

# カルシウムと脳の可塑性

## —記憶のモデルとしての長期増強誘導の分子機構—

熊本大学医学部薬理学第一講座・教授 宮本英七  
助教授 福永浩司  
講師 山本秀幸  
助手 笠原二郎

### 要約

海馬におけるシナプス伝達効率長期増強はヒトの記憶、学習の原型である。海馬CA1領域の長期増強誘導には、後シナプス部位のNMDAグルタミン酸受容体刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が第一義的に作用している。Ca<sup>2+</sup>作用はCa<sup>2+</sup>依存性プロテインキナーゼの活性化を介し発揮されているとみなされている。長期増強誘導におけるCaMキナーゼIIの役割について研究してきた。

### キーワード

カルシウムイオン、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII、学習、記憶、長期増強誘導

### I はじめに

カルシウムはヒトの身体にとって欠かすことのできない化合物であり、牛乳はカルシウムを摂取する上に良好な栄養源である。カルシウムは身体内では、骨や歯などの硬組織にハイドロキシアパタイトの形で沈着している。身体内の1%にも満たない、イオンとして存在しているカルシウムが、細胞内外で重要な役割を演じている。とくに、細胞内のカルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) 濃度は、10<sup>-8</sup>~10<sup>-7</sup>M以下であり、細胞刺激によって10<sup>-6</sup>~10<sup>-5</sup>Mレベルに上昇するにすぎないが、細胞機能に重要な役割を演じている。

私達は、長年にわたって細胞内における低濃度のCa<sup>2+</sup>作用について研究してきた。とくに、脳においては、脳の可塑性に関与しており、ヒトの脳高次機能に密接に関わっていることが明らかにされた。

ヒトの記憶や学習の成立機構は最近の神経科学における大きな研究課題の一つであり、解明のために種々の試みがなされている。記憶、学習に関する最近の一般的に認められている考えはシナプス伝達効率の持続的増加にあるとされている。1973年、BlissとLømoが海馬において、テタヌス性電気刺激を与えるとシナプス伝達長期増強の起こることを発見して以来、長期増強が記憶、学習などの基本的モデルとみなされ、活発な研究が続いてきた。

CA1領域での長期増強の誘導機構についてはまだ議論が続いている。最初、前シナプス部位の作用に依存していると考えられ、神経伝達物質の放出素量の増大と考えられた。しかし、最近では、前シナプス部位の関与を否定していないものの、後シナプス部位のグルタミン酸のNMDA受容体刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>流入の増加が引き金となるとする仮説が大きく取り上げられてきた。細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入に続く反応としては、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII)の活性化反応が起こり、長期増強誘導へと導かれると考えられている。

本研究では、海馬CA1での長期増強誘導に細胞内Ca<sup>2+</sup>およびCaMキナーゼIIが活性化され、その分子機構に関与することが明らかになった。

## II 実験方法

### 1 海馬初代培養細胞の調製法

生後1日目のWistar系ラット脳から海馬を剔出し、機械的方法により細胞を分散させる。10%仔ウシ血清、10%ウマ血清、2% Nu血清、カナマイシン5 μM、シトシン-β-アラビノフラノシドを含む培養液中で7~8日培養する。2および6日目で仔ウシ血清を含まない培養液に置き換え、培養は37°C、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>の下で行う。

### 2 海馬切片の標本作製と電気生理学的記録

脱血後、雄Sprague-Dawleyラット(5~8週齢)の脳を取り出し、海馬を剔出した。剔出海馬をMacIlwain chopperを用いて、400 μM厚さの海馬切片を作製した。切片は、chamber内で次の組成を持つ培養液で連続灌流の下に保持した。【124mM NaCl、3mM KCl、2.5mM CaCl<sub>2</sub>、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、1.25mM NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、26mM NaHCO<sub>3</sub>、10mM glucose、2mMアスコルビン酸、pH7.4、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、34°C】

1~2時間回復期の後、Schaffer collateral/commisural 経路に2本の刺激電極を置き、Θ burst刺激を10~20秒間隔で3回行った。記録電極は、後シナプスニューロンであるCA1領域に置いた。対照実験は、低頻度刺激を与えた。Θ burst刺激によって後シナプス電位の長期増強が誘導された。低頻度刺激では長期増強の誘導を認めなかった。

長期増強後、時間的経過でCA1領域を剔出し、直ちに液体窒素で凍結した。凍結標本は使用時まで-80°Cで保存した。

### 3 CaMキナーゼII活性測定

海馬切片から得た組織を、4°Cで超音波処理によってホモジェナイズした。用いた緩衝液は0.1%トリトンX-100、50mM HEPES (pH7.4)、4mM EGTA、10mM EDTA、15mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、100mM β-glycerophosphate、25mM NaF、0.1mM leupeptin、75 μM pepstatin A、0.1 mg/ml aprotininである。不溶性物質を15,000×g、5分間遠心沈殿によって除去した。95%以上のCaMキナーゼII活性は上清分画に存在していた。CaMキナーゼII活性はシンタイド2、シナプシンIを基質として測定した。[γ-<sup>32</sup>P]

ATP (0.1mM) を用い、基質のリン酸化反応の程度を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

#### 4 免疫沈殿とCaMキナーゼII、MAP2、シナプシンIリン酸化反応の定量的測定

海馬切片を [ $^{32}$ P] 無機リン酸と30分間インキュベートした。インキュベーション後、 $\Theta$  burst刺激あるいは低頻度刺激(対照実験)を与え、[ $^{32}$ P] 無機リン酸存在下で維持した。1時間後、海馬切片標本からCA1領域を剔出して、液体窒素上で凍結した。得られた組織標本を、手動ホモジナイザー内で、50mM Tris-HCl (pH7.5)、0.5M NaCl、0.5%トリトンX-100、100mM EDTA、4 mM EGTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、30mM sodium pyrophosphate、50mM NaF、0.1% SDS、0.1mM leupeptin、75  $\mu$ M pepstatin A、0.1mg/ml aprotininを用いてホモジェナイズした。超音波処理後、15,000 $\times$ g、20分間遠心沈殿した。得られた細胞上清分画の一定量をCaMキナーゼII、シナプシンI、MAP2それぞれの抗体およびprotein A-Sepharose CL-4B懸濁液(50% v/v)と4時間インキュベートした。免疫沈殿後、SDSサンプル緩衝液で処理し、免疫沈殿物をprotein A-Sepharose CL-4Bから分離した。遠心沈殿後、上清分画の一部をSDS-PAGEによって電気泳動した。電気泳動後、オートラジオグラフィーを行い、それぞれの蛋白質のリン酸化反応の程度をバイオイメージングアナライザーで定量化した。

### III 結 果

#### 1 海馬初代培養細胞を用いたグルタミン酸受容体刺激によるCaMキナーゼII活性化反応

これまでの報告は、カルモデュリン、プロテインキナーゼ、CaMキナーゼIIなどの特異性の高い阻害剤を用いて長期増強誘導に対するCaMキナーゼIIの関与を証明してきた。阻害剤の使用には、特異性の点からどうしても間接的にならざるをえない。より直接的な方法としては、長期増強誘導に伴う酵素活性の上昇を把握することにある。

長期増強誘導とCaMキナーゼIIとの密接な関係を検索する目的で、海馬初代培養細胞を用いた実験を行った。生後1日目のラット海馬を機械的操作で細胞を分離し、7~8日間培養した後、実験に供した。グルタミン酸を投与すると、30秒以内に急激な $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン非依存性活性の上昇がみられ、調べた範囲の30分以内では、活性の上昇が維持されていた。グルタミン酸の効果は $\text{Mg}^{2+}$ を添加することにより抑制された。NMDAはグルタミン酸と同等の効果を持ち、 $\text{Mg}^{2+}$ によって阻害された。AMPAはほとんど効果をもたなかったが、カイニン酸はわずかな効果を示した。向代謝性グルタミン酸受容体刺激因子であるキスカル酸、ACPDは効果を示さなかった。作動薬の効果は、拮抗薬を用いることにより確認された。NMDA受容体拮抗薬であるAP5、CPPはグルタミン酸の効果を阻害し、非NMDA受容体阻害剤であるCNQX、向代謝性受容体阻害剤であるAP3、電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤であるニフェジピンはいずれも効果を示さなかった。これらの結果は、CaMキナーゼII活性化反応がNMDA受容体刺激を介する $\text{Ca}^{2+}$ 流入により生じていることを示している。

## 2 長期増強誘導後のCaMキナーゼII活性化反応

脳海馬切片のCA1領域に入るSchaffer線維にテタヌス性刺激を与え、CA1領域の組織をパンチアウトしてホモジェナイズ後、上清画分についてCaMキナーゼII活性を測定した。酵素活性測定反応液中には、プロテアーゼ阻害剤、PKC阻害ペプチド (PKC<sub>19-36</sub>) を添加し、CaMキナーゼIIにかなり特異的なシンタイド2を基質として測定した。得られた酵素活性は、CaMキナーゼIIそのものと考えられた。対照としては、低頻度の同じ強度の電気刺激を与えた同領域組織とした。CaMキナーゼIIの全活性 (Ca<sup>2+</sup>/CaM存在下) およびCa<sup>2+</sup>/カルモデュリン非依存性活性が対照に比較して有意に上昇した (図1)。時間的経過でみると、長期増強誘導後測定し始めた5分ではすでに最大活性が得られ、測定した60分でも活性の上昇が維持されていた (図1)。全活性、Ca<sup>2+</sup>/カルモデュリン非依存性活性の上昇は、蛋白質性基質であるシナプシンIを用いても同様に認められた。NMDA受容体阻害剤であるAP5をあらかじめ培養液中に添加しておく、と、テタヌス性刺激を与えても長期増強誘導が抑制される

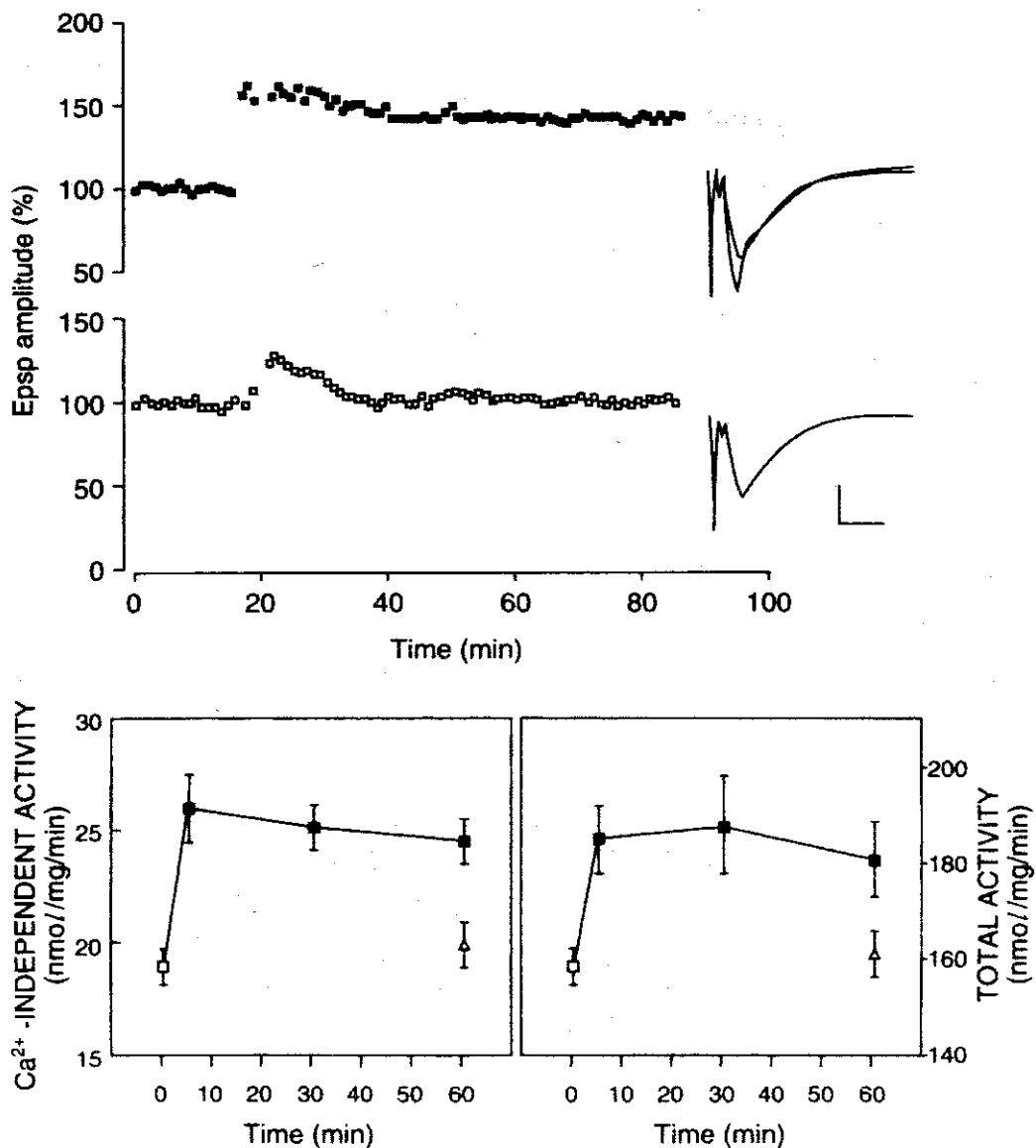


図1 長期増強誘導に伴ったCaMキナーゼII全活性およびCa<sup>2+</sup>/カルモデュリン非依存性活性の増加

とともに、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン非依存性活性の上昇もまた抑制された。

### 3 長期増強誘導時におけるCaMキナーゼII自己リン酸化反応とシナプシンIリン酸化反応の増加

図1で示したとおり、海馬CA1領域における長期増強誘導時に、錐体細胞時におけるCaMキナーゼII  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン非依存性活性の上昇が観察された。すなわち、酵素の活性化反応が伴うことがわかった。このことは、CaMキナーゼII自己リン酸化反応のおこっていることを示している。

あらかじめ、ATPプールをラベルするために、海馬切片を  $^{32}\text{P}$ 無機リン酸とインキュベートした後、 $\Theta$  burst刺激を与え、長期増強を誘導した。刺激後60分で、CA1錐体細胞部位標本を得、CaMキナーゼIIおよびシナプシンIに対する特異的抗体で免疫沈殿をした。沈殿物をSDS-PAGE処理後、オートラジオグラフィーを行った(図2)。CaMキナーゼII  $\alpha$ と $\beta$ サブユニットにとりこまれた $^{32}\text{P}$ をバ

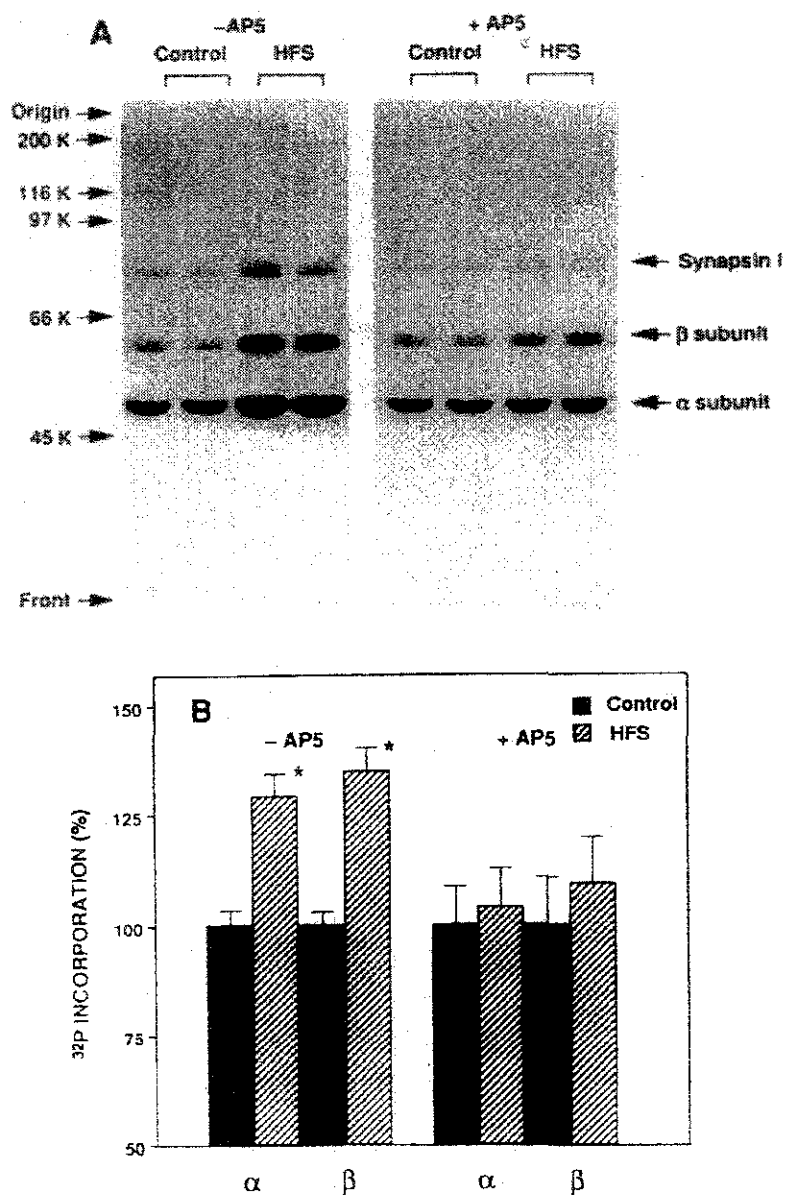


図2 長期増強誘導に伴ったCaMキナーゼII  $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニット自己リン酸化反応とシナプシンIリン酸化反応の増加

イオイメージングアナライザーで測定した。CaMキナーゼⅡ $\alpha$ と $\beta$ サブユニットへのリン酸のとりこみは、それぞれ $29 \pm 5$ 、 $35 \pm 5$ %有意に増加していた。すなわち、対照に比較して、長期増強誘導時に、CaMキナーゼⅡサブユニットの自己リン酸化反応が上昇していることを示した。

同じ実験条件下で、前シナプス領域に局在していることの知られているシナプシンⅠリン酸化反応の変化を調べた(図2)。シナプシンⅠはIaとIbのダブレットを示し、長期増強誘導時に、 $37 \pm 7$ %増加することが明らかになった。シナプシンⅠリン酸化反応の上昇は、CaMキナーゼⅡサブユニット自己リン酸化反応の上昇の程度と類似していた。

NMDAグルタミン酸受容体阻害剤であるAP5で海馬切片をあらかじめ処理しておく、 $\Theta$  burst刺激を与えても長期増強誘導を惹起させることはできなかった。さらに、同様の条件下でCaMキナーゼⅡ $\alpha$ と $\beta$ サブユニット自己リン酸化反応およびシナプシンⅠリン酸化反応を調べると、AP5の存在下に抑制された。

以上の結果は、長期増強誘導とCaMキナーゼⅡ自己リン酸化反応、シナプシンⅠリン酸化反応が密接に相関していることを示している。

後シナプスニューロンに局在の知られているMAP2リン酸化反応の変化を調べた(図3)。長期増強誘導時に、MAP2リン酸化反応が $27 \pm 5$ %、有意に増加することがわかった。図2Bには、シナプシンⅠとMAP2リン酸化反応に関し、データを統計的処理した結果を示している。両蛋白質のリン酸化反応ともに、AP5の存在下でその増加が抑制された。

シナプシンⅠはN末端部位とC末端部位がそれぞれcAMPキナーゼとCaMキナーゼⅡによってリン酸化されることが知られている。シナプシンⅠリン酸化反応がどの部位におこっているかを調べた。シナプシンⅠは黄色ブドウ状球菌から得たV8プロテアーゼで処理すると、それぞれ分子量10,000と30,000のsiteⅠ(N末端部位)とsiteⅡ(C末端部位)が得られる。このようにして得られたsiteⅠとsiteⅡへのリン酸のとりこみを調べると、それぞれ約10%と90%であることが示され、長期増強誘導時におけるシナプシンⅠリン酸化反応はCaMキナーゼⅡによることが明らかにされた。

#### 4 CaMキナーゼⅡ自己リン酸化反応、シナプシンⅠ、MAP2リン酸化反応に対するカルミダゾリウムの効果

長期増強誘導時における、カルモデュリン拮抗剤であるカルミダゾリウムのCaMキナーゼⅡ自己リン酸化反応、シナプシンⅠ、MAP2リン酸化反応に対する効果を調べた(図4)。カルミダゾリウムで海馬切片を処理すると、長期増強誘導が阻害された(図4B)。このような条件下で、CaMキナーゼⅡ $\alpha$ と $\beta$ サブユニット自己リン酸化反応、シナプシンⅠ、MAP2リン酸化反応は有意に阻害された(図4C)。

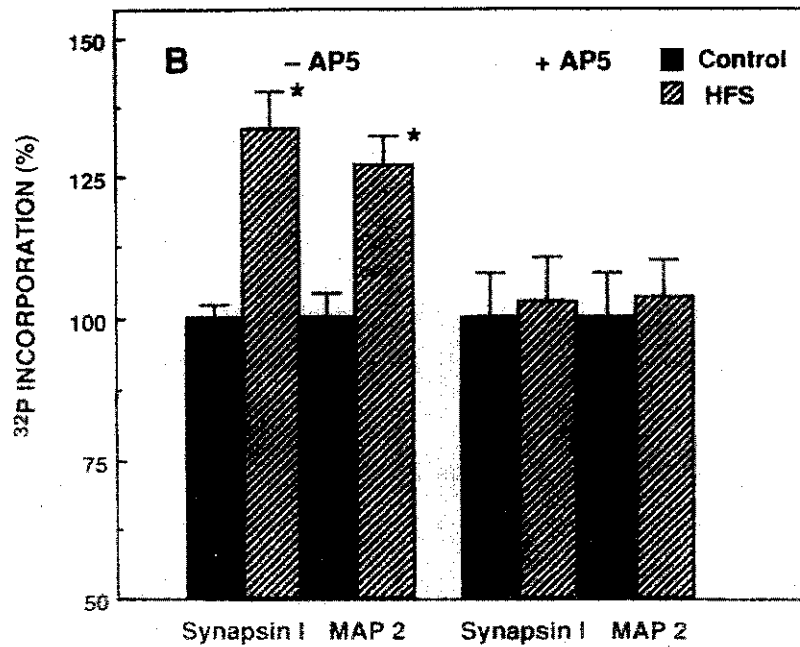
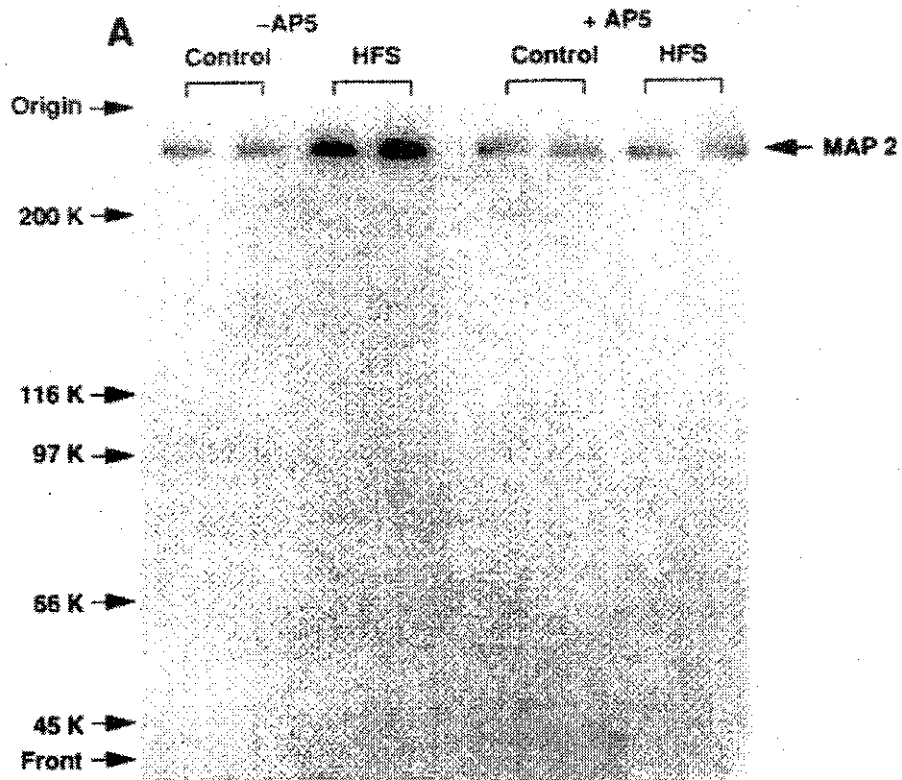


図3 長期増強誘導に伴ったシナプシン I とMAP 2 リン酸化反応の増加

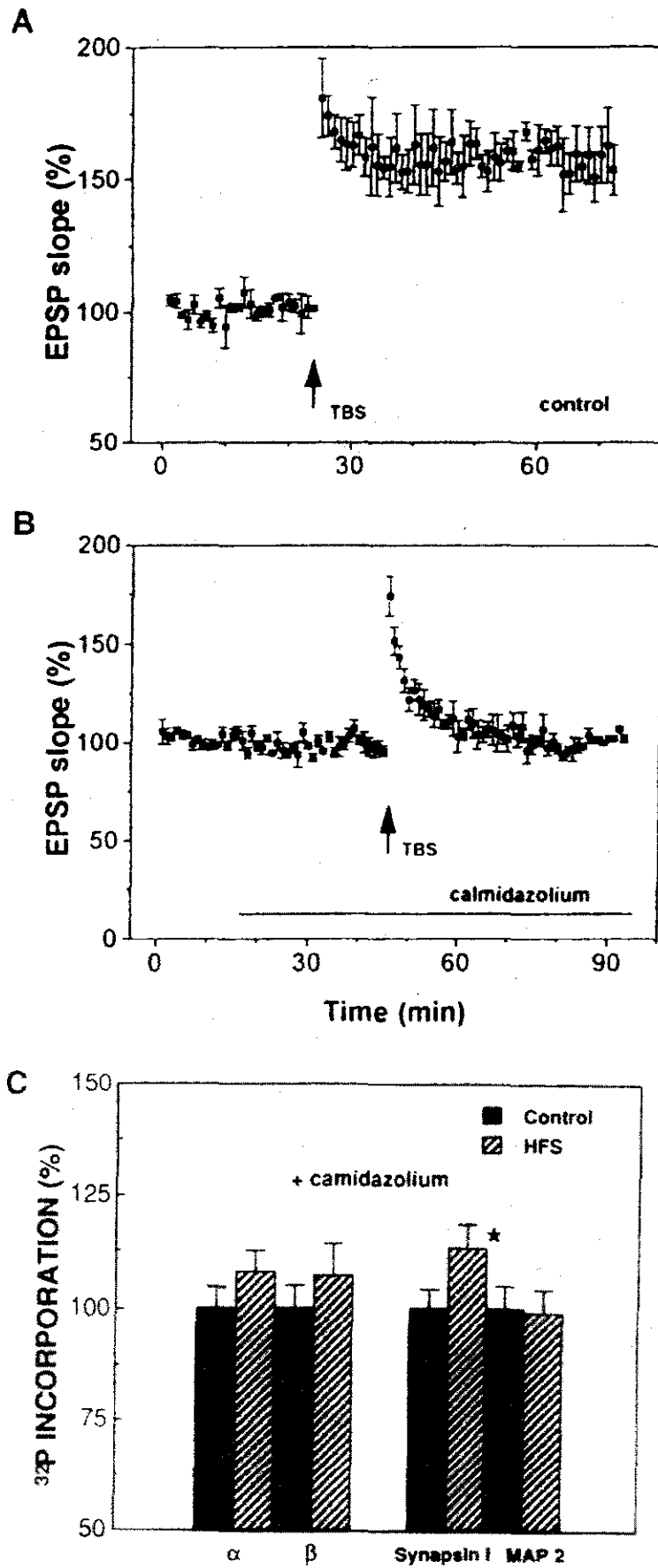


図4 長期増強誘導、CaMキナーゼII自己リン酸化反応、シナプシンIとMAP2リン酸化反応に対するカルミダゾリウムの効果



## IV 考 察

海馬CA1領域における長期増強誘導時にCaMキナーゼII活性化反応、自己リン酸化反応、基質としてシナプシンI、MAP2のリン酸化反応の増加が観察された。これらの刺激に反応したリン酸化反応の増強は、NMDAグルタミン酸受容体を介していることが明らかになった。対照実験である低頻度刺激ではおこらなかったことから、長期増強に特異的反応であると考えられた。カルモデュリン拮抗剤であるカルミダゾリウムを用いた実験から、シナプシンI、MAP2リン酸化反応が活性化されたCaMキナーゼIIによって惹起されていることが示唆された。

MAP2は後シナプスニューロンに局在することの知られた蛋白質であることから、後シナプスニューロンに存在する他の蛋白質がリン酸化されることが考えられた。最近、AMPA受容体がCaMキナーゼIIによってリン酸化され、グルタミン酸に対する反応性が上昇することを報告されたことから、長期増強誘導時にAMPA受容体がCaMキナーゼIIによってリン酸化されることが示唆され、事実、その後の研究でAMPA受容体リン酸化反応が明らかにされた。一方、前シナプスニューロンに局在することが知られているシナプシンIがリン酸化されることは、前シナプスニューロンの活性化反応がおこっていることを示し、長期増強誘導時にグルタミン酸放出を促進する反応が前シナプスニューロン内に惹起されていることを示唆している。実際、シナプシンIリン酸化反応そのものが直接的に、開口分泌を促進していることが十分に考え得る反応である。すなわち、シナプス小胞に結合しているシナプシンIは、CaMキナーゼIIリン酸化反応によってその結合が解除され、シナプス小胞の膜への移行を可能にすることが知られているからである。

長期増強誘導によって、CaMキナーゼII自己リン酸化反応がおこるだけでなく、 $\beta$ サブユニット蛋白質量の増加が観察された。このことは、以前に私達の研究で、長期増強誘導時に $\text{Ca}^{2+}$ /カルモデュリン依存性活性（全活性）の上昇を報告した結果と一致している所見と考えられる。

## 文 献

- 1) K. Fukunaga, D. Muller, M. Ohmitsu, E. Bako, A.A. DePaoli-Roach and E. Miyamoto: Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.*, **74**, 807-817 (2000)
- 2) J. Kasahara, K. Fukunaga and E. Miyamoto: Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.*, **59**, 594-600 (2000)
- 3) N. Ogata, H. Yamamoto, K. Kugiyama, H. Yasue and E. Miyamoto: Involvement of protein kinase C in superoxide anion-induced activation of nuclear factor- $\kappa$ B in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, **45**, 513-521 (2000)
- 4) K. Fukunaga, M. Ohmitsu, E. Miyamoto, T. Sato, M. Sugimura, T. Uchida and Y. Shirasaki:

- Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by 3-[2-[4-(3-chloro-2-methylphenyl)-1-piperazinyl] ethyl]-5, 6-dimethoxy-1-(4-imidazolylmethyl)-1H-indazole dihydrochloride 3.5 hydrate (DY-9760e), a novel neuroprotective agent, *in vitro* and in cultured neuroblastoma cells *in situ*. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 693-699 (2000)
- 5) H. Kanasaki, K. Fukunaga, K. Takahashi, K. Miyazaki and E. Miyamoto: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase activation in bromocriptine-induced apoptosis in rat pituitary GH 3 cells. *Biol. Reprod.*, **62**, 1486-1494 (2000)
  - 6) Y. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Miyakawa and E. Miyamoto: Increase of brain-derived neurotrophic factor gene expression in NG108-15 cells by the nuclear isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.*, **74**, 1913-1922 (2000)
  - 7) Y. Takeuchi, H. Yamamoto, K. Fukunaga, T. Miyakawa and E. Miyamoto: Identification of the isoforms of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in rat astrocytes and their subcellular localization. *J. Neurochem.*, **74**, 2557-2567 (2000)
  - 8) H. Tabuchi, H. Yamamoto, K. Matsumoto, K. Ebihara, Y. Takeuchi, K. Fukunaga, H. Hiraoka, Y. Sasaki, M. Shichiri and E. Miyamoto: Regulation of insulin secretion by overexpression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in insulinoma MIN 6 cells. *Endocrinology*, **141**, 2350-2360 (2000)
  - 9) T. Kimura, H. Yamamoto, J. Takamatsu, T. Yuzuriha, E. Miyamoto and T. Miyakawa: Phosphorylation of MARCKS in Alzheimer disease brains. *Neuroreport*, **11**, 869-873 (2000)
  - 10) I. Munir, K. Fukunaga, H. Kanasaki, K. Miyazaki, T. Ohba, H. Okamura and E. Miyamoto: Expression of cyclo-oxygenase 2 by prostaglandin E2 in human endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1B. *Biol. Reprod.*, **63**, 933-941 (2000)
  - 11) S. Ohmori, N. Sakai, Y. Shirai, H. Yamamoto, E. Miyamoto, N. Shimizu and N. Saito: Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C-kinase substrate. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26449-26457 (2000)
  - 12) N. Inagaki, M. Nishizawa, N. Arimura, H. Yamamoto, Y. Takeuchi, E. Miyamoto, K. Kaibuchi and M. Inagaki: Activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II within post-synaptic dendritic spines of cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, **275**, 27165-27171 (2000)
  - 13) T. Moriya, Y. Kouzu, S. Shibata, H. Kadotani, K. Fukunaga, E. Miyamoto and T. Yoshioka: Close linkage between calcium/calmodulin kinase II  $\alpha/\beta$  and NMDA-2A receptors in the lateral amygdala and significance for retrieval of auditory fear conditioning. *Eur J. Neurosci.*, **12**, 3307-3314 (2000)
  - 14) Y. Sakata, T. Masuyama, K. Yamamoto, N. Nishikawa, H. Yamamoto, H. Kondo, K. Ono, K. Otsu, T. Kuzuya, T. Miwa, H. Takeda, E. Miyamoto and M. Hori: Calcineurin inhibitor attenuates left

- ventricular hypertrophy, leading to prevention of heart failure in hypertensive rat. *Circulation*, **102**, 2269-2275 (2000)
- 15) 福永浩司、宮本英七：海馬における神経活動依存性シナプス伝達効率の調節。蛋白質核酸酵素、増刊「神経回路形成と機能発達」(編集：津本忠治、村上富士夫、小幡邦彦、吉岡亨、川合述史)、**45**、474-482 (2000)
- 16) 宮本英七、佐藤真一、浅野敏雄、上畑雅義：プロテインキナーゼ阻害薬からの開発。蛋白質核酸酵素、増刊「最先端創薬—戦略的アプローチと先端的医薬品」(編集：長尾拓、成宮周、加藤隆一、宮本英七)、**45**、845-851 (2000)
- 17) 宮本英七：脳の可塑性—学習、記憶の分子機構—。加齢医学研究所雑誌、**51**、85-92 (2000)
- 18) 宮本英七、佐藤真一、浅野敏雄、上畑雅義：プロテインキナーゼ阻害薬からの開発。最先端創薬—戦略的アプローチと先端的医薬品 (編集：長尾拓、成宮周、加藤隆一、宮本英七)、845-851 (2000)、共立出版、東京