

内臓小胞体より放出されるカルシウムの生理機能の検討

生理機能グループ

加藤 邦夫

【要約】

細胞内のカルシウム貯蔵庫から放出されるカルシウムが神経組織において果たす生理学的役割を調べるために、IP3 受容体の遺伝子を欠損させたマウスを用いて解析を行った。その結果、これらのカルシウムは神経シナプスの可塑性の誘導に重要な働きをしていることがわかった。小脳 Purkinje 細胞での代表的なシナプス可塑性である LTD が IP3 受容体欠損マウスにおいて欠如していることから、IP3 受容体の活性が LTD の誘導に必須であることがわかった。また欠損マウスでは海馬 CA1 錐体細胞において LTP が増強していることがわかった。このことから海馬では小脳と異なり、内臓小胞体より放出されたカルシウムが可塑性を抑制していることが判明した。また海馬錐体細胞において IP3 受容体の活性を抑制するとシナプスにおける入力特異性が失われることから、IP3 受容体の活性はシナプス間の可塑性の伝播を抑制していることがわかった。またリアノジン受容体の海馬における生理学的役割をリアノジン 3 型受容体遺伝子欠損マウスを用いて調べた。

【緒言】

神経細胞における細胞内カルシウム濃度はカルシウムポンプやイオン輸送蛋白の働きによって通常低濃度に抑えられているが、刺激によってその濃度が上昇するとさまざまな信号伝達系を賦活することが知られている。なかでもシナプス可塑性は神経細胞の持つ重要な機能のひとつである。この時増加するカルシウムの主たる経路は細胞外からの流入であり、とりわけグルタミン酸受容体のサブタイプのひとつである NMDA 受容体の重要性が知られている。刺激時に伝達物質としてシナプス間隙に放出されたグルタメートは代謝型グルタメート受容体を活性化し IP3 を放出して、IP3 受容体を介して細胞内のカルシウム貯蔵庫に蓄えられたカルシウムを放出する。このように細胞内から放出されるカルシウムの働きを、シナプス可塑性を主とする神経細胞の機能に着目して調べた。その手法としては、薬理的な手法の他に、IP3 受容体に特異的な機能阻害抗体を用いたり、受容体遺伝子欠損マウスを用いた。

1. IP3 受容体の生理学的機能

1.1 IP3-1 型受容体遺伝子欠損マウス

IP3 受容体は 1 から 3 型まで存在し中枢神経系においては 1 型が優位に存在する。この遺伝子を欠損させたマウスを製作すると歩行失調、けいれん発作などの表現型がみられた。ま

た出生後20日前後で死亡する。(図1)

1.2 小脳 Purkinje 細胞における長期抑圧現象 (Long-term depression : LTD)

小脳は中枢神経系の中でも最も IP3 受容体が豊富に存在する組織である。IP3 受容体遺伝子欠損マウスの小脳のスライス標本を作成し、Purkinje 細胞における平行線維の入力シナプスに電氣的低頻度刺激と細胞体の脱分極刺激の組み合わせ刺激を与えると、野生型ではシナプス反応の LTD が見られるのに対して、遺伝子欠損マウスでは LTD がみられなかった (図2)。また IP3-1 型受容体の特異的機能阻害抗体を細胞内に拡散すると同様に LTD は阻害された。これらの事実から小脳における代表的な可塑性である LTD の誘導には、IP3 受容体の活性が必須であることが判明した。また Purkinje 細胞における LTD の誘導と表現型にみられる歩行失調の関連がこの結果から示唆された。

1.3 海馬CA1領域における長期増強現象 (Long-term potentiation : LTP)

海馬 CA1 錐体細胞の入力線維に高頻度刺激を与えると野生型マウスではシナプス反応が LTP を示す。同じ刺激を遺伝子欠損マウスに与えるとより大きな LTP が誘導される (図3)。このことは IP3 受容体の活性が小脳とは異なって LTP の誘導に対しては抑制効果をもつことを示している。NMDA 受容体の選択的拮抗薬存在下では LTP の誘導が阻害されることから、細胞外から流入するカルシウムは LTP の誘導に重要な働きをすることが知られている。このことは、IP3 受容体を介して細胞内のカルシウム貯蔵庫から放出されるカルシウムは、細胞外から流入するカルシウムと LTP の誘導に関して逆の働きを示す。同じカルシウムイオンの増加がその由来の違いによって異なる働きをすることは非常に驚きであった。その原因を調べるとひとつには NMDA 受容体の活性の変化にあることがわかった。IP3-1 型遺伝子欠損マウスの NMDA 受容体電流を計測すると、静止膜電位に近い膜電位で増加がみられた (図4)。これは入力刺激時に NMDA 受容体を介して細胞外から流入するカルシウムが増加することを示している。また膜電位特性を調べると K チャンネル活性が低下していることが示唆された。このように IP3 受容体の活性は細胞膜上の各種チャンネルの活性を修飾することによって LTP の誘導を調節していることがわかった。チャンネル活性修飾のメカニズムは現在不明であるが、最近の細胞生物学の報告から推察して、IP3 受容体が細胞膜上のチャンネルと細胞骨格蛋白を介して結合していることによるものではないかと考えられる。

1.4 IP3 受容体活性によるシナプス可塑性のシナプス入力特異性の制御。

脳組織は通常電氣的な振動をしていることが脳波の研究によって知られている。この振動のリズムと外界からの入力刺激のタイミングが可塑性の誘導に関与していることが議論されている。細胞体に whole-cell clamp を行い脱分極刺激 (1nA, 3msec) を与えると、樹状突起

に逆向性に活動電位が伝播する。この時入力線維に刺激（5Hz、16秒）を与えると入力特異的にシナプスの可塑性が誘導される。この組み合わせ刺激によって誘導される可塑性はNMDA受容体を阻害することによって起こらなくなるので、細胞内のカルシウム濃度増加が必要であることがわかる。海馬CA1の錐体細胞において細胞内貯蔵庫から放出されるカルシウムがこの可塑性に対してどのような役割を果たしているかを調べてみた。まず組み合わせ刺激のパターンと可塑性の関係を図5に示す。すなわち、逆向性活動電位とシナプス入力刺激のタイミングが合うとLTPがシナプス入力特異的に誘導される。またシナプス入力刺激が活動電位に対して前後に20ミリ秒以下のタイミングのずれで加えられるとLTDが誘導される。またそれ以上タイミングがずれると可塑性は生じない。また、樹状突起に対して対側側での入力刺激を受けないシナプス可塑性を、可塑性の入力特異性を調べる目的で観察した。これらの条件下でIP3受容体活性の関与を遺伝子欠損マウスと特異的機能阻害抗体を用いて調べてみた。この結果わかったことは、LTPはシナプス入力特異性を持つが、IP3受容体の活性がないとLTPの大きさが増大しかつ入力特異性が失われる。すなわちLTPは誘導刺激を受けたシナプスから近傍のシナプスに伝播する。LTDに関してはもともと入力特異性はこのプロトコールでは認められなかった、すなわちLTDは近隣のシナプスに伝播するが、IP3受容体活性がないとLTDがLTPへと転換し、同時に近隣のシナプスではLTDの伝播が消失した（図6）。このようにIP3受容体の活性は可塑性の方向を定めるとともに、入力特異性を維持する重要な働きをしていることがわかった。また細胞内カルシウムを放出するもうひとつの受容体であるリアノジン受容体を薬理的に阻害すると、LTDが消失しまたLTPの増強がみられた。このことはリアノジン受容体の活性がIP3受容体とは異なった機構で可塑性を修飾していることを示している。

2. リアノジン3型受容体遺伝子欠損マウスの海馬におけるシナプス可塑性

リアノジン3型受容体は海馬CA1領域に特異的に優位に発現している。リアノジン3型遺伝子欠損マウスを製作し、この局在性を利用して海馬CA1領域における神経シナプス可塑性におけるリアノジン受容体の役割を調べた。この遺伝子欠損マウスは目立った表現型を示さないが、水迷路試験において学習行動の亢進が見られた。海馬のスライス標本を製作し、CA1領域でLTPを測定するとLTPの大きさに差はなかったが、LTP誘導の閾値の低下がみられた。またLTDは誘導されなかった。この原因を調べるために膜電位依存性カルシウムチャンネルやNMDA受容体の活性を測定したが異常は認められなかった。すなわち誘導刺激時の細胞外からのカルシウムの流入は変わらないが、LTPの誘導がより少ないカルシウム濃度の増加で可能であることを示している。これらの事実からリアノジン受容体の活性はIP3受容体と同様にLTPの誘導に対して抑制的に働いていることがわかった。また海馬CA1領域のLTPが記憶学習機能と相関していることが示唆された。（詳細及びデータは二木発表参照）

3. GABA_B 受容体機能に関わる IP3 受容体活性

海馬 CA1 領域において抑制性神経細胞の主要な伝達物質である GABA に対する錐体細胞の電気応答を調べた。GABA 受容体は Cl⁻ 透過性の GABA_A 受容体と K⁺ チャンネルに関与する GABA_B 受容体にそれぞれ分類される。IP3-1 型受容体遺伝子欠損マウスを用いて海馬神経細胞の初代培養系をつくり、GABA_A および GABA_B に対する電気応答を調べてみた。GABA_A 受容体反応では野生型との差はみられなかったが、GABA_B 受容体に対する反応は遺伝子欠損マウスにおいて優位に低下していた (図 7)。また海馬歯状回には IP3 受容体 2 型も発現していることから 1 型受容体の機能をより選択的に調べるために CA1 領域特異的な初代培養系を製作したところ、同様に GABA_B 受容体反応の低下が見られ、また歯状回から作った培養細胞系では変化がみられなかったことから IP3 受容体は 1 型 2 型にかかわらず GABA_B 受容体反応を亢進していることがわかった。GABA_B 受容体を活性化すると PI 代謝回転が亢進することは従来知られていたが、IP3 受容体の活性が GABA_B 受容体反応に対して促進的に働くことがこれらの研究からわかった。

【結語】

細胞内貯蔵庫から放出されるカルシウムの生理学的役割が遺伝子欠損マウスや特異的機能抗体を用いた研究によってあきらかになった。これらのカルシウムが、細胞外から NMDA 受容体や膜電位依存性カルシウムチャンネルを通して流入するカルシウムとは異なった働きをすることは興味をひかれる (図 8)。細胞内のカルシウムの働きを整理すると小脳 Purkinje 細胞では可塑性に対して促進的に、海馬では抑制的に働く。またシナプス可塑性の限局性に関わり、抑制性神経細胞の活性にも貢献している。小脳 Purkinje 細胞が抑制性神経細胞であることを考慮すると IP3 受容体の働きは脳機能を抑制的に調節しているといえる。このような働きをする詳細なメカニズムは不明であり、今後明らかにされる必要がある。

References

1. Matsumoto, M. et al., Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor., *Nature*, 379(6561), 168-171, 1996
2. 加藤 邦夫他、「細胞内 Ca²⁺ ホメオスタシスと電気生理学的測定」、*蛋白質、核酸、酵素*、43(12),1561-66, 1998
3. Inoue, T. et al., Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar neurons., *J. Neuroscience*, 18(14), 5366-5373, 1998
4. Hamada, T. et al., Induction of epilepsy in the IP3 type receptor knockout mouse by the suppression of GABAergic neuron activity., 76th The Physiological society of Japan, Nagasaki, March 1999
5. Futatsugi, A. et al., Facilitation of NMDAR-independent LTP and spatial learning in mutant mice lacking ryanodine receptor type 3., *Neuron*, , 701-713, 1999
6. Nishiyama, M. et al., Polarity and input specificity of synaptic modification: critical role of calcium release from internal stores., *Axon Guidance and Synaptic Plasticity*, in press, 2000



図1. IP₃受容体1型ノックアウトマウスの表現型

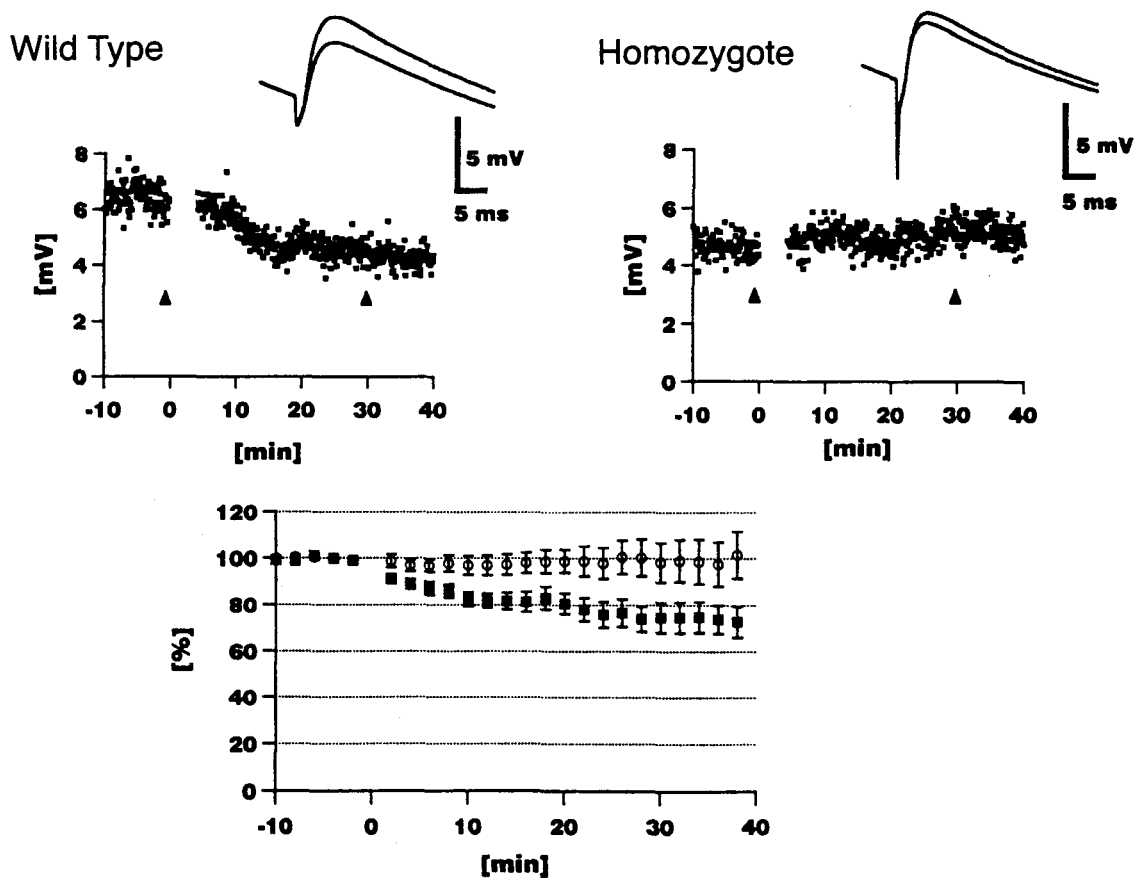


図2. IP₃受容体ノックアウトマウスの小脳におけるLTD誘導

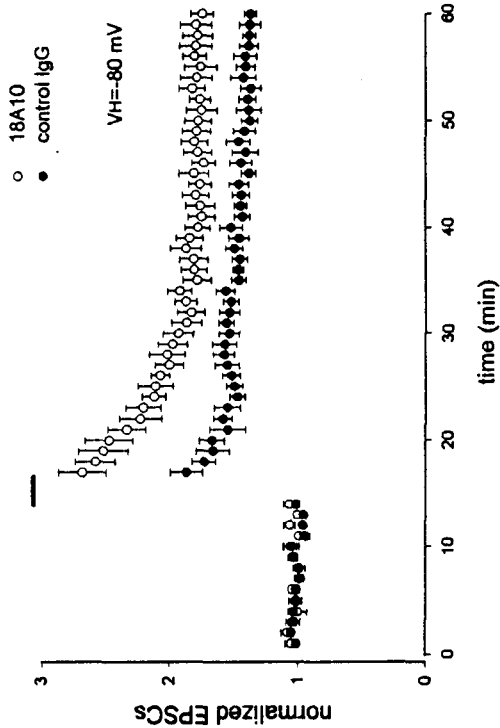
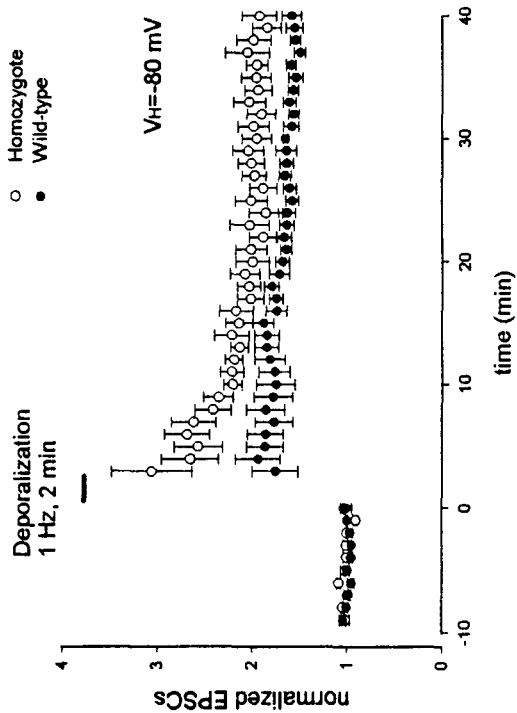


図3. IP₃受容体ノックアウトマウスの海馬錐体細胞におけるLTP
 上段はノックアウトマウスにおけるLTPの増強
 下段は野生型におけるIP₃受容体機能阻害抗体におけるLTPの増強

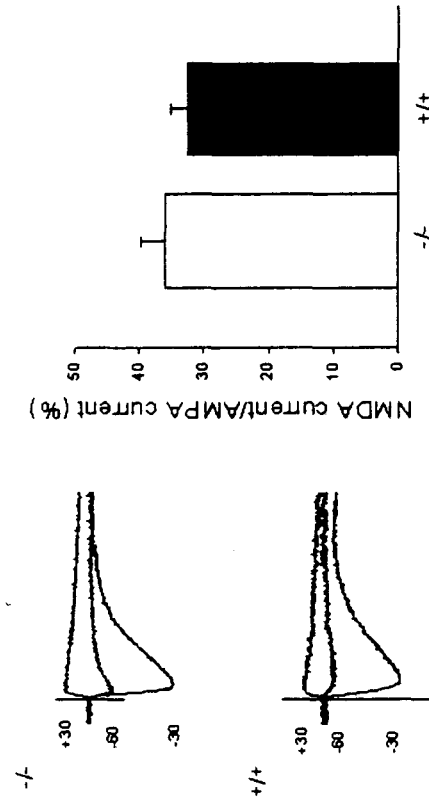
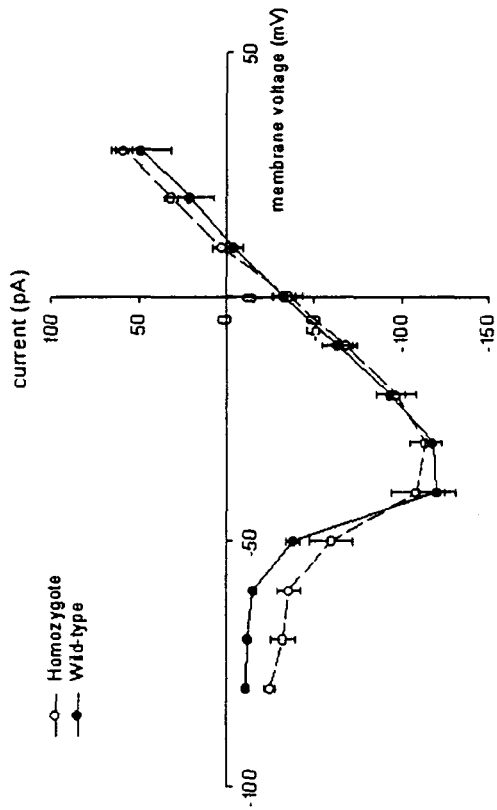


図4. IP₃受容体ノックアウトマウスにおけるNMDA電流特性

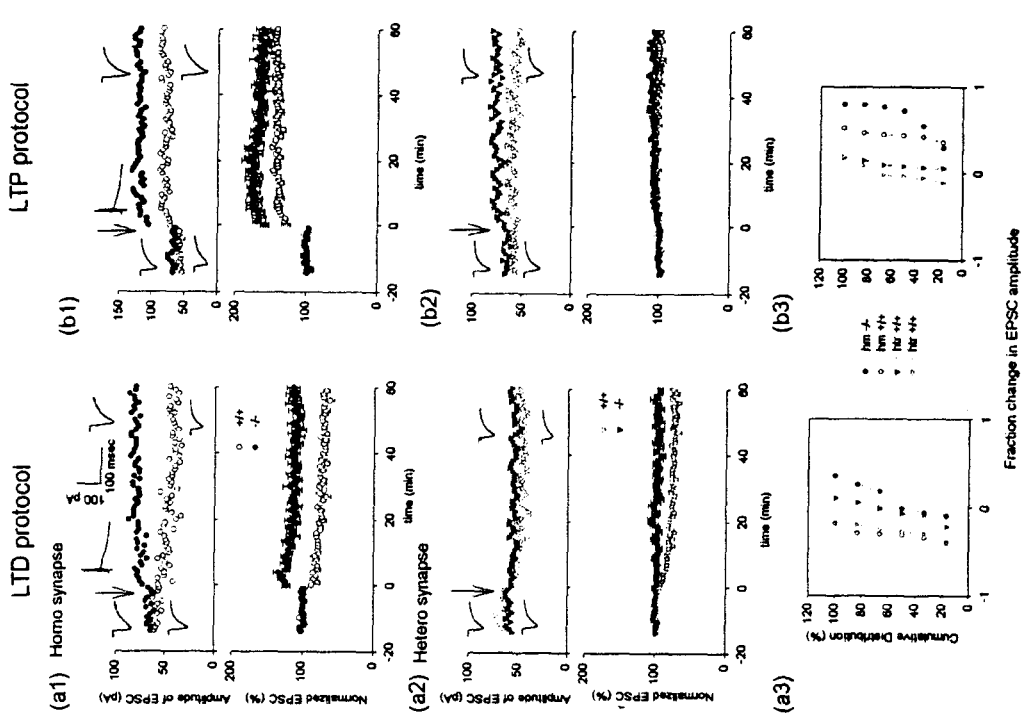


図6 IP₃受容体ノックアウトマウスにおいてLTP誘導刺激を与えた場合(a1,a2,a3)とLTD誘導刺激を与えた場合(b1,b2,b3)の可塑性の変化

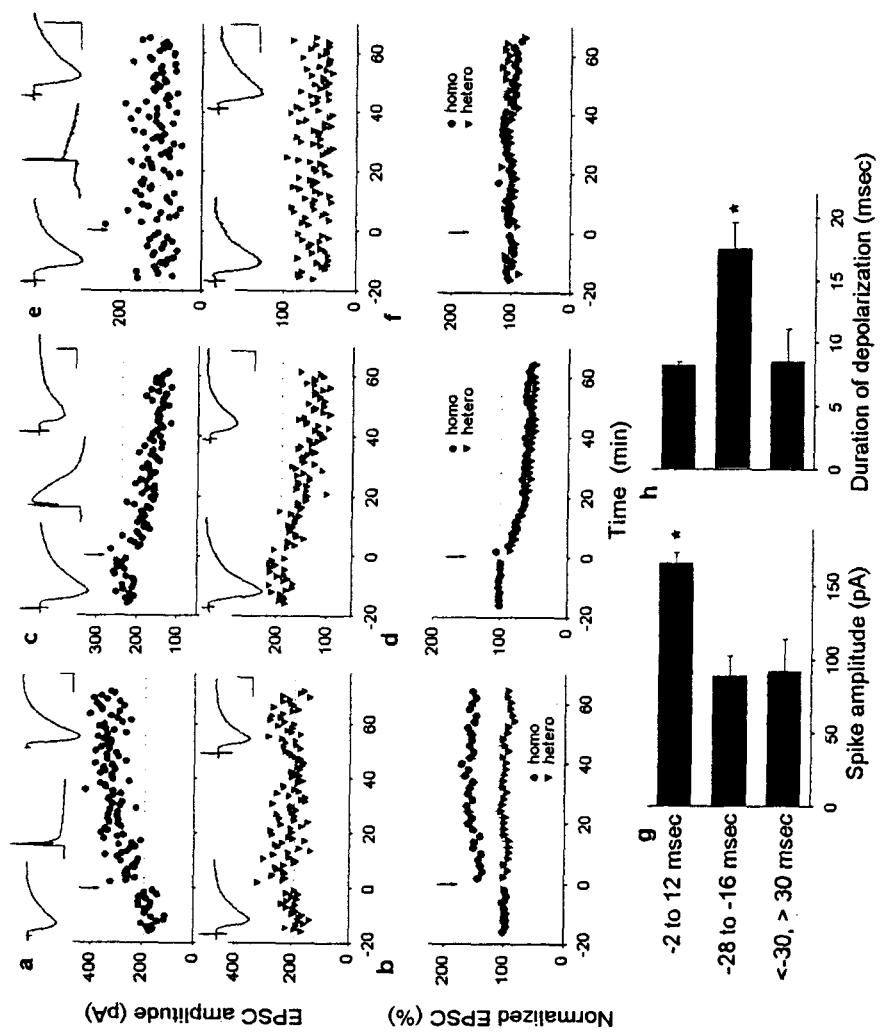


図5. 組み合わせ刺激のタイミングによる可塑性の変化

図a, b: -2~12 msecでLTPを誘発

図c, d: -28~-16 msecでLTDを誘発

図e, f: -30 msec以上では可塑性を生じない

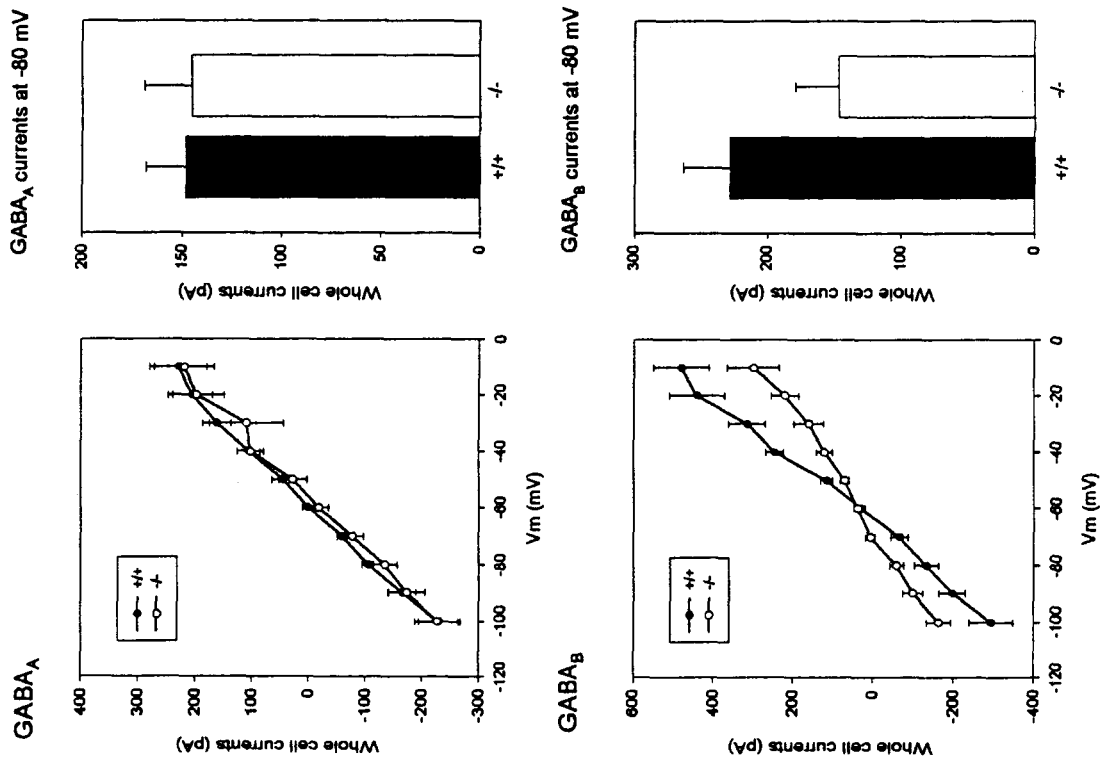


図7. IP₃受容体ノックアウトマウス海馬初代培養細胞におけるGABA_A及びGABA_B受容体電流特性

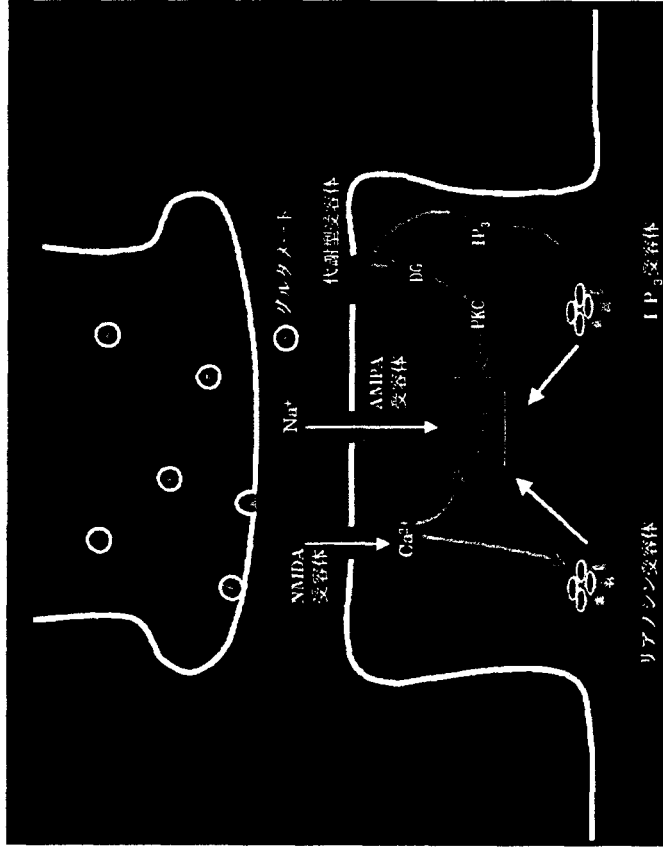


図8. 細胞内カルシウムの増加がLTPに与える影響の模式図
IP₃およびryanodine受容体から放出されたカルシウムはLTPを抑制する