

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700349

研究課題名 (和文) 抑制性シナプス可塑性の長期持続の分子機構

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of long-term synaptic plasticity at cerebellar inhibitory synapses

研究代表者

川口 真也 (KAWAGUCHI SHIN-YA)

京都大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：00378530

研究成果の概要 (和文)：

小脳プルキンエ細胞に形成される抑制性シナプスでは、プルキンエ細胞が強く脱分極すると GABA(A) 受容体を介する応答が長時間にわたり増強する。本研究では、電気生理学実験や蛍光イメージングと計算機シミュレーションを組み合わせて解析し、脱分極がもたらすリン酸化酵素 CaMKII の持続的活性化と、その結果起こる GABA(A) 受容体結合タンパク質 GABARAP の状態変化が、増強の安定な発現維持に協調的に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

At GABAergic synapses on a cerebellar Purkinje neuron, long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission mediated by GABA(A) receptors is induced by postsynaptic depolarization. Using electrophysiological and fluorescent imaging experiments coupled with systems biological simulation, this study revealed that neuronal activity-dependent sustained activation of CaMKII leads to stable modification of GABARAP self-association, contributing to the long-term maintenance of inhibitory synaptic LTP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス可塑性、パッチクランプ、システム生物学、GABARAP、CaMKII、GABA、シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系において、抑制性の情報は神経伝達物質 GABA により伝達される。GABA による抑制性の情報伝達は、グルタミン酸によ

る興奮性情報伝達と同様、中枢神経系における情報処理に重要な役割を担う。また、近年 GABA 性シナプス伝達の異常が、てんかん、不安、うつ病、統合失調症などの精神障害と関連していることが明らかになってきた。

しかしながら、グルタミン酸性シナプス伝達の制御メカニズムに比べ、GABA 性シナプス伝達の制御機構についての理解は遅れている現状である。そこで本研究では、小脳のプルキンエ細胞に形成される抑制性シナプスをモデル系として、GABA 性シナプス伝達を制御するメカニズムを分子的に明らかにすることを旨とした。特に、記憶・学習の細胞レベルでの基盤と考えられている神経活動依存的なシナプス伝達効率変化（シナプス可塑性）が、抑制性シナプスで発現し、長期持続する仕組みを分子的に究明することを目標とした。

## 2. 研究の目的

プルキンエ細胞が強く脱分極すると、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。この脱分極依存性増強の誘導にはリン酸化酵素 CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/CaM- dependent protein kinase II)が重要で、リン酸化酵素と脱リン酸化酵素の活性バランスにより増強の成否が調節される。これまでの研究により明らかにされた脱分極依存性増強を制御する分子経路を図1に示した。細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に伴い CaMKII が活性化することにより、脱分極依存性増強は誘導される。CaMKII は自身の Thr286 を自己リン酸化することにより、Ca<sup>2+</sup>/CaM が解離した後も活性を維持することができ、この自己リン酸化による活性長期維持が、脱分極依存性増強に重要であると考えられている。そして、その CaMKII の自己リン酸化による活性維持は、PP-1 (protein phosphatase 1) などの脱リン酸化酵素により抑制される。脱分極依存性増強の誘導は、代謝型 GABA(B)受容体により脱リン酸化酵素の経路が亢進することにより抑制されることも明らかにされている。

しかし、CaMKII がいかにして GABA (A) 受容体の変化を持続的に起こし、脱分極依存性増強が発現・維持されるのかは不明である。そこで、この点を明らかにすることを本研究の目的とした。

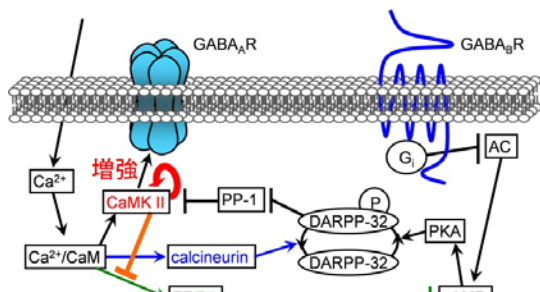


図1 脱分極依存性増強を制御する細胞内シグナル経路

## 3. 研究の方法

分散培養した小脳プルキンエ細胞に、パッチクランプ法や免疫細胞化学法、分子生物学的手法、蛍光イメージング等を適宜適用することにより、CaMKII が脱分極により活性化される時間経過や、GABA(A)受容体結合タンパク質 GABARAP の変異体発現が増強誘導に与える影響を検討した。

本研究ではこれらの実験的手法に加えて、増強の成否を担うシグナル伝達経路の動的挙動を定量的に理解するために、シミュレーションモデルを構築してシステム解析し、さらに新たな増強の制御メカニズムを理論的に予測することにも挑戦した。そしてそのモデルから理論予測を得て、生きたプルキンエ細胞を用いて実証することで、抑制性シナプス可塑性発現の分子メカニズム理解を深化させることを試みた。

## 4. 研究成果

まず、脱分極により CaMKII がどれくらいの時間活性化するかを検討すると、CaMKII の自己リン酸化反応により、少なくとも2時間以上にわたって活性が維持されることが示された。したがって、この持続的な CaMKII 活性化が、増強の安定性に寄与すると考えられた。

次に、持続的な CaMKII 活性化が、図1の複雑な分子経路のどのような動的相互作用により達成されるかを理論的に解析した。具体的には、様々なパターンの Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と GABA (B) 受容体活性化に応じて、リン酸化・脱リン酸化のバランスがどのように動的に制御され、その結果増強発現がどのように調節されるかを系統的に理解するために、分子経路全体のシステム生物学的なシミュレーションモデルを構築した。分子間結合・解離反応および酵素反応をそれぞれ固有の微分方程式であらわし、多数の連立微分方程式を計算機で数値的に解くことにより、分子経路全体の時間経過をシミュレートした。

そして、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に応じて CaMKII が持続的に活性化し、一方 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と組み合わせると GABA(B)受容体を活性化すると CaMKII 活性は刺激後すぐに抑えられることが分かった (図2)。これらのシミュレーション

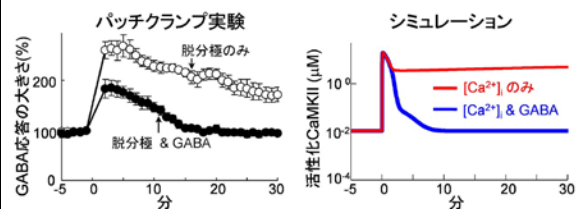


図2 モデルによる増強制御の再現

ン結果は、刺激の組み合わせの違いによる脱分極依存性増強の発現成否を再現するものであると考えられる (図 2)。

このようにして、これまでの電気生理学実験の結果を再現できるシミュレーションモデルを構築できたので、そのモデルを用いて未知の制御メカニズムを探索した。具体的には、増強誘導に必要な  $\text{Ca}^{2+}$  閾値を決定する分子機構に焦点を当てた。シミュレーション解析により、cAMP 分解酵素である PDE1 活性が弱まると、かなり低い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇でも長時間にわたる CaMKII 活性化を引き起こせることが示された (図 3)。したがって、PDE1 を阻害すると増強が起こり易くなることが理論的に予測された。この予測について、ホールセルパッチクランプ法と  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを初代分散培養したプルキンエ細胞に適用し、検証を行った。その結果、シミュレーション結果と一致して、PDE1 阻害剤存在下では弱い  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇を起こす脱分極条件刺激でも、増強を誘導できるようになった (図 3)。したがって、理論予測が実証された。以上から、モデルシミュレーションと電気生理学実験を組み合わせることで適用することにより、脱分極依存性増強を誘導するのに必要な  $\text{Ca}^{2+}$  閾値が主に PDE1 により決定されることが明らかになった。

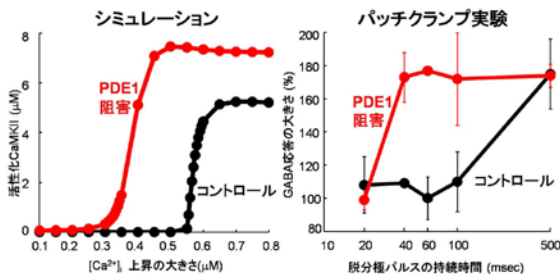


図 3 増強発現の閾値制御メカニズムのモデル予測と実験による検証

さらなるモデルの数理解析により、増強発現が  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の時間パターンにより、ダイナミックに制御される興味深い仕組みが示唆された。そこで、そのモデル予測についても実験的に検証を行い、入力のパルスに応じて、シナプス可塑性の成否を動的に制御するメカニズムが明らかになった。

一方で、CaMKII がいかに GABA(A) 受容体に作用して増強発現が達成されるかについても、GABARAP に焦点を当てた解析を行い、GABARAP の N 末領域 10 アミノ酸領域を欠失した変異体により、増強の発現が阻害されることが分かった。この N 末領域は、GABARAP の多量体化に寄与すると考えられており、FRET イメージングによりその可能性を支持する結果を得た。以上から、

CaMKII が持続的に活性化することにより、GABA(A) 受容体の足場タンパク質群が再編成され、安定な増強の発現・維持がもたらされると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kitagawa, Y., Hirano, T., and Kawaguchi, S. Prediction and validation of a mechanism to control the threshold for inhibitory synaptic plasticity. *Molecular Systems Biology*, 5, 280 (2009). 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① Kawaguchi S. Systems Biology of Inhibitory Synaptic Plasticity. Second International "Neuron to Synapse 2010 Meeting", Jun. 7<sup>th</sup>, 2010 in New York, U.S.A.
- ② Kawaguchi S. and Hirano T. Temporal sequence of  $\text{Ca}^{2+}$  signals regulates long-term potentiation at inhibitory synapses on a cerebellar Purkinje neuron. Nov. 17<sup>th</sup>, 2010, Neuroscience2010 in San Diego, CA, USA
- ③ Nagasaki N., Hirano T. and Kawaguchi S. Opposite roles of  $\alpha$  and  $\beta$ CaMKII in LTP at inhibitory synapses on a Purkinje neuron. Nov. 17<sup>th</sup>, 2010, Neuroscience2010 in San Diego, CA, USA
- ④ 川口 真也, 平野 丈夫  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの時間パターンによる小脳抑制性シナプス可塑性の制御 日本神経科学学会 Neuro2010 2010年9月3日兵庫県神戸市 神戸国際会議場
- ⑤ 長崎 信博, 平野 丈夫, 川口 真也 小脳抑制性シナプス可塑性における CaMKII サブユニット構成の役割 日本生理学大会 2010年5月19日岩手県盛岡市 盛岡市民文化ホール
- ⑥ 長崎 信博, 平野 丈夫, 川口 真也 CaMKII サブユニット構成の違いによる小脳抑制性シナプス可塑性の調節 日本神経科学学会 Neuro2009 2009年9月16

日 愛知県名古屋市 名古屋国際会議場

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Kawaguchi, S. and Hirano T. Molecular Mechanism of Long-Term Plasticity at Cerebellar Inhibitory Synapses. **Inhibitory Synaptic Plasticity**, Springer, 29-38, (2010).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.neurosci.biophys.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川口 真也 (KAWAGUCHI SHIN-YA)  
京都大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号：00378530

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし