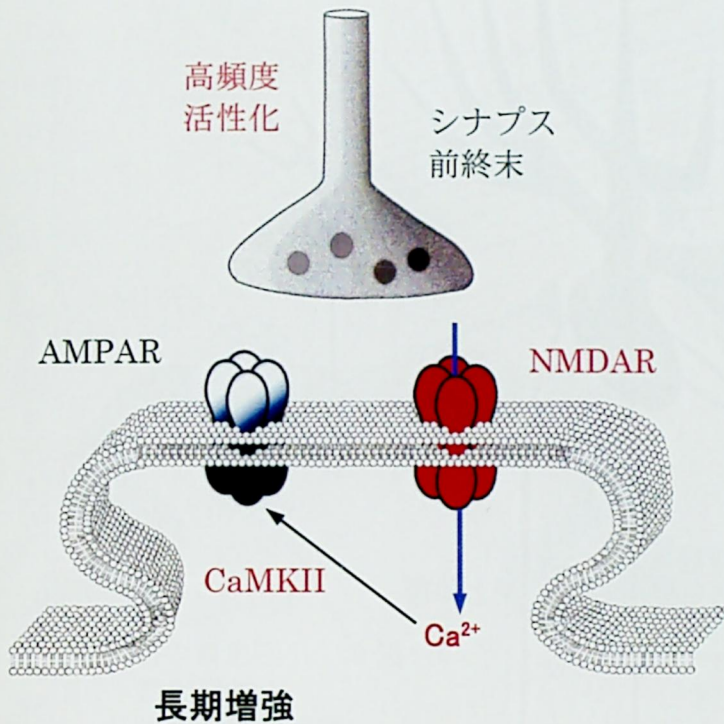


図 1. 海馬におけるLTPのモデル図
 AMPAR : AMPA型グルタミン酸受容体
 NMDAR : NMDA型グルタミン酸受容体

体が活性化して、細胞内Ca²⁺濃度が上昇することがその誘導に必須な条件である(図1)。そしてLTP誘導にはリン酸化酵素であるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)が重要な役割を果たすことが示されている。また、LTD誘導時には、脱リン酸化酵素の活性が重要であることが示されている。海馬におけるLTP/LTDを制御するシグナル伝達経路については、第二章の考察で詳述する。最近、シナプスは機能的にだけでなく構造的にも動的な性質を有し、神経活動に依存してその形態を変化させることが報告されている。シナプス構造の構築・維持・再

編成には細胞接着分子のはたらきが重要であると考えられる。シナプスが神経活動により機能的変化を起こすときに細胞接着分子の機能が必要であったり、また細胞接着分子の量が変化する例が最近報告されつつある。シナプスの機能あるいは構造の変化にどのように細胞接着分子が寄与するのかはほとんど分かっていない。

小脳は中枢神経系の中で最も神経細胞数が多い部位であり、その数は一千億を超えるのではないかと推定されている。小脳皮質は明瞭な三層構造を形成しており、内側から顆粒層・プルキンエ細胞層・分子層と呼ばれている。小脳皮質に含まれる主要な神経細胞は五種類で、顆粒層に顆粒細胞とゴルジ細胞が、プルキンエ細胞層にはプルキンエ細胞の細胞体が、分子層には星状細胞と籠状細胞が存在している。これら五種類のうち興奮性の神経細胞は顆粒細胞のみであり、他の四種の細胞はGABAを伝達物質とする抑制性の神経細胞である。図2に小脳神経回路の模式図を示した。小脳への入力は一は苔状線維入力、もう一つが登上線維入力である。橋核から入った苔状線維が顆粒細胞に投射して興奮性伝達を行い、顆粒細胞は平行線維を介してプルキンエ細胞に興奮性の情報伝達を行い、プルキンエ細胞は小脳核に抑制性の出力をする。以上が小脳皮質の主要な入出力経路である。皮質内では、ゴ

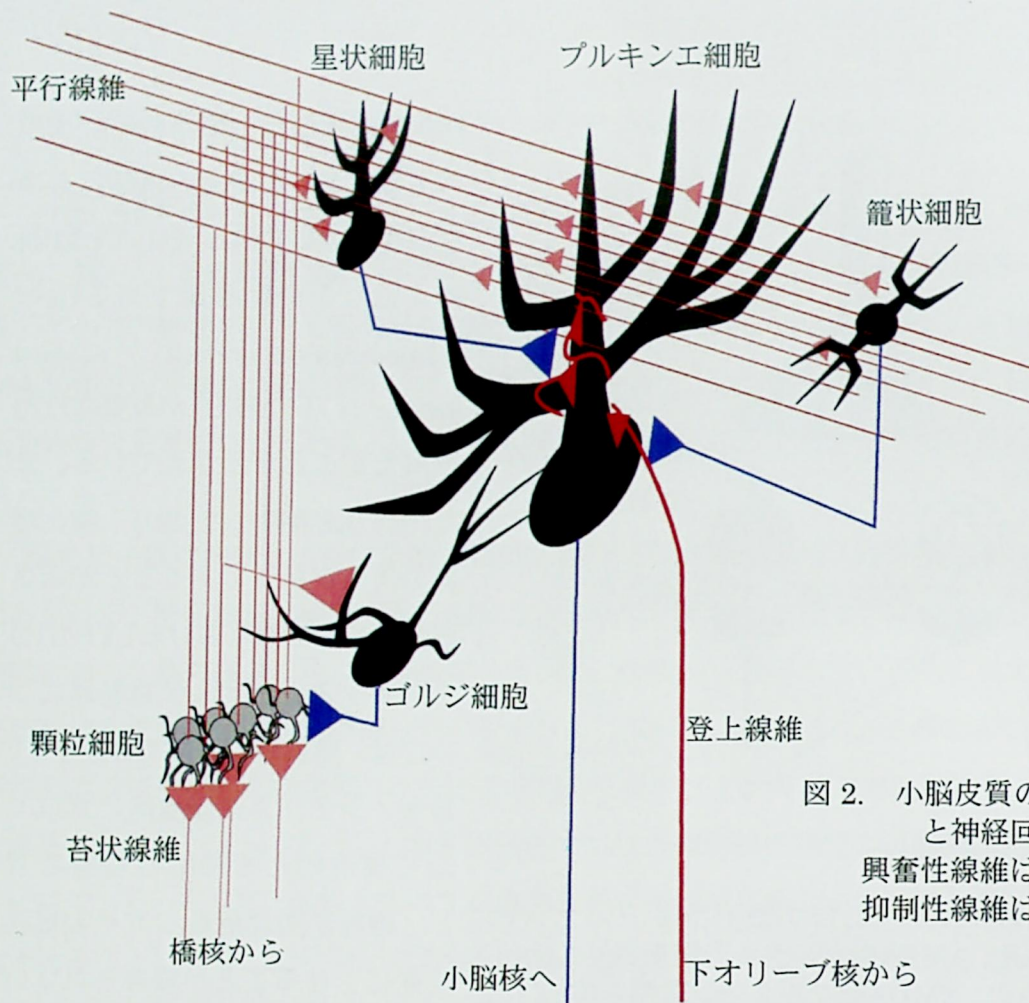


図 2. 小脳皮質の神経細胞と神経回路
興奮性線維は赤、抑制性線維は青で示す

ルジ細胞が顆粒細胞を抑制し、分子層の星状・籠状細胞といった抑制性介在ニューロンがプルキンエ細胞に抑制性の情報伝達を行う。また、下オリーブ核から入った登上線維はプルキンエ細胞に非常に強力な興奮性情報伝達を行い、プルキンエ細胞を大きく脱分極させる。

小脳皮質におけるシナプス可塑性で最もよく知られているのは、平行線維-プルキンエ細胞間のLTDである。図3に示すように、LTDは登上線維と平行線維から同期した入力が増え繰り返されることにより、平行線維-プルキンエ細胞間のシナプス伝達が長時間減弱する現象で、小脳における運動学習の細胞レベルの基盤と考えられている。一方、分子層の抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のGABA性シナプスにおいても、神経活動により可塑性が誘導されることが知られている。それは、登上線維入力によりプルキンエ細胞が大きく脱分極して細胞内のCa²⁺濃度が上昇すると、抑制性シナプス伝達が増強するという可塑性で、rebound potentiation (RP)と呼ばれている(図4)。

本論文では、シナプス前介在ニューロンの活性によるRPの抑制、その調節を担う細胞内情報伝達経路、そして神経活動による細胞接着分子の活性亢進を介したシナプスの長期安定化という、これまでに報告されたことの無い独特の制御機構が小脳の抑制性シナプスで機能していることを示す。

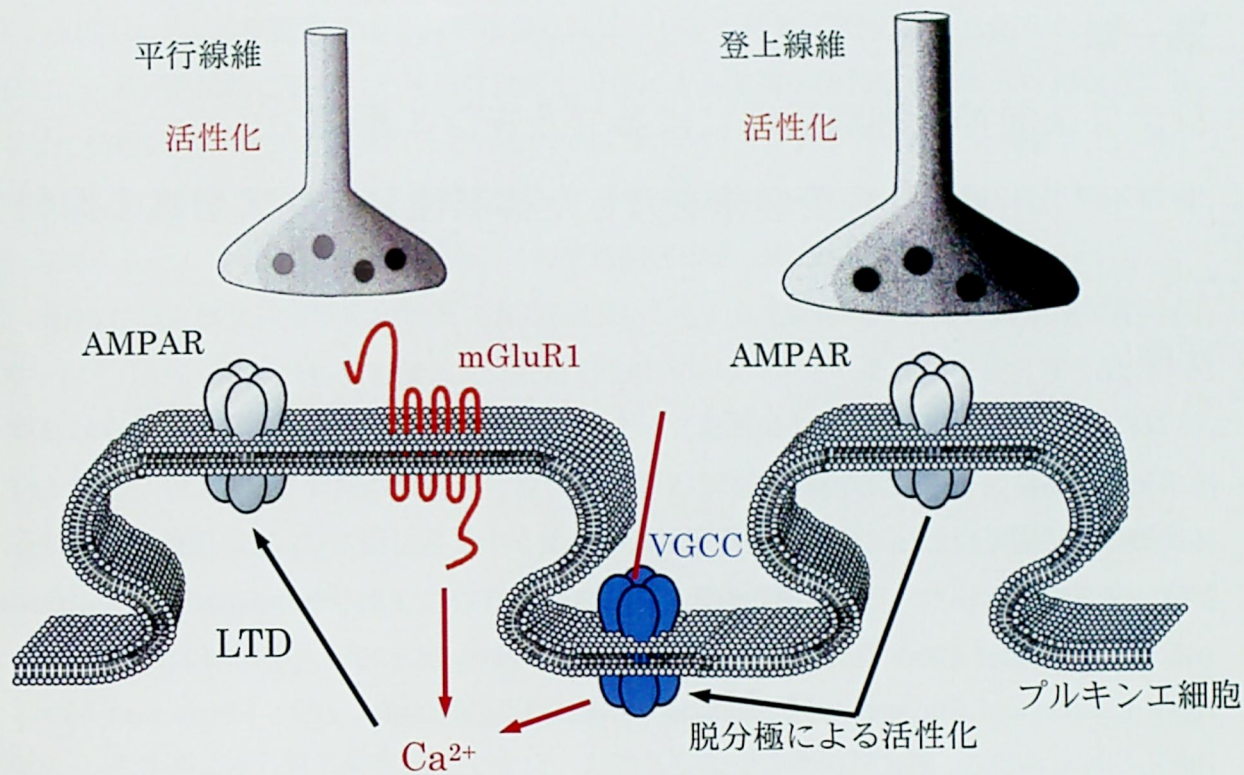


図 3. 小脳LTDのモデル図

AMPA: AMPA型グルタミン酸受容体

mGluR1: 代謝型グルタミン酸受容体1

VGCC: 電位依存型 Ca^{2+} チャネル

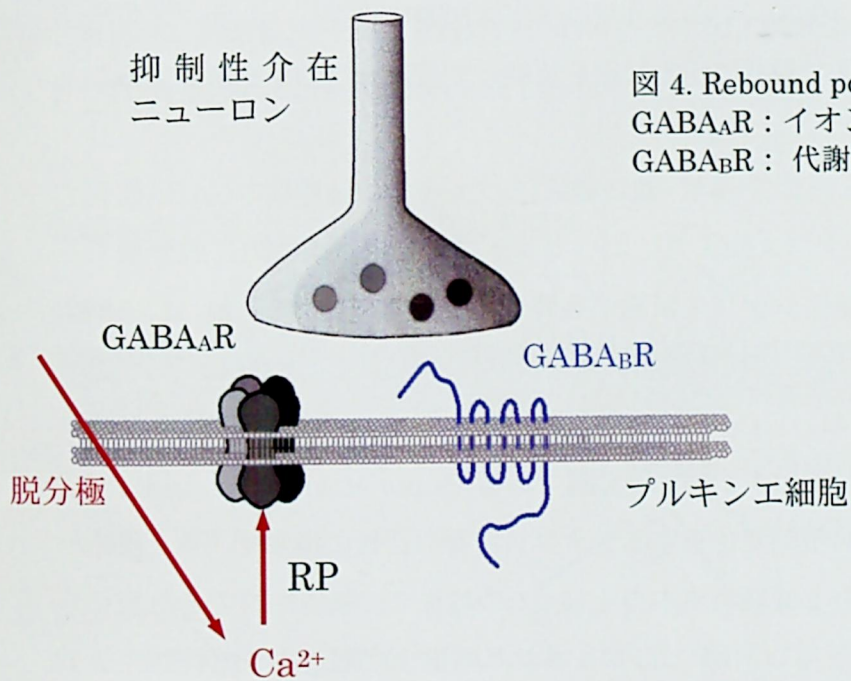


図 4. Rebound potentiationのモデル図

GABA_AR: イオン透過型GABA_A受容体

GABA_BR: 代謝型GABA_B受容体

第一章

シナプス前神経細胞活性によるプルキンエ細胞

GABA_B受容体を介した抑制性シナプス増強の抑制

序論

これまでに中枢神経系の多くの部位でシナプス活動に依存して、そのシナプスの伝達効率が変化するシナプス可塑性が報告されている。シナプス活動に依存して、そのシナプスに特異的に長時間にわたって情報伝達効率に変化するシナプス可塑性は、中枢神経系における記憶・学習の細胞レベルでの基礎的過程であると考えられてきた (Bailey et al., 2000; Bliss and Collingridge, 1993; Daniel et al., 1998; Hansel et al., 2001; Kandel, 2001; Kano, 1995; Linden and Connor, 1995; Lisman et al., 2002; Malenka, 1994; Marty and Llano, 1995; Silva, 2003)。例えば海馬のシナプスでは、シナプス前線維を繰り返し高頻度 (~100 Hz)で刺激することにより長期増強(long-term potentiation: LTP)が誘導され、低頻度で刺激することにより長期抑圧(long-term depression: LTD)が誘導される (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka, 1994)。小脳では登上線維と平行線維の両方から同期した入力に繰り返しプルキンエ細胞に入ると、平行線維とプルキンエ細胞間のグルタミン酸性シナプスにおける伝達効率が長時間減弱するLTDが起こる (Daniel et al., 1998; Hansel et al., 2001; Ito, 1989 and 2001; Linden and Connor, 1995)。このようなシナプス活動に依存したシナプス可塑性誘導により、それぞれのシナプスで独立に活動履歴を反映して情報伝達効率を調節することが可能になる。

一方、小脳の抑制性介在ニューロン(星状・籠状細胞)とプルキンエ細胞間のGABA性シナプスでは、登上線維からの異シナプス性入力によってシナプス後細胞が強力に脱分極すると、GABA_A受容体を介する抑制性シナプス伝達が長時間増強される (Kano et al., 1992; Kano, 1995; Hansel et al., 2001)。この現象はrebound potentiation (RP)と呼ばれる。RPの誘導には、プルキンエ細胞内においてCa²⁺濃度が上昇してCa²⁺/calmodulin依存性タンパク質リン酸化酵素II (CaMKII)が活性化することが必要である (Kano et al., 1992 and 1996; Hashimoto et al., 1996)。RPは可塑的变化をするシナプス自身の活性に拠らず、登上線維からの異シナプス性入力のみ依存して誘導されるという、これまでに報告されてきた多くのシナプス可塑性とは異なる特徴をもつ。RPではプルキンエ細胞上に形成された抑制性シナプス伝達は、すべて一様にシナプス後細胞の活動のみに依存して調節されてしまうことにな

る。私は、シナプス前細胞である抑制性介在ニューロンの活動がRPの誘導を何らかの形で調節し、シナプス活動に依存した可塑性調節を可能にする機構が抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のシナプスに備わっているのではないかと考え、その可能性を検証した。第一章では、シナプス前神経細胞の活動によるプルキンエ細胞のGABA_B受容体活性化がRP誘導を抑制する、という新しい形のシナプス可塑性制御機構を報告する。

脳内での主要な抑制性伝達物質であるGABAに対する受容体は、イオン透過型で早い伝達を担うGABA_A、GABA_C受容体と、代謝型で比較的ゆっくりとした応答を起こすGABA_B受容体に大別される(図5)。GABA_B受容体はシナプス前終末およびシナプス後部位両方に局在しており、三量体Gタンパク質と共役して細胞内情報伝達系を駆動する(Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1997 and 1998; Kuner et al., 1999; White et al., 1998)。GABA_B受容体のシナプス前終末での機能として、伝達物質放出を抑制しシナプス伝達を減弱させることが知られている。またシナプス後部位では、G_{βγ}を介してGIRKチャネルを開き、細胞のK⁺コンダクタンスを上昇させて神経興奮を抑制したり、あるいは電位依存性Ca²⁺チャネルを負に調節することが知られている(Batchelor and Garthwaite, 1992; Dutar and Nicoll, 1988; Jarolimsek and Misgeld, 1997; Misgeld et al., 1995; Newberry and Nicoll, 1984)(図5)。また、GABA_B受容体はGi/Goタイプの三量体Gタンパク質を介してアデニリルシクラーゼを抑制することで、細胞内cAMP濃度を低下させタンパク質リン酸化酵素であるPKAの活性を下げるという働きももつ(Kaupmann et al., 1997; Kuner et al., 1999; Misgeld et al., 1995)(図5)。ところで、これまでにGABA_B受容体がシナプス可塑性の調節に関与することを示した報告が二例ある。一つは海馬LTPにおけるシナプス前終末のGABA_B受容体による調節であり(Davies et al., 1991; Mott and Lewis, 1991)、もう一つは大脳皮質視覚野におけるシナ

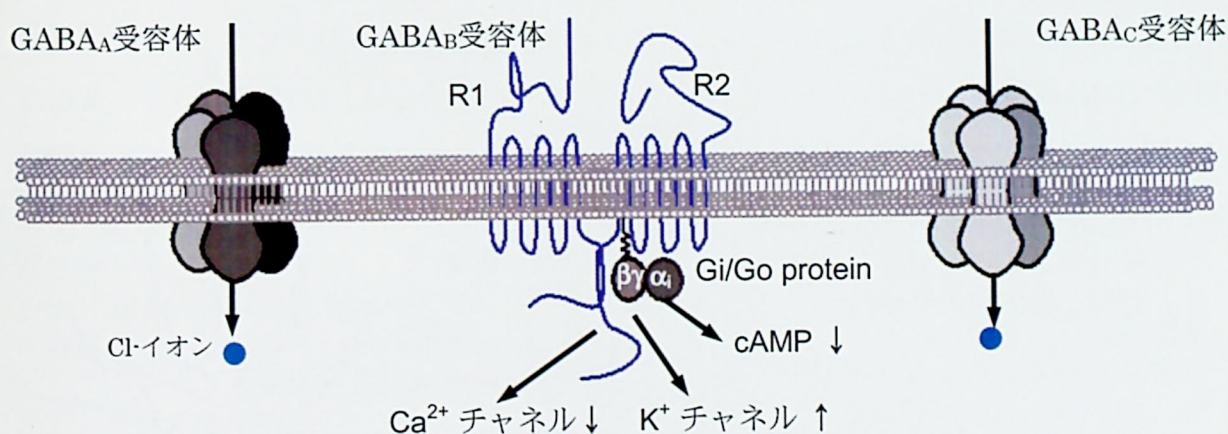


図 5. 代謝型GABA受容体 (GABA_BR) は異型二量体として機能しGi/GoタイプのGタンパク質と共役している。その作用として細胞内cAMP濃度の減少やCa²⁺チャネルの抑制、K⁺チャネル活性化等を引き起こす。一方、イオン透過型GABA受容体 (GABA_AR, GABA_CR) はCl⁻イオンを透過させることで神経細胞を抑制する。

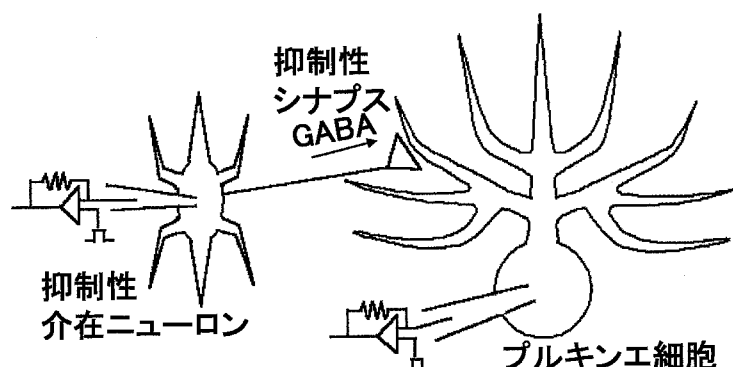
プス後部位のGABA_B受容体によるものである (Komatsu, 1996)。後者において、シナプス後細胞のGABA_B受容体活性化がモノアミンによるIP₃産生を促して、それが小胞体からのCa²⁺遊離を引き起こすことによりLTP誘導が促進される。これが、シナプス後細胞のGABA_B受容体による直接的なシナプス可塑性制御に関する唯一の報告である。以下、これまで全く知られていなかったシナプス後GABA_B受容体による可塑性誘導の負の制御機構を報告する。

結果

シナプス前細胞活動によるRP誘導抑制

ラット小脳初代分散培養のプルキンエ細胞と抑制性介在ニューロン双方から、図6に示すように同時にホールセルパッチクランプ記録を行ない、両細胞間のシナプス伝達を記録した。シナプス前細胞である抑制性介在ニューロンでは、電流固定あるいは電位固定記録を行った。抑制性介在ニューロンに10ミリ秒間の脱分極または電流パルスを与え、活動電位あるいはNa⁺電流を誘起してシナプス伝達を起こし、電位固定記録下のプルキンエ細胞から抑制性シナプス後電流(IPSC)を記録した(図7 A, B)。なお、細胞内溶液に高濃度のCl⁻溶液を使用したため、IPSCは内向き電流として記録された。Kanoら(1992)が報告したように、プルキンエ細胞に500ミリ秒間0 mVの脱分極パルスを0.5 Hzで5回行う条件刺激を与えると、その後30分以上にわたってIPSCの大きさが増強するRPが確認された(232 ± 44 %, 20 min)(図7 C, F)。次に、RPの誘導調節においてシナプス前細胞の活動が果たす役割を調べるために、プルキンエ細胞への脱分極パルス時に抑制性介在ニューロンを20 Hzで刺激するという組み合わせの条件刺激を行った。その結果、意外なことにシナプス後細胞脱分極時にシナプス前細胞を活性化させると、一時的にIPSCの大きさは増強するが、そのIPSCの増大は持続せず約15分間で元の大きさに戻った(110 ± 23 %, 20 min)(図7 D, F)。なお、シナプス前細胞の20 Hz刺激のみを500 msec、0.5 Hzで5回行った場合には、IPSCの大きさに変化は見られなかった(109 ± 22 %, 20 min)(図7 E, F)。またそれぞれの条件刺激はIPSCの時間経

図 6. 抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞双方からの同時記録実験の概略図



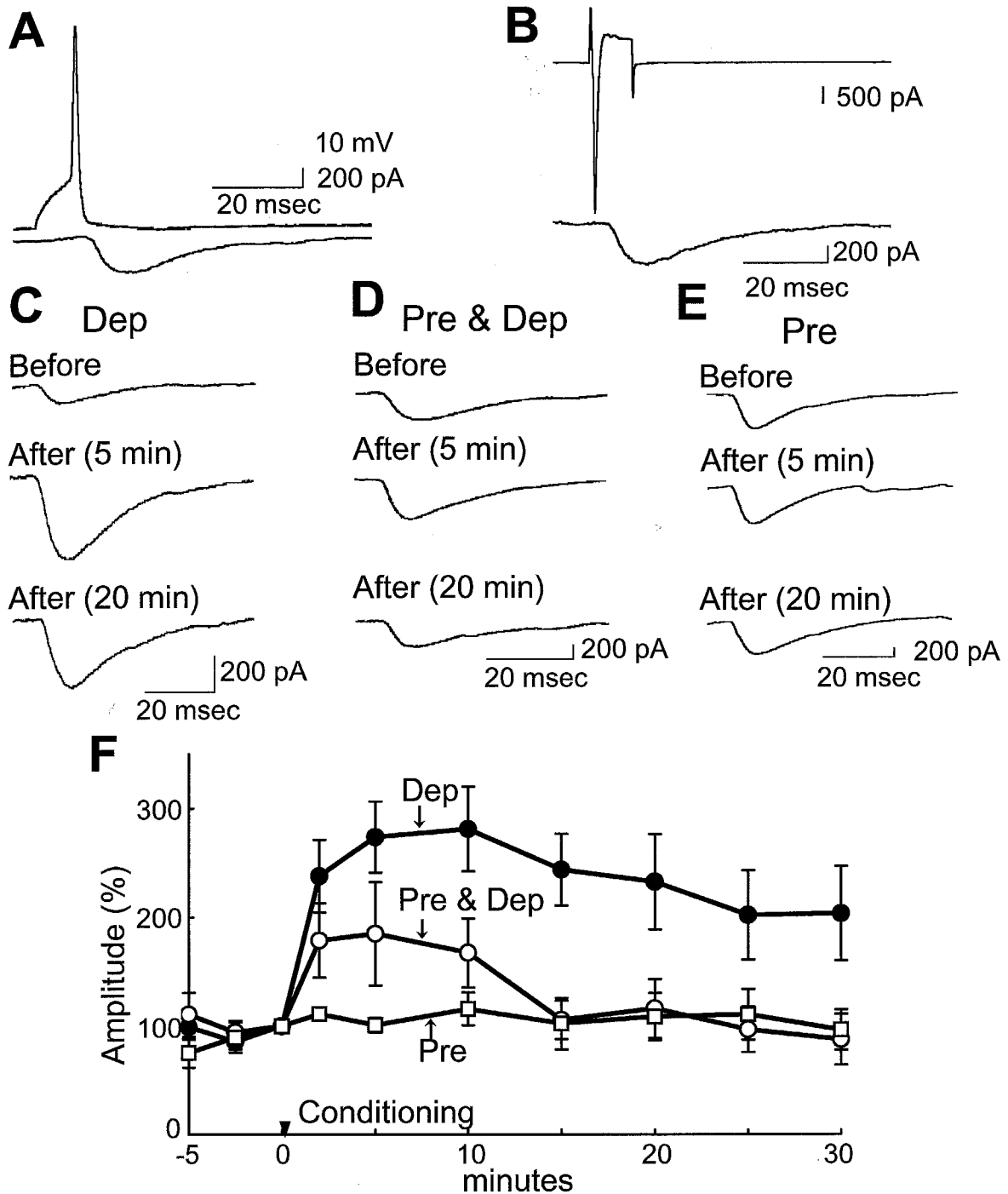


図 7. プルキンエ細胞脱分極によるRPと、シナプス前細胞活性化によるRPの抑制
 A, B 抑制性介在ニューロンの活動電位(A)、或いは電位依存性Na⁺電流(B)と、プルキンエ細胞から記録されたIPSC。C, D, E それぞれの条件刺激前、5分後、20分後におけるIPSC (IPSC5トレースを平均化したもの)。C.条件刺激として、脱分極を行なった。D. 条件刺激として、プルキンエ細胞脱分極とシナプス前細胞活性化を行なった。E. 条件刺激として、シナプス前細胞活性化のみを行なった。F. 条件刺激前後のIPSCの大きさの時間経過。数値は条件刺激の2分前から0分までのIPSCの大きさの平均値を100%として、標準化した値を平均値 ± 標準誤差で示している。統計的有意差(P<0.05)が、DepとPreの間で0分から、またDepとPre & Depの間で5分以降検出された。

過やシナプス前・後細胞における保持電流や入力抵抗・直列抵抗などには影響を及ぼさなかった。以上の結果から、抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のシナプスでは、シナプス前細胞の活性化がシナプス伝達のRP誘導を負に調節すると考えられる。

GABA_A受容体応答の増強であるRPはGABA_B受容体により抑制される

脱分極に依存して誘導されるRPが、シナプス前抑制性介在ニューロンからの伝達物質放出機構の機能亢進によるのか、それともシナプス後プルキンエ細胞のGABAに対する応答性増大によるのかを調べるために、私はプルキンエ細胞の樹状突起に直接GABAを電気泳動的に投与して、その応答の変化を調べる実験を行った(図8)。電気泳動的に投与したGABAに対するプルキンエ細胞の応答は、図9に示すような内向き電流として記録される。なお、このGABA応答はGABA_A受容体阻害剤bicuculline (20 μM)により完全に消失するので(データ示さず)、GABA_A受容体を介する応答である。プルキンエ細胞に脱分極条件刺激(500 msec, 0 mVの脱分極パルスで0.5 Hzで5回)を行うと、応答の大きさが30分以上にわたり増大した(174 ± 18 %, 20 min)(図9 A, C)。樹状突起に直接投与したGABAに対する応答が脱分極により増大したというこの結果から、少なくともシナプス後プルキンエ細胞のGABA_A受容体の機能亢進がRPに寄与すると考えられる。さらにこの点を確認するために、GABAの代わりにGABA_A受容体の選択的作用薬であるmuscimolを投与してその応答を記録した。GABA投与の場合と同様に、muscimolによるGABA_A受容体を介する応答がプルキンエ細胞の脱分極により増強した(170 ± 12 %, 20 min)(図10)。以上の結果から、プルキンエ細胞脱分極により、GABA_A受容体を介する応答が30分間以上にわたり増強されることが明らかになった。

次に、シナプス前細胞の活動が如何にしてRP誘導を負に調節するかを検討した。プルキンエ細胞へのそれぞれの脱分極パルス時にGABAを電気泳動的に投与するという組み合わせ条件刺激を与えると、シナプス前細胞を活性化した場合と同様にRP誘導が抑制された(104 ± 8 %, 20 min)(図9 B, C)。このことから、脱分極時に何らかのGABA受容体が活性化す

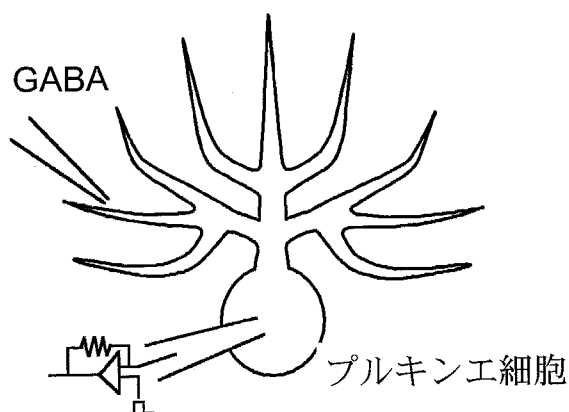


図 8. プルキンエ細胞へのGABA電気泳動投与とその応答記録を行う実験の概略図

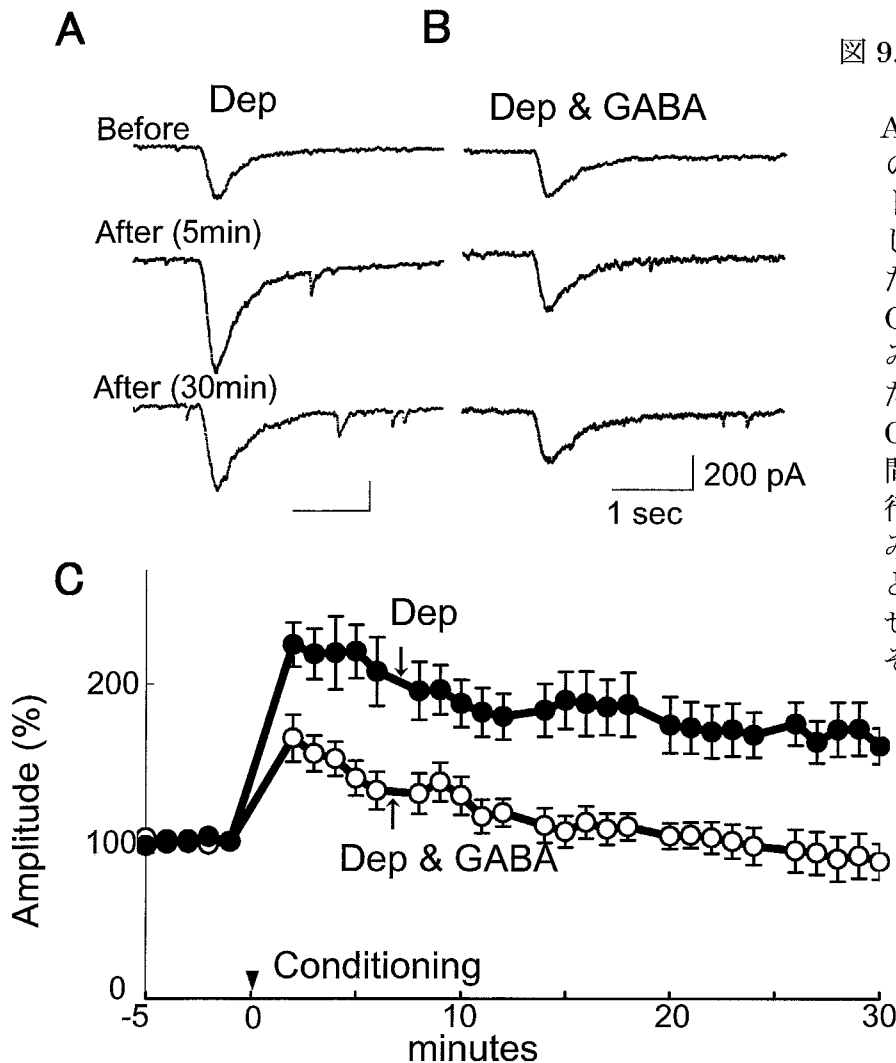


図9. RPとそのGABA

による抑制

A, B, 条件刺激を行う前後の代表的なGABA応答のトレース。A, 条件刺激として、脱分極のみを行った。B, 脱分極と同時にGABAを電気泳動する組み合わせ条件刺激を行った。C, 条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過。0分で条件刺激を行った。Dep:脱分極のみ。Dep & GABA: 脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激。

それぞれ n = 6

ると、RPが誘導されないようになると思われる。一方、GABA_A受容体作用薬である muscimol を用いて、同様に脱分極と muscimol 投与の組み合わせ条件刺激を行った場合には、RPが普通に誘導された ($176 \pm 22\%$, 20 min) (図10)。したがって、増強を負に調節し得る受容体はGABA_A以外のGABA受容体であると考えられる。

図11に示すように、プルキンエ細胞の樹状突起には、代謝型GABA受容体であるGABA_B受容体が多く発現している (Batchelor and Gartwaite, 1992; Kaupmann et al., 1997 and 1998; Jones et al., 1998; Kuner et al., 1999)。そこで、GABA_B受容体がRP誘導を負に調節するのではないかと考えた。GABA_B受容体の特異的な阻害剤である (+)-5, 5-dimethyl-2-morpholineacetic acid hydrochloride (SCH50911, 10 μ M) 存在下で、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったところ、GABAによるRP誘導の抑制が消失した ($181 \pm 7\%$, 20 min) (図12 A)。さらに、シナプス前・後両細胞からの同時記録を行いIPSCを測定する実験においても、シナプス前細胞活性化によるRP誘導抑制はSCH50911により阻害された ($227 \pm 32\%$, 20 min) (図12 C)。これらの結果から、GABA_B受容体がRP誘導を抑制するのに必要で

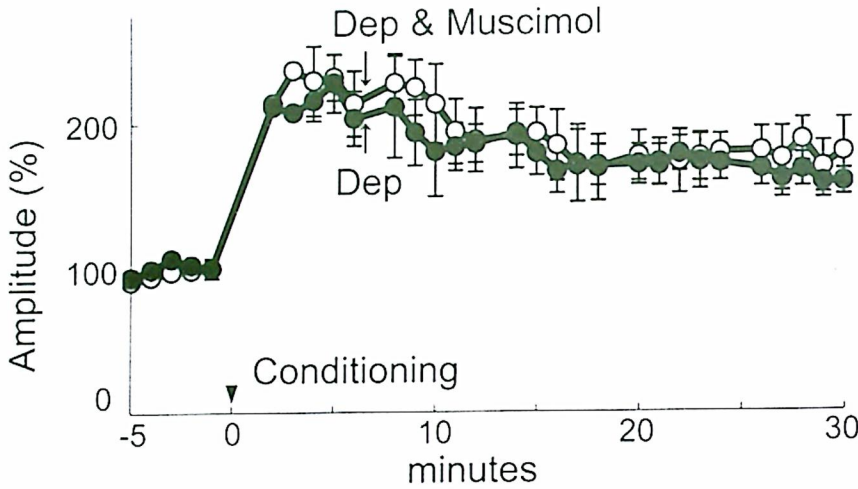


図10. muscimol 応答の RP

条件刺激前後の muscimol 応答の大きさの時間経過。0分で条件刺激を行った。Dep: 脱分極のみ。Dep & Muscimol: 脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激。それぞれ $n = 5$

あることが示唆される。この点をさらに確かめるために、GABA_B受容体作用薬である baclofen (20 μ M)がRP誘導に及ぼす影響を検討した。baclofenによりGABA_B受容体を活性化すると、プルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行っても、RPは誘導されなかった($91 \pm 8\%$, 20 min) (図12 B)。なお、プルキンエ細胞に脱分極条件刺激を与えた10分後にbaclofenを投与しても、いったん誘導されたRPへの影響は無かった (データ示さず)。以上の結果から、プルキンエ細胞の脱分極時にGABA_B受容体が活性化すると、RP誘導が抑制されることが明らかに

なった。

RPとGABA_B受容体によるその抑制が、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) においても観察されるかを調べた。mIPSCはシナプス前終末から自発的に放出される単一のシナプス小胞に含まれる伝達物質に対する応答であると考えられており、シナプス後細胞での受容体応答の大きさの指標となる。脱分極条件刺激により、プルキンエ細胞でのmIPSCの大きさの平均値は30分間以上にわたり増強された ($165 \pm 21\%$, 20 min) (図13 A, B, E)。baclofenによりGABA_B受容体を活性化させた状態で脱分極条件刺激を行った場合には、mIPSCのRP誘導は抑制された ($99 \pm 6\%$, 20 min) (図13 C, D, E)。また、SCH50911によりGABA_B受容体の活性化を完全に阻害し

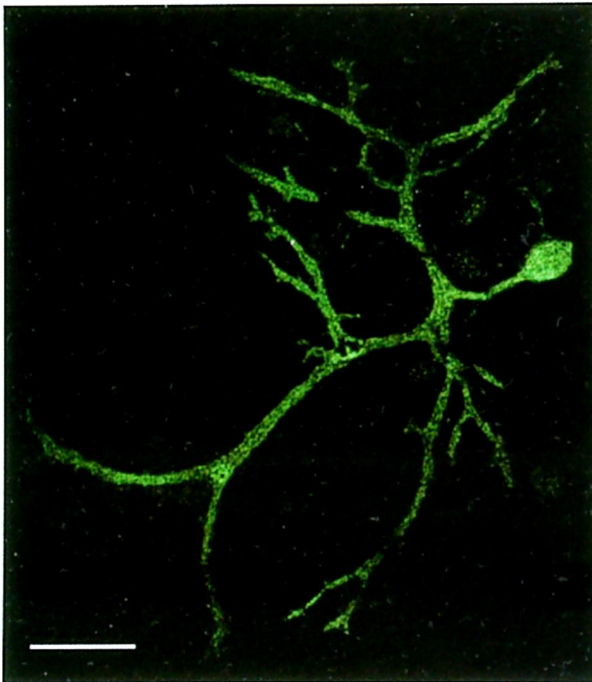


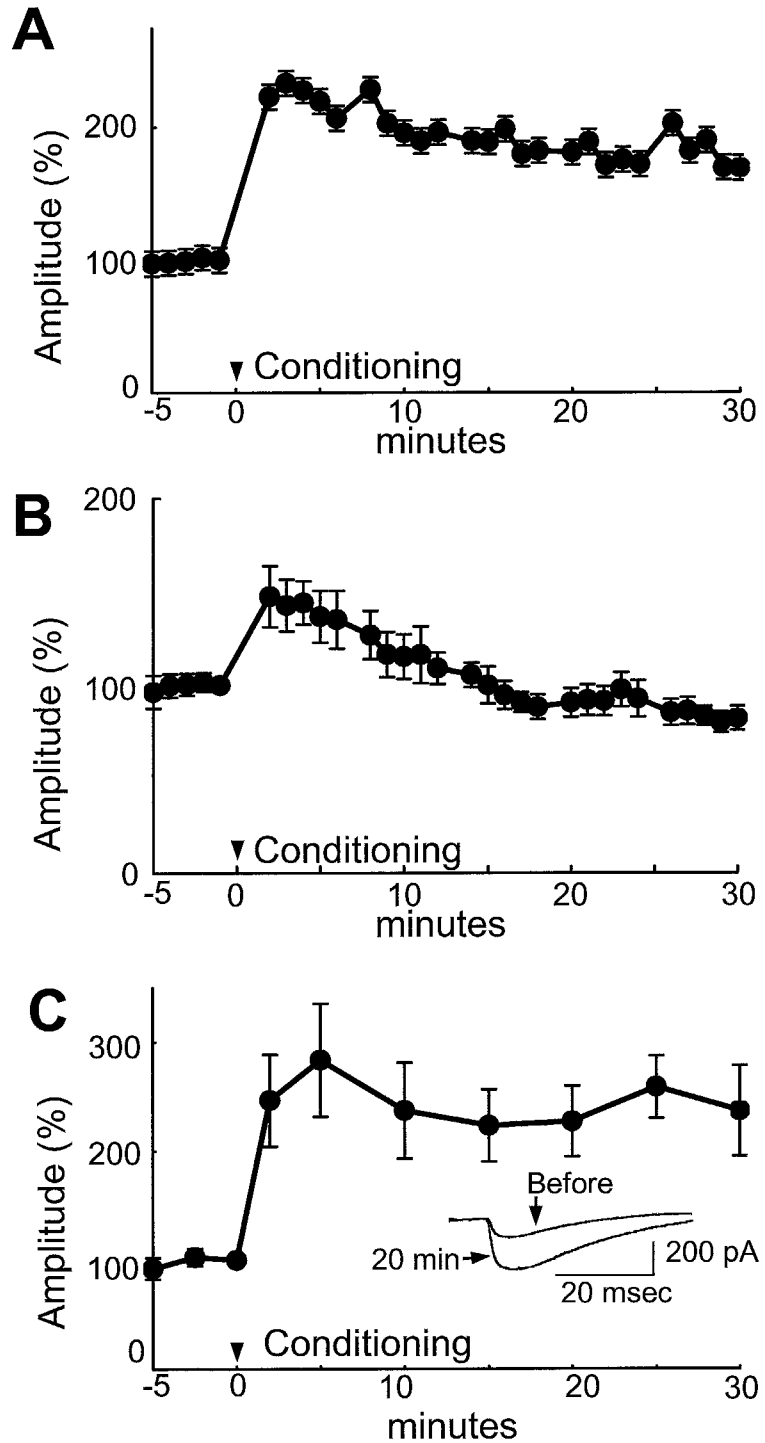
図11. 培養プルキンエ細胞で発現している GABA_B受容体
初代分散培養したプルキンエ細胞を抗GABA_B受容体抗体で免疫染色した。スケールバーは40 μ m

図12. RPの抑制へのGABA_B受容体関与

A:
SCH50911存在下でプルキンエ細胞の脱分極とGABA投与を組み合わせ条件刺激を行った際のGABA応答の大きさの時間経過。n=5

B:
baclofen存在下でプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行った際の muscimol 応答の大きさの時間経過。n=5

C:
SCH50911存在下で、プルキンエ細胞の脱分極とシナプス前細胞活性化を組み合わせ条件刺激を行った際の、誘発IPSCの大きさの時間経過。n=5



た場合には、統計的有意差は認められないもののmIPSCのRPの程度が強められた ($203 \pm 18\%$, 20 min) (データ示さず)。これらの結果から、mIPSCにおいても、プルキンエ細胞脱分極によりRPが誘導され、それは脱分極時のGABA_B受容体活性化により抑制されることが確かめられた。

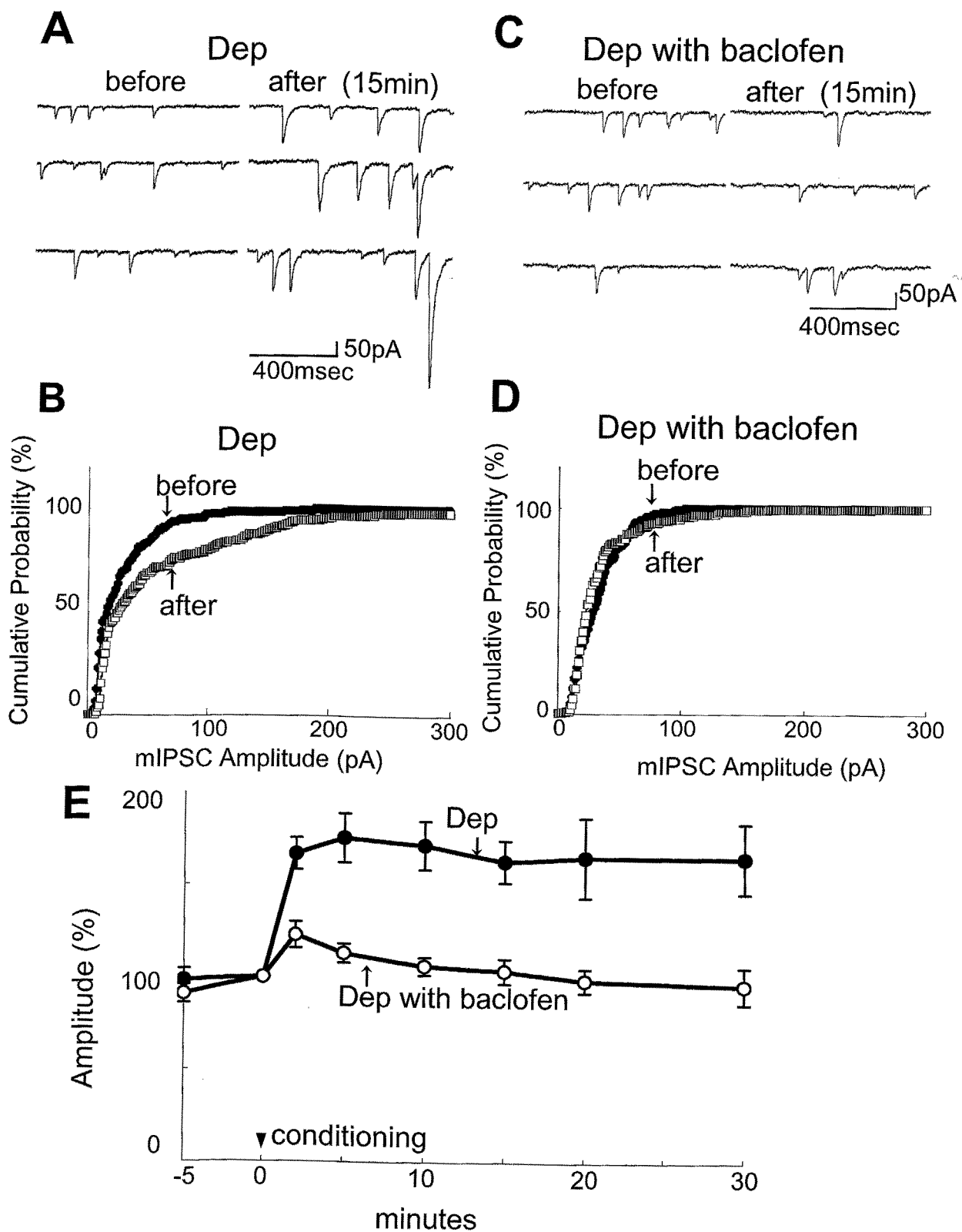


図 13. mIPSCのRPとその抑制

A, C, baclofen非存在下(A)と存在下(C)における、脱分極を行なう前と15分後のmIPSCの代表的トレース。

B, D, baclofen非存在下(B)と存在下(D)における、脱分極を行なう前と15分後におけるmIPSCの大きさの累積確率分布。

E, baclofen非存在下(Dep)と存在下(Dep with baclofen)における、脱分極を行なう前・後のmIPSCの大きさの時間経過。両者ともn=7。

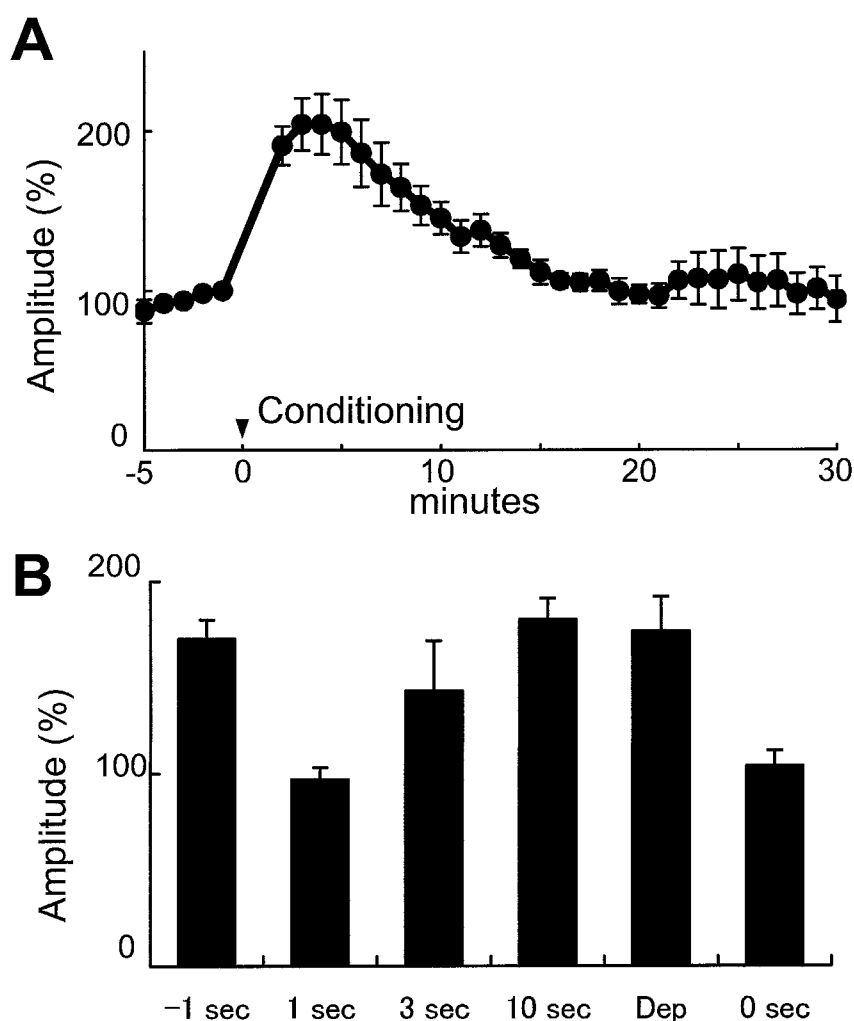
GABA_B受容体によるRP抑制効果の有効時間枠

次に、RP誘導を抑制するためにGABA_B受容体がどのような時間枠で活性化することが必要であるかを調べた。条件刺激時のプルキンエ細胞への脱分極パルスに対してGABAを投与するタイミングをずらしたところ、脱分極終了1秒後からGABA投与を行った場合には、RP誘導が完全に抑えられたが ($97 \pm 6\%$, 20 min) (図14 A, B)、10秒後からGABA投与を行った場合には通常と同程度のRPが誘導された ($180 \pm 11\%$, 20 min) (図14 B)。脱分極3秒後からGABA投与を開始した場合には、程度は少し弱いもののRPが誘導された ($143 \pm 26\%$, 20 min) (図14 B)。一方、脱分極開始の一秒前にGABA投与が終了するタイミングで条件刺激を行った場合には、RP誘導への影響は無かった ($170 \pm 10\%$, 20 min) (図14 B)。したがって、これらの結果から、RP誘導を抑えるのに十分なGABA_B受容体活性化の有効時間枠は、脱分極中およびその一秒後程度であると考えられる。

図14. GABAによるRP抑制効果の有効時間枠

A,
プルキンエ細胞脱分極の終了から一秒後にGABA条件刺激投与を開始したときのGABA応答の時間経過。

B,
GABA条件刺激投与のタイミングを、脱分極開始の一秒前に終了(-1sec)、或いは、脱分極終了一秒後(1 sec), 三秒後(3 sec), 十秒後(10 sec)に開始した場合の、条件刺激20分後におけるGABA応答の大きさ。脱分極時にGABA投与を組み合わせない時(Dep)と組み合わせたとき(0 sec)を対照として示した。



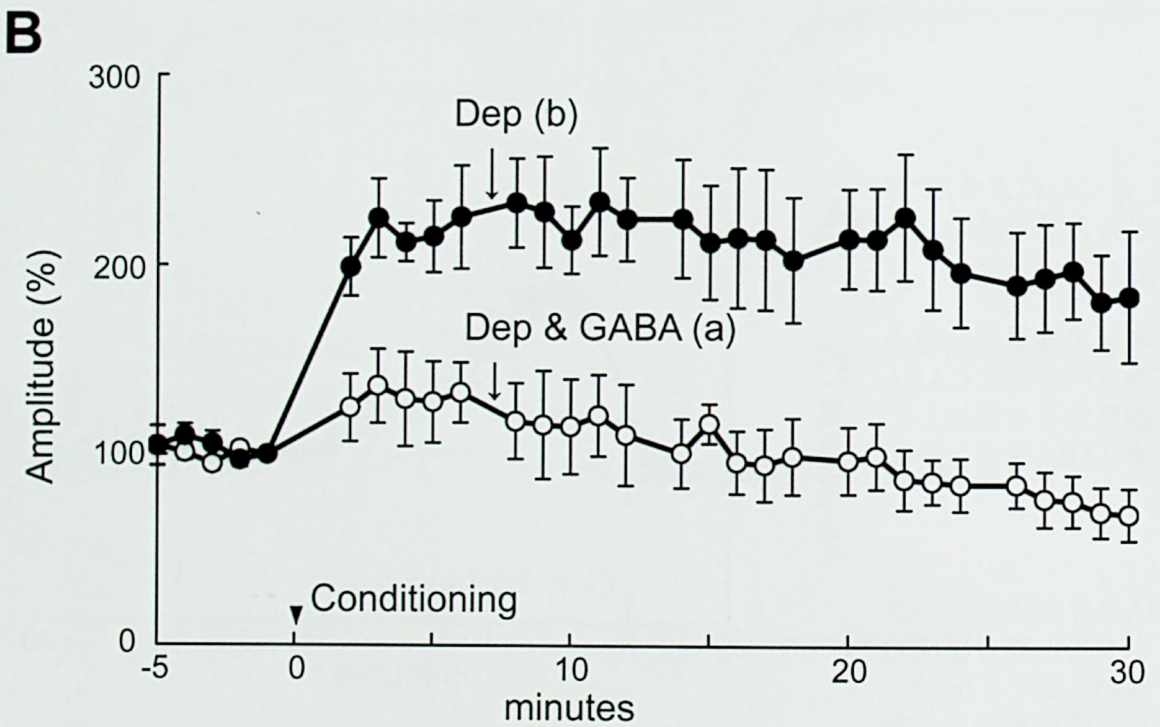
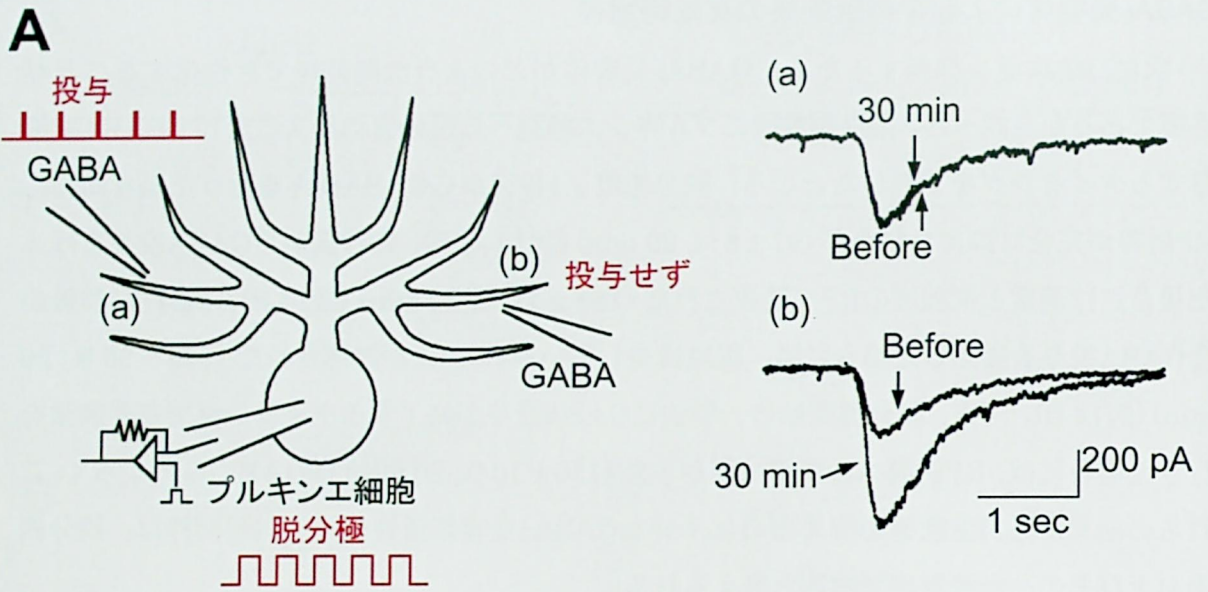


図15. RPの抑制における部位特異性

A, 左: プルキンエ細胞の互いに離れた二箇所の樹状突起へのGABA投与と条件刺激の概略。GABAは二本のガラスピペットから、部位(a)と(b)に交互に投与された。赤で示すように、条件刺激としてプルキンエ細胞の脱分極時に、部位(a)のみにGABA投与を組み合わせ、部位(b)にはGABA投与を行わなかった。

右: 部位(a)と部位(b)から記録された条件刺激前と三十分後の代表的なGABA応答のトレース。

B, 条件刺激前後の部位(a)と部位(b)におけるGABA応答変化の時間経過。部位(a)には、プルキンエ細胞脱分極時に、GABA投与を組み合わせた。一方、部位(b)では、プルキンエ細胞脱分極時に、GABA投与を行わなかった。両者の間に、2分以降有意な差 ($p < 0.05$; students' t-test)がみられた。

GABA_B受容体によるRP抑制の部位特異性

異シナプス性の興奮性入力によりプルキンエ細胞が脱分極すると、GABA_A受容体応答が無差別的に増強されるのであるから、RPそのものは部位非特異的な現象である。一方、シナプス前細胞活動によりシナプス後プルキンエ細胞のGABA_B受容体が活性化されることでRP誘導が抑制されることから、このRP抑制という現象は入力部位特異的なシナプス伝達調節機構となり得る。そこで、GABA_B受容体によるRP抑制が入力部位特異的に起こるか否かを検討した。電位固定記録下のプルキンエ細胞樹状突起の互いに離れた(>100 μm)二箇所(部位a, b)でそれぞれ独立したガラスピペットから電気泳動的にGABAを投与し、各々の位置(部位a, b)におけるGABA応答を30秒おきに交互に記録した。プルキンエ細胞脱分極時には、片方の部位ではGABA投与を同時に行い(部位a)、もう一方の部位ではGABA投与を行わない(部位b)という条件刺激を行った。その結果、脱分極時にGABA投与を行った部位(a)でのみRP誘導が抑制され(97 ± 18 %, 20 min) (図15)、脱分極時にGABAが投与されなかった部位(b)ではRPが誘導された(213 ± 26 %, 20 min) (図15)。この結果は、プルキンエ細胞脱分極時にGABAの入力があった部位でのみ特異的にRPが抑制されることを示しており、GABA_B受容体によるRP抑制は、プルキンエ細胞での抑制性入力に依存してそのシナプス伝達を調節することを可能にする機構であることが示唆される。

考察

小脳の抑制性介在ニューロンとプルキンエ細胞間のGABA性シナプスでは、プルキンエ細胞の脱分極によりシナプス伝達が長時間にわたり増強する(Kano et al., 1992)。本章において、プルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前細胞である抑制性介在ニューロンが活性化すると、プルキンエ細胞のGABA_B受容体活性化を介してRP誘導が抑えることを示した。

シナプス活性によるシナプス可塑性誘導の抑制

興奮性シナプスにおけるシナプス可塑性については精力的に研究が行われてきた(Bliss and Collingridge, 1993; Daniel, et al., 1998; Hansel, et al., 2001; Ito, 1989 and 2001; Kandel, 2001; Linden and Conner, 1995; Lisman, et al., 2002; Malenka, 1994; Sheng and Kim 2002; Silva, 2003)。抑制性シナプスでも、大脳および小脳皮質、小脳核、海馬や金魚のMauthnerニューロンにおいて、GABAを伝達物質とするシナプスの長期および短期のシナプス可塑性が報告されている(Aizenman, et al., 1998; Kano, 1995; Kano, et al., 1992; Komatsu, 1996; Marty and Llano, 1995; Nusser, et al., 1998; Oda, et al., 1998)。興奮性・抑

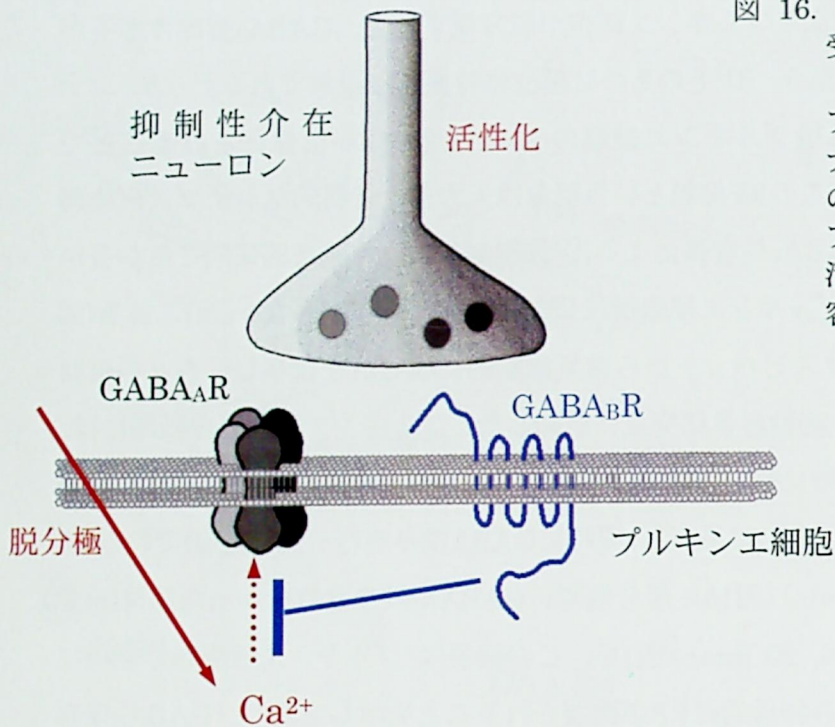


図 16. シナプス前細胞活性化にGABA_B受容体を介したRP抑制

プルキンエ細胞の脱分極時に、シナプス前細胞が活性化すると、その終末よりGABAが放出されて、プルキンエ細胞のGABA_B受容体が活性化する。その結果、GABA_A受容体のRPが抑制される。

制性を問わず、ほとんどのシナプス可塑性はシナプス前細胞が繰り返し活性化することにより誘導される。このシナプス活動に依存した可塑性誘導機構により、個々のシナプスで独立して伝達効率を変化させることが可能になる。このような入力依存性、入力特異性、そして長期持続性といった特徴ゆえに、シナプス可塑性は中枢神経系における記憶・学習の基礎過程であると考えられてきた。なぜなら自己の活性履歴に依存して、その部位でのみ長時間にわたり情報伝達効率を変化させるというシナプス可塑性の特徴は、経験に依存してその情報処理過程を長期間保持・獲得するという記憶・学習の特徴と似ているからである。

一方、小脳抑制性介在ニューロン・プルキンエ細胞間のGABA性シナプスでは、登上線維から入力を受けてプルキンエ細胞が大きく脱分極することが繰り返されると、それだけで抑制性シナプス伝達が増強される (Kano et al., 1992)。つまり、RPの誘導は変化をするシナプス自体の入力に依存せず、あらゆるGABA性シナプスでの情報伝達効率が同時に増強されることになる。このようにRPの誘導調節に入力依存性・入力特異性が欠落しているとすれば、他のシナプス可塑性と同じような形での記憶や学習への寄与を期待するのは難しいであろう。しかしながら、これまでに示してきたようにプルキンエ細胞の脱分極時にシナプス前細胞が活性化すると、プルキンエ細胞のGABA_B受容体を介してRP誘導は抑制される (図16)。このシナプス前細胞活性による可塑性誘導の負の調節は、これまでに報告されていないユニークな形で入力依存的・入力部位特異的な可塑性誘導調節を可能にする機構となっている

る。このような調節機構が備わっていることで小脳抑制性シナプスは各々が独立に調節され、それが学習・記憶に寄与しているのではなかろうか。

RPとその抑制の生理的意義

シナプス前抑制性介在ニューロンを20 Hzで刺激することにより、RP誘導が抑制された。Cell-attachパッチクランプ記録によると、初代分散培養下の抑制性介在ニューロンは自発的に数Hzで発火しており、しばしば20 Hz以上で500 msec以上続くバースト状の発火が認められた(データ示さず)。また、スライス標本における抑制性介在ニューロンの自発発火頻度が40 Hzを超えることがあるという報告もある(Llano and Marty, 1995)。生体内においてはニューロンの活動がより活発であろうことを考慮すると、抑制性介在ニューロン活性化によるRP抑制は生理的に起こり得る現象であると考えられる。おそらく、登上線維入力が増え繰り返されてプルキンエ細胞が大きく脱分極したときに、活性化していた抑制性シナプスではプルキンエ細胞のGABA_B受容体を介してRPが抑制され、活動していなかった抑制性シナプスでのみRPが誘導されてGABA_A受容体を介するシナプス応答が長時間増強されるのであろう。プルキンエ細胞の活動と抑制性介在ニューロンの活動双方に依存して、抑制性シナプス伝達の調節が行われると考えられる。

小脳皮質における平行線維とプルキンエ細胞間のグルタミン酸性シナプスで起こるLTDは、運動学習の細胞基盤であると提唱されてきた(Aiba et al., 1994; Conquet et al., 1994; Kashiwabuchi et al., 1995; DeZeeuw et al., 1998; Hansel et al., 2001; Ito, 1989 and 2001 とLisberger, 1998 参照)。LTDの誘導にも登上線維入力が必要な役割を果たすことから、ともに登上線維入力に依存するRPとLTDは、プルキンエ細胞において何らかの形で機能的な相互作用をするのかも知れない。RPの生理的意義はまだよく分かっていないが、プルキンエ細胞が過興奮状態にならないようにしながら、時々刻々と変化する入力に対応して、プルキンエ細胞が発火頻度や発火タイミングを調節するのに寄与しているのではなかろうか。理論的モデルにより、プルキンエ細胞への抑制性入力は平行線維からの興奮性入力よりもプルキンエ細胞の発火パターンに大きな影響を与えることが予測されている(Jaeger and Bower, 1999)。このようなことから、RPとそのシナプス活動による抑制はLTDと協調して小脳皮質における情報処理に寄与しているのではないかと推測される。

第二章

GABA_B受容体によるRP誘導抑制の細胞内情報伝達経路

第二章では、第一章で明らかにしたGABA_B受容体によるRP誘導抑制がどのような細胞内分子情報伝達経路により担われるかを検討した結果を報告する。

序論

海馬CA1領野のLTPおよびLTD誘導調節を司る分子機構についてはかなりの知見が得られている (Kandel, 2001; Lisman et al., 2002; Malenka, 1994; Malenka and Nicoll, 1999; Sheng and Kim, 2002; Silva, 2003)。LTP/LTDでは、ともに細胞内Ca²⁺濃度上昇が必須の誘導条件であり、大きくCa²⁺濃度が上昇するとCaMKII活性化が起こりLTPが誘導されるが、Ca²⁺濃度が比較的弱く上昇した場合にはタンパク質脱リン酸化酵素であるProtein Phosphatase-1 (PP-1)活性の亢進が起こりその結果LTDが誘導される (Kandel, 2001; Malenka, 1994; Mulkey et al., 1994; Sheng and Kim, 2002; Silva, 2003)。Ca²⁺/calmodulinにより活性化される脱リン酸化酵素calcineurinとPKAが、inhibitor-1(I-1)のリン酸化状態を互いに拮抗しながら調節することでPP-1活性が制御されている (Kandel, 2001; Malenka, 1994; Mulkey et al., 1994; Silva, 2003)。このような、リン酸化酵素および脱リン酸化酵素活性のバランスによりシナプス伝達が増強あるいは抑圧される。

小脳プルキンエ細胞におけるGABA_A受容体を介する応答の増強 (RP) は、その誘導にCaMKIIの活性を必要とすることが分かっている (Kano et al., 1996)。私は、RP誘導およびその抑制が海馬におけるリン酸化調節機構と類似の分子メカニズムを基盤として調節されているのではないかと考え、その可能性を検討した。

第一章に示したように、RP誘導はGABA_B受容体により抑制される (Kawaguchi and Hirano, 2000)。GABA_B受容体は、シナプス前終末での伝達物質放出抑制やシナプス後部位でのK⁺コンダクタンス上昇、電位依存性Ca²⁺チャンネルの抑制といった生理作用を持つ (Newberry and Nicoll, 1984; Dutar and Nicoll, 1988; Batchelor and Garthwaite, 1992; Jarolimek and Misgeld, 1997; Misgeld et al., 1995) (図5)。また、Gi/Goタンパク質を介したアデニルシクラーゼ抑制によって、細胞内cAMP濃度を下げてPKA活性を低下させることもGABA_B受容体の重要な機能である (Misgeld et al., 1995; Kaupmann et al., 1997; Kuner et al., 1999) (図5)。第二章では、GABA_B受容体によるPKA活性の低下が、海馬LTP/LTD制御と類似の機構により脱リン酸化酵素の分子経路を促進してCaMKII活性化を抑制

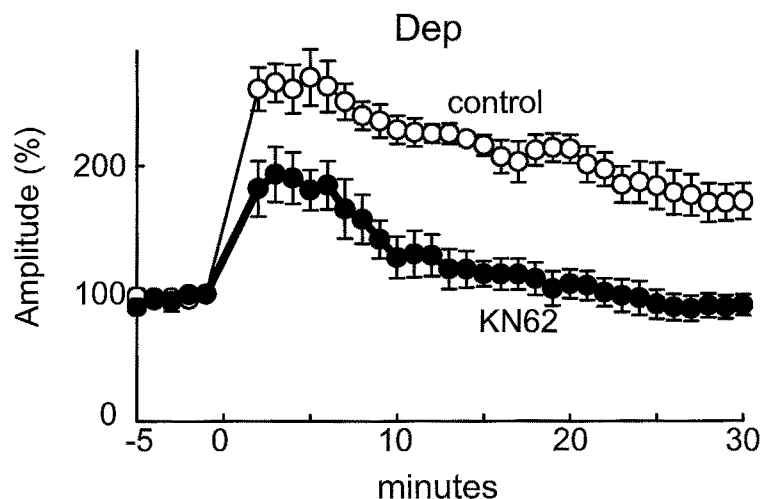
し、その結果RP誘導が抑えられることを報告する。

結果

GABA_B受容体によるRP抑制はCa²⁺チャネル抑制に依存しない

RPの誘導には、脱分極による細胞内Ca²⁺濃度の上昇とその結果起こるCaMKII活性化が必須であることが知られている (Kano et al., 1992 and 1996; Hashimoto et al., 1996)。KN62 (3 μM)を用いてCaMKIIを阻害すると、ホールセルパッチ記録下のプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を加えても、電気泳動投与したGABAに対する応答のRPが阻害された (91 ± 8 %, 30 min) (図 17)。このことから、CaMKIIがRPを誘導するのに必要であることが確認された。プルキンエ細胞においてGABA_B受容体活性化によりPタイプの電位依存性Ca²⁺チャネルを介する電流が抑制されるので (Mintz and Bean, 1993)、GABA_B受容体は脱分極時の細胞内Ca²⁺濃度上昇を弱めることでRP誘導を抑制するという可能性が考えられる。そこで、私はCa²⁺指示薬fura-2をパッチピペットから細胞内に導入してCa²⁺イメージングを行い、GABA_B受容体によりどの程度細胞内Ca²⁺濃度の上昇が抑えられるのかを検討した。プルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行うと、波長340 nmの光で励起したfura-2の蛍光強度を波長380 nmの光で励起した時の蛍光強度で割った比(ratio)が大きく増加することから、脱分極条件刺激により細胞内のCa²⁺濃度が上昇することが分かる (図18 B)。GABA_B受容体作用薬baclofenを灌流投与すると、脱分極時のfura-2の蛍光比は、樹状突起においてbaclofen投与前の92 ± 2 %に減弱した (図18 B, C, D)。この結果から、意外にもGABA_B受容体によるCa²⁺濃度上昇抑制はさほど大きくないということが分かった。次に、このようなCa²⁺流入の微小な減少が増強誘導に影響するか否かを検討するために、baclofenと同程度にCa²⁺濃度上昇を減弱させる条件を細胞外のCa²⁺濃度を低下させて探索した。その結果、細胞外のCa²⁺濃度を通常の半分である1 mMに下げると、脱分極時のfura-2の蛍光比が89 ± 5 %に減少した (図18

図17. CaMKII阻害剤によるRP誘導阻害
KN62によりCaMKIIを阻害した状態で、プルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行なった際の、GABA応答変化の時間経過。対照として、KN62非存在下でRPを起こした時の時間経過も示す。それぞれ、n = 5



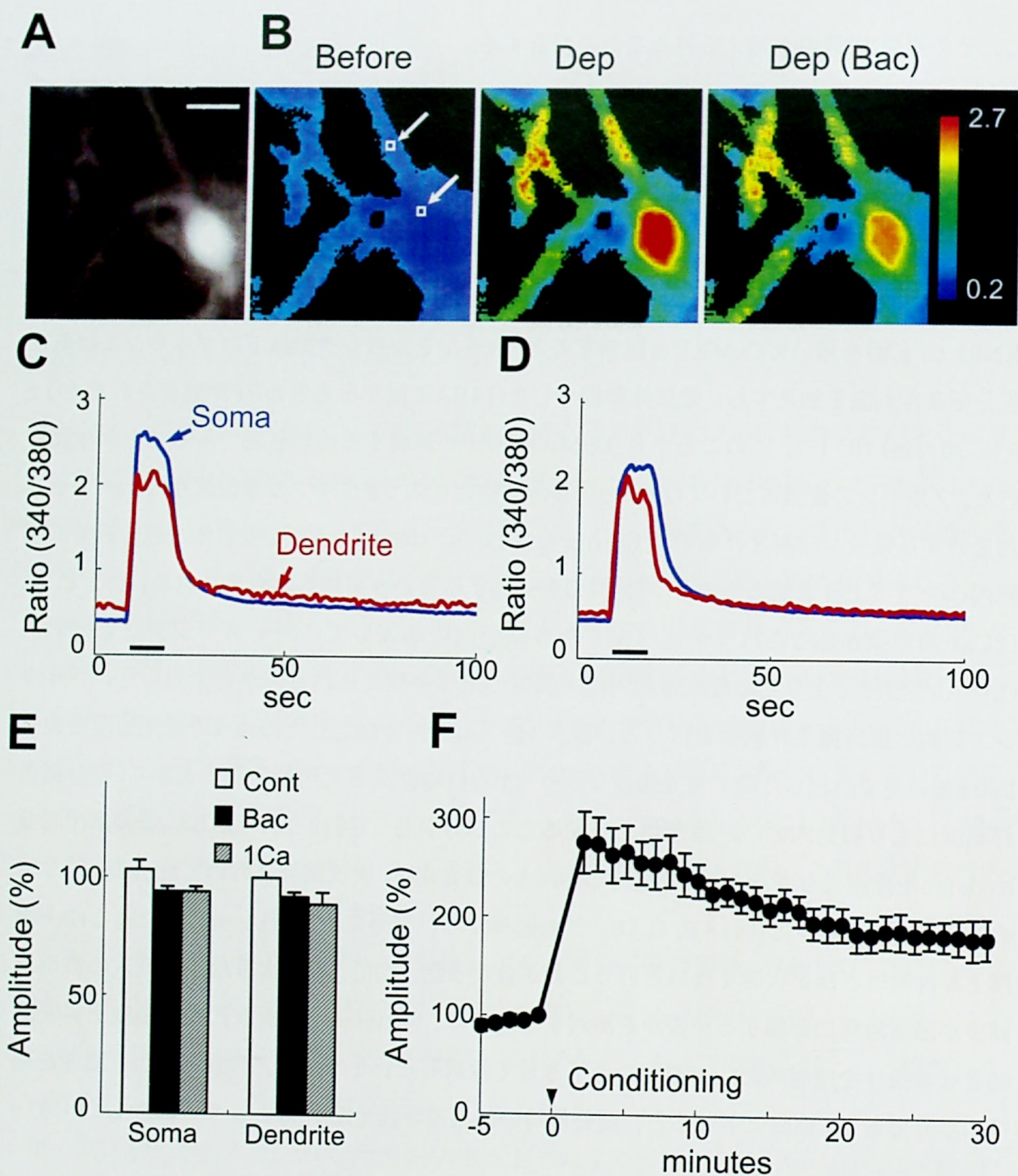


図18. GABA_B受容体活性化による細胞内Ca²⁺濃度上昇の減少と、そのRP誘導に対する影響

A, fura-2 (200 μM) を負荷したプルキンエ細胞を、波長380 nmの光で励起したときの蛍光画像。

B, 脱分極前(before)の蛍光比 (340/380)の画像と、baclofen投与前(Dep), 後(Dep(Bac))における脱分極中の蛍光比画像。

C, D, baclofen 投与前 (C), 後(D)の細胞体及び樹状突起における脱分極前後の蛍光比変化の時間経過。

E, baclofen投与 (Bac)および細胞外液を1 mM Ca²⁺溶液へ交換 (1Ca)した際の、細胞体及び樹状突起における細胞内Ca²⁺濃度上昇。数値は外液交換前の蛍光比の最大値に対する外液交換後の蛍光比の最大値の割合を示す。

F, 1 mM Ca²⁺外液中でプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行ったときの、GABA応答変化の時間経過。n = 5

E)。そこで、baclofenを用いた場合と同程度に脱分極時の細胞内Ca²⁺濃度上昇が弱められる細胞外Ca²⁺濃度1 mMの条件下においてRP誘導の可否を検討したところ、プルキンエ細胞への脱分極条件刺激によりRPが誘導された (194 ±17 %, 20 min) (図18 F)。この結果は、baclofenによりGABA_B受容体を活性化させた場合と同程度に細胞内Ca²⁺濃度上昇が弱まったとしても、RP誘導に影響が無いことを示している。したがって、GABA_B受容体によるRP誘導抑制は、Ca²⁺チャネルを抑制することによる細胞内Ca²⁺濃度上昇の減弱によらないと考えられる。

GABA_B受容体によるRP抑制はPKA活性低下による

GABA_B受容体がGi/Goタンパク質を介したアデニリルシクラーゼ抑制によりPKA活性を低下させることが、RP誘導抑制を引き起こすのではないかと考えた。Gタンパク質の阻害剤であるGDP-βS (500 μM)をパッチ電極内に含めると、脱分極時にGABA投与を行ってもRP誘導を抑制することが出来なかった (180 ±20 %, 20 min) (図 19)。また、Gi/oタイプのGタンパク質阻害剤である百日咳毒素 (PTX, 500 ng/ml)で一晩処理したプルキンエ細胞では、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ってもRPが誘導されてしまった (179 ±12 %, 20 min)(図 19)。同様に、PTX感受性のGタンパク質を阻害するN-ethylmaleimide (NEM, 10 μM)によってもRP誘導抑制が消失した (168 ±12 %, 20 min) (図 19)。これらの結果から、GABA_B受容体によるRP誘導抑制は、Gi/oタイプのGタンパク質を介していることが分かった。

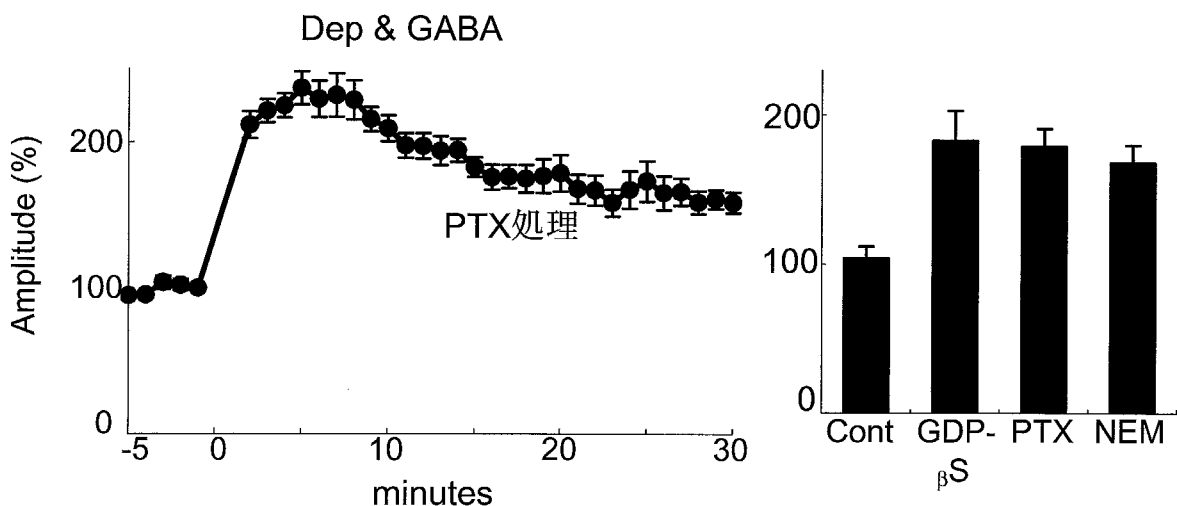


図 19. GABA_B受容体によるRP抑制へのGi/Goタンパクの関与
 左, PTXで一晩処理したプルキンエ細胞に、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったときの、GABA応答変化の時間経過。n = 5
 右, PTX一晩処理後、GDP-βS、或いはNEM存在下で脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行った際の条件刺激20分後のGABA応答の大きさ。それぞれ、n = 5

次にPKAがRP誘導抑制に関与するか否かを検討した。Sp-cAMP-AM (10 μ M) をプルキンエ細胞に負荷してPKA活性を上昇させると、脱分極と組み合わせたGABA_B受容体活性化によるRP誘導抑制が消失した (167 \pm 7 %, 20 min) (図 20 A, B)。また、アデニリルシクラーゼの活性化薬であるforskolin (20 μ M) を用いて細胞内cAMP濃度を上昇させてもGABA_B受容体によるRP抑制が阻害された (182 \pm 27 %, 20 min) (図20 B)。これらの結果から、GABA_B受容体はPKA活性を低下させることによりRPを抑制すると考えられる。そこで、PKAがRP誘導に本当に必要であるかを検討するため、PKAの特異的阻害剤であるKT5720 (10 μ M)を

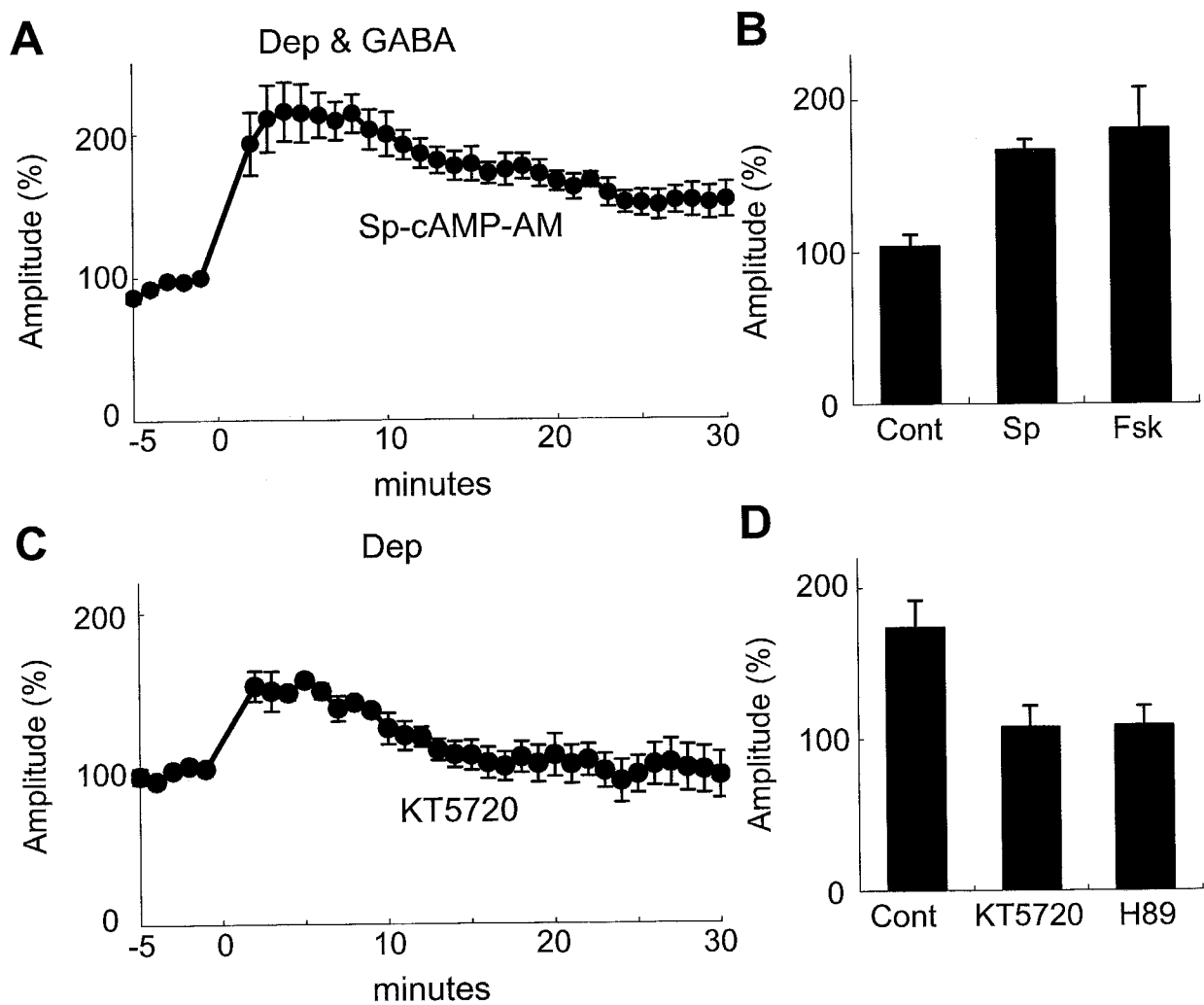


図 20. GABA_B受容体によるRP抑制へのPKAの関与

A, Sp-cAMP-AMを負荷したプルキンエ細胞に、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったときのGABA応答の大きさの時間経過。n = 5

B, Sp-cAMP-AM負荷後、或いはforskolin(Fsk)存在下で脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったときの、20分後のGABA応答の大きさ。それぞれ、n = 5

C, KT5720存在下でプルキンエ細胞に、脱分極条件刺激を行ったときのGABA応答の大きさの時間経過。n = 5

D, KT5720 或いはH89存在下で、脱分極条件刺激を行ったときの20分後のGABA応答の大きさ。それぞれn = 5

投与したところ、脱分極条件刺激を行ってもRPが誘導されなかった ($108 \pm 14 \%$, 20 min) (図 20 C, D)。また、H89 (100 nM)を用いてPKAを阻害した場合にも、同様にRP誘導が阻害された (109 ± 13 , 20 min) (図 20 D)。これらの結果は、PKAの活性がRP誘導に必要であることを示している。以上の結果を考え合わせると、GABA_B受容体はGi/oタイプのGタンパク質を介してアデニルシクラーゼを抑制して、PKA活性を低下させることによりRPを抑制すると考えられる。

RP抑制へのPP-1の関与

図17に示したように、RP誘導にはPKA活性だけでなくCaMKII活性も必須である (Kano et al., 1996)。PKAやCaMKIIといったリン酸化酵素がRP誘導に寄与するのであれば、脱リン酸化酵素の活性がRP誘導を負に調節するという可能性が考えられる。CaMKIIは自己リン酸化によりその活性をCa²⁺/calmodulin非依存的に維持する活性化型となるが、この自己リン酸化を主に脱リン酸化するのが脱リン酸化酵素PP-1である (Strack et al., 1997)。そこで、RP誘導抑制にPP-1が関与するかどうかを検討した。PP-1をnodularin (2 nM)で薬理的に阻害すると、GABA_B受容体によるRP抑制が消失した ($150 \pm 4 \%$, 30 min) (図21 A, B)。また、別のPP-1害剤であるokadaic acidを100 nM (PP-1およびPP-2Aを阻害する濃度)で用いると、RP抑制が阻害された ($183 \pm 10 \%$, 30 min) (図21 C, D)。しかし、okadaic acidをPP-2Aのみを阻害する濃度1 nMで用いた場合には、RP抑制を阻害する効果は無かった ($102 \pm 7 \%$, 30 min) (図21 D)。以上の結果から、PP-1がGABA_B受容体によるRP誘導抑制に関与していることが分かった。なお、nodularinやokadaic acidを投与してPP-1活性を抑制するだけでは、GABA応答に変化を起こすことは無かった。また、TTXとCNQX存在下で微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を記録したところ、nodularinを投与してもその大きさや頻度、時間経過に変化は認められなかった (図21 E, F)。したがって、プルキンエ細胞においてPP-1活性の変化がそれ自体でGABA_A受容体の特性に変化をもたらすことは無いと考えられる。

PKAよりもCaMKIIがRP誘導に直接的に関与する

これまでに示したように、RP誘導にはPKAとCaMKIIの活性が必須である (Kano et al., 1996; Kawaguchi and Hirano, 2000)。次に、これら二種類のタンパク質リン酸化酵素と脱リン酸化酵素PP-1がどのようにしてRP誘導の調節を担うのかを明らかにすることを試みた。PKAあるいはCaMKIIの阻害剤とPP-1の阻害剤を組み合わせ投与し、それがRP誘導にどのような影響を与えるかを調べた。KT5720 (10 μM)によりPKAを阻害すると、RP誘導が抑制されるが、同時にnodularinによりPP-1を阻害するとRP誘導が回復した ($172 \pm 11 \%$, 30

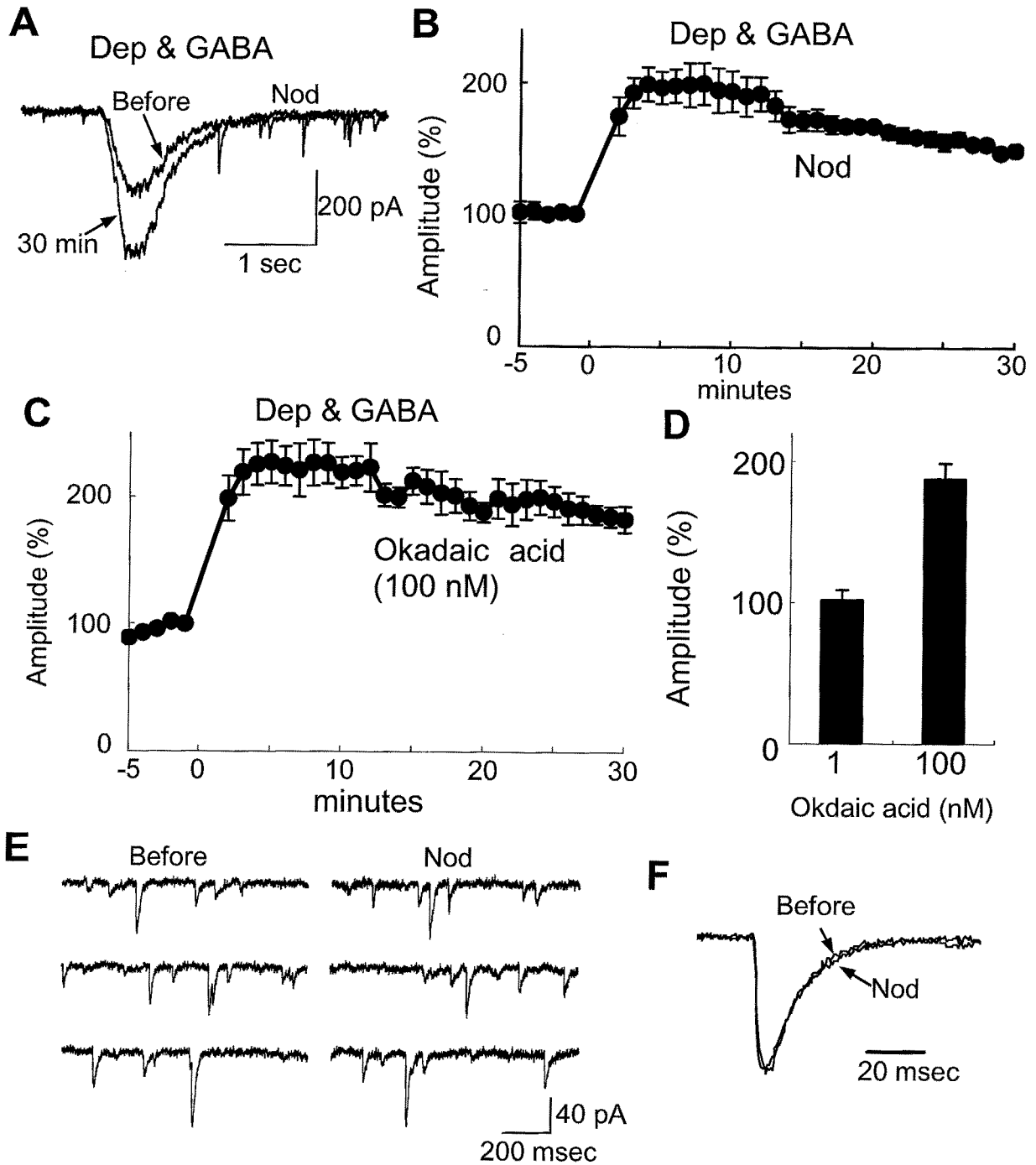


図 21. RP誘導抑制におけるPP-1の必要性

- A, nodularin (2 nM) 存在下で脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行う前と30分後のGABA応答のトレース
- B, nodularin (2 nM) 存在下で脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったときの、GABA応答の時間経過。n = 5
- C, okadaic acid (100 nM) 存在下で、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行ったときの、GABA応答の時間経過。n = 5
- D, okadaic acid を1 nMと100 nMで使用したときの、組み合わせ条件刺激20分後のGABA応答の大きさ。
- E, nodularin (2 nM) を投与する前・15分後のmIPSCのトレース。
- F, nodularin 投与前・15分後の20個ずつmIPSCを平均加算して重ねたもの。

min) (図22 A)。この結果は、PKA活性が低下してRP誘導が阻害されるのは、PP-1活性に依存することを示唆する。一方、KN62を用いてCaMKIIを阻害した場合のRP誘導抑制は、同時にnodularinによりPP-1を阻害しても影響されなかった ($98 \pm 7\%$, 30 min) (図22 B)。したがって、CaMKIIを阻害すると直接的にRP誘導が阻害されると考えられる。以上の結果をまとめると、PP-1活性はPKA活性低下よりも下流で機能してRP誘導の抑制に寄与すること、およびCaMKIIはPP-1活性よりも下流でRP誘導に寄与することが示唆される。そしてま

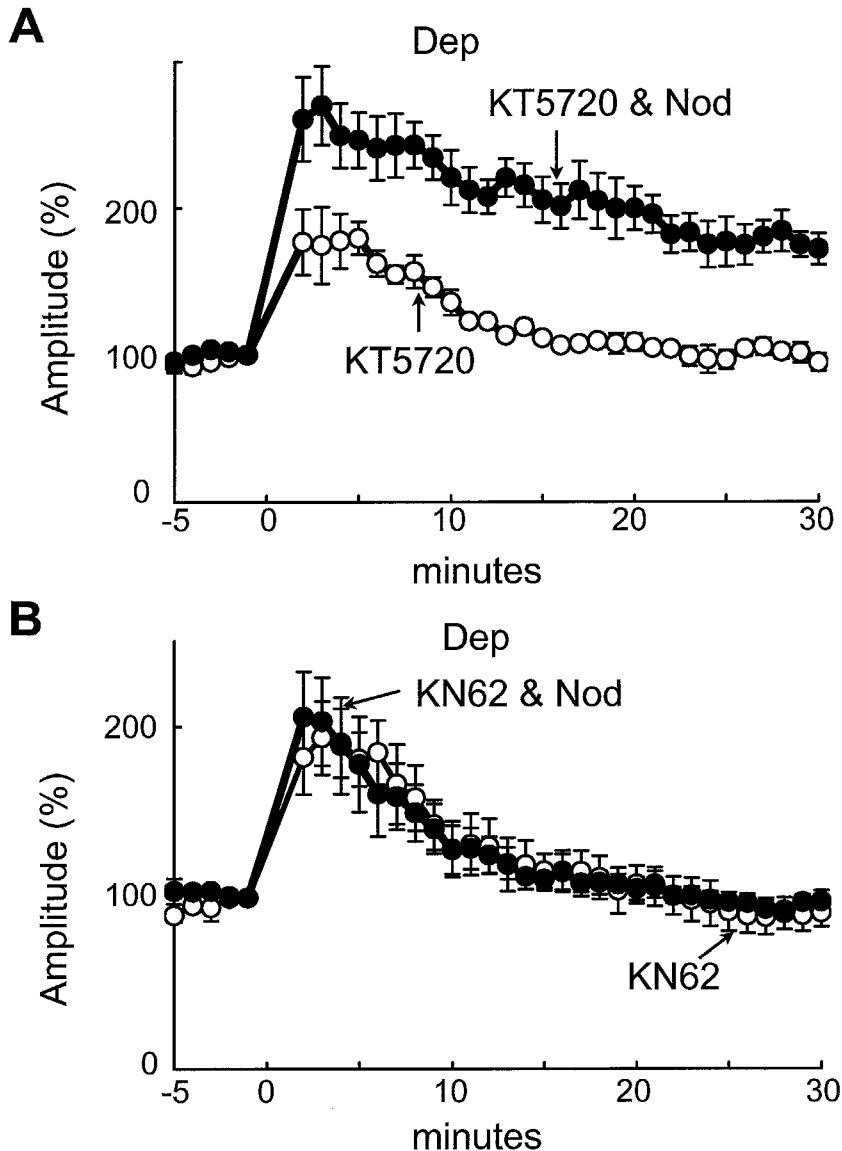


図 22. CaMKII・PKA阻害によるRP誘導抑制へのPP-1阻害の影響
A, KT5720とnodularin存在下でプルキンエ細胞に脱分極の条件刺激を行なった時のGABA応答の時間経過(●, n=5)。比較の為に、KT5720のみ投与した場合も示している(○, n=5)。
B, KN62とnodularin存在下で、プルキンエ細胞に脱分極の条件刺激を行なった時のGABA応答の時間経過(●, n=5)。比較の為に、KN62のみ投与した場合も示している(○, n=5)。

た、PKAに比べてCaMKIIがより直接的にRP誘導に関与すると考えられる。

RP抑制へのカルシニューリン活性の必要性

海馬のLTP/ LTD誘導調節に、CaMKIIとcalcineurin/I-1/PP-1という脱リン酸化酵素経路が重要な働きをされると考えられている (Kandel, 2001; Malenka, 1994; Mulkey et al., 1994; Silva, 2003)。I-1はPKAによりリン酸化されると直接PP-1に結合してその活性を抑制する (Ingebritsen and Cohen, 1983)。一方、Ca²⁺/calmodulinによりcalcineurinが活性化されると、I-1を脱リン酸化してPP-1を抑制から開放する (Kandel, 2001; Malenka, 1994; Silva, 2003)。プルキンエ細胞においてCaMKII, PKA, PP-1がRP誘導調節に関与することを考慮すると、calcineurinもRP誘導の制御に関与している可能性が考えられる。その点を検討するために、calcineurinをFK506 (100 nM)で阻害するしたところ、脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激によるRP抑制が阻害された (153 ± 6 %, 30 min) (図23)。なお、FK506投与自体がGABA応答やmIPSCの大きさ、時間経過や頻度に影響を与えることは無かった (データ示さず)。この結果から、calcineurinの活性に依存してGABA_B受容体はRP誘導を抑制することが示唆された。

さらに、calcineurinがRP誘導を抑制する際に、CaMKIIやPKAとどのように相互作用するかを調べるために、KT5720によるPKA阻害あるいはKN62によるCaMKII阻害によるRP

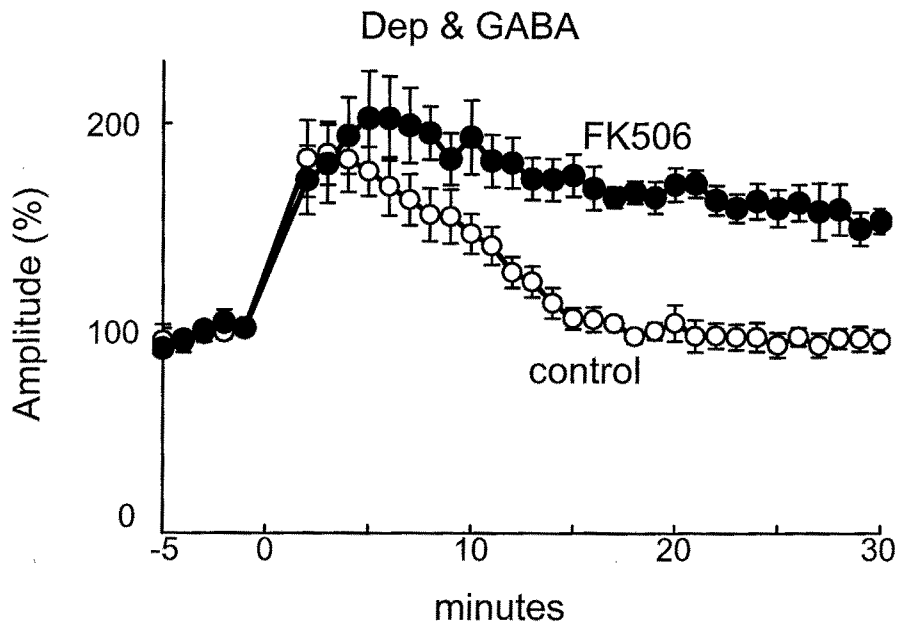


図 23. GABA_B受容体によるRP抑制におけるcalcineurinの必要性

FK506存在下でプルキンエ細胞に脱分極とGABA投与の組み合わせ条件刺激を行なった時の、GABA応答の時間経過 (●, n=5)。比較の為に、FK506非存在下での対照を示している(○, n=5)。

誘導抑制に対して、FK506によるcalcineurin阻害が及ぼす影響を検討した。その結果、PKA阻害が引き起こすRP誘導抑制はcalcineurin阻害により消失した ($161 \pm 11\%$, 30 min) (図24 A)。一方CaMKII阻害によるRP阻害はcalcineurinを阻害しても影響されなかった ($84 \pm 4\%$, 30 min) (図24 B)。これらの結果から、calcineurinはPKA活性低下の下流でRP誘導抑制に寄与し、その下流でCaMKIIがRPを誘起すべく機能していると考えられる。

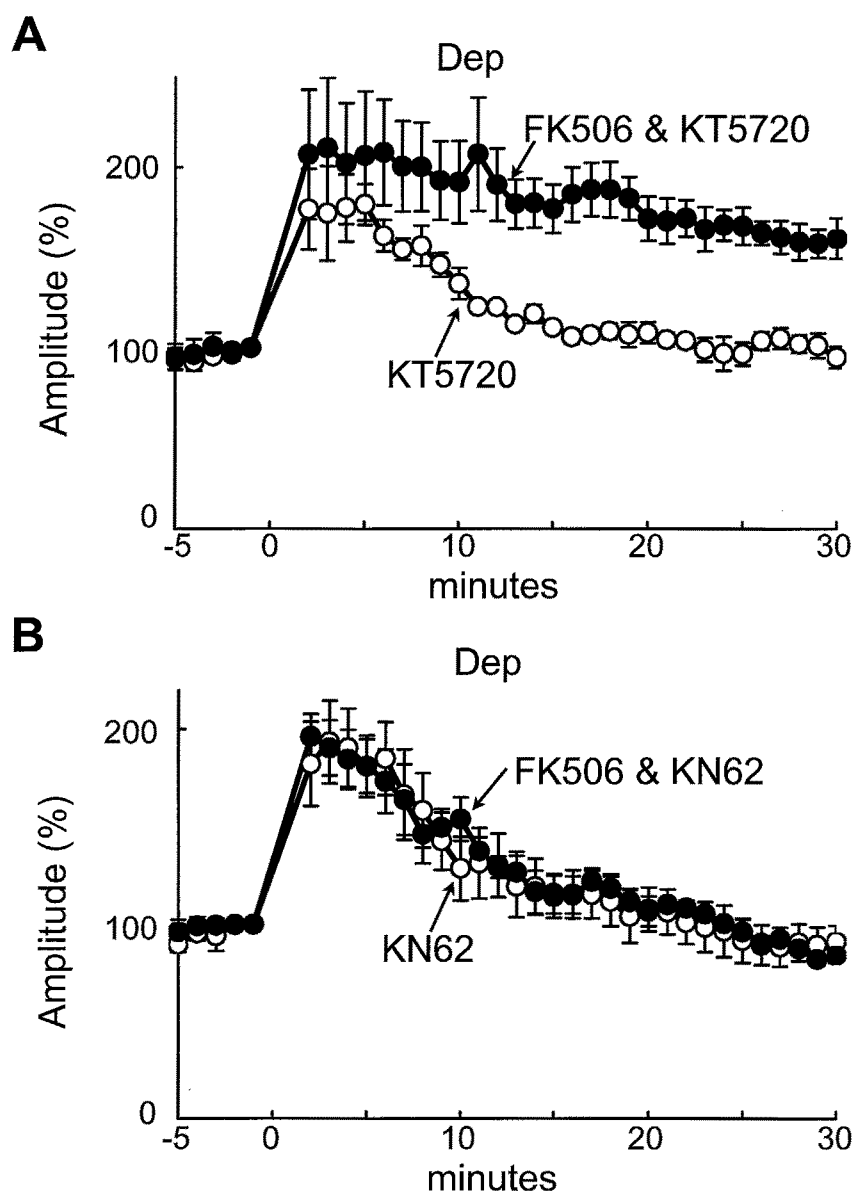


図 24. CaMKII, PKA阻害によるRP阻害へのcalcineurin阻害の影響

A, KT5720とFK506存在下でプルキンエ細胞に脱分極の条件刺激を行なった時のGABA応答の時間経過(●, n=5)。比較の為に、KT5720のみ投与した場合も示している(○, n=5)。

B, KN62とFK506存在下でプルキンエ細胞に脱分極の条件刺激を行なった時のGABA応答の時間経過(●, n=5)。比較の為に、KN62のみ投与した場合も示している(○, n=5)。

RP誘導へのDARPP-32の関与

海馬ではcalcineurin/I-1/PP-1の経路がPKAにより調節されてCaMKIIによるリン酸化が制御されると考えられている (Kandel, 2001; Malenka, 1994; Silva, 2003)。プルキンエ細胞にはI-1は発現していないが、その類似分子であるDARPP-32 (dopamine and cAMP-regulated phospho-protein, 32 kDa) が多く発現していることが報告されている (Hemmings et al., 1984; Schalling et al., 1990; Greengard et al., 1999)。I-1と同様にDARPP-32はPKAによりThr34をリン酸化されると直接PP-1を抑制し、またそのThr34はcalcineurinにより脱リン酸化される。そこで、プルキンエ細胞では、DARPP-32がPKAとcalcineurinの活性に依存してPP-1活性を調節することで、CaMKIIにより誘導されるRPを制御するのではないかと考えた。現在のところDARPP-32のはたらきを制御する薬剤は存在しななので、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いてDARPP-32遺伝子の発現をロックダウンすることを試みた。DARPP-32 mRNAの翻訳開始部位周辺に対するアンチセンス処理から8時間後には、DARPP-32タンパク質の量が $65 \pm 6\%$ に減少することがウエスタンブロッ

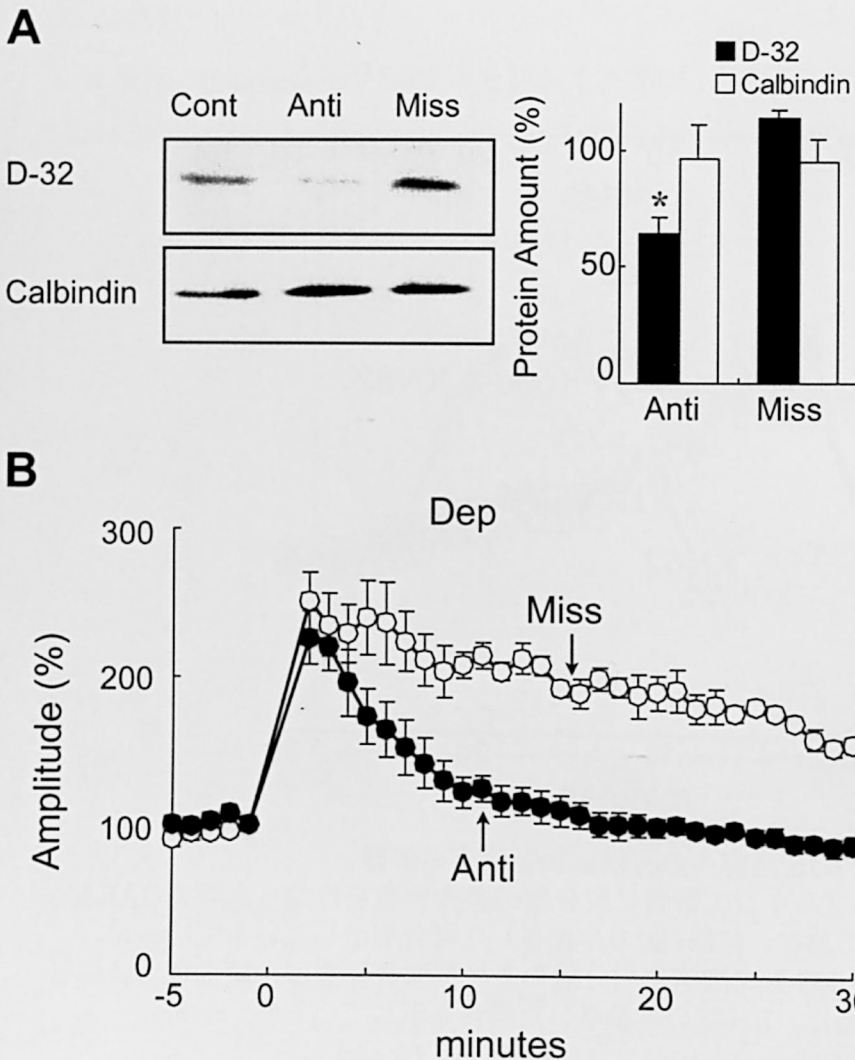


図 25. DARPP-32のRP誘導調節への関与

A, DARPP-32に対するアンチセンス効果。アンチセンス処理を8時間行い、Western blottingを行った。アンチセンス処理により、DARPP-32タンパク質の量が減少していることが分かる。対照として、プルキンエ細胞の分子マーカーであるcalbindinを用いた。

D-32 : DARPP-32

Anti: アンチセンスオリゴ処理

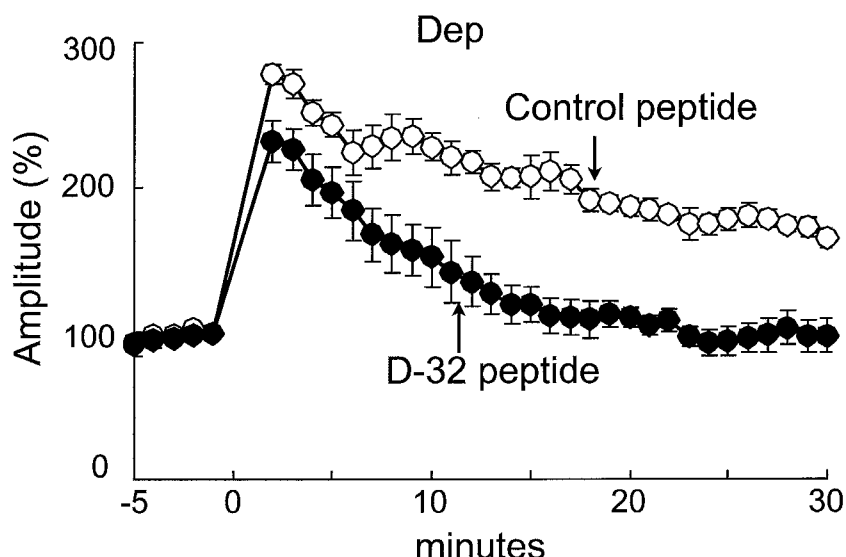
Miss: ミスセンスオリゴ処理

*: $p < 0.01$

B, アンチセンス処理(●, $n=5$)あるいはミスセンス処理(○, $n=5$)を8時間行ったプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行なったときのGABA応答の大きさの時間経過。

図 26. DARPP-32によるPP-1抑制のRP誘導調節への関与

DARPP-32のN末ペプチド(●, n=5)あるいはそのKIQQFモチーフをKETQYに置換したコントロールペプチド(○, n=5)を細胞内に導入して、プルキンエ細胞に脱分極処理を行ったときのGABA応答の大きさの時間経過。



D-32 : DARPP-32

ティングにより明らかになった(図25 A)。一方、オリゴヌクレオチドの配列をランダムにしたミスセンスオリゴ処理を行った場合には、DARPP-32タンパク質量は変化しなかった(97 ± 14%) (図25 A)。このミスセンスオリゴ処理を行ったプルキンエ細胞では、脱分極条件刺激によりRPが通常通り誘導されたが(156 ± 5 %, 30 min) (図25 B)、アンチセンス処理を行ったプルキンエ細胞では、脱分極条件刺激を行ってもRPが誘導されなかった(89 ± 6 %, 30 min) (図25 B)。これらの結果からDARPP-32は、おそらくPP-1活性を抑制することでRP誘導を正に調節する因子であると考えられる。

I-1やDARPP-32などのPP-1に結合するタンパク質はKKIQFモチーフを持ち、その領域を介してPP-1に結合すると考えられている(Greengard et al., 1999 参照)。生化学的実験により、KKIQFモチーフを含むDARPP-32のN末部分の23アミノ酸からなるペプチドが、DARPP-32とPP-1との結合を競合的に阻害して、PP-1を抑制から開放することが報告されている(Kwon et al., 1997)。そこで、このペプチドを用いてPP-1活性をプルキンエ細胞で上昇させ、それがRP誘導に及ぼす影響を調べた。パッチ電極からDARPP-32N末ペプチドをプルキンエ細胞に導入すると、脱分極条件刺激によるRP誘導が阻害された(98 ± 11 %, 30 min) (図 26 A)。一方、KKIQFモチーフ配列をKETQYに換えたペプチドは、RP誘導を阻害しなかった(165 ± 7 %, 30 min) (図 26)。このことから、DARPP-32がPP-1に結合することがRP誘導に必要不可欠であり、またPP-1活性が上昇するだけでRP誘導を阻害するのに十分であることが結論された。

PKA活性低下およびPP-1活性を介したGABA_B受容体によるCaMKII抑制

CaMKIIはThr286を自己リン酸化することによりCa²⁺/calmodulin非依存的にその活性

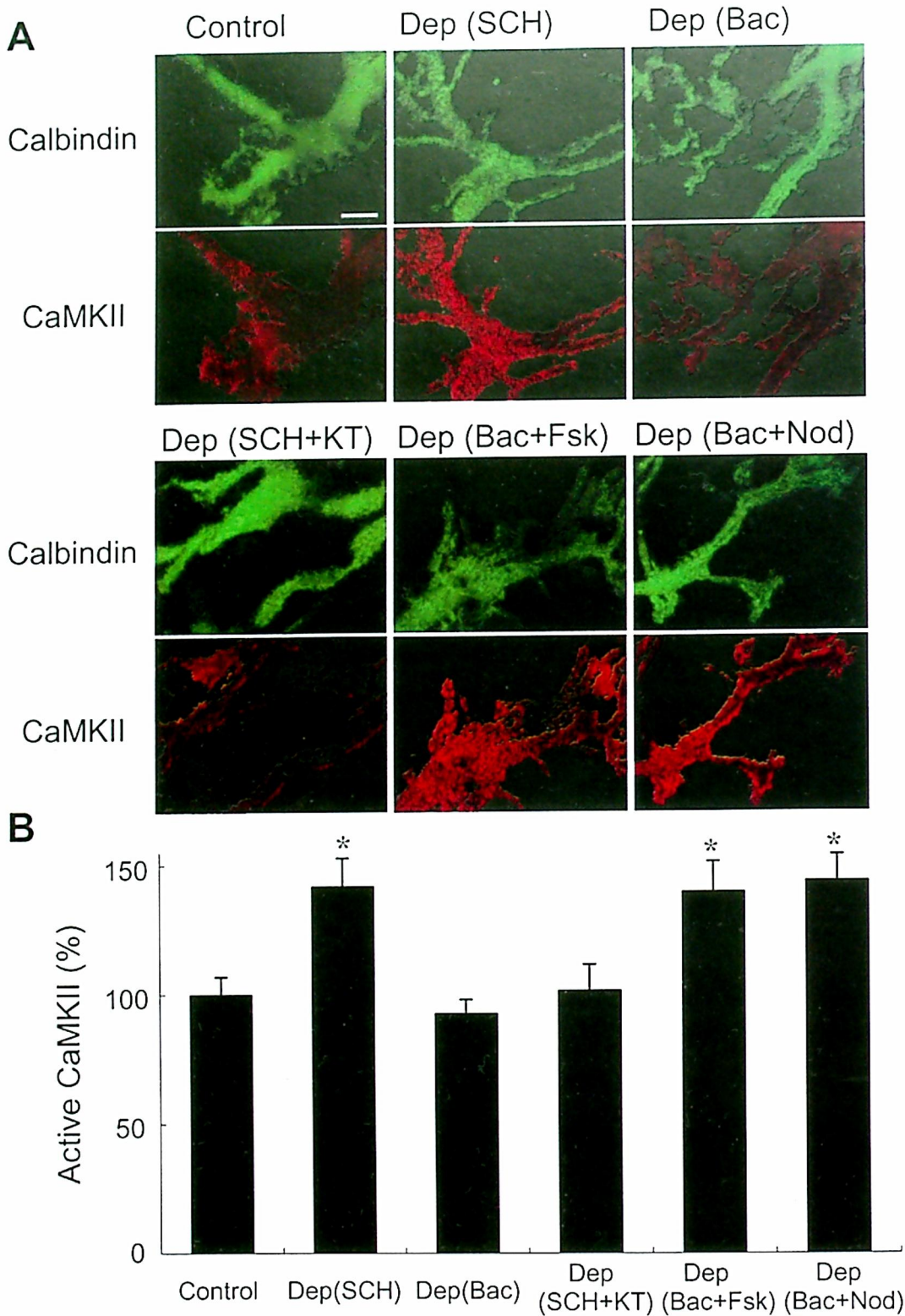


図 27. GABA_B受容体によるPKA活性低下とPP-1に依存したCaMKII抑制
 小脳培養細胞を2分間それぞれの条件処理液で処理し、その3分後に細胞を固定してThr286がリン酸化された活性化型CaMKIIのみを選択的に染色した。

Control: 標準実験液処理、Dep (SCH): GABA_B受容体阻害剤SCH50911を含む高濃度 (50 mM) K⁺溶液で処理、Dep (Bac): GABA_B受容体作用薬baclofenを含む高濃度 K⁺溶液で処理、Dep (SCH +KT): SCH50911とPKA阻害剤KT5720を含む高濃度 K⁺溶液で処理、Dep (Bac + Fsk): baclofenとアデニルシクラーゼ活性化剤forskolinを含む高濃度 K⁺溶液で処理、Dep (Bac + Nod): baclofenとPP-1阻害剤nodularinを含む高濃度 K⁺溶液で処理。

スケールバーは10 μm

*: P < 0.01

を維持する活性化型になることが海馬LTP誘導に重要な役割を果たす (Fukunaga et al., 1993; Braun and Schulman, 1995; Blitzler et al., 1998; Giese et al., 1998; Lisman et al., 2002; Silva, 2003; Soderling, 2000)。このThr286の自己リン酸化はPP-1により脱リン酸化される。そこで、RPが誘導あるいは抑制される条件と、そのときの活性化型CaMKIIの量に相関関係があるかを調べた。Thr286がリン酸化されたCaMKIIのみを選択的に認識する抗体を用いた免疫細胞化学的染色により、プルキンエ細胞におけるCaMKII活性を測定した。プルキンエ細胞を脱分極させるための条件刺激として、50 mMのK⁺溶液で小脳培養細胞を二分間処理し、その後標準実験液で洗浄してから三分後に固定して抗体染色を行った。その結果、標準液で処理した対照と比較すると、GABA_B受容体阻害剤SCH50911を含んだ50 mM K⁺溶液処理を行った場合には活性化型CaMKIIが増加した (図 27)。ところが、この高濃度K⁺溶液処理時にbaclofenでGABA_B受容体を活性化させた場合には、活性化型CaMKIIの増加が抑えられた (図 27)。このことから、GABA_B受容体活性化によりCaMKII活性が負に調節されると考えられる。この脱分極によるCaMKII活性化に対するbaclofenによる抑制効果は、PKA阻害剤KT5720によっても得られた (図 27)。逆に、baclofenと高濃度K⁺処理時にforskolinを用いてPKA活性を上昇させると、CaMKII活性化が回復した (図 27)。これらの結果から、GABA_B受容体はアデニリルシクラーゼの抑制を介してPKA活性を低下させることにより、CaMKII活性化を抑制すると考えられる。さらに、nodularinによりPP-1の活性を阻害した場合にも、GABA_B受容体によるCaMKIIの抑制が消失した (図 27)。このことは、GABA_B受容体によるCaMKII抑制はPP-1活性に依存することを示している。なお、全てのCaMKIIを認識する抗体を用いて染色すると、上記のどの処理によってもCaMKIIの量は変わらなかった (データ示さず)。以上の結果を総合すると、プルキンエ細胞の脱分極により引き起こされるCaMKIIのThr286自己リン酸化は、GABA_B受容体活性化によりPKA抑制とPP-1活性を介して抑えられると考えられる。また、RPが誘導あるいは抑制される条件が、活性化型CaMKII量の多寡を制御する条件とよく一致していることが明らかになった。したがって、RPが誘導されるか否かはCaMKII活性によって決まると考えられる。

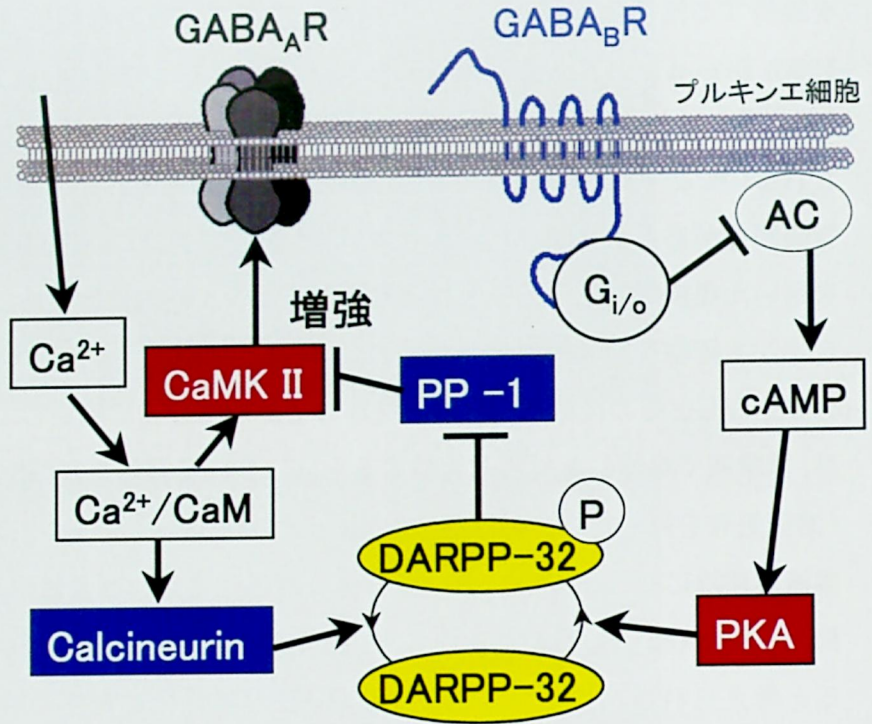
考察

RP誘導と抑制を制御する細胞内シグナル伝達経路

第二章では、GABA_B受容体によるRP誘導抑制を制御する細胞内情報伝達経路について明らかにした。得られた実験結果から考えられるモデルを図28に示す。プルキンエ細胞の脱分極により細胞内Ca²⁺濃度が上昇するとcalmodulinにCa²⁺が結合し、その結果CaMKIIが活性

図 28. RPを調節する細胞内情報伝達経路

GABA_AR: GABA_A受容体
 GABA_BR: GABA_B受容体
 AC: アデニルシクラーゼ
 CaM: calmodulin



化されGABA_A受容体を介する応答が増強される。同時に、Ca²⁺/calmodulin依存性脱リン酸化酵素calcineurinも活性化されて、その基質であるDARPP-32を脱リン酸化しようとする。ところが、定常状態のPKA活性によるリン酸化によりDARPP-32は十分に脱リン酸化されず、結果的にある程度リン酸化された状態のDARPP-32が存在するためにPP-1活性が低いまま維持され、RPを誘起するのに十分なCaMKII活性化が可能になると考えられる。ところが、プルキンエ細胞の脱分極時にGABA_B受容体が活性化すると、Gi/Goタイプの三量体Gタンパク質が活性化され、アデニルシクラーゼが抑えられることにより細胞内cAMP濃度が低下する。するとPKAの活性が低下して、calcineurinによるDARPP-32の脱リン酸化が促進されると推察される。その結果、DARPP-32によるPP-1活性の抑制が減弱し、PP-1がCaMKIIの自己リン酸化されたThr286を脱リン酸化するために、十分なCaMKII活性化が得られず、RP誘導が抑制されてしまうと考えられる (図 28)。

CaMKIIがどのようにしてGABA_A受容体応答を増強させるのかという機構はまだ分からない。CaMKIIがGABA_A受容体を直接リン酸化するという報告があり (MacDonald and Moss, 1994)、プルキンエ細胞でも直接的なリン酸化によりGABA_A受容体の単一チャンネルコンダクタンスやチャンネルの開時間などが変化することで、RPが起こるのかも知れない。また、興奮性のグルタミン酸性シナプスで観察されるように、受容体分子のシナプス後膜での数が増加するという可能性もある (Hayashi et al., 2000)。リン酸化により受容体の細胞内局在が変化して細胞膜への移動が促進されることも有り得るだろう。

通常の条件下では脱分極条件刺激によりRPが誘導されるので、プルキンエ細胞では定常

的にPKAがある程度の活性を持っており、それはcalcineurin/DARPP-32/PP-1の分子経路を抑え込んでRP誘導に必要なCaMKII活性化を達成させるのに十分なようである。したがって、プルキンエ細胞で定常的にcAMP濃度を比較的高いまま維持する何らかの機構が存在するはずである。プルキンエ細胞においては、アミンやグルタミン酸など多様な伝達物質に対する代謝型受容体がcAMP濃度調節に関与していると推察される。例えば、代謝型グルタミン酸受容体1 (mGluR1)がGsタンパク質を介してアデニリルシクラーゼを活性化してcAMP濃度を上昇させ得ることが報告されている (Miyashita and Kubo, 2000)。mGluR1はプルキンエ細胞に多量に存在し、平行線維-プルキンエ細胞間の興奮性シナプスにおけるLTD発現において重要な役割を担うことが知られており (Aiba et al., 1994; Conquet et al., 1994; Ito, 2001; Shigemoto et al., 1994)、そのmGluR1がプルキンエ細胞でさらに抑制性シナプス可塑性にも関与するとすれば興味深い。

RPとLTP/LTDを調節するシグナル経路の類似性

これまでに最もよく研究されてきたシナプス可塑性調節の情報伝達系経路は、海馬CA1領野の錐体細胞におけるLTP/LTD制御を担うシグナル経路であろう。図29に示す様に、その細胞内情報伝達系は本章で示したRPを調節するシグナル経路と似ている。LTP/LTD誘導の調節にはCaMKIIとcalcineurin/I-1/PP-1経路が関与している (Kandel, 2001; Lisman et al., 2002; Malenka, 1994; Malenka and Nicoll, 1999; Lisman and Zhabotinsky, 2001; Sheng and Kim, 2002; Silva, 2003)。Leeら(2000)により、LTP誘導の際にAMPA受容体のSer831がCaMKIIによりリン酸化され、一方定常状態でPKAによりリン酸化されているSer845がLTD誘導時にはPP-1/PP2Aにより脱リン酸化されることが示されている。CA1錐体細胞で細胞内Ca²⁺濃度が大きく上昇すると、CaMKIIが活性化されると同時にCa²⁺/calmodulin依存性のアデニリルシクラーゼであるIおよびVIII型が活性化され、cAMP産生によりPKAが活性化される (Cooper et al., 1995; Wong et al., 1999)。その結果、I-1がリン酸化されてPP-1を抑制し、CaMKIIの十分な活性化がもたらされる (Blitzer et al., 1995 and 1998; Makhinson et al., 1999; Allen et al., 2000; Otmakhova et al., 2000)。一方、細胞内Ca²⁺濃度上昇の程度が弱い場合には、Ca²⁺/calmodulinとの結合親和性の違いからCaMKIIよりもむしろ優先的にcalcineurinが活性化され、I-1の脱リン酸化を介してPP-1活性が上昇する。その結果CaMKIIは抑制されてしまい、AMPA受容体などのリン酸化が進まず、むしろ脱リン酸化反応が進んでLTDが誘導されると考えられている (Malenka, 1994; Mulkey et al., 1994)。

このように、小脳と海馬で似た分子機構により抑制性と興奮性のシナプス可塑性が制御さ

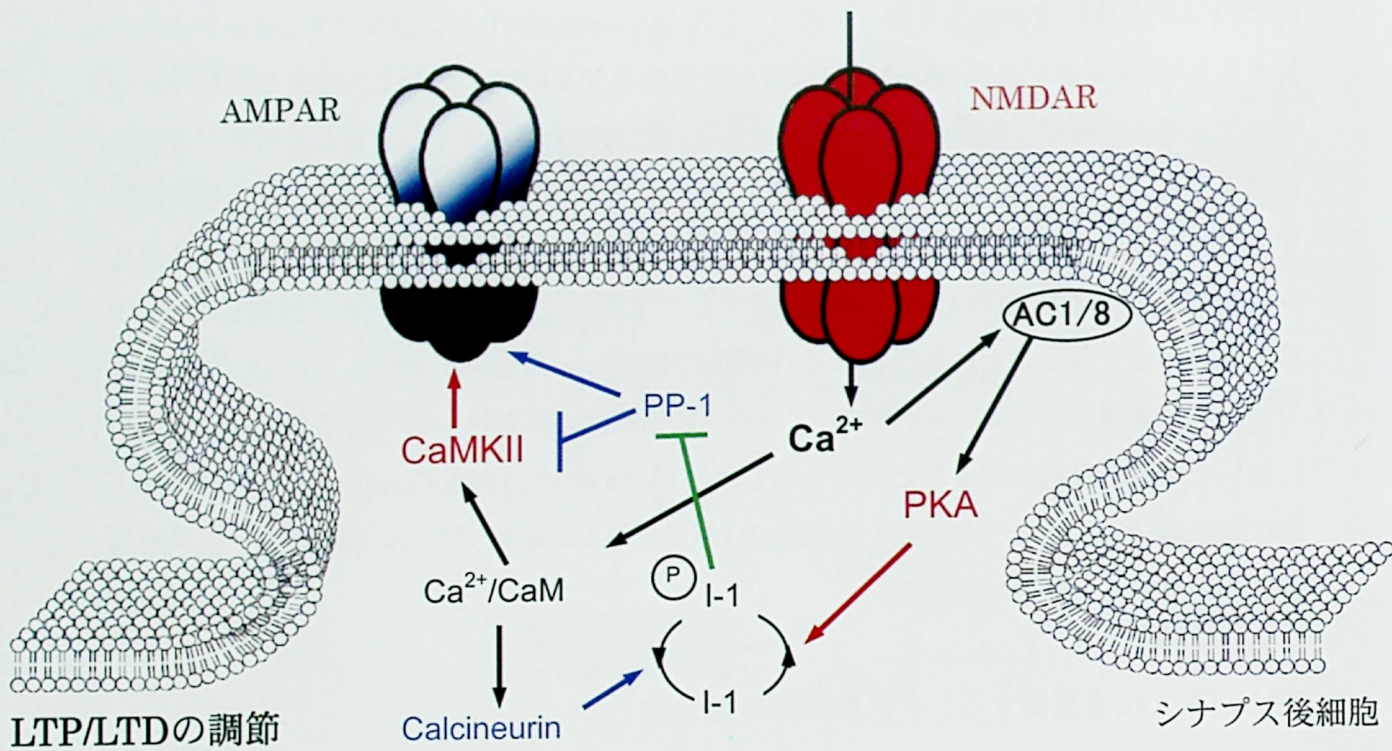


図 29. 海馬LTP/LTDを調節する細胞内情報伝達経路

AMPA : AMPA型グルタミン酸受容体
 NMDAR : NMDA型グルタミン酸受容体
 AC : アデニルシクラーゼ
 I-1 : inhibitor-1
 CaM : calmodulin

れているが、海馬ではLTP/LTDが切り替えられるという両方向性の可塑性調節が行われるのに対し、小脳プルキンエ細胞ではRP誘導/抑制の切り替えという一方向性の可塑性誘導の可否が決定される。この違いは、双方において変化する受容体分子や生化学反応を担う分子の違い、また定常状態のPKA活性が異なることに起因するのかもしれない。海馬錐体細胞ではDARPP-32は発現していないが、その類似分子であるI-1が発現している。DARPP-32とI-1は相同な分子であるが、DARPP-32にはcdk-5によってもリン酸化される部位が存在し (Bibb et al., 2000)、独自の調節がなされることもある。また、Ca²⁺/calmodulin依存性のアデニルシクラーゼI/VIII型は海馬では発現しているが、プルキンエ細胞では発現していない。したがって、両細胞でPKA活性の調節機構はかなり異なっていると言えよう。DARPP-32は主にドーパミン投射を受ける細胞で発現が認められるが (Hemmings et al., 1984; Greengard et al., 1999)、線条体におけるLTP/LTDの誘導切り替えにおいても重要な働きを担うことが示されている (Calabresi et al., 2000)。本章で示したcalcineurin/DARPP-32 (I-1)/PP-1

経路によるCaMKII活性制御は、中枢神経系の幅広いニューロンにおいてそのシナプス伝達効率調節に関与しているのかも知れない。

第三章

インテグリンによるGABA性シナプス伝達の

活動依存的長期安定化機構

第一章において、小脳抑制性シナプス可塑性の誘導がシナプス活動により負に調節されることを示し、第二章ではその調節を担う細胞内情報伝達経路を明らかにした。第三章では、視点を変え細胞接着分子であるインテグリンの活性による抑制性シナプス可塑性調節について扱う。プルキンエ細胞の神経活動によりインテグリンの機能が亢進し、その結果数日間の長期にわたり可塑性が起こらなくなるという、新たな長期間持続性の可塑性制御機構について報告する。

序論

国内外でシナプス伝達制御機構に関して精力的に研究が行われてきた結果、さまざまな分子がシナプス可塑性の調節に関与することが明らかになってきた (Hansel et al., 2001; Kandel, 2001; Malenka, 1994; Sheng and Kim, 2002; Silva, 2003)。その中で、細胞間あるいは細胞と細胞外マトリックスとの構造的結合を担う細胞接着分子がシナプス伝達制御に関わっていることを示す知見が最近報告されてきている。これまでに、海馬におけるLTP誘導の調節にカドヘリン、L1やNCAMといった細胞接着分子が必要であることが報告されている (Benson et al, 2000)。また、主に細胞-マトリックス間の結合を担うインテグリンも海馬LTP誘導の安定した持続に必要であることが示唆された (Kramer et al., 2002)。ほとんどの場合、これらの細胞接着分子の活性はシナプス可塑性の誘導を正に調節するが、第三章では、インテグリン活性が小脳プルキンエ細胞におけるRP誘導を抑制する働きをもつことを示す。

インテグリンは、 α サブユニットと β サブユニットからなる異型二量体として機能する細胞接着分子であり、主に細胞外マトリックスと細胞内アクチン骨格系の橋渡しをする (Beckingham et al., 1998; Benson et al., 2000; Leitinger et al., 2000; Milner and Campbell, 2002)。その役割はただ構造的な接着を担うだけではなく、リガンドが結合することで細胞内の多様な情報伝達系を駆動することが分かっている。例を挙げると、PKCやMAPKなどのセリン・スレオニンタンパク質リン酸化酵素やFAK (focal adhesion kinase)やSrc等のチロシンタンパク質リン酸化酵素、そしてアクチン骨格を調節するRhoなどのGTPaseの活性化がインテグリンの活性化により引き起こされる (Beckingham et al., 1998; Benson et

al., 2000; Guan, 1997; Leitinger et al., 2000; Milner and Campbell, 2002; Schwartz et al., 1995)。これらの分子は、シナプス可塑性の誘導調節に関わると考えられており (Sheng and Kim, 2002 参照)、インテグリンは様々な中枢神経系部位においてシナプス伝達の可塑的変化を調節する可能性があるのではないかと考えられる。

近年の研究により、シナプス構造は動的な性質を有しており、神経活動に依存してその形態を大きく変化させることが明らかにされつつある(Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Nikonenko et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002)。しかしながら、構造的なダイナミクスと機能的な情報伝達効率の変化の間にどのような因果関係があり、その関係がどのような分子機構を基盤とするのかは、ほとんど明らかにされていない。細胞接着分子は構造的安定性をもたらすと同時に神経細胞間のシナプス伝達も制御し得ることから、構造的・機能的なシナプス可塑性の制御において細胞接着分子が重要な働きをしているのではないかと考えられる。また、神経活動によりカドヘリンやインテグリン分子がその量を変化させる現象も少数ながら報告されている (Benson et al., 2000; Bozdagi et al., 2000; Pinkstaff et al., 1998; Tanaka et al., 2000)。第三章では、プルキンエ細胞において脱分極と GABA_B受容体活性化が同時に起こると、新規の遺伝子発現を介してインテグリンタンパク質の量が長時間にわたり変化し、それが機能的なシナプス伝達効率制御に変化をもたらすというユニークな現象を報告する。

結果

抑制性シナプス伝達増強誘導のインテグリンによる抑制

インテグリンがRP誘導の調節に関与しているかを検討するために、まずインテグリンの

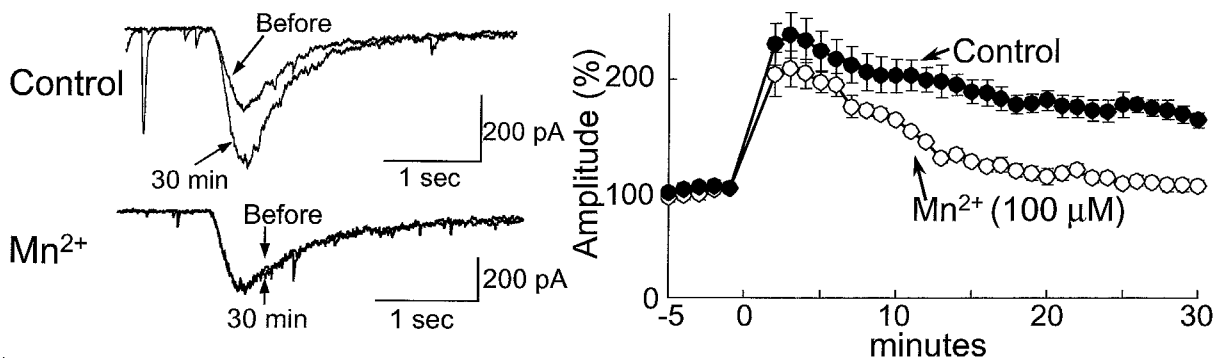
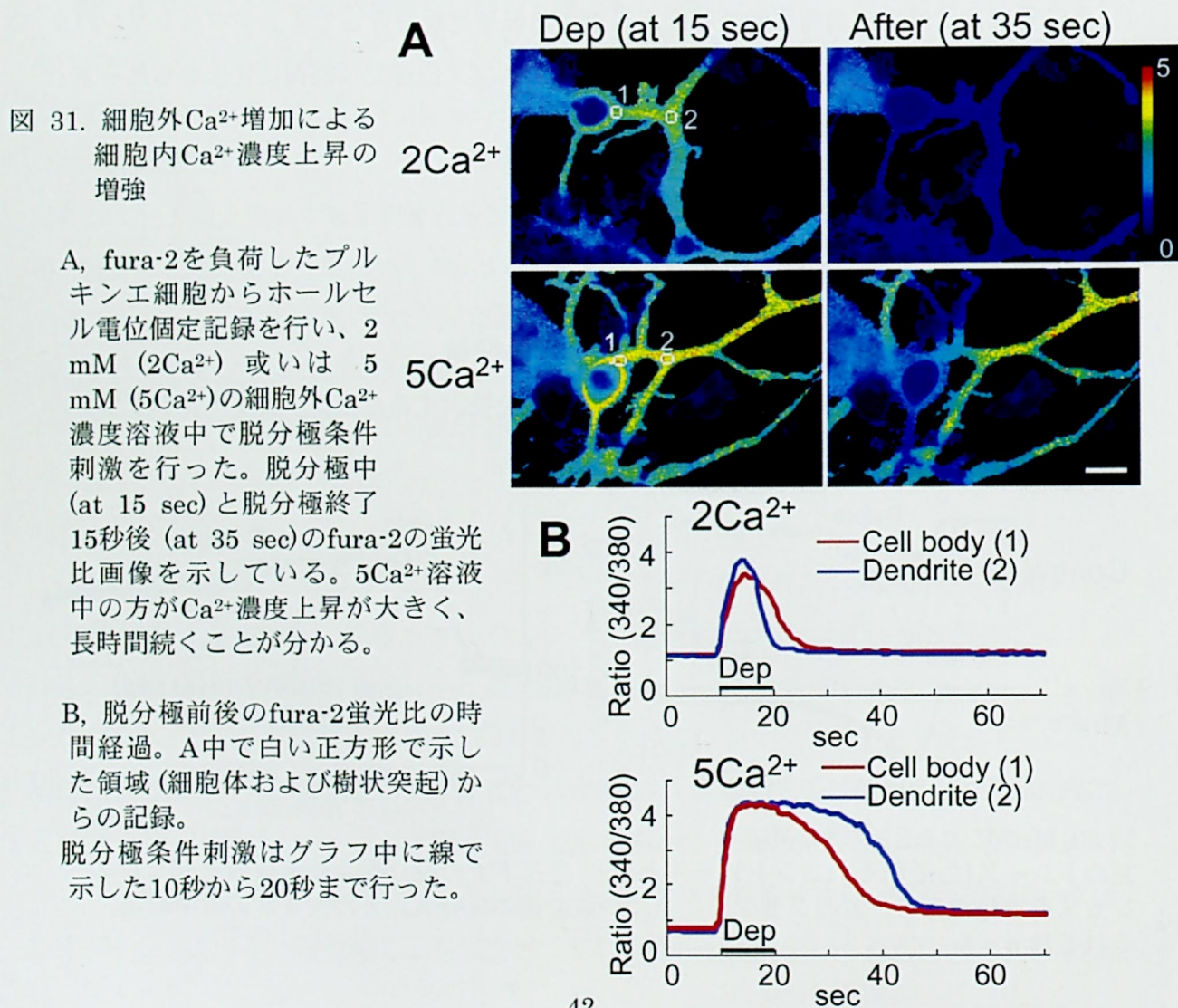
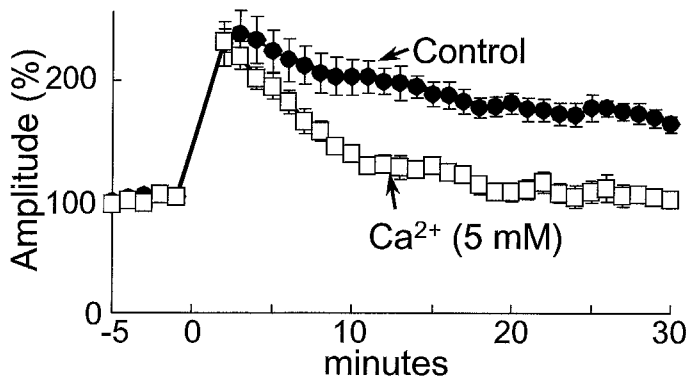


図 30. Mn²⁺によるRP誘導の阻害

左のトレースは、それぞれコントロールとMn²⁺存在下での脱分極条件刺激前と30分後のトレースを重ねたもの。右のグラフは、条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過。それぞれ n = 5。

活性を上昇させ、そのRP誘導に与える影響を検討することを試みた。インテグリンは細胞外領域に多くの二価陽イオン結合部位を持ち、その二価陽イオンとの結合がインテグリン活性に影響することが分かっている (Beckingham et al., 2002; Leitinger et al., 2002)。とりわけ、 Mn^{2+} はインテグリンを活性化させる際によく使われる二価陽イオンである (Ivins et al., 2000)。そこで、 Mn^{2+} によりインテグリンを活性化させてRP誘導がどう影響されるか検討した。 Mn^{2+} (100 μM)存在下ではプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行っても、RP誘導が阻害されてしまうことが分かった (102 \pm 6 %, 30 min) (図 30)。ところで、 Mn^{2+} は電位依存性の Ca^{2+} チャネルに対するブロッカーとしても作用し得るが、 Ca^{2+} チャネルを介する Ba^{2+} 電流の計測を行ったところ、100 μM の濃度では Mn^{2+} はほとんど Ca^{2+} チャネル電流を阻害しなかった (データ示さず)。さらに、 Mn^{2+} によるRP誘導阻害が Ca^{2+} 流入を減少させる作用によるのではない事確かめるために、細胞外の Ca^{2+} 濃度を2 mMから5 mMに上げて、RP誘導への影響を調べた。細胞外 Ca^{2+} は Mn^{2+} と同様、インテグリンに結合しその活性を変化させる。fura-2を用いた細胞内 Ca^{2+} イメージングにより、細胞外 Ca^{2+} 5 mM存在下では、脱分極条件刺激

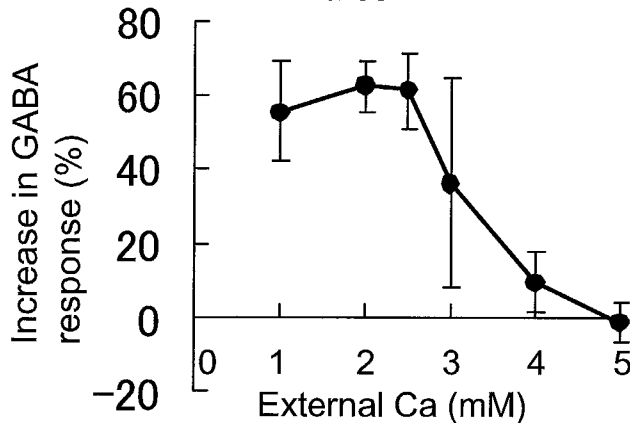


A図 32. 細胞外Ca²⁺によるRP誘導抑制

A, 2 mM (Control) 或いは 5 mMの細胞外Ca²⁺濃度溶液中での脱分極条件刺激を行う前後のGABA応答の大きさの時間経過。

Ca²⁺ (5 mM): n = 6

Control: n = 5

B

B, それぞれの細胞外Ca²⁺濃度に対する、脱分極条件刺激30分後のGABA応答の増加率(%)。

Ca²⁺ (5 mM): n = 6

その他はそれぞれ n = 5

時の細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、通常の2 mM条件下に比べより大きく、時間的にもより長く続くことが分かった(図 31)。そのように細胞内Ca²⁺濃度上昇が強まるにも拘らず、5 mM Ca²⁺存在下では、Mn²⁺存在下の場合と同様にRPが誘導されなかった(99 ± 5 %, 30 min)(図 32)。RPは細胞内Ca²⁺濃度上昇に依存して誘導されるにもかかわらず、細胞外Ca²⁺を増加させた場合にはRPが誘導されないという逆説的な結果が得られた。

細胞外Ca²⁺によるRP誘導阻害がインテグリン活性によるか否かを検討するために、ペプチドを用いてインテグリンとリガンドとの結合を阻害して、その細胞外Ca²⁺によるRP誘導阻害に対する影響を検討した。インテグリンはリガンド内のRGDというアミノ酸配列を認識して結合することが知られており、そのRGD配列を含む短いペプチドはインテグリンとリガンドとの結合を競合的に阻害することが知られている(Benson et al., 2000; Milner and Campbell, 2002)。図33に示す様に、GRGDSPペプチドを用いてインテグリンを阻害すると、5 mMのCa²⁺存在下でも脱分極条件刺激によりRP誘導が起こった(175 ± 11 %, 30 min)。なお、RGD配列をRADに替えたGRADSPコントロールペプチドは効果を示さなかった。(107 ± 5 %, 30 min) (図 33)。この結果から、細胞外Ca²⁺はインテグリン活性を介してRP誘導を阻害すると考えられる。

次に、インテグリンのどのサブユニットがプルキンエ細胞でRP誘導抑制に寄与するのか

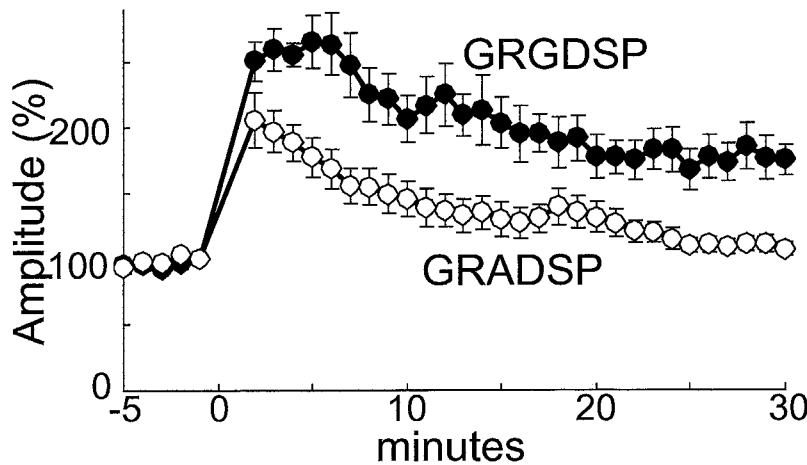


図 33. 細胞外Ca²⁺によるRP抑制はインテグリンによる

A, GRGDSP ペプチド(n = 6)あるいはGRADSP (n = 5) ペプチド存在下で、細胞外Ca²⁺ 5 mM条件下でプルキンエ細胞から記録した、脱分極条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過。

を明らかにするために、まず免疫細胞化学的にプルキンエ細胞でのインテグリン α サブユニットの局在を調べた。以前 Pinkstaff (1999)らが行った *in situ* hybridization によりプルキンエ細胞で発現する主なインテグリンの α サブユニットは、 $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV であることが分かっている。プルキンエ細胞の分子マーカーである calbindin との二重染色により、インテグリン $\alpha 3$ サブユニットはプルキンエ細胞で樹状突起の細胞膜に局在していることが分かった (図 34 A)。さらに、シナプス前終末に局在する分子であるシナプトフィジンの二重染色を行ったところ、インテグリン $\alpha 3$ サブユニットはシナプス前終末のシナプトフィジンのシグナルと完全には重ならず、接するように局在していることが分かった (図 34 E)。このインテグリン $\alpha 3$ サブユニットの局在は、GABA_A受容体 $\alpha 1$ サブユニットのプルキンエ細胞での局在と似ていた (図 34 D)。一方、インテグリン $\alpha 5$ サブユニットはプルキンエ細胞の樹状突起付近に観察されるシナプトフィジンのシグナルと完全に重なるような局在を示した (図 34 B, F)。このことはインテグリン $\alpha 5$ サブユニットは主にプルキンエ細胞の樹状突起に形成されたシナプス前終末に局在することを示唆している。また、インテグリン αV サブユニットは、プルキンエ細胞の樹状突起に局在が見られるが、細胞膜上あるいは細胞膜付近よりもむしろ細胞質中で観察された (図 34 C)。これらの結果から、インテグリン $\alpha 3$ サブユニットが、プルキンエ細胞におけるGABA_A受容体を介する応答の可塑性を調節する候補ではないかと考えられる。

そこで、インテグリン $\alpha 3$ サブユニットに対する機能阻害抗体が細胞外Ca²⁺による抑制からRP誘導を回復させ得るかどうかを調べた。インテグリン $\alpha 3$ サブユニット機能阻害抗体存在下では、細胞外Ca²⁺によるRP誘導の抑制は消失した(166 ± 8 %, 30 min) (図 35)。一方、インテグリン $\alpha 5$ および αV サブユニットに対する機能阻害抗体は、細胞外Ca²⁺によるRP誘導抑制に影響を与えなかった(それぞれ、97 ± 5 % と 98 ± 5 %, 30 min) (図 35)。これらの結果から、インテグリンの α サブユニットのうち $\alpha 3$ がプルキンエ細胞において、RP誘導を負に調節することが明らかになった。さらに、 $\alpha 5$ か $\beta 1$ サブユニットのどちらかを含むインテグリン

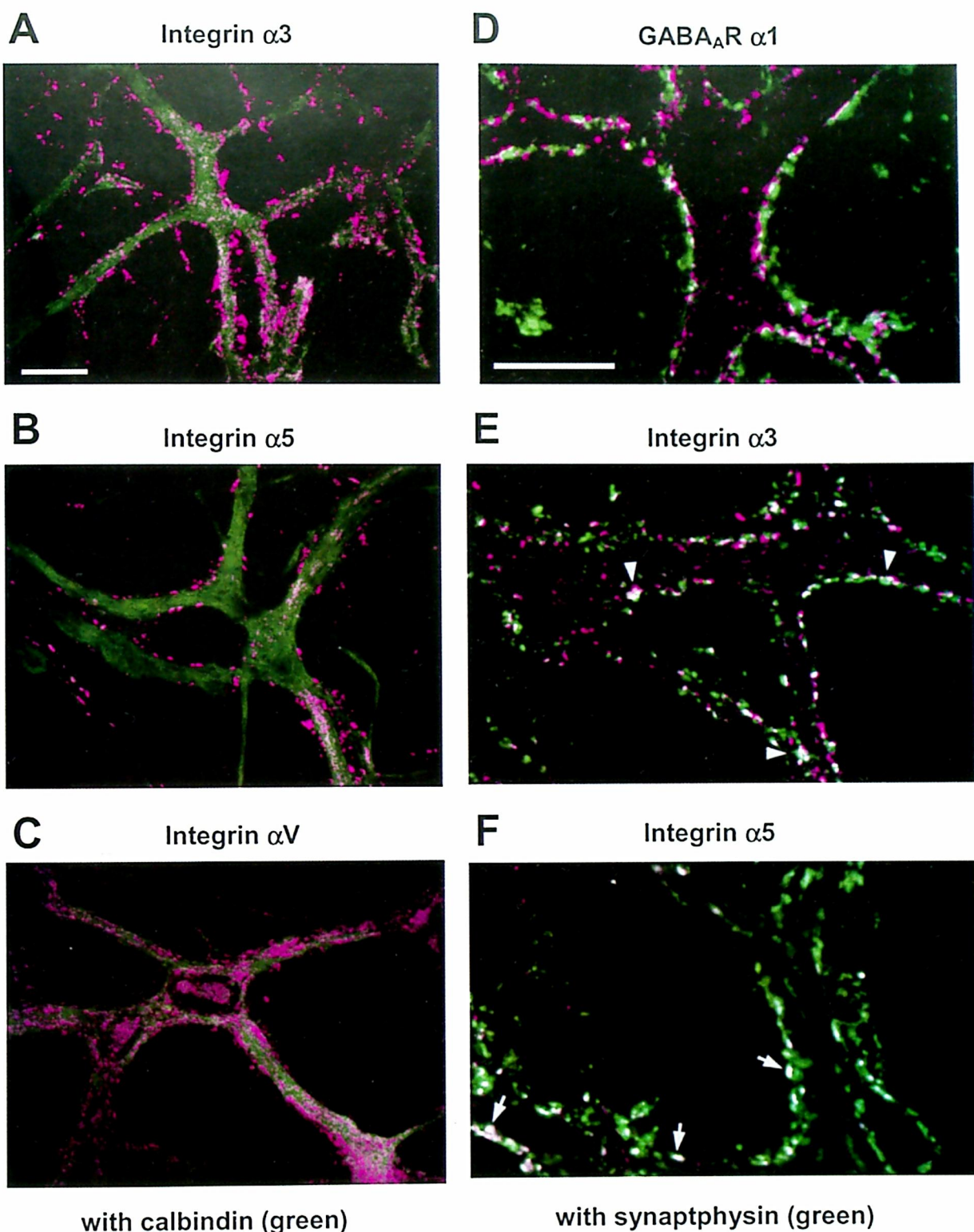
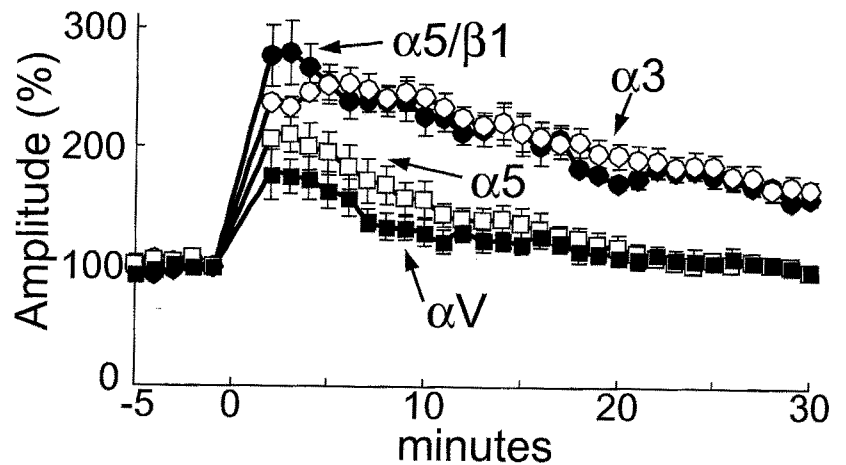


図 34. 免疫細胞化学染色による小脳プルキンエ細胞におけるそれぞれのインテグリンサブユニットの局在

A, B, C 緑 : calbindin、マゼンダ : インテグリンサブユニット $\alpha 3$ (A), $\alpha 5$ (B), αV (C)
 D 緑 : シナプトフィジン、マゼンダ : GABA_AR $\alpha 1$ サブユニット
 E, F 緑 : calbindin、マゼンダ : インテグリンサブユニット $\alpha 3$ (E), $\alpha 5$ (F)
 スケールバー は 10 μm

図 35. 細胞外Ca²⁺によるRP抑制に対するインテグリン機能阻害抗体の効果

5 mM細胞外Ca²⁺条件下で、それぞれのインテグリンに対する機能阻害抗体存在下でプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行った際のGABA応答の大きさの時間経過。それぞれ n = 5



に対する機能阻害抗体を用いた場合にも、5 mM Ca²⁺を含む細胞外溶液中でのRP誘導が回復したことから (159 ± 5 %, 30 min) (図 35)、インテグリンβ1サブユニットもRP誘導の抑制に寄与することが示唆される。以上をまとめると、インテグリンα3/β1異型二量体がRP強誘導を抑制すると考えられる。

さらに、インテグリンがどのような分子を介してRPを抑制するのかを検討した。前述したようにインテグリン活性化は細胞内の様々な情報伝達経路を駆動するが、その中で私はSrc型のチロシンリン酸化酵素に着目した (Guan, 1997 参照)。Srcチロシンキナーゼは、海馬CA1領野におけるLTP誘導への関与が報告されている (Huang et al., 2001; Lu et al., 1998)。Src型チロシンリン酸化酵素の特異的阻害剤であるPP2存在下では、細胞外Ca²⁺が5 mMであっても脱分極条件刺激によりRPが誘導された (156 ± 17 %, 30 min) (図 36)。一方、

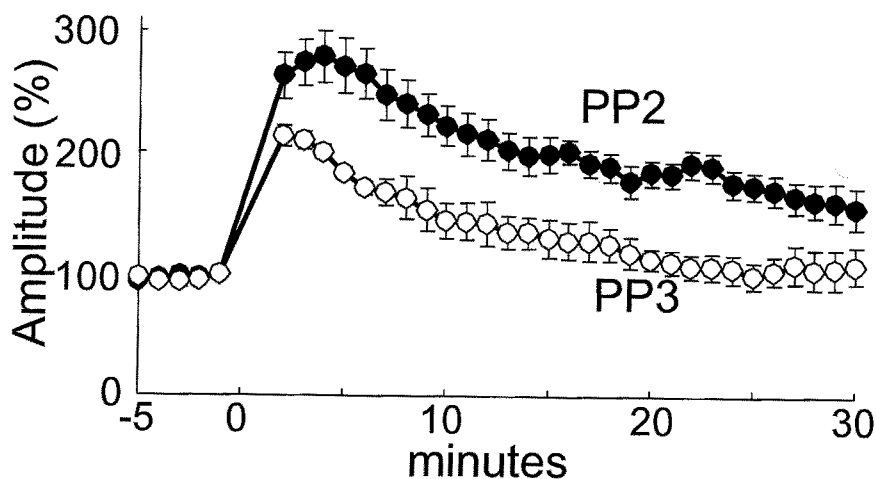


図 36. 細胞外Ca²⁺によるRP抑制へのSrcの関与

5 mMの細胞外Ca²⁺溶液中で、Src阻害剤PP2或いはその類似体PP3存在下でプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行う前後のGABA応答の大きさの時間経過。それぞれ n = 5。

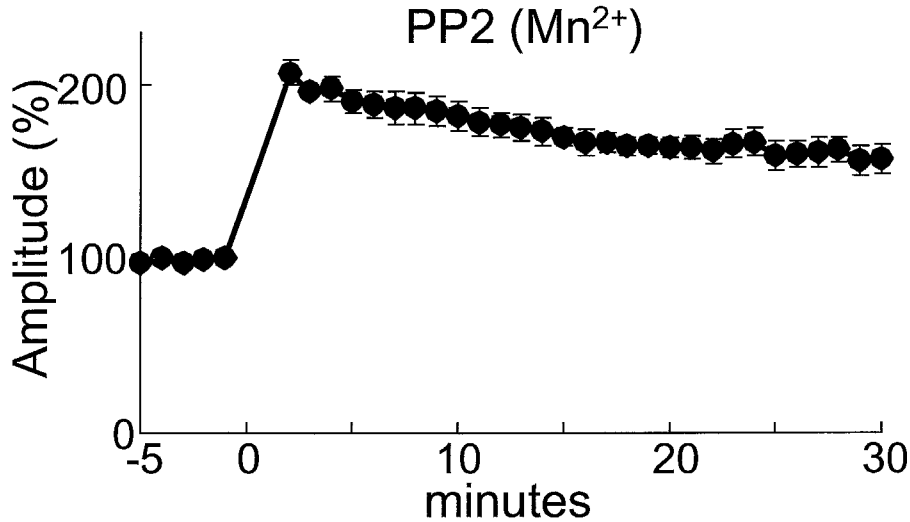


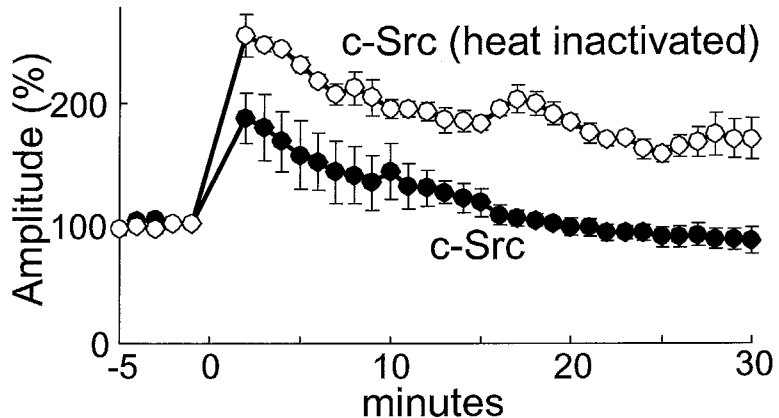
図 37. Mn^{2+} を用いたインテグリン活性化によるRP抑制へのSrcの関与

Mn^{2+} (100 μM) を含む溶液中で、PP2存在下でプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行う前後の、GABA応答の大きさの時間経過。n = 5)。

PP2の類似体でSrc型チロシンリン酸化酵素への阻害効果のないPP3は、細胞外 Ca^{2+} によるRP誘導の抑制に影響を与えなかった ($109 \pm 15 \%$, 30 min) (図 36)。また、PP2によるSrc阻害は、 Mn^{2+} を用いたインテグリン活性化によるRP誘導の抑制も消失させた ($157 \pm 8 \%$, 30 min) (図 37)。これらの結果から、インテグリンによるRP誘導抑制はその下流でSrcファミリーのチロシンリン酸化酵素が担っていると示唆される。さらに、この点を確認するためにSrcの活性がそれ自体でRP誘導を抑制するか否かを検証した。パッチ電極からc-Srcタンパク質をプルキンエ細胞に導入したところ、脱分極条件刺激を行ってもRP誘導が阻害されてしまった ($85 \pm 11 \%$, 30 min) (図 38)。なお、c-Srcの酵素活性を熱処理(95 $^{\circ}C$ 、30分)により消失させた熱変性c-Srcをプルキンエ細胞に導入しても、RP誘導に影響は無かった ($170 \pm 17 \%$, 30 min) (図 38)。これらの結果により、Srcチロシンリン酸化酵素の活性がRP誘導を負に調節することが明らかになった。

図 38. SrcによるRP誘導阻害

c-Srcタンパク質或いは熱変性させたc-Srcをプルキンエ細胞にパッチ電極から導入した条件下で、脱分極条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過。それぞれ n = 5



GABA_B受容体によるインテグリン α 3の増加

これまでに、インテグリンの活性が亢進するとプルキンエ細胞で脱分極による抑制性シナプス可塑性の誘導が抑制されることを示した。しかし、通常の条件下ではRPを誘導することが可能であることを考慮すると、インテグリンによるRP抑制は機能していないと推察される。私は、この通常は働かないインテグリンによる可塑性誘導阻止機構が、何らかの神経活動により機能するようになるのではないかと考えた。第一章および第二章で示したように、プルキンエ細胞脱分極時のGABA_B受容体活性化はRP誘導を抑制する (Kawaguchi and Hirano, 2000 and 2002)。したがって、インテグリン活性とGABA_B受容体活性は、RPが起らないようにするという点で同じ働きをしている。そこで、GABA_B受容体の活性化が何らかの形でインテグリンの働きを変化させるのではないかと考え、その可能性を検証した。

プルキンエ細胞に脱分極とGABA_B受容体活性化を起こすために、小脳培養細胞を50 μ Mのbaclofenを含む高濃度K⁺ (50 mM) 溶液で5分間処理して、その24時間後にウエスタンブロットティングを行ったところ、標準実験液で処理した対照に比べてインテグリン α 3サブユニットタンパク質の量が増加していることが分かった (147 \pm 12 %) (図 39)。尚、脱分極のみを起こすためSCH50911(10 μ M) を加えた高濃度K⁺溶液や、GABA_B受容体活性化だけを起こすbaclofenのみの処理では、インテグリン α 3サブユニットのタンパク質量は変化しなかった(そ

図 39. 脱分極とGABA_B受容体活性化処理によるインテグリン α 3サブユニットタンパク質の増加

小脳培養細胞をそれぞれの条件の溶液で5分間処理し、その24時間後にインテグリン α 3サブユニットのタンパク質量をWestern blottingにより調べた。calbindinを対照とした。

それぞれの処理条件は、

Con: 標準細胞外実験液

K: SCH50911を含む50 mM K⁺溶液

Bac: baclofen (50 μ M)

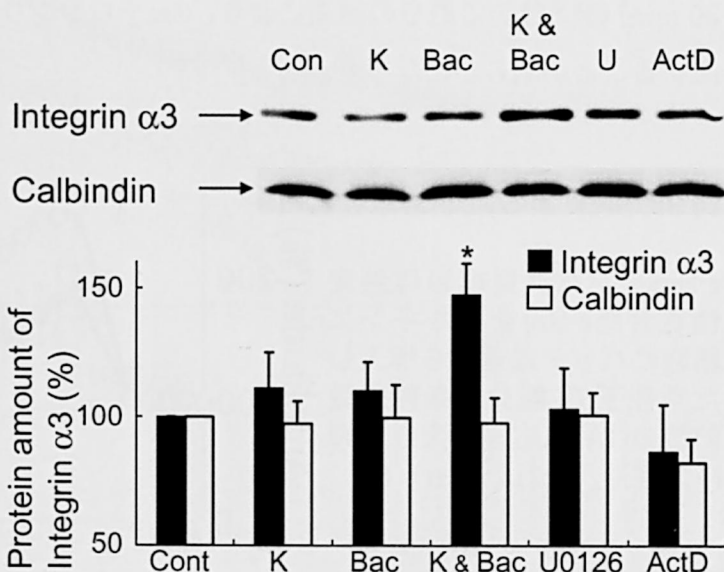
K & Bac: baclofenを含んだ50 mM K⁺溶液

U: MAPKカスケード阻害剤U0126と共に baclofenを含んだ50 mM K⁺溶液

ActD: K & Bac処理後五分間転写阻害剤actinomycin Dで5分間処理

各シグナルを定量化した結果 (n = 7)を下のグラフに示す。

*: p < 0.05, Duncan's test



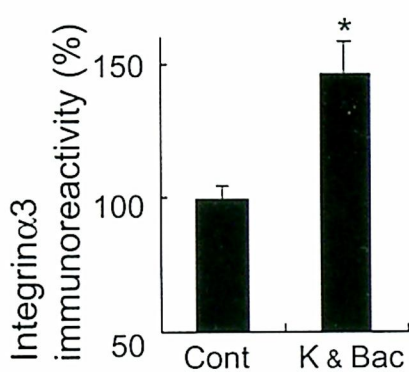
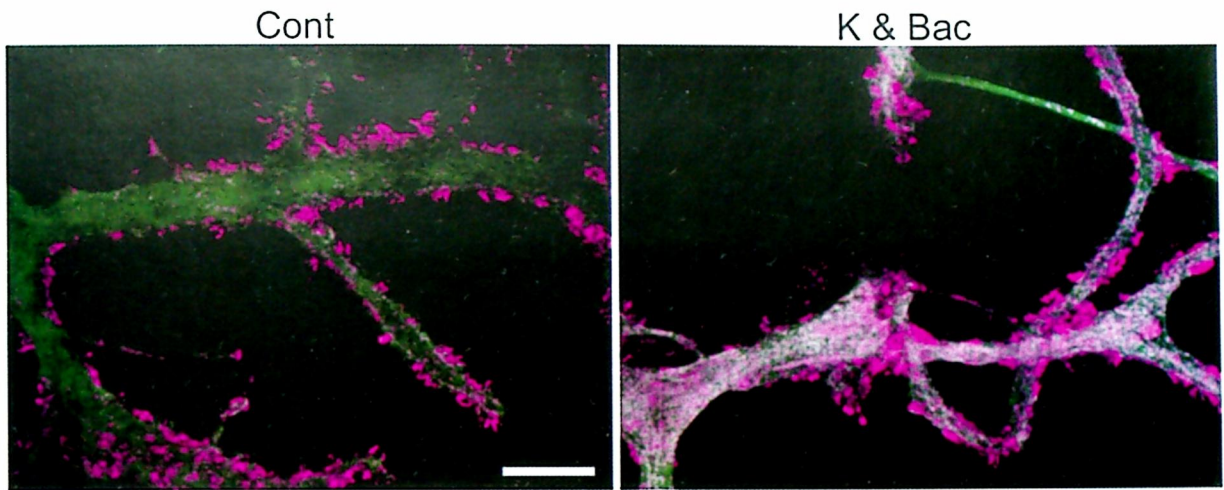


図 40. 脱分極とGABA_B受容体活性化処理によるインテグリン α 3サブユニットタンパク質の増加
 小脳培養細胞をbaclofenを含んだ50 mM K⁺溶液で処理し、その24時間後にインテグリン α 3サブユニット (マゼンダ)とcalbindin (緑)に対する抗体で染色した。
 スケールバーは10 μ m
 インテグリン α 3の蛍光シグナルを定量化した結果を下のグラフに示す。
 *: P < 0.01; students' t-test
 それぞれ、n = 16 cells

れぞれ111 \pm 14%、110 \pm 11%) (図 39)。さらに、免疫細胞化学的にプルキンエ細胞でのインテグリン α 3サブユニットを染色したところ、脱分極とGABA_B受容体活性化処理を行うことにより、インテグリン α 3サブユニットの蛍光シグナルが強くなることが分かった (146 \pm 12%) (図 40)。以上の結果から、プルキンエ細胞で脱分極とGABA_B受容体活性化が起こると、その24時間後にはインテグリン α 3サブユニットのタンパク質量が増加すると考えられる。

24時間以上にわたって引き起こされるタンパク質量の変化は、何らかの遺伝子が新規に発現することに依存していると期待される。そこで、baclofenと高濃度K⁺処理の直後5分間、mRNA転写阻害剤であるactinomycin D (20 μ M)で処理をしたところ、インテグリン α 3サブユニット増加は阻害された (86 \pm 18%) (図 39)。このことから、脱分極とGABA_B受容体活性化により新規mRNA合成に依存してインテグリン α 3サブユニットタンパク質量の増加が引き起こされたと考えられる。

神経細胞でmRNA転写に依存して長期可塑性が誘導される時に、MAPKカスケードが重要な役割を果たすことが報告されている (Curtis and Finkbeiner, 1999; Kandel, 2001; Sheng and Kim, 2002)。そこで、脱分極とGABA_B受容体活性化によりmRNA合成を介して起こるインテグリン α 3サブユニットタンパク質量の増加もMAPKカスケードに依存しているのではないかと考えた。baclofenと高濃度K⁺溶液処理時にU0126 (10 μ M)によりMAPKカスケード

を阻害すると、インテグリン $\alpha 3$ サブユニットのタンパク質量増加は阻害された ($103 \pm 16 \%$) (図 39)。したがって、脱分極とGABA_B受容体活性化によるインテグリン $\alpha 3$ サブユニットの増加は、MAPKカスケード活性に依存すると考えられる。

脱分極とGABA_B受容体活性化による長期RP誘導抑制

インテグリンのタンパク質量が増加すると、細胞での全体的なインテグリン活性が上昇することが推察される。もし、インテグリン活性が上昇するのであれば、プルキンエ細胞において脱分極によるRP誘導が抑制されるようになるかも知れない。そこで、脱分極とGABA_B受容体活性化によって引き起こされるインテグリン $\alpha 3$ サブユニット増加のRP誘導への影響を検討した。

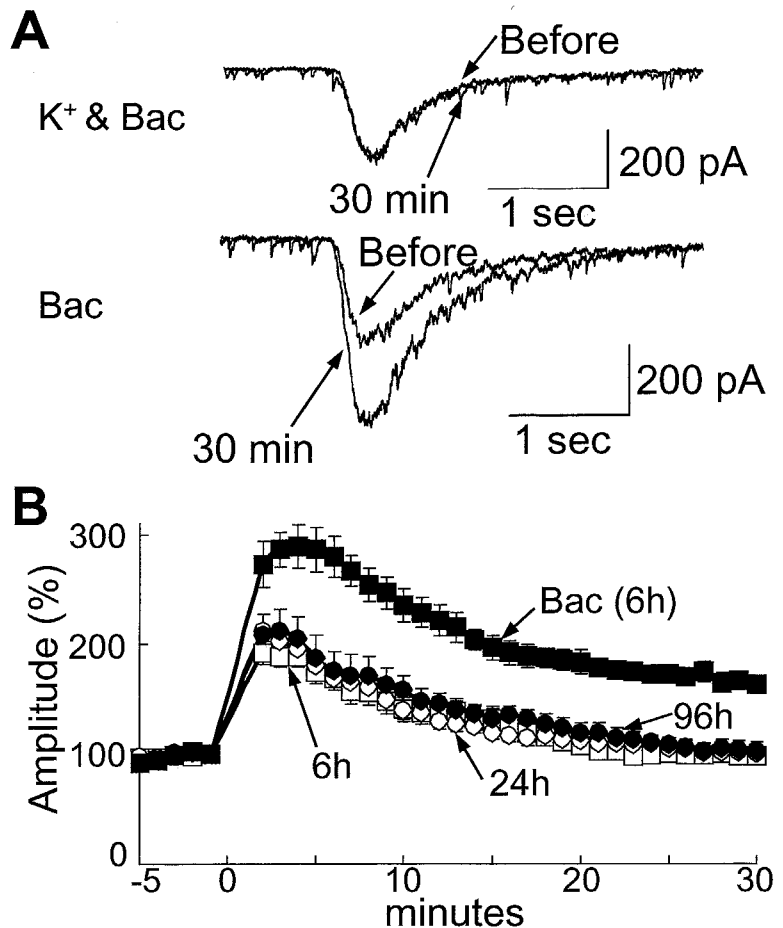
baclofenと高濃度K⁺溶液による条件処理の24時間後にプルキンエ細胞からホールセルパッチ記録を行い、電気泳動投与したGABAに対する応答を記録してRP誘導が起こるか否かを検討した。その結果、脱分極とGABA_B受容体活性化の条件処理から24時間経過したプルキンエ細胞に脱分極条件刺激を行っても、GABA_A受容体を介する応答のRPが抑えられてしまうことが分かった ($100 \pm 4 \%$, 30 min) (図 41)。つまり、GABA_B受容体によるRP誘導抑制

図 41. 脱分極とGABA_B受容体活性化による長期RP誘導抑制 (LSRP)

小脳培養細胞を baclofen を含んだ 50 mM K⁺ 溶液 (K⁺ & Bac) 或いは baclofen のみ (Bac) で処理し、その 24 時間後にプルキンエ細胞からホールセルパッチ記録を行った。

A, K⁺ & Bac 処理 24 時間後或いは Bac 処理 6 時間後のプルキンエ細胞から記録した GABA 応答を示す。それぞれ、脱分極条件刺激前と 30 分後のトレースを重ねた。

B, K⁺ & Bac 処理からそれぞれ示された時間後あるいは Bac 処理 6 時間後のプルキンエ細胞から記録した、脱分極条件刺激前後の GABA 応答の大きさの時間変化。



効果は即時的な作用だけでなく、持続して発揮されることが示唆された。このGABA_B受容体によるRP誘導抑制効果がいつまで持続するのかを調べたところ、baclofenと高濃度K⁺処理から6時間後および96時間後においても、脱分極条件刺激によりGABA_A受容体応答のRPを誘導することは出来なかった(それぞれ98±6%、103±8%、30 min)(図41 B)。なおインテグリンα3タンパク質の量に変化が認められなかったbaclofenのみの処理では、処理6時間後にRPが正常に誘導できた(164±5%、30 min)(図41)。これらの結果から、プルキンエ細胞で脱分極とGABA_B受容体活性化が起こり、インテグリンα3サブユニットが増加するような状況では、その後4日間以上にわたってプルキンエ細胞は脱分極依存性のRPを起こせなくなることが明らかになった。以後、この脱分極とGABA_B受容体活性化によってもたらされる長期にわたるRP誘導の抑制をLSRP(long-lasting suppression of RP)と呼ぶ。

LSRPへのインテグリンの関与

LSRPが本当にインテグリンの活性に依存して起こっているのかを検討するために、GRGDSPペプチドによりインテグリンとそのリガンドとの結合を阻害してRP誘導の可否を調べた。図42に示すように、baclofenと高濃度K⁺処理の6時間後、24時間後ともに、GRGDSPペプチド存在下では、RPの誘導が可能であった(それぞれ159±12%、161±12%、

図42. LSRPへのインテグリンとSrcの関与

baclofenと50 mM K⁺溶液処理から6時間(A)あるいは24時間(B)後に、GRGDSPインテグリン阻害ペプチドあるいはSrc阻害剤PP2存在下でプルキンエ細胞からホールセルパッチ記録を行った。脱分極条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過を示している。それぞれ、n=5

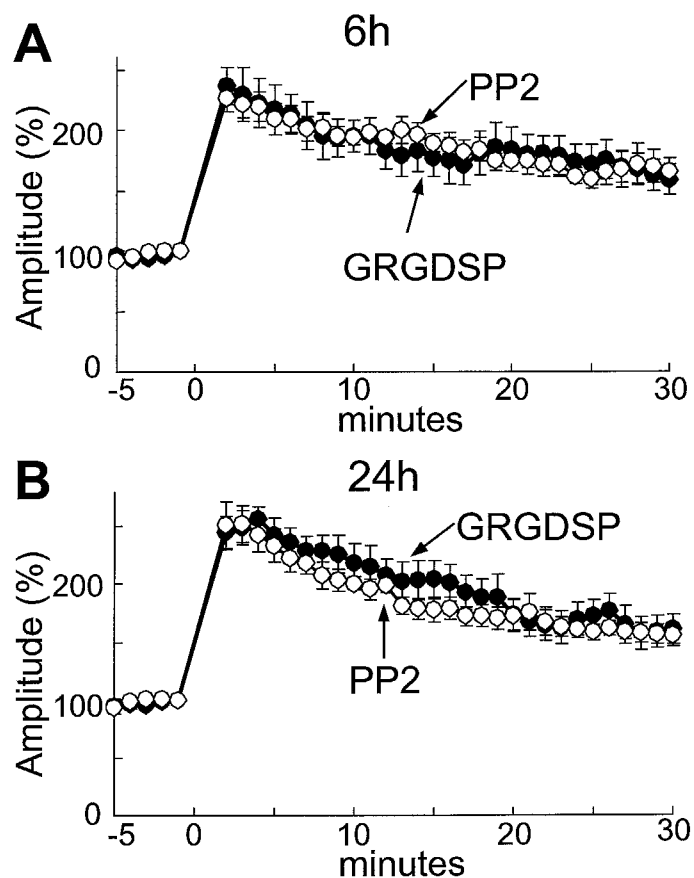
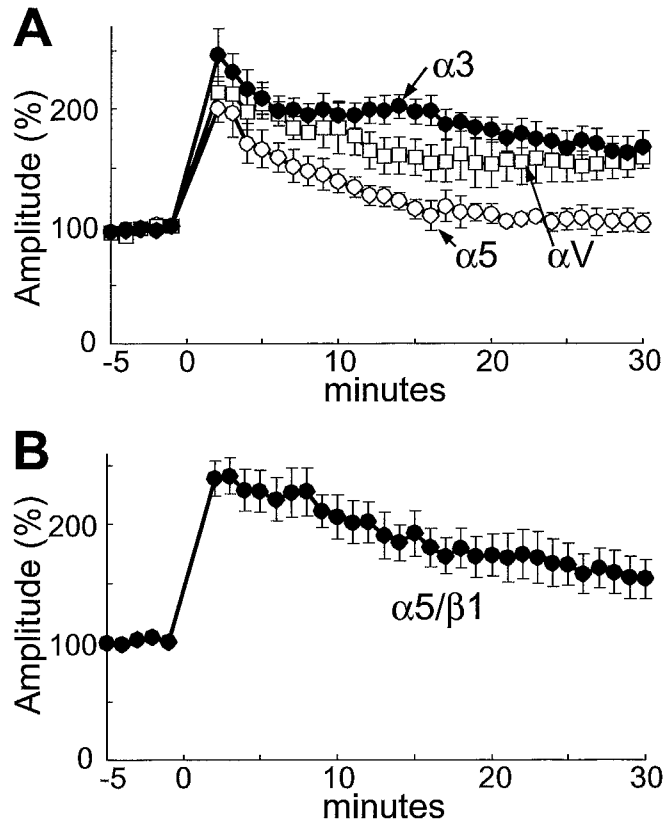


図 43. インテグリン機能阻害抗体によるLSRP阻害

baclofenと50 mM K⁺溶液処理の24時間後に、それぞれのインテグリン阻害抗体存在下でプルキンエ細胞からホールセルパッチ記録を行った。脱分極条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過を示している。

A, インテグリン $\alpha 3$, $\alpha 5$, αV に対する機能阻害抗体存在下で実験を行った。それぞれ、 $n = 5$

B, インテグリン $\alpha 5$ 或いは $\beta 1$ を含むインテグリンに対する機能阻害抗体を用いた。 $n = 5$



at 30 min)。この結果から、LSRPはインテグリン活性に依存していることが分かる。また、PP2によってSrc型チロシンキナーゼを阻害しても、同様にLSRPが消失した(6時間後: $166 \pm 10\%$, 24時間後: $156 \pm 9\%$, 30 min) (図 42)。したがって、脱分極とGABA_B受容体活性化が起こると、インテグリンおよびその下流分子であるSrcの活性により長期間RPを誘導することが不可能になったと示唆される。

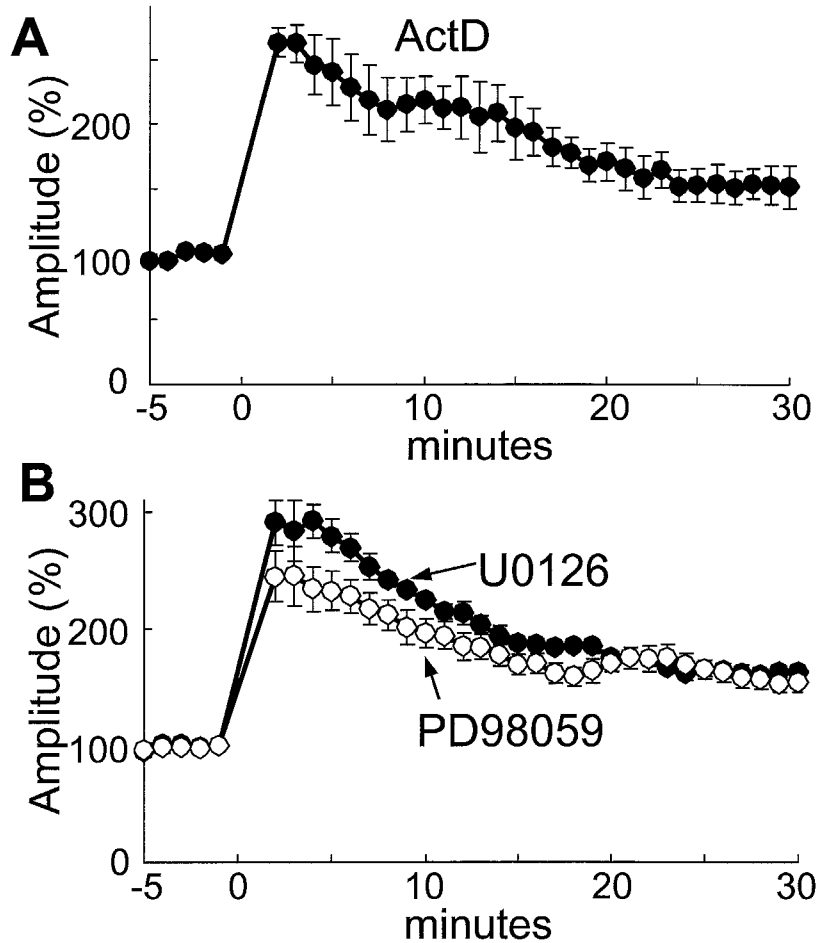
LSRPがインテグリン活性により担われることをさらに確かめる為に、インテグリンの機能阻害抗体を用いてRP誘導が回復するかを調べた。図 43に示すように、インテグリン $\alpha 3$ サブユニット特異的な機能阻害抗体によりRP誘導が回復したが ($167 \pm 14\%$, 30 min) (図 43A)、 $\alpha 5$ サブユニットに対する機能阻害抗体は効果が無かった ($102 \pm 8\%$, 30 min) (図 43A)。また、 $\alpha 5$ か $\beta 1$ のいずれかを含むインテグリンに対する機能阻害抗体によってもRP誘導が回復した ($153 \pm 16\%$, 30 min) (図 43B)。インテグリン αV に対する機能阻害抗体は、前述した5 mMの細胞外Ca²⁺によるRP誘導抑制には効果が無かったが、意外な事にLSRPに対しては効果が認められた ($158 \pm 9\%$, 30 min) (図 43A)。免疫染色では、インテグリン αV サブユニットの局在に変化は認められなかったが(データ示さず)、LSRPが誘起される際には αV サブユニットもRP誘導が起こらないように機能するのも知れない。以上の結果から、インテグリンの活性によりLSRPが起こっていると結論される。

最後に、LSRPがインテグリン $\alpha 3$ サブユニットの増加に依存して起こるかを確かめるため

図 44. LSRPへのインテグリンとSrcの関与

baclofenと50 mM K⁺溶液処理を行う際に、処理直後の転写阻害剤actinomycin D (A)処理か、或いはMAPKカスケード阻害剤であるU0126またはPD98059 (B) を処理時に投与した。

それぞれの処理から6時間後に、プルキンエ細胞からホールセルパッチ記録を行った。グラフはそれぞれ脱分極条件刺激前後のGABA応答の大きさの時間経過を示している。それぞれ、n = 5



に、その誘導条件が一致するかを検証することを目的として、新規のmRNA合成とMAPKカスケードに対する依存性を調べた。条件処理後5分間のactinomycin D処理により、その6時間後にはRP誘導が可能であった ($150 \pm 11\%$, 30 min) (図 44 A)。この結果から、LSRPは新規のmRNA合成に依存することが分かった。また、MAPKカスケード阻害剤であるU0126あるいはPD98059 (50 μ M) 存在下でbaclofenと高濃度K⁺処理を行った場合にも、その6時間後にはRPを誘導することができた (それぞれ $163 \pm 5\%$, $154 \pm 8\%$, 30 min) (図 44 B)。したがって、LSRPの誘起もMAPKカスケードに依存すると考えられる。これらの結果は、LSRPの誘導には新規のmRNA合成とMAPKカスケードが必要であり、その条件はインテグリン α 3タンパク質量の増加の条件と等しいことを示している。これら一連の実験から、プルキンエ細胞に脱分極とGABA_B受容体活性化が同時に起こると、おそらくMAPKカスケードを介して何らかのmRNAが新規に合成されてインテグリン α 3サブユニットが増加し、その結果インテグリン/Src経路の活性が亢進することにより、4日以上にわたる長期間RP誘導を抑制するLSRPが誘起されると考えられる。

考察

第三章では、細胞接着分子の変化を介した新たな神経活動依存性のシナプス可塑性調節機構について記載してきた。プルキンエ細胞で脱分極と同時にGABA_B受容体活性化が起こるとMAPKカスケードと新規mRNA合成に依存してLSRPが起る。LSRPは $\alpha 3$ サブユニットの増加に伴うインテグリン活性およびその下流のSrcチロシンリン酸化酵素の活性亢進により起る。総合すると、プルキンエ細胞において、脱分極とGABA_B受容体活性化が同時に起こると、MAPKカスケードに依存した転写を介してインテグリンの活性が上昇し、その結果インテグリンがSrc型チロシンキナーゼを介してシナプス可塑性の誘導を抑制することで数日間シナプス伝達を安定化させると考えられる(図45)。

インテグリンによるシナプス可塑性の抑制

インテグリンは中枢神経系において、発生中のニューロンの移動や分化に様々な形に関わる(Milner and Campbell, 2002)。この数年でインテグリンがシナプスの成熟やシナプス伝達の制御にも関与するということが明らかになってきている(Benson et al., 2000; Chavis and Westbrook, 2001; Grotewiel et al., 1998; Kramer et al., 2002 and 2003; Milner and Campbell, 2002; Rohrbough et al., 2000)。スパインなどのシナプス前終末やシナプス後部位は構造的に動的であり、その形態はLTPを誘導するような神経活動により変化するようである(Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Nikonenko et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002)。シナプス構造の構築と維持に細胞接着分子は不可欠と考えられ

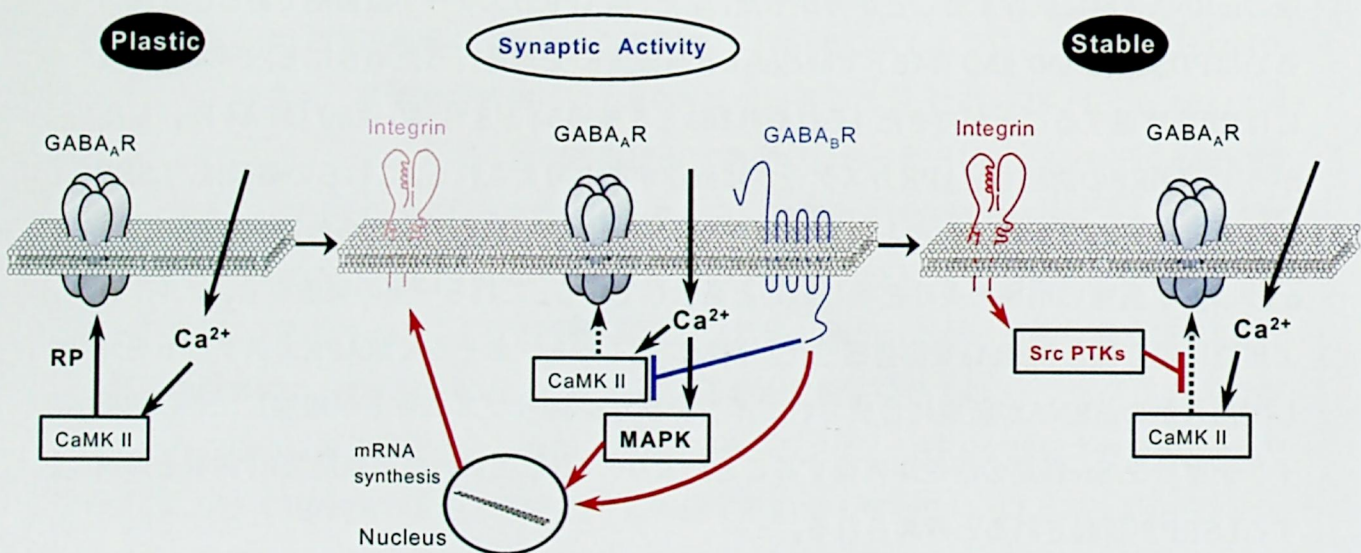


図 45. 脱分極とGABA_B受容体活性化によるLSRP誘導のモデル図

るが、神経活動により誘起されるシナプス再構築時にどのように細胞接着分子がはたらくのかは良く分かっていない。海馬CA1領野におけるグルタミン酸性シナプスのLTPが安定して持続するのに、インテグリンの活性が必要であることが報告されている (Kramer et al., 2002)。ショウジョウバエにおいては、インテグリンが短期シナプス可塑性と臭い記憶に必要である (Grotewiel et al., 1998)。しかしながら、神経細胞においてインテグリン活性がどのように調節され、またインテグリンがシナプス可塑性の調節にどのような役割を果たすのかということは謎であった。

カドヘリン、L1やNCAM等、インテグリン以外の細胞接着分子がLTP誘導に関与するということが明らかにされてきた (Benson et al., 2000 参照)。多くの場合、細胞接着分子の活性は可塑性誘導に寄与する。これまでに報告された唯一の例外は、カドヘリン11のノックアウトマウスにおいて海馬CA1領野でのLTPの程度が強まっているという報告である (Manabe et al., 2000)。本研究で示したプルキンエ細胞におけるインテグリン $\alpha3/\beta1$ によるRP誘導抑制は、細胞接着分子が可塑性誘導を負に調節するという新たな例になる。

インテグリンに結合する主要なリガンドは、細胞外マトリックスを形成するタンパク質であると考えられてきたが、それ以外のタンパク質もインテグリンのリガンドになり得ることが分かっている。例えば、免疫グロブリンスーパーファミリー分子やカドヘリンがインテグリンリガンドとなることもある (Benson et al., 2000 参照)。したがって、プルキンエ細胞に形成されたGABA性シナプス前終末の細胞膜上に発現している何らかの接着分子が、プルキンエ細胞の $\alpha3/\beta1$ 異型二量体の結合相手なのかもしれない。

第三章では、Src型チロシンキナーゼがインテグリンによるRP誘導抑制を担うことを示した。Srcチロシンキナーゼはシナプス可塑性に重要な役割を果たすことが報告されている。海馬のLTPの場合は、Srcによるリン酸化によりNMDA受容体を介する Ca^{2+} 流入が増大し、その結果LTPが誘導されやすくなる (Huang et al., 2001; Lu et al., 1998; Sheng and Kim, 2002)。プルキンエ細胞でRP誘導を抑制するときのSrcによるリン酸化の標的分子は不明である。第二章で示したように、GABA_B受容体活性化はセリン/スレオニン脱リン酸化酵素PP-1を介してCaMKII活性を抑えることによりRP誘導を抑制するが (Kawaguchi and Hirano, 2002)、インテグリン活性によるRP誘導抑制はPP-1を阻害しても消失しなかった (データ示さず)。このことから、SrcはGABA_B受容体がRP誘導を抑制するのとは異なる分子経路によりRP誘導を抑制することが示唆される。SrcがGABA_A受容体そのものをリン酸化することも報告されている (Boxall, 2000; Brandon et al., 2001; Wan et al., 1997)。Srcによる直接的なチロシンリン酸化によって、GABA_A受容体がRP誘導の際に必要なとされる変化を受けられなくなるのかもしれない。

神経活動に依存したインテグリン分子の増加

癲癇発作によりインテグリン β 1サブユニットのmRNA量が脳内で増加することが報告されており、神経活動によりインテグリンの機能が増強することがあるようだ (Pinkstaff et al., 1998)。N-カドヘリン活性は海馬LTP後期相の確立に必要であり、また後期相LTPの誘導はN-カドヘリンのタンパク質量増加を伴うことも報告されている (Bozdazi et al., 2000)。第三章において、脱分極とGABA_B受容体活性化がプルキンエ細胞に起こると、インテグリン α 3サブユニットが増加することを示した。この場合、脱分極のみやGABA_B受容体活性化のみではインテグリン α 3のタンパク質量が増加しなかったことから、特定のパターンの神経活動のみが細胞接着分子の量を変化させ得るものと考えられる。

インテグリン α 3の増加は、新規mRNA合成とMAPKカスケードに依存していた。MAPKカスケードは長期シナプス可塑性誘導時の転写制御に関わっていることが多いことを考慮すると (Curtis and Finkbeiner, 1999; Sheng and Kim, 2002)、MAPKカスケードが何らかの遺伝子の新規mRNA転写を促して、インテグリン α 3サブユニットタンパク質量の増加をもたらされるのかも知れない。しかし、どのようにしてインテグリン α 3サブユニットが増加するかは明らかではない。RT-PCRを行ったところ、baclofenと高濃度K⁺溶液処理の前後でインテグリン α 3サブユニットのmRNA量に変化は認められなかった。したがって、インテグリン α 3は転写後調節によりそのタンパク質量が増加したものと考えられる。何か別の遺伝子のmRNAが合成され、その分子がインテグリン α 3サブユニットタンパク質の合成やシナプスへの局在化、或いは分解を調節することで、インテグリン α 3の増加が引き起こされたのかも知れない。

シナプスの可塑性と安定性

神経活動に依存して誘導されるシナプス可塑性は、学習・記憶の基礎的過程であると考えられてきた (Bailey et al., 2000; Hansel et al., 2001; Kandel, 2001; Lisman et al., 2002; Silva, 2003)。海馬におけるNMDA型グルタミン酸受容体がより多く発現するように遺伝子操作を施されたマウスにおいては、LTPの程度が強くなっており、また空間学習能力が向上したという報告がなされている (Tang et al., 1999)。シナプス可塑性の程度が増進すると学習能力が向上するというこの結果は、シナプス可塑性が学習・記憶の基盤であるという考えを支持するものである。ところが近年、必ずしもシナプス可塑性の程度が大きくなれば記憶や学習能力が高まるわけではないことを示唆する知見が報告されている。アクチン骨格の動態を制御するリン酸化酵素であるLIMK-1やシナプス後肥厚部を構成するPSD-95のノック

アウトマウスでは、LTPが起こり易くその程度も強まっているにも拘らず、その学習能力には異常が認められることが報告されている (Komiyama et al., 2002; Meng et al., 2002)。これらの結果から、学習・記憶能力にはシナプス可塑性の程度の強弱よりも、その誘導制御が正確に行われることが重要なのではないかと考えられる。

生体内において神経細胞が往々にしてかなり高い定常的活動を呈していることを考慮すると、不必要な可塑的变化が起こらないようにシナプス可塑性の誘導と維持を適切に制御することが重要なのではなからうか。シナプス可塑性が適切に調節されず安易に誘導されてしまうと、それまでの経験に依存して形成されてきた情報処理機構は崩壊してしまうと推測される。つまり、シナプス伝達は状況に応じて安定に保たれることが求められるのではなからうか。しかしながら、シナプスの可塑性と安定性が神経回路内でどのように調和を保っているのかはほとんど分かっていない。形態的にシナプス構造はかなり変化し得るという報告がある一方 (Engert and Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Nikonenko et al., 2002; Trachtenberg et al., 2002)、大脳皮質や嗅球のニューロンではスパインを含む樹状突起構造がかなり安定であることも報告されている (Grutzendler et al., 2002; Mizrahi and Katz, 2003)。これらの研究報告は一見矛盾しているようにも思えるが、新しい記憶や行動様式を獲得するために情報処理を変化させる必要があるときにのみ、限定的にシナプス構造が変化することを示唆しているのではなからうか。アフリカツメガエルのオタマジャクシの視蓋では、神経活動に依存したシナプス可塑性は、その可塑性を誘導した神経活動に引き続いて類似したパターンの入力を与えられたときにのみ安定化し、そうでない場合はニューロンの定常的活動により可塑性が打ち消されてしまうことが示された (Zhou et al., 2003)。この場合、継続した一連の感覚入力が続いた場合にのみ、シナプスの変化が維持されるのである。第三章で示してきたように、プルキンエ細胞では脱分極と同時にGABA_B受容体が活性化すると、インテグリン/Src経路が亢進されることにより数日間以上GABA_A受容体応答の可塑性が起こらなくなってしまう。この機構はある特定の神経活動を経験するとその後長期にわたり可塑的变化を制限することにより、シナプスの可塑性と安定性の調和を図ることに寄与しているのであろう。このような制御機構が脊椎動物の中枢神経系において、安定性と一貫性を伴った情報処理に寄与するのではないかと推測される。

方法と材料

小脳培養

第一章・第二章の研究に用いた小脳の初代分散培養は、ほぼ Hirano and Kasono (1993) に従った。簡単に記すと、胎生 20 日或いは生後 1 日のラットから取り出した小脳から脳膜を取り除いて、0.1%トリプシン及び 0.05%DNase を含む Hank's Balanced Salt Solution で、37°Cにおいて 15 分間処理した。その後、小脳をパスツールピペットにより分散させ、basal medium eagle (Sigma)を主とした無血清培地で 4~6 週間培養した。培養液は 3~4 日に一度、半量を新しいものに交換した。第三章の研究では、小脳分散培養がより早く成熟するように、細胞分散時にのみ DMEM/F12 を基にした 2% ウシ胎児血清を含む培養液を用いた (Furuya et al., 1998)。培養翌日に、培養液の 3/4 を新鮮な無血清の basal medium eagle を基にした培養液に交換した。なお、グリア細胞の増殖を抑えるために AraC (4 μ M)を培養一週間後より投与した。

電気生理学

第一章・第二章では培養後 4~6 週、第三章では培養後 3~4 週の小脳細胞から、特に記述しない限り(mM で)145 NaCl, 5 KOH, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 Hepes, and 10 glucose (pH 7.3) からなる標準細胞外溶液中、室温(20~24 °C)で電気生理学的記録を行った。細胞外液には、グルタミン酸性のシナプス伝達を抑えるために常時 10 μ M の CNQX を加えた。それぞれの小脳神経細胞は Hirano and Kasono (1993)に従って各々の形態で同定した。プルキンエ細胞からホールセル記録に用いたパッチピペットは、(mM で) 150 CsCl, 15 CsOH, 0.5 Ethylene glycol bis (β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 Hepes, 2 Mg-ATP (Sigma), 0.2 Na-GTP (Sigma) からなる細胞内液 (pH 7.3)で満たした。Mg-ATP と Na-GTP は GABA_A 受容体を介する応答の経時的減弱を最小化させるために用いた。パッチ電極として抵抗が 2.5~5 M Ω のものを用いた。抑制性介在ニューロンとの同時記録実験においては、5~6 M Ω の抵抗を持つパッチピペットに KCl 147, EGTA 5, Hepes 10, KOH 15 (mM)を含む細胞内液(pH 7.3)を使用した。プルキンエ細胞の膜電位は、特に指定しない限り-70 mV で固定した。なお、液間電位の差(junction potential)は補正した。この-70 mV の固定電位と 150 mM の Cl⁻ を含む細胞内液により、抑制性シナプス後電流及び GABA_A

受容体応答は内向き電流として記録された。誘発シナプス後電流 (IPSC)は、特に指定しない限り 0.15 Hz で記録した。入力抵抗が 100 M Ω 以上でかつ直列抵抗が 30 M Ω 以下に制御することができた記録のみを実験結果として解析に用いた。直列抵抗と入力抵抗は 2~5 分ごとに計測し、元のレベルから 20 %以内の変化しか示さなかった記録のみを解析した。

GABA、或いは muscimol (Research Biochemicals International)の電気泳動投与は、Linden et al., (1991)と Hirano et al.,(1994)を模倣して行なった。10 mM Hepes と、10 mM の GABA 或いは 300 μ M の muscimol を含むガラスピペットを、近位或いは二次樹状突起付近に配置し、20 msec の正電流パルスを与えることにより電気泳動投与を行なった。プルキンエ細胞の脱分極条件刺激としては、500 msec、0 mV の脱分極を 0.5 Hz で 5 回行なう、という操作を用いた。プルキンエ細胞脱分極と組み合わせたシナプス前細胞の条件刺激は、プルキンエ細胞に対する 500msec の脱分極パルスの間 20 Hz で行なった。脱分極と組み合わせた GABA 或いは muscimol の電気泳動投与は、5 回行われる 500 msec の脱分極パルス各々において、その開始から 100 msec 後に行なった。組み合わせでない単独の脱分極の際には、シナプス前細胞刺激や GABA_A 受容体作用薬の投与は行なかった。2 箇所樹状突起から GABA 応答を記録する実験においては、プルキンエ細胞の樹状突起の互いに 100 μ m 以上離れた 2 箇所に 2 本のガラスピペットを配置し、30 秒ごとに交互に GABA を投与した (Kasono and Hirano, 1994)。条件刺激脱分極中には、一方にのみ組み合わせ GABA 投与を行ない、もう一方の部位では投与しなかった。mIPSC、GABA 或いは muscimol 応答を記録する実験においては、活動電位の発生を抑えるために 1 μ M TTX (Wako, Japan)を細胞外液に加えた。CNQX, TTX, baclofen (Tocris), SCH50911 (Tocris), NEM (Sigma), forskolin (Tocris), KT5720 (Calbiochem), H89 (Calbiochem), okadaic acid(Tocris), nodularin (Calbiochem), KN62 (Calbiochem), GRGDSP ペプチド (Calbiochem), GRADSP ペプチド (Calbiochem), PP2 (Calbiochem), PP3 (Calbiochem)らの薬剤やインテグリン機能阻害抗体 (Chemicon)は細胞外液に加えて使用した。FK506 (Calbiochem)はパッチピペットよりプルキンエ細胞内に投与した。Sp-cAMPS-AM (Biolog) は 30 分間神経細胞に負荷し、その後記録開始の前に洗浄した。細胞外液に Sp-cAMPS-AM が存在すると、GABA 応答や IPSC が抑えられたからである。この効果は、Sp-cAMPS-AM に

より GABA_A 受容体が外側から塞がれるためであろうと考えられており、これは他のほとんどの cAMP アナログに共通して見られる特徴である(Lambert and Harrison, 1990)。PTX (List Biological Laboratories) 処理は一晩行なった。GDP- β S (Sigma) を使用する際には、細胞内液の GTP と交換して使用した。DARPP-32 の N 末ペプチド、及びその対照ペプチドはクラボウに合成を委託し、HPLC により純度 92 %以上に精製されたものを 2 μ M の濃度でパッチピペットよりプルキンエ細胞内に投与した。

Ca²⁺ イメージング

プルキンエ細胞内 Ca²⁺濃度は、倒立顕微鏡(Olympus IX70, Japan)あるいは正立顕微鏡 (Olympus BX50WI, Japan)に設置した Ca²⁺ イメージング装置(ARGUS/Hisca あるいは Aquacosmos, Hamamatsu Photonics, Japan)により、蛍光色素 fura-2 (Calbiochem)を用いて計測した(Konnerth et al., 1992)。fura-2 (200 μ M) はパッチピペットを介してプルキンエ細胞内に負荷した。プルキンエ細胞を波長 340 nm と 380 nm の励起光で交互に 250 msec 間励起し、それぞれの蛍光画像を 1 Hz で記録した。記録終了後に、蛍光比(340 nm 励起した時の蛍光強度を 380 nm 励起したときのそれで割った値)を計算した。baclofen (20 μ M)、或いは低 Ca²⁺ (1 mM)外液は灌流によって投与した。液交換後における脱分極中の蛍光比の最大値を、液交換前のそれと比較することにより液交換の影響を定量した。液交換を行わない対照実験においては、最初の記録とその 5 分後(液交換をする場合に必要な時間)を比較した。低 Ca²⁺溶液は、細胞外液中の 1 mM の Ca²⁺を Mg²⁺に置き換えて作成した。

免疫細胞染色

Current Protocols In Molecular Biology に従った。一次抗体として、抗 calbindin マウスモノクローナル抗体 (Sigma 或いは Swant), 抗 calbindin ラビットポリクローナル抗体 (Chemicon), 抗 DARPP-32 ラビットポリクローナル抗体 (Chemicon), 抗 Active CaMKII ラビットポリクローナル抗体 (Promega)、抗 GABA_A 受容体 α 1 サブユニットラビット抗体 (alomone labs)、抗 GABA_B 受容体 1 型モルモット抗体 (Chemicon)、抗インテグリン α 3, α 5, α V ラビットポリクローナル抗体 (Chemicon), 抗シナプトフィジンマウスモノクローナル抗体 (Progen)を用いた。二次抗体として

Alexa488 抱合抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probe)、Alexa488 抱合抗モルモット IgG 抗体 (Molecular Probe)、Alexa568 抱合抗ラビット IgG 抗体 (Molecular Probe)を用いた。免疫染色を行なった試料を共焦点レーザー顕微鏡(横川電気, CSU 10)を用いて観察、画像取込を行なった。活性化型 CaMKII の定量化を行なう際は、calbindin 陽性の領域をプルキンエ細胞の領域であると考え、領域内の全蛍光強度の合計を領域の面積で割った値、つまり、プルキンエ細胞内の単位面積当たりの平均蛍光強度をシグナルの大ききとした。この画像処理は、IP ラボソフトウェア(ソリューションシステムズ)を用いて行なった。

ウエスタンブロッティング

Current Protocols In Molecular Biology に従った。DARPP-32 のタンパク質量を調べる実験では、小脳培養細胞に沸騰した 1 % SDS 溶液を投与し 5 分間超音波処理を施して、タンパク質を可溶化させた。その後さらに等量の 2×Sample buffer を加えて作成した試料のタンパク質のうち 70 µg を SDS-page により展開しニトロセルロースメンブレンに転写した。インテグリン α 3 サブユニットのタンパク質の量を比較する実験では、それぞれの条件処理から 24 時間後に小脳培養細胞のタンパク質を RIPA バッファーに可溶化し、2×Sample buffer を等量投与した。一次抗体として、抗 DARPP-32 ラビットポリクローナル抗体(Chemicon)或いは、抗インテグリン α 3 マウスモノクローナル抗体 (Transduction Lab)を用い、二次抗体に HRP 抱合抗ラビット抗体ポリクローナル抗体(Chemicon)或いは HRP 抱合抗マウス抗体ポリクローナル抗体(Chemicon)を用いた。シグナルは ECL 発色キットを用いて Kodak X-OMAT で検出し、Scion Image ソフトウェアにより解析を行った。

アンチセンスオリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドは、アマシャムファルマシアに依頼合成した。アンチセンス配列は、ラット DARPP-32mRNA (Ehrich et al., 1990 に報告された cDNA 配列より) の 48 番目から 67 番目までの配列に対して相補的な配列である 5'-GGGGGTCGAGCTGGCTCGGG-3' を用いた。ミスセンスオリゴヌクレオチドは、アンチセンスの配列を無作為に並べ替えた 5'-AGGGGGGGGGCTCGGCGCTT-3' とい

う配列を用いた。両オリゴヌクレオチドにおいて、細胞内の DNase による分解を最小化する目的で、両端 3 塩基の結合は S 結合にした。

LSRP 誘導の培養細胞処理

小脳分散培養細胞に脱分極と GABA_B 受容体活性化を起こすために、baclofen を含む高濃度 K⁺溶液処理を行った。処理後、標準実験液で二回洗浄して元の培養液に戻した。MAPK カスケードを阻害する際には、処理液に U0126 (10 μM, Promega)、PD98059 (20 μM, New England Biolabs)を加えた。転写を阻害する際には、処理後すぐに五分間 actinomycin D (20 μM, Sigma)で処理した。

謝辞

学部卒業研究生の頃から大学院終了までの六年間、絶えず熱心にご指導いただくとともに、私を信頼して下さり気の向くままに思いつくことを試せる自由な研究機会を提供し続けてくださった平野丈夫教授に心より感謝申し上げます。授けていただいたことを、今後の飛躍に繋げたいと思います。

私の空想に基づいた研究計画をいつも支持して励ましてくださり、研究者として生きる範を示して下さった見学美根子講師に深く感謝申し上げますとともに、認めて頂いたことに恥じない仕事をこれから成し遂げていきたいと思っています。

鈴木由利子さんと板橋彩さんには、研究室の秘書としていつも事務的な手続きを行っていただきました。有難うございました。

生まれたばかりの若い平野研究室に所属し、自ら率先して研究環境を整えより良い状態に改善していこうという志ある人たちが多く集う中で研究生活を始めることが出来たことは、私にとって非常に大きな糧となったと思います。研究室設立時の研究室メンバーの方々に感謝の意を表したいと思います。

大学院生になった後、毎年新しく研究室に入ってきた後輩諸君の素晴らしい発想や涙ぐましいまでの努力に驚きをもって刺激されることは、一度や二度ではありませんでした。この場を借りて有難うと申し上げるとともに、彼らがそれぞれの分野で活躍されることを祈ります。

博士後期課程に進学するにあたり日本学術振興会の特別研究員に採用された結果、研究に専心することが出来ました。この特別研究員制度を支える日本国民へ感謝するとともに、これまでに頂いた援助が少しでも報われるように今後も科学研究に邁進する所存です。

私が研究者として生きるかを迷っている時に、兄・良仁が“やれよ”と無責任にも背中を押してくれて気持ちが吹っ切れました。そして延子姉さんと姪の萌寧が元気を与えてくれました。ありがとう。

私の研究者としての行き方を理解しようと努め、傍で支えてくれている妻・奈緒に対する感謝の気持ちを今後も生涯忘れずにいたいと思います。

そして、二十八年間ずっと好き放題にすることを認め、助け、時に励ましながら、心配を隠して黙って見守りつづけてくれた父・雅良と母・千歳に最大限の謝意をこの場を借りて伝えたいと思います。

参考文献

- Aiba, A., Kano, M., Chen, C., Stanton, M.E., Fox, G.D., Herrup, K., Zwingman, T.A. and Tonegawa, S. (1994). Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell* *7*, 377-388.
- Aizenman, C.D., Manis, P.B. and Linden, D.J. (1998). Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* *21*, 827-835.
- Allen, P. B, Hvalby, O., Jensen, V., Errington, M. L., Ramsay, M., Chaudhry, F. A., Bliss, T. V., Storm- Mathisen, J., Morris, R. G., Andersen, P., Greengard, P. (2000) Protein phosphatase-1 regulation in the induction of long-term potentiation: heterogeneous molecular mechanisms. *J Neurosci* *20*: 3537-3543.
- Bailey, C. H., Giustetto, M., Huang, Y. Y., Hawkins, R. D. and Kandel, E. R. (2000). Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* *1*, 11-20.
- Batchelor, A. M. and Garthwaite, J. (1992). GABA_B receptors in the parallel fibre pathway of rat cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* *4*, 1059-1064.
- Beckingham, K., Lu, A. Q. and Andruss, B. F. (1998). Calcium-binding proteins and development. *Biometals* *11*, 359-373.
- Benson, D. L., Schnapp, L. M., Shapiro, L. and Huntley, G. W. (2000). Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell. Biol.* *10*, 473-482.
- Bibb, J. A., Snyder, G. L., Nishi, A., Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, A. A., Tsai, L. H., Kwon, Y. T., Girault, J. A., Czernik, A. J., Huganir, R. L., Hemmings, H. C. Jr, Nairn, A. C., Greengard, P. (1999). Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5

- modulates dopamine signalling in neurons. *Nature* *402*, 669-671.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31-39.
- Blitzer, R. D., Wong, T., Nouranifar, R., Iyengar, R., Landau, E. M. (1995) Postsynaptic cAMP pathway gates early LTP in hippocampal CA1 region. *Neuron* *15*: 1403-1414.
- Blitzer, R. D., Connor, J. H., Brown, G. P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., Landau, E. M. (1998) Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* *280*: 1940-1942.
- Boxall, A. R. (2000). GABAergic mIPSCs in rat cerebellar Purkinje cells are modulated by TrkB and mGluR1-mediated stimulation of Src. *J. Physiol.* *524*, 677-684.
- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L. and Huntley, G. W. (2000). Increasing numbers of synaptic puncta during late phase LTP: N-Cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron* *28*, 245-359.
- Brandon, N. J., Delmas, P., Hill, J., Smart, T. G. and Moss, S. J. (2001). Constitutive tyrosine phosphorylation of the GABA_A receptor γ 2 subunit in rat brain. *Neuropharmacology* *41*, 745-752.
- Braun, A. P., Schulman, H. (1995) The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu Rev Physiol* *57*: 417-445.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A. A., Greengard, P. (2000) Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 k Da controls both striatal long-term depression

- and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J Neurosci* 20: 8443-8451.
- Chavis, P. and Westbrook, G. (2001). Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411, 317-321.
- Conquet, F., Bashir, Z. I., Davies, C. H., Daniel, H., Ferraguti, F., Bordi, F., Franz-Bacon, K., Reggiani, A., Matarese, V., Conde, F. (1994) Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature* 372: 237-243.
- Cooper, D. M., Mons, N., Karpen, J. W. (1995) Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374: 421-424.
- Curtis, J. and Finkbeiner, S. (1999). Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth. *J. Neurosci. Res.* 58, 88-95.
- Daniel, H., Levenes, C. and Crepel, F. (1998). Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends. Neurosci.* 21, 401-407.
- Davies, C. H., Starkey, S. J., Pozza, M. F. and Collingridge, G. L. (1991). GABA_B autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349, 609-611.
- De Zeeuw, C. I., Hansel, C., Bian, F., Koekkoek, S. K., van, Alphen, A. M., Linden, D. J. and Oberdick, J. (1998). Expression of a protein kinase C inhibitor in Purkinje cells blocks cerebellar LTD and adaptation of the vestibulo-ocular reflex. *Neuron* 20, 495-508.
- Dutar, P. and Nicoll, R. A. (1988). Pre- and postsynaptic GABA_B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron* 1, 585-591.

- Ehrlich, M. E., Kurihara, T., Greengard, P. (1990) Rat DARPP-32: cloning, sequencing, and characterization of the cDNA. *J Mol Neurosci* 2: 1-10.
- Engert, F. and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66-70.
- Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E., Muller, D. (1993) Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 268: 7863-7867.
- Furuya, S., Makino, A. and Hirabayashi, Y. (1998). An improved method for culturing cerebellar Purkinje cells with differentiated dendrites under a mixed monolayer setting. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 3, 192-198.
- Giese, K. P., Fedorov, N. B., Filipkowski, R. K., Silva, A. J. (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279: 870-873.
- Greengard, P., Allen, P. B., Nairn, A. C. (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23: 435-447.
- Grotewiel, M. S., Beck, C. D., Wu, K. H., Zhu, X. R. and Davis, R. L. (1998). Integrin-mediated short-term memory in *Drosophila*. *Nature* 391, 455-460.
- Grutzendler, J., Kasthuri, N. and Gan, W. B. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature* 420, 812-816.
- Guan, J. L. (1997). Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 29, 1085-1096.
- Hansel, C., Linden, D. J. and D'Angelo, E. (2001). Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat. Neurosci.* 4, 467-475.

- Hashimoto, T., Ishii, T., Ohmori, H. (1996) Release of Ca^{2+} is the crucial step for the potentiation of IPSCs in the cultured cerebellar Purkinje cells of the rat. *J Physiol (Lond)* 497: 611-627.
- Hayashi, Y., Shi, S. H., Esteban, J. A., Piccini, A., Poncer, J. C., Malinow, R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287: 2262-2267.
- Hemmings, H. C. Jr, Greengard, P., Tung, H. Y., Cohen, P. (1984) DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 310: 503-505.
- Hirano, T. and Kasono, K. (1993). Spatial distribution of excitatory and inhibitory synapses on a Purkinje cell in a rat cerebellar culture. *J. Neurophysiol.* 70, 1316-1325.
- Hirano, T., Kasono, K., Araki, K., Shinozuka, K. and Mishina, M. (1994). Involvement of the glutamate receptor delta 2 subunit in the long-term depression of glutamate responsiveness in cultured rat Purkinje cells. *Neurosci. Lett.* 182, 172-176.
- Huang, Y. Q., Lu, W. Y., Ali, D. W., Pelkey, K. A., Pitcher, G. M., Lu, Y. M., Aoto, H., Roder, J. C., Sasaki, T., Salter, M. W. and MacDonald, J. F. (2001). $\text{CAK}\beta$ /Pyk2 kinase is a signaling link for induction of long-term potentiation in CA1 hippocampus. *Neuron* 29, 485-496.
- Ingebritsen, T. S., Cohen, P. (1983). Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-338.
- Ito, M. (1989). Long-term depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 12, 85-102.
- Ito, M. (2001) Cerebellar long-term depression: characterization, signal

- transduction, and functional roles. *Physiol Rev* 81: 1143-1195.
- Ivins, J. K., Yurchenco, P. D. and Lander, A. D. (2000). Regulation of neurite outgrowth by integrin activation. *J. Neurosci.* 20, 6551-6560.
- Jaeger, D. and Bower, J.M. (1999). Synaptic control of spiking in cerebellar Purkinje cells: dynamic current clamp based on model conductances. *J. Neurosci.* 19, 6090-6101.
- Jarolimek, W. and Misgeld, U. (1997). GABA_B receptor-mediated inhibition of tetrodotoxin-resistant GABA release in rodent hippocampal CA1 pyramidal cells. *J. Neurosci.* 17, 1025-1032.
- Jones, K.A., Borowsky, B., Tamm, J.A., Craig, D.A., Durkin, M.M., Dai, M., Yao, W.J., Johnson, M., Gunwaldsen, C., Huang, L.Y., Tang, C., Shen, Q., Salon, J.A., Morse, K., Laz, T., Smith, K.E., Nagarathnam, D., Noble, S.A., Branchek, T.A. and Gerald, C. (1998). GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396, 674-679.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.
- Kano, M. (1995). Plasticity of inhibitory synapses in the brain: a possible memory mechanism that has been overlooked. *Neurosci. Res.* 21, 177-182.
- Kano, M., Kano, M., Fukunaga, K. and Konnerth, A. (1996). Ca²⁺-induced rebound potentiation of γ -aminobutyric acid-mediated currents requires activation of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93, 13351-13356.
- Kano, M., Rexhausen, U., Dreessen, J. and Konnerth, A. (1992). Synaptic excitation produces a long-lasting rebound potentiation of inhibitory synaptic signals in

- cerebellar Purkinje cells. *Nature* *356*, 601-604.
- Kashiwabuchi, N., Ikeda, K., Araki, K., Hirano, T., Shibuki, K., Takayama, C., Inoue, Y., Kutsuwada, T., Yagi, T. and Kang, Y. (1995). Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* *81*, 245-252.
- Kasono, K. and Hirano, T. (1994). Critical role of postsynaptic calcium in cerebellar long-term depression. *Neuroreport* *6*, 17-20.
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W. and Bettler, B. (1997). Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* *386*, 239-246.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froestl, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A. and Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* *396*, 683-687.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2000). Suppression of inhibitory synaptic potentiation by presynaptic activity through postsynaptic GABA_B receptors in a Purkinje neuron. *Neuron* *27*, 339-347.
- Kawaguchi, S. and Hirano, T. (2002). Signaling cascade regulating long-term potentiation of GABA_A receptor responsiveness in cerebellar Purkinje neurons. *J. Neurosci.* *22*, 3969-3976.
- Komatsu, Y. (1996). GABA_B receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* *16*:

6342-6352.

Komiyama, N. H., Watabe, A. M., Carlisle, H. J., Porter, K., Charlesworth, P., Monti, J., Strathdee, D. J., O'Carroll C. M., Martin, S. J., Morris, R. G., O'Dell, T. J. and Grant, S. G. (2002). SynGAP regulates ERK/MAPK signaling, synaptic plasticity, and learning in the complex with postsynaptic density 95 and NMDA receptor. *J. Neurosci.* *15*, 9721-9732.

Kramar, E. A., Bernard, J. A., Gall, C. M. and Lynch, G. (2002). Alpha3 integrin receptors contribute to the consolidation of long-term potentiation. *Neuroscience* *110*, 29-39.

Kramar, E. A., Bernard, J. A., Gall, C. M. and Lynch, G. (2003). Integrin modulate fast excitatory transmission at hippocampal synapses. *J. Biol. Chem.* *278*, 10722-10730.

Kuner, R., Kohr, G., Grunewald, S., Eisenhardt, G., Batch, A. and Kornau, H. (1999). Role of heteromer formation in GABA_B receptor function. *Science* *283*, 74-77.

Kwon, Y. G., Huang, H. B., Desdouits, F., Girault, J. A., Greengard, P., Nairn, A. C. (1997) Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP-32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* *94*: 3536-3541.

Lambert, N.A. and Harrison, N.L. (1990). Analogs of cyclic AMP decrease gamma-aminobutyric acid A receptor-mediated chloride current in cultured rat hippocampal neurons via an extracellular site. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *255*, 90-94.

Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., Huganir, R. L. (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional

- synaptic plasticity. *Nature* 405: 955-959.
- Leitinger, B., McDowall, A., Stanley, P. and Hogg, N. (2000). The regulation of integrin function by Ca^{2+} . *Biochim. Biophys. Acta.* 1498, 91-98.
- Linden, D. J. and Connor, J. A. (1995). Long-term synaptic depression. *Annu. Rev. Neurosci.* 18, 319-357.
- Linden, D. J., Dickinson, M. H., Smeyne, M. and Connor, J. A. (1991). A long-term depression of AMPA currents in cultured cerebellar Purkinje neurons. *Neuron* 7, 81-89.
- Lisberger, S. G. (1998). Cerebellar LTD: a molecular mechanism of behavioral learning? *Cell* 92, 701-704.
- Lisman, J., Schulman, H. and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175-190.
- Lisman, J. E., Zhabotinsky, A.M. (2001). A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron* 31: 191-201.
- Llano, I. and Marty, A. (1995). Presynaptic metabotropic glutamatergic regulation of inhibitory synapses in rat cerebellar slices. *J. Physiol. (Lond.)* 486, 163-176.
- Lu, Y. M., Roder, J. C., Davidow, J. and Salter, M. W. (1998). Src activation in the induction of long-term potentiation in CA1 hippocampal neurons. *Science* 279, 1363-1367.
- MacDonald, B. J. and Moss, S. J. (1994) Differential phosphorylation of intracellular domains of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 269: 18111-18117.

- Makhinson, M., Chotiner, J. K., Watson, J. B., O'Dell, T. J. (1999) Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J Neurosci* 19: 2500-2510.
- Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78: 535-538.
- Malenka, R. C., Nocoll, R. A. (1999) Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285: 1870-1874.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R. and Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923-1927.
- Manabe, T., Togashi, H., Uchida, N., Suzuki, S. C., Hayakawa, Y., Yamamoto, M., Yoda, H., Miyakawa, T., Takeichi, M. and Chisaka, O. (2000). Loss of cadherin-11 adhesion receptor enhances plastic changes in hippocampal synapses and modifies behavioral responses. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 534-546.
- Marty, A. and Llano, I. (1995). Modulation of inhibitory synapses in the mammalian brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 335-341.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W. Y., MacDonald, J. F., Wang, J. Y., Falls, D. L. and Jia, Z. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121-133.
- Milner, R. and Campbell, I. L. (2002). The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J. Neurosci. Res.* 69, 286-291.
- Mintz, I. M. and Bean, B. P. (1993). GABA_B receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* 10, 889-898.

- Misgeld, U., Bijak, M. and Jarolimek, W. (1995). A physiological role for GABA_B receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* *46*, 423-462.
- Miyashita, T. and Kubo, Y. (2000) Extracellular Ca²⁺ sensitivity of mGluR1 α induces an increase in the basal cAMP level by direct coupling with Gs protein in transfected CHO cells. *Receptors Channels* *7*: 77-91.
- Mizrahi, A. and Katz, L. C. (2003). Dendritic stability in the adult olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* *6*, 1201-1207.
- Mott, D. D. and Lewis, D. V. (1991). Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABA_B receptors. *Science* *252*, 1718-1720.
- Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S., Malenka, R. C. (1994) Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* *369*: 486-488.
- Newberry, N. R. and Nicoll, R. A. (1984). Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature* *308*, 450-452.
- Nikonenko, I., Jourdain, P., Alberi, S., Toni, N. and Mullar D. (2002). Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus* *12*, 585-591.
- Nusser, Z., Hajos, N., Somogyi, P. and Mody, I. (1998). Increased number of synaptic GABA_A receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* *395*, 172-177.
- Oda, Y., Kawasaki, K., Morita, M., Korn, H., Matsui, H. (1998) Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behavior. *Nature* *394*, 182-185.
- Otmakhova, N. A., Otmakhov, N., Mortenson, L. H., Lisman, J. E. (2000) Inhibition

- of the cAMP pathway decreases early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 4446-4451.
- Pinkstaff, J. K., Detterich, J., Lynch, G. and Gall, C. (1999). Integrin subunit gene expression is regionally differentiated in adult brain. *J. Neurosci.* 19, 1541-1556.
- Pinkstaff, J. K., Lynch, G. and Gall, C. M. (1998). Localization and seizure-regulation of integrin β 1 mRNA in adult rat brain. *Mol. Brain Res.* 55, 265-276.
- Rohrbough, J., Grotewiel, M. S., Davis R. L. and Broadie K. (2000). Integrin-mediated regulation of synaptic morphology, transmission, and plasticity. *J. Neurosci.* 15, 6868-6878.
- Schalling, M., Djurfeldt, M., Hokfelt, T., Ehrlich, M., Kurihara, T., Greengard, P. (1990). Distribution and cellular localization of DARPP-32 mRNA in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 7, 139-149.
- Schwartz, M. A., Schaller, M. D. and Ginsberg, M. H. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal Transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 549-599
- Sheng, M. and Kim, M. J. (2002). Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Shigemoto, R., Abe, T., Nomura, S., Nakanishi, S., Hirano, T. (1994) Antibodies inactivating mGluR1 metabotropic glutamate receptor block long-term depression in cultured Purkinje cells. *Neuron* 12, 1245-1255.
- Silva, A. J. (2003). Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. *J. Neurobiol.* 54, 224-237.
- Soderling, T. R. (2000) CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 10, 375-380.

- Strack, S., Barban, M. A., Wadzinski, B. E., Colbran, R. J. (1997) Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J Neurochem* *68*, 2119-2128.
- Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G. W., Benson, D. L., Colman, D. R. (2000). Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron* *25*, 93-107.
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G. and Tsien, J. Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* *401*, 63-69.
- Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R. Welker, E. and Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* *420*, 788-794.
- Wan, Q., Man, H. Y., Braunton, J., Wang, W., Salter, M. W., Becker, L. and Wang, Y. T. (1997). Modulation of GABA_A receptor function by tyrosine phosphorylation of β subunits. *J. Neurosci.* *17*, 5062-5069.
- White, J. H., Wise, A., Main, M. J., Green, A., Fraser, N. J., Disney, G. H., Barnes, A. A., Emson, P., Foord, S. M. and Marshall, F. H. (1998). Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* *396*, 679-682.
- Wong, S. T., Athos, J., Figueroa, X. A., Pineda, V. V., Schaefer, M. L., Chavkin, C. C., Muglia, L. J., Storm, D. R. (1999) Calcium-stimulated adenylyl cyclase activity is critical for hippocampus-dependent long-term memory and late phase LTP. *Neuron* *23*, 787-798.

Zhou, Q., Tao, H. W. and Poo M. M. (2003). Reversal and stabilization of synaptic modification in a developing visual system. *Science* *300*, 1953-1957.