

神経細胞系におけるシグナリング機構

Signaling Mechanism in Neuronal System

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00310)

プロジェクトリーダー

吉岡 亨 早稲田大学人間科学部・教授

コメンター

柴田 重信 井上 宏子

守屋 孝洋 平倉 穰

池田 真行 廣野 守俊

J. de Barry

早稲田大学人間科学部

早稲田大学人間総合研究センター

早稲田大学理工総合研究センター

国立科学研究センター(仏)



研究目的

脳の高次機能に関与することの分かっている脳機能部位のニューロンに焦点を絞り、そこでのシグナリング機構の詳細をノックアウトマウスを用いて明らかにする。具体的には

- (i) 連合学習の研究から記憶のメカニズムを探る。
- (ii) 視交叉上核の研究から概日リズム形成のメカニズムを探る。
- (iii) 上記 2 項目の基本過程としてポストシナプスの Ca カスケードを明らかにする。

研究成果

(1) 記憶のメカニズムに対するアプローチ

PLCβ4 は、生体膜に微量に存在しているリン脂質の一つ、ホスファチジルイノシトール 2 リン酸を加水分解して、セカンドメッセンジャーであるイノシトール 3 リン酸(IP₃)を生成する酵素である。この酵素が機能しないときはレセプターの活性化に伴う Ca 濃度の上昇が起こらなくなり、その下流にあるシグナリングカスケードは停止し、ニューロンの機能不全が起こる。PLCβ4 には 1~4 までのファミリーがあり、機能的には殆ど同じであるが、局在する部位が異なっている。

Fig.1 に示すように PLCβ4 は、長期抑圧(LTD)現象を示す小脳プルキンエ細胞に豊富に存在していることが知られているので、LTD の形成について調べた。



Fig.1 マウス脳における PLCβ4 の分布。濃く染色している部分に存在している。Ob:嗅球、Sp:上丘、TGN:視床、Cb:小脳

Fig.2 に示すように、PLCβ4 ノックアウトマウスでは LTD は形成されなかった。

プルキンエ細胞の代謝型グルタミン酸受容体(mGluR)に係わるシグナル伝達では mGluR1→Gqα→PLCβ4→cPKC としたシグナリングカスケードが確立している。若しも PLCβ4 の欠損が LTD 形成不良をもたらすものならば、mGluR や cPKC(PKCα、βI/βII、γを指す)をノックアウトしても LTD は形成されない筈である。ところが米国の Tonegawa 研究室の結果によれば mGluR1 のノックアウトでは LTD は形成されなかったものの、小脳に一番豊富に存在する PKCγをノックアウトしても LTD は形成されたのである。

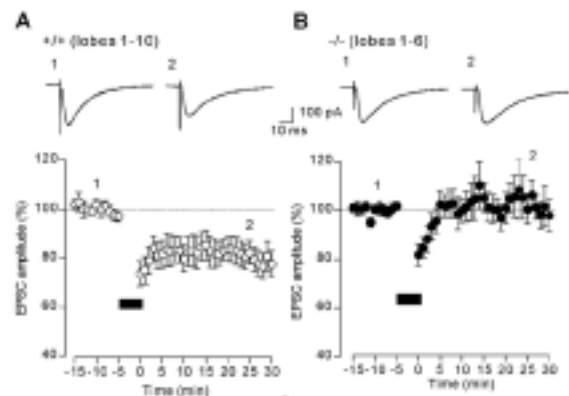


Fig.2 小脳プルキンエ細胞の LTD。A)は野生型のプルキンエ細胞の応答が刺激後(■印)後 80%位に低下している。B)はノックアウトマウスの応答で LTD は殆ど形成されていない。

全 4 段階のうち我々の実験により第 3 段階までは正しいことが確かめられた。

そこで最終段階、即ち PKC の活性化段階については再検討しなくてはならない。

PKC の活性化は、細胞刺激による PKC の膜近傍への移動で測定する。そこで我々は小脳切片を、LTD 形成条件で刺激して、その時に目的とする PKC が果たして膜方向に移動するかどうかで調べた。その結果 PKCαとβ1 については膜移動が確かめられたものの、PKCβ2 と PKCγについては膜移動は認められなかった。即ち Tonegawa の

グループの発信した疑問に対する答えは、“LTD 形成には PKC α か PKC β 1 の一方または両方の活性化が必要である”ということになる。この論文は 2001 年 J.Biol.Chem. に発表されたが米国での評価は高く、共同研究の申し込みや打診がある。

(2) REM 睡眠のメカニズムに対するアプローチ

睡眠のメカニズムは、記憶のメカニズムよりはるかにアプローチが困難である。その理由は

- (イ) 睡眠にかかわる脳部位の数は多く、いわゆる睡眠中枢を特定できるのかという疑問がある。
- (ロ) 睡眠の判定は脳波(EEG)のみでは困難で筋電図(EMG)の併用が必要である。そのために Awake、non-REM、REM という 3 段階の判定に主観的な要素が入りやすいという欠点がある。

PLC β 4 は視床に局在していることが分かったので、直ちにこのノックアウトマウスを用いて EEG を測定した。

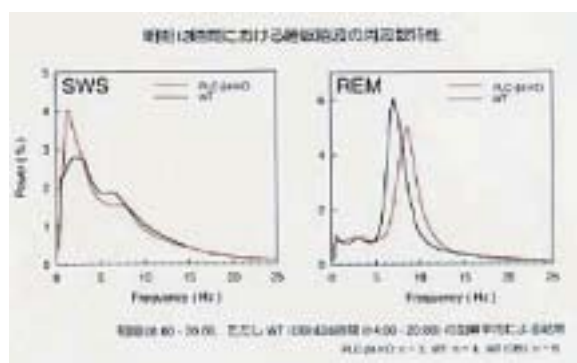


Fig.3 SWS(non-REM)と REM 睡眠時脳波の周波数特性。赤のラインが PLC β 4 ノックアウトマウス、黒のラインが野生型マウス。REM 睡眠ではノックアウトマウスの中心周波数が 2Hz 上昇している。

そして以下のことが明らかになった。

- (i) REM 睡眠の EEG をフーリエ解析すると、7Hz を中心とする単振動をしていることが分かった。しかも PLC β 4 ノックアウトマウスではこの中心周波数は 2Hz もシフトして 9Hz になっていた。
- (ii) これまでの EEG では振幅に関する情報は全く無視されていた。横軸を振幅 $x(t)$ 、縦軸をその微分 dx/dt として野生型マウス EEG の軌跡を描くとドーナツ状になった。一方ノックアウトマウスの軌跡は中心が高密度で裾を広げる形になり、non-REM のそれと同じになった。
- (iii) ノックアウトマウスでは、ナルコレプシー症候群の場合と同様、awake→REM が頻繁に見られた。これは REM の(位相空間での)軌跡がドーナツ状

になっていないために、awake からの転移が起こり易くなっているのかもしれない。

- (iv) ノックアウトマウスの EEG に見られる中心周波数の 2Hz シフトは、視床ニューロンの K チャネルのコンダクタンスが、リン酸化によって制御されているためであろうと思われる。

(3) 概日リズム形成機構

- (i) 視交叉上核にはオピオイド受容体 (μ -, δ -, κ -) が多数存在している。このレセプターの役割は長い間不明であったが、我々はこのレセプターは NMDA レセプターによる Ca 動員を抑制し、光による位相前進を抑制していることも見出した。
- (ii) 概日リズムを制御することで知られるメラトニン受容体は他の 7 回膜貫通型と異なり N124 アミノ酸がアスパラギン酸になっているために Gi と結合していることを見出した。

(4) Ca 感受性蛍光タンパクカメレオンのトランスジェニックマウスの作成

カメレオンを過剰発現したトランスジェニックマウスを作り出すことが出来た。これにより脳内のどのニューロンでも、細胞外から Ca 感受性色素を導入することなしに Ca 濃度の変化を測定することが出来る。

関連する出版された論文

- i) Hirono, M., Sugiyama, T., Kishimoto, Y., Sakai, I., Miyazawa, T., Kishio, M., Inoue, H., Nakao, K., Ikeda, M., Kawahara, S., Kirino, Y., Katsuki, M., Horie, H., Ishikawa, Y., Yoshioka, T. PLC β 4 and Protein Kinase C α and /or Protein Kinase C β 1 Are Involved in Induction of Long Term Depression in Cerebellar Purkinje Cells. J. Biol. Chem. 276(48), 45236-45242. 2001
- ii) Hirono, M., Yoshioka, T., Konishi, S. GABA(B) receptor activation enhances mGluR-mediated responses at cerebellar excitatory synapses. Nat. Neurosci. 12, 1207-1216. 2001
- iii) Kishimoto, Y., Hirono, M., Sugiyama, T., Katsuki, M., Yoshioka, T., Kirino, Y. Impaired Delay but Normal Trace Eye Blink Conditioning in PLC β 4 Mutant Mice. Neuro Report 12(13): 2919-2922. 2001
- iv) Allen, C.N., Jiang, Z., Teshima, K., Darland, T., Ikeda, M., Nelson, C.S., Quigley, D.I., Yoshioka, T., Allen, R.G., Rea, M.A., and Grandy, D.K. Orphanin-FQ (OFQ) Modulates the Activity of Suprachiasmatic Nucleus Neurons. J. Neurosci. 19, 2152-2160. 1999.
- v) Nelson, C. S., Ikeda, M., Gompf, H.S., Robinson, M. L., Fuchs, N. K., Yoshioka, T., Neve, K. A. and Allen, C. N. Regulation of melatonin 1a receptor signaling and trafficking by asparagines-124. Mol. Endocrinol. 15(8): 1306-1317 2001.