

# ラット海馬 CA1 神経細胞の長期抑圧現象における カルシニューリンの役割

李 勝天

カルシニューリン (CaN) は中枢神経系において  $Ca^{2+}$ /calmodulin により活性化される唯一の脱リン酸化酵素であり、神経系のシナプス可塑性に関与していると考えられている。今回の実験は CaN が海馬 CA1 神経細胞の長期抑圧現象 (LTD) の形成において果たす役割について調べた。

1973年 Bliss と Lomo により脳の皮質でのシナプス伝達効率の長期増強現象 (LTP) が報告されて以来、LTP やその逆に伝達効率の下がる長期抑圧現象 (LTD) などのシナプス可塑性は記憶や学習といった脳の高次機能における細胞レベルでの基礎過程と考えられてきた。海馬CA1 ニューロンにおいては N-methyl-D-aspartate 型グルタミン酸レセプター (NMDAR) と代謝型グルタミン酸レセプター (mGluR) のそれぞれの活性に依存する二種類の LTD (NMDAR-LTDとmGluR-LTD) が報告されている。1994年、NMDAR-LTD の形成において CaN 活性が必要であることが報告されて以来、CaN は  $Ca^{2+}$  シグナリングの一環として、LTD の形成に重要な蛋白分子であると考えられてきた。

私は mGluR-LTD においても NMDAR-LTD と同様に細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が必要であることから、mGluR-LTD の形成においても CaN の活性が関与しているのではないかという仮説を立て、集合電位記録法と whole cell 記録法などの電気生理学的手法を用いて、ラット海馬 CA1 錐体細胞の mGluR-LTD における CaN の役割について検討した。

## 【結果】

1. CaN の特異的阻害剤である FK506 の存在下で NMDAR 非依存性の LTD が誘導される。  
集合電位記録法で LTD の形成を記録した。低頻度刺激 (1 Hz, 15 min) により、平均 25%前後の LTD が誘導された (Fig. 1)。この LTD は NMDAR の特異的阻害剤である D-AP5 の投与により阻害された (Fig. 2A)。ところが、FK506 (0.1%DMSO) と D-AP5 を同時に投与した状態では LTD が誘導された (Fig. 2B)。それに対して、0.1%の DMSO と D-AP5 の存在下では LTD は誘導されなかった。また、FK506 のアナログで、CaN に対する阻害作用を持っていないラパマイシンと D-AP5 を同時に投与しても LTD は誘導されなかった (Fig. 2C)。以上の結果から、FK506 の投与により CaN の活性を阻害すると、新たに NMDAR 非依存性の LTD が誘導されることが示唆された。この LTD を CaN - inhibited LTD と呼ぶ。
2. CaN - inhibited LTD の誘導はグループ 2 mGluR の活性に依存する。

グループ1/2 mGluRの阻害剤である MCPG、グループ 1 mGluRの阻害剤である AIDA 及びグループ 2 mGluRの阻害剤である EGLUを用いて、CaN - inhibited LTDへの影響を調べた。その結果、CaN - inhibited LTDの形成はグループ 2 mGluRの活性に依存していることが判明した (Fig. 3)。従って、CaNは mGluR-LTDの形成を抑制していることが示唆された。

3. *CaN - inhibited LTD* の形成における、CaNの作用部位は後シナプス側ではない。

whole cell 記録法により CaN - inhibited LTDにおける CaNの作用部位を検討した。灌流液に FK506 を投与した場合、単一の神経細胞において低頻度刺激により CaN - inhibited LTDは誘導されたが、パッチパイペットを用いて神経細胞に FK506を直接注入した場合は LTDは誘導されなかった。また、細胞膜を透過しないもう一種類の CaN阻害剤である auto inhibitory peptide を神経細胞に直接注入した場合も LTDは誘導されなかった (Fig. 4)。以上の結果から、CaN - inhibited LTDの形成における、CaNの作用部位は、後シナプス側ではないことが強く示唆された。

4. CaNはグループ 2 mGluRのアゴニストにより誘導される LTDを抑制する。

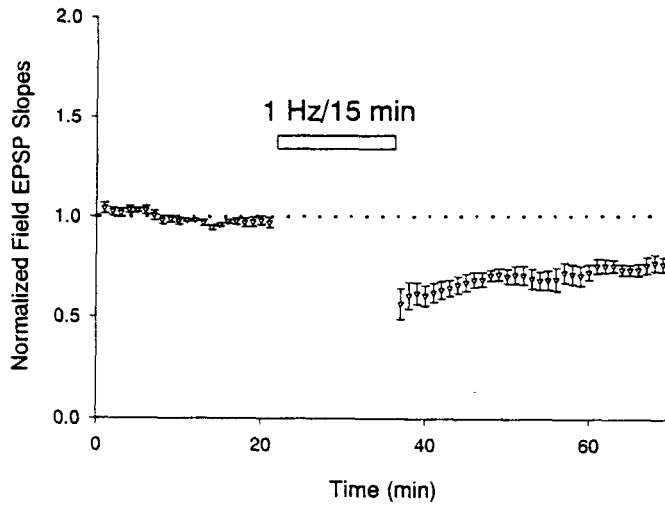
低頻度刺激を与えずに、グループ 2 mGluRのアゴニストである L-CCG-1を投与した。コントロールでは L-CCG-1を投与しても LTDは誘導されなかったが、FK506の存在下では LTDが誘導された (Fig. 5)。

5. CaNの活性は NMDAR-LTDの形成に必要である。

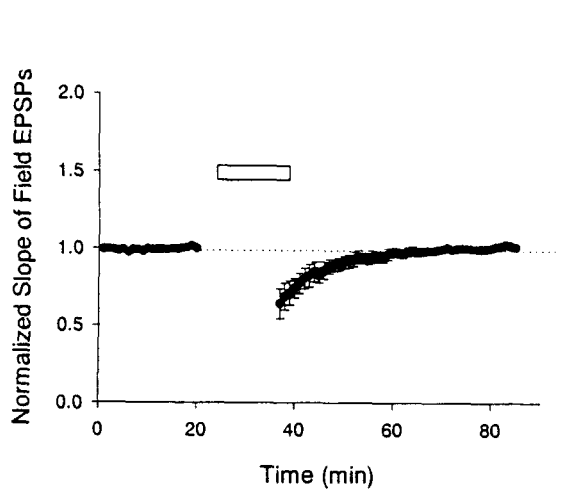
グループ1/2 mGluRの阻害剤 MCPGの存在下で、NMDAR-LTD形成への CaN阻害剤の影響を調べた。ラパマイシンはNMDAR-LTDの形成を阻害しなかったのに対し、FK506は NMDAR-LTDの形成を完全に阻害した (Fig. 6)。

## 【結論】

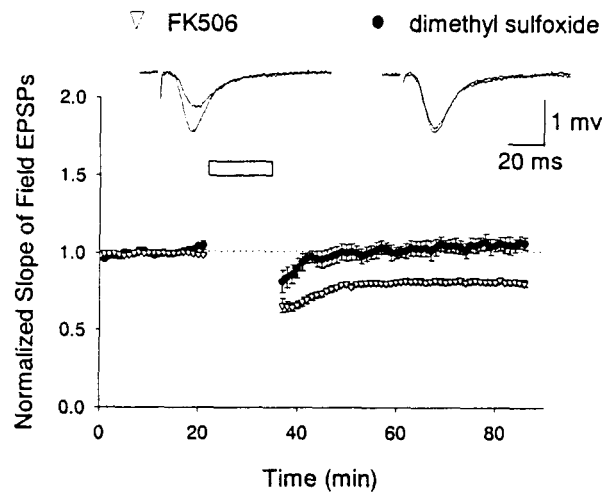
以上の結果から、CaNは海馬 CA1 神経細胞において NMDAR-LTDの形成を促進すると同時に、mGluR-LTDの形成を抑制するという二つの役割を果たしていることが示唆された。



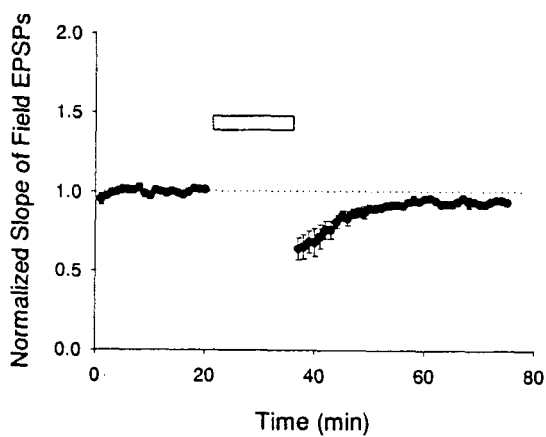
**Figure 1.** Induction of LTD by low frequency stimulation.



**Figure 2a.** D-AP5 blocked the induction of LTD.

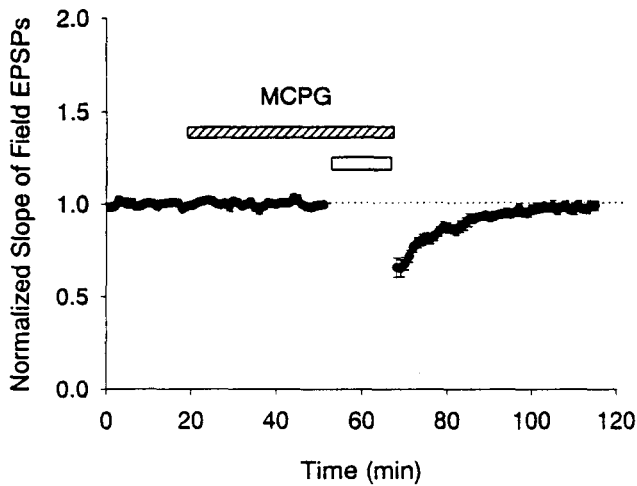


**Figure 2b.** LTD was induced in the presence of FK-506 and D-AP5.

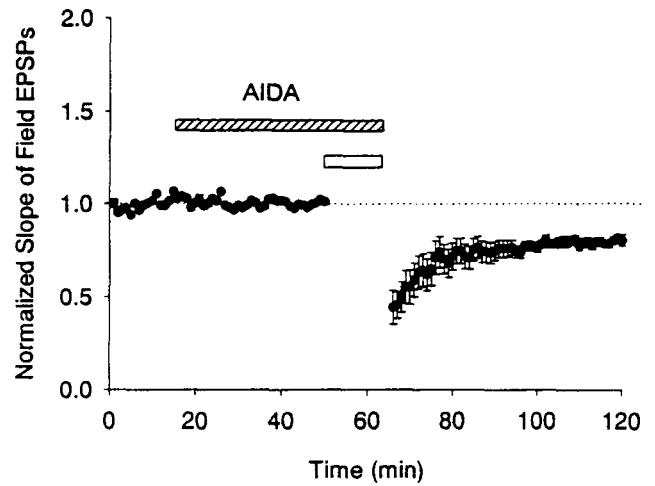


**Figure 2c.** LTD was not induced when FK-506 is replaced with rapamycin.

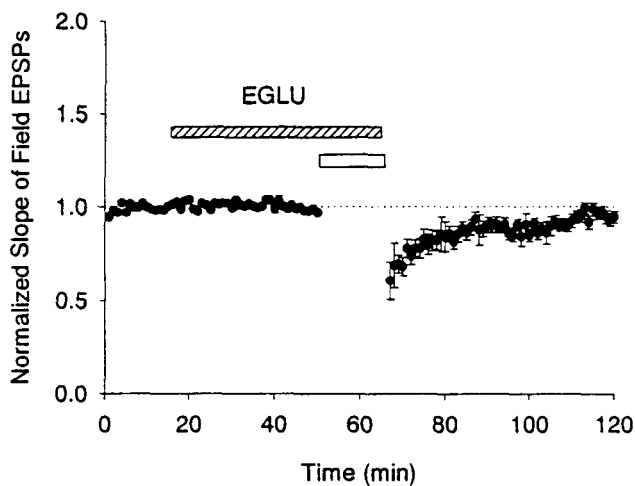
- 1) All pharmacological agents were delivered whole through recordings. Dimethyl sulfoxide was employed to examine the effect of vehicle for FK-506.
- 2) Low frequency stimulation was applied at the time shown as open bars.
- 3) Each circle and vertical bar indicates mean and standard error.



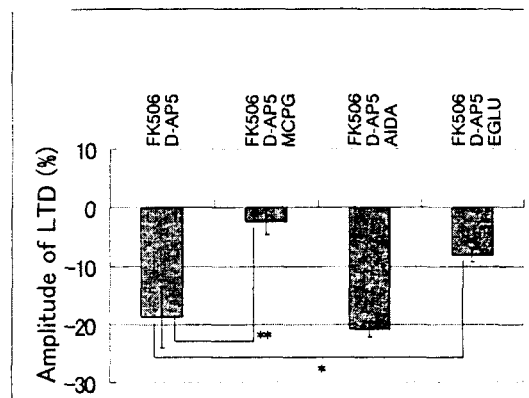
**Figure 3a.** MCPG, a blocker of metabotropic glutamate receptor, inhibited LTD induced in the presence of D-APV and FK-506.



**Figure 3b.** AIDA, a selective blocker of group 1 metabotropic glutamate receptor, did not inhibit LTD induced in the presence of D-APV and FK-506.

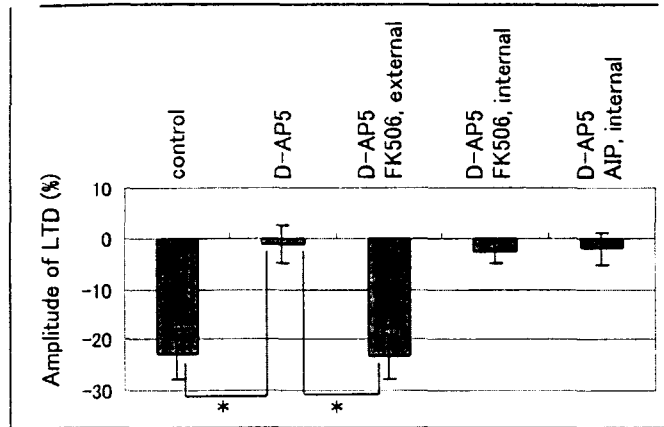


**Figure 3c.** EGLU, a selective blocker of group 2 metabotropic glutamate receptor, inhibited LTD induced in the presence of D-APV and FK-506.

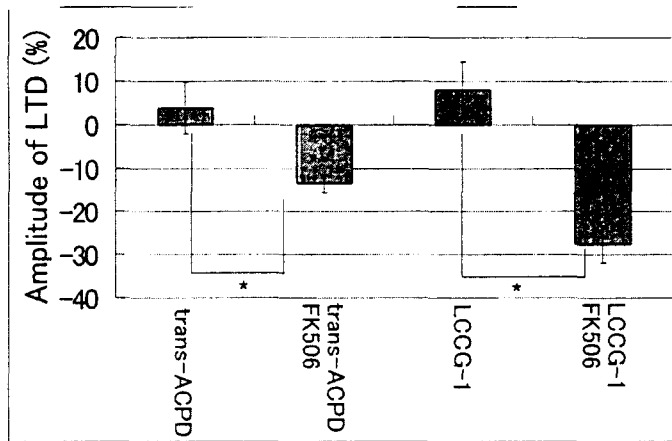


**Figure 3d.** Quantification of the effect of each pharmacological agent acting on metabotropic glutamate receptor on LTD induced in the presence of D-APV and FK-506. Symbols (\*:  $p < .05$ ; \*\*:  $p < .01$ ) indicate significant difference.

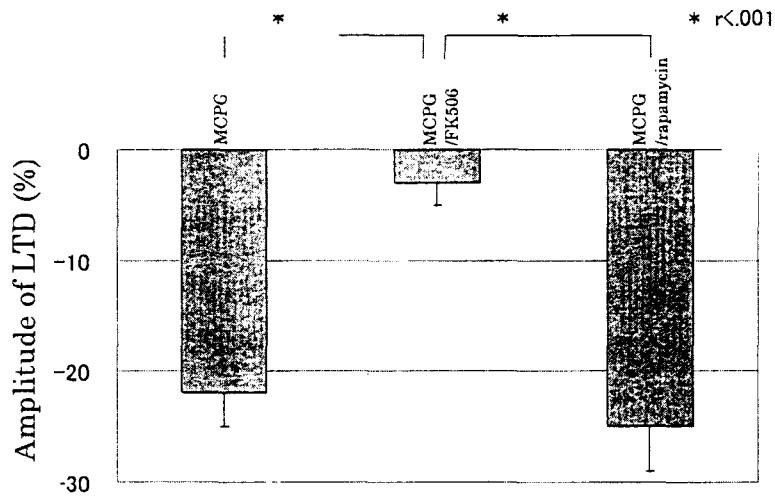
- 1) D-APV and FK-506 were delivered whole through recordings. The other compounds were applied at the time shown as hatched bars.
- 2) Low frequency stimulation was applied at the time shown as open bars.
- 3) Each circle and vertical bar indicates mean and standard error.



**Figure 4** A summary of the effect of FK-506 and AIP on LTD induced in the presence of D-AP5.



**Figure 5** A summary of the effect of agonists to metabotropic glutamate receptor on LTD induced with and without existence of FK-506.



**Figure 6** The effect of rapamycin on LTD induction was examined to confirm the effect of FK-506.