

## 線条体シナプス可塑性の分子機構のシミュレーション研究

中野 高志<sup>†‡</sup> 土居 智和<sup>‡</sup>  
吉本 潤一郎<sup>†‡</sup> 銅谷 賢治<sup>†‡b</sup>

<sup>†</sup> 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 〒 630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5  
<sup>‡</sup> 沖縄科学技術大学院大学先行研究 〒 904-2234 沖縄県うるま市州崎 12-22  
<sup>‡</sup> 大阪バイオサイエンス研究所 〒 565-0874 大阪府吹田市古江台 6-2-4  
<sup>b</sup> ATR 脳情報研究所 〒 619-0288 京都府相楽郡精華町光台 2-2-2

### 概要

大脳基底核線条体はドーパミンの投射を受けており、その強度によって大脳皮質と線条体間のシナプス伝達効率調節される。本研究では、このシナプス可塑性を実現している細胞内シグナル伝達機構を解明するために、その動力学モデルを構築し、様々な条件下における細胞の応答をシミュレーションによって予測した。また、そのモデルが持つ力学的特性の解析を行った。その結果、PKA および DARPP-32 がドーパミンおよびカルシウム依存性シナプス可塑性において必須の分子であり、特に、CK1-Cdk5-D75 経路はカルシウム依存シナプス長期減弱に、PP2A-D75 経路が長期増強に重要な役割を果たしていることが分かった。

## A simulation study of molecular mechanisms for striatal synaptic plasticity

TAKASHI NAKANO<sup>†‡</sup>, TOMOKAZU DOI<sup>‡</sup>, JUNICHIRO YOSHIMOTO<sup>†‡</sup>  
and KENJI DOYA<sup>†‡b</sup>

<sup>†</sup> Nara Institute of Science and Technology 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0192  
<sup>‡</sup> Okinawa Institute of Science and Technology 12-22 Suzaki, Uruma, Okinawa 904-2234  
<sup>‡</sup> Osaka Bioscience Institute 6-2-4 Furuedai, Suita, Osaka 565-0874  
<sup>b</sup> ATR Computational Neuroscience Laboratories 2-2-2 Hikaridai, Seika, Souraku, Kyoto 619-0288

### Abstract

The plasticity of cortico-striatal synapses is regulated by dopamine, glutamate and post-synaptic activation. We built an intracellular signaling cascade model in order to examine the dynamic mechanisms of cortico-striatal synaptic plasticity. According to our simulation results, bidirectional synaptic plasticity was reproduced well and molecular mechanisms of striatal synaptic plasticity was clarified. We conclude that PKA and DARPP-32 are essential for Ca- and DA-dependent cortico-striatal synaptic plasticity. Especially, the activation of CK1-Cdk5-D75 pathway is important for Ca-dependent LTD and the activation of PP2A-D75 pathway is important for Ca-dependent LTP.

### 1. はじめに

線条体での可塑性は大脳皮質からのグルタミン酸投射と黒質からのドーパミン投射によって調節されている。この可塑性は、ドーパミンという神経修飾物質が関わっている点で海馬や小脳で見られる可塑性と異なる。皮質線条体シナプスの可塑性は、Calabresi ら<sup>6)</sup>により初めて報告されて以来様々な報告がなされているが、未だ統一的な理解が得られていない。

本研究では線条体におけるシナプス可塑性を理解するためにそれを直接的に引き起こしている細胞内分

子間のシグナル伝達に注目する。ドーパミンおよびグルタミン酸は細胞膜の受容体に結合すると細胞内にシグナルを伝え、最終的に受容体の修飾や、その合成に関わる遺伝子発現を引き起こす。線条体シグナル伝達経路の大きな特徴として DARPP-32 (Dopamine and cAMP Regulated PhosphoProtein of molecular weight 32 kDa) の存在があげられる。この分子は線条体に特徴的に発現しているタンパク質であり、グルタミン酸シグナルとドーパミンシグナルの両方のシグナルを統合する役割を果たしていると考えられている<sup>35)</sup>。しかしながら、DARPP-32 がシナプス可塑性

にどのように関与するのかその仕組みの詳細はまだ明らかにされていない。また細胞内シグナル伝達経路は複雑なネットワークを形成しているため、生化学実験のみからシグナル分子間の相互作用を包括的に理解することは困難である。そこでこれまで得られている実験的知見をもとにシグナル伝達経路の動力学モデルを構築し、計算機シミュレーションによる力学的解析を通してその相互作用をシステムとして理解しようという流れができつつある。このようなモデル研究は小脳や海馬などの他の部位のシナプス可塑性では報告されているものの<sup>22)12)</sup>、線条体に関しては Le Novère<sup>13)</sup> と Kotaleski<sup>23)</sup> による先行研究が二例あるのみであり、それらは DARPP-32 などの活性変化のモデル化にとどまり、シナプス可塑性までを含むものではない。そこで、本研究では、受容体のリン酸化によるシナプス可塑性までを含めた線条体におけるシグナル伝達経路の動力学モデルを構築し、そこで実現されていると考えられる細胞内メカニズムについて調べた。

## 2. 線条体シナプス可塑性

線条体は主にグルタミン酸とドーパミンの二種類の投射を受けている。これらの二つの入力はそれぞれ一つのスパインに投射され、皮質線条体シナプス可塑性を調節している。線条体におけるシナプス可塑性はドーパミン入力に大きく依存しており、この点で大脳皮質や海馬、小脳でのシナプス可塑性と異なる。

### 2.1 ドーパミン依存シナプス可塑性

初めて線条体のシナプス可塑性を調べた Calabresi<sup>1)</sup>によると、皮質線条体線維にテタヌス刺激のみを与えたときは長期抑圧 (LTD) がおきる<sup>3)6)11)</sup>。しかし Wickens<sup>2)</sup>らは、テタヌス刺激にあわせて黒質への刺激強度を増やしていくと、黒質の自発発火レベルで可塑性は起きなくなり、さらに刺激を強くすると長期増強 (LTP) がみられるようになることを示した<sup>29)30)31)36)</sup>。つまり、グルタミン酸によって LTD が起き、そこにドーパミン入力が増えるとその強度に応じて LTP が起きる。また、ドーパミンを枯渇するとシナプス可塑性がみられなくなる<sup>6)</sup>。これらをまとめるとドーパミン依存性のシナプス可塑性は図 1 のように表される。

### 2.2 カルシウム依存シナプス可塑性

線条体では外液から  $Mg^{2+}$  を除去した  $Mg^{2+}$ -free 条件でグルタミン酸刺激を与える実験を行ったところ LTP が生じると報告されている<sup>4)7)8)</sup>。また、線条体は大脳皮質から無数の入力を受けており、それによって膜電位は -85 mV (down state) から -60 mV (up state) くらいの間を 1Hz 程度の低い頻度で振動して

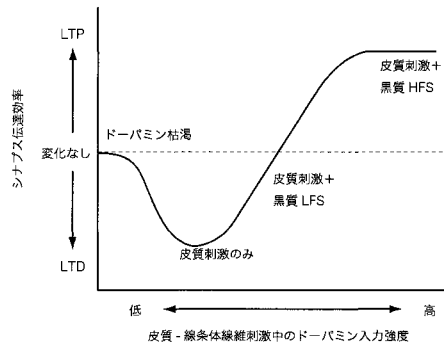


図 1 ドーパミン依存シナプス可塑性 (31) より改変。

いる。普段 NMDA 型グルタミン酸受容体 (以下 NMDAR) をブロックしている  $Mg^{2+}$  が、Up state になると外れやすくなり、NMDAR から  $Ca^{2+}$  が流入しやすくなる。また、皮質への高頻度刺激は LTP を誘因し、低頻度刺激では LTD を誘因する。

Up state にあわせてグルタミン酸刺激を与えると LTP が起こりやすく、Spencer<sup>3)</sup>の実験では皮質線条体への刺激によって、その 38% のニューロンは LTP が起こっていることが報告されている<sup>1)9)10)34)</sup>。

このように線条体シナプス可塑性は前シナプス細胞と後シナプス細胞の活動に依存するが、これらは結局イオンチャネル共役型グルタミン酸受容体、代謝型グルタミン酸受容体、電位依存性カルシウムチャネルを介した細胞内カルシウム濃度の変化として考えることができ、弱いカルシウム増加だと LTD が、強いカルシウム増加だと LTP が起こる、と図 2 のように単純化することができる。

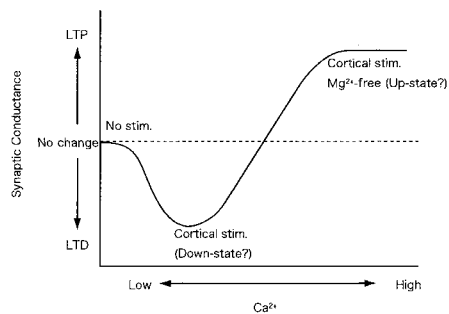


図 2 カルシウム依存シナプス可塑性。カルシウム入力強度に応じてシナプス可塑性の変化の方向が変わる。

本研究ではドーパミンとカルシウムに依存したシナプス可塑性に焦点をあてて、線条体シナプス可塑性の

分子機構を解明することを目標とした。

### 3. 細胞内シグナル伝達経路モデル

#### 3.1 線条体細胞内シグナル伝達経路

図3は、線条体シグナル伝達経路を推定した文献<sup>15)16)17)18)28)</sup>を基に、本研究でモデル化した線条体中型有棘細胞内のシグナル伝達経路のプロック線図である。

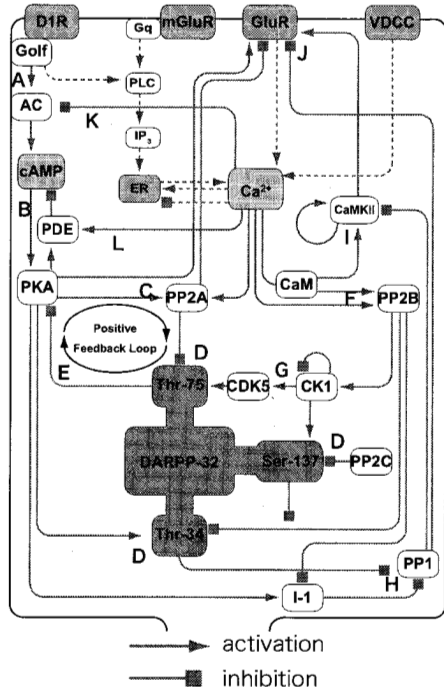


図3 線条体細胞内シグナル伝達経路モデル。通常矢印は活性、終点が四角の矢印は抑制の作用を表す。グルタミン酸はグルタミン酸受容体に結合し細胞内カルシウム濃度を上昇させる。ドーパミンはドーパミン受容体を介して cAMP 濃度を变化させる。カルシウムと cAMP はこれらのシグナル伝達経路を介して最終的に細胞膜上の AMPAR の個数を変化させることでシナプス伝達効率を変化させている。点線は本研究ではモデル化していない経路を表す。

線条体中型有棘神経細胞が投射を受けている主要な神経伝達物質は、グルタミン酸とドーパミンである。ドーパミンはドーパミン受容体と G タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼ (AC: Adenylyl Cyclase) の活性を高める (図3A)。AC は ATP を分解しサイクリック AAMP(cAMP) を産生しているため、ドーパミンによって細胞内の cAMP 濃度が高まる。

cAMP は PKA (cAMP-dependent protein ki-

nase) を活性化し (図3B)、PKA は DARPP-32 の Thr-34 残基をリン酸化する (図3D)。Thr-34 がリン酸化された DARPP-32 は PP1 (Protein Phosphatase 1) と結合し、PP1 活性を抑制する (図3H)。また PKA は PP2A (Protein Phosphatase 2A) を活性化する (図3C)。活性化した PP2A は DARPP-32 の Thr-75 残基を脱リン酸化する (図3D)。Thr-75 がリン酸化された DARPP-32 は PKA と結合し PKA 活性を抑制しているため、PP2A によって脱リン酸化されると抑制が弱まり、PKA 活性が高まる。このように PKA と PP2A と DARPP-32 はポジティブフィードバックループを形成している (図3E)。

グルタミン酸はイオン透過型グルタミン酸受容体 (AMPA, NMDAR) および G タンパク共役型グルタミン酸受容体 (mGluR) に結合し、細胞内の  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させる。また細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は電位依存性カルシウムチャネル (VDCC) によって膜電位の上昇によっても増加する。 $Ca^{2+}$  は PP2A, PP2B および CaM を活性化する (図3F)。PP2B は DARPP-32 の Thr-34 残基および I-1 (Inhibitor-1) を脱リン酸化し、それによって PP1 の活性を高める (図3H)。また PP2B は CK1 を活性化する。CK1 は DARPP-32 の Ser-137 をリン酸化し (図3D)、同時に Cdk5 を活性化する (図3G)。Cdk5 は DARPP-32 の Thr-75 をリン酸化している (図3D)。CaMKII は CaM によって活性化するが、PP1 によって抑制される (図3I)。

また、 $Ca^{2+}$  はドーパミンシグナルを阻害する。線条体に発現している AC のサブタイプ AC5 はカルシウムによって阻害されやすく、 $Ca^{2+}$  と結合すると cAMP 産生が抑制される (図3K)。また PDE (Phosphodiesterase) は CaM および PKA によって活性化し、cAMP を AMP に分解する (図3L)。

これらのシグナル伝達経路は最終的に AMPAR を調整する (図3J)。PKA, CaMKII は AMPAR をリン酸化し、PP2A, PP2B は脱リン酸化する。リン酸化された AMPAR は細胞質から細胞膜に輸送され、逆に脱リン酸化された AMPAR は細胞質に輸送される。

なお、線条体の中型有棘細胞には D1 ニューロン、D2 ニューロンの二種類があるが、簡単のため、本研究では D1 型ドーパミン受容体を発現している D1 ニューロンのみを対象にした。

CaM, PP2B, CaMKII, PP1, PKA, PDE のモデルは、シグナル伝達系の動力学モデルのデータベースである DOQCS database<sup>32)</sup> のモデルを用いた。

## 4. シミュレーション結果

### 4.1 モデルへの入出力

モデルへのドーパミンの入力は1秒間の矩形波とした。ドーパミン濃度は静止状態で10 nM, 興奮時で最大5  $\mu$ Mとした<sup>14)21)</sup>。線条体へのグルタミン酸の入力は、簡潔さのためにグルタミン酸受容体の下流の細胞内セカンドメッセンジャーであるカルシウム濃度変化によって表現するものとした。カルシウム入力も1秒間の矩形波とした。カルシウム濃度は静止状態で0.06  $\mu$ Mとした<sup>21)</sup>。皮質線条体線維にテタヌス刺激を与えたときの細胞内カルシウム濃度を計測した実験をもとに、興奮時のカルシウム濃度は10  $\mu$ Mとした<sup>2)</sup>。本研究では全てのシミュレーションにおいて、これらの入力は同時に与えた。

シナプス伝達効率の増減は主に細胞膜上のグルタミン酸受容体の数の増減によって決まる。シミュレーションでは、モデルに含まれる細胞膜上のAMPARの数は、シグナル伝達の結果として決まるものとし、それ以外の受容体の数は固定されているものとした。したがって、シナプス伝達効率の変化であるシナプス可塑性は細胞膜上のAMPARが入力刺激前に比べて入力刺激後10分の時点でどれだけ増減したかの倍率によって評価されるものとした。

### 4.2 シグナル伝達経路の応答

まず、4通りのカルシウムのドーパミンの入力条件(1. 1  $\mu$ Mのカルシウム入力, 2. 1  $\mu$ Mのカルシウムと5  $\mu$ Mのドーパミンの同時入力, 3. 10  $\mu$ Mのカルシウム入力, 4. 5  $\mu$ Mのドーパミン単体の入力)のもとで細胞内分子の時間変化をシミュレーションした。図4と5はそのシミュレーション結果を示したものである。

ドーパミン入力はcAMPの濃度を増加させる(図4(a))。しかし強いカルシウム入力ではアデニル酸シクラーゼが阻害され、またPDEによるcAMPの分解が促進されるのでcAMP濃度は減少する。

PKAはcAMPによって活性化するが、強いカルシウム入力によっても活性化する(図4(b))。この活性化機構については後述する。

PP2AはこのPKAの活性をうけて活性化する。またPP2Aは強いカルシウム入力に対して強く反応する(図4(c))。

カルシウム入力はCaMを介してPP2Bを活性化する(図4(d))。PP2Bの活性はカルシウム入力によって顕著に大きくなる。

PKAとPP2Bによって調節されているのが

DARPP-32のThr-34残基で、ドーパミン入力によってリン酸化レベルが増加する。カルシウム入力はPP2B活性を介してThr-34の脱リン酸化を引き起こす。その影響はドーパミン入力によるリン酸化の影響に比べて強い(図5(a))。

また、PP2BはCK1を活性化し(図4(e))、CK1はCdk5を活性化する(図4(f))。両者ともカルシウム入力によって活性化されるが、ドーパミン入力の影響を受けない。

ドーパミン入力はPKA-PP2A経路によってDARPP-32のThr-75残基のリン酸化レベルを下げる。カルシウム入力の影響はその強度によって違い、弱いカルシウム入力はリン酸化レベルを上昇させるが、強いカルシウム入力はリン酸化レベルを減少させる(図5(b))。この分子機構については次節で詳しく述べる。

PP1の活性はカルシウム入力によって上昇する(図4(g))。ドーパミン入力によって活性が低下しているのは、ドーパミンシグナリングによるDARPP-32のThr-34およびI-1のリン酸化によって、PP1が阻害されるためである。

カルシウム入力の影響をうけるタンパク質としてCaMKIIがある。CaMKIIの活性は強いカルシウム入力によって劇的に上昇するが、それ以外の入力ではあまり活性化しない(図4(h))。

### 4.3 生化学実験との整合性

Nishiらの実験<sup>26)</sup>ではドーパミンはThr-34のリン酸化レベルを増加させるが10分後には元に戻る。Thr-75のリン酸化レベルは減少する。モデルではドーパミンを与えると(図5細線)、Thr-34のリン酸化レベルは上昇し、Thr-75のリン酸化レベルは低下する。これらの結果は実験に一致している。

ドーパミンを与えたときのcAMP濃度の変化(図4(a))は数百秒のオーダーで減衰していく。Hempelらのロブスターを用いた実験ではcAMP濃度は時定数300s程度で指数減衰する<sup>20)</sup>。

また、Nishiらはカルシウムシグナリングを刺激したときのDARPP-32のリン酸化レベルの変化を調べた実験を行っている。それによれば、グルタミン酸投与では、Thr-34のリン酸化レベルは急激に立ち上がったあといったん静止状態よりも低くなってから静止状態に戻る。Thr-75のリン酸化レベルは低下するが10分程度で元に戻る<sup>27)</sup>。

mGluRアゴニストを与えた実験では、Thr-75、Ser-137およびCDK5の活性は上昇するが、2分時点をピークに静止状態に戻っていく<sup>24)</sup>。

またAMPA、NMDAを与えた実験ではThr-34お

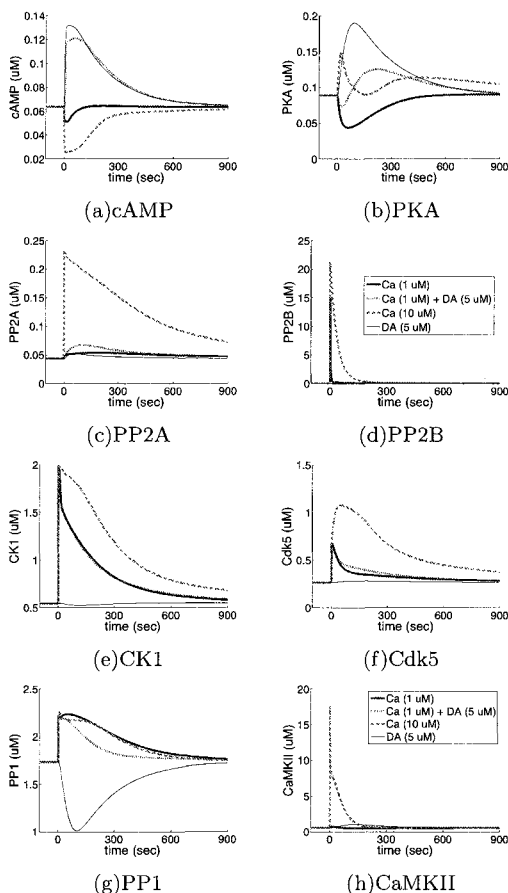


図4 各分子の活性の時系列変化。実線が1  $\mu\text{M}$  のカルシウム入力、点線がカルシウム1  $\mu\text{M}$  とドーパミン5  $\mu\text{M}$  の同時入力、破線がカルシウム10  $\mu\text{M}$  の入力、細線はドーパミン5  $\mu\text{M}$  のみの入力を与えたときの各分子活性の時系列変化。それぞれ0秒時点で入力を与えた。(a)~(h)は各シグナル分子の活性変化。

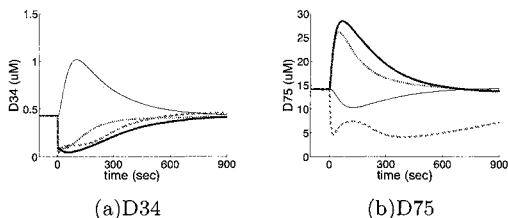


図5 DARPP-32のリン酸化レベルの時系列変化。D34およびD75はそれぞれDARPP-32のThr-34およびThr-75残基がリン酸化されている総数を表す。各線種は図4のカルシウム、ドーパミンの入力条件に対応している。

よびThr-75のリン酸化レベルは5分以内に低下する<sup>25)</sup>。

本研究では、これらの刺激をカルシウム入力と考え、グルタミン酸投与によるThr-34のリン酸化レベルの急激な立ち上がりを除けば、実験に合致している。

また、Thr-75に関してはカルシウムシグナリングの刺激によって、リン酸化レベルの変化の方向が逆になる、という実験結果が得られている。これは実験におけるmGluRアゴニスト投与とグルタミン酸投与を、それぞれシミュレーション上での弱いカルシウム入力、強いカルシウム入力に対応づけられると仮定すると、図5(b)のように、モデルでも再現することができた。この両方向の変化はカルシウム濃度によるCdk5とPP2Aの活性変化のバランスによるものと推測される(図6)。Cdk5は比較的低レベルのカルシウムでも活性化するが、PP2Aは高レベルのカルシウム入力で活性を高める。つまり、弱いカルシウム入力ではカルシウム-PP2B-CK1-Cdk5という経路によってThr-75のリン酸化レベルは増加する。一方強いカルシウム入力ではカルシウム-PP2Aという経路によってThr-75は脱リン酸化されることが分かる。

他にも図5(a)の細線と点線を比較すると、カルシウムがあるとドーパミンによるThr-34の活性が抑えられるということが分かる。これは実験結果に一致する<sup>33)</sup>。

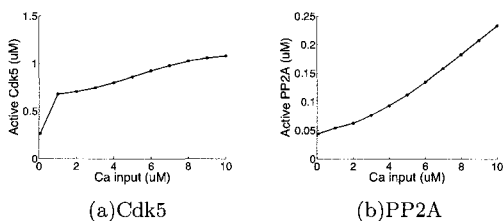


図6 カルシウム入力強度に応じた(a)Cdk5と(b)PP2Aの最大時の活性変化

#### 4.4 ドーパミン依存とカルシウム依存のシナプス可塑性

図7(a)はドーパミン入力後10分時点における細胞膜上のAMPA数の増減を、各ドーパミン入力強度ごとに示したものである。カルシウム(1  $\mu\text{M}$ )だけの入力ではシナプス伝達効率は低下する(図7(a)点線)。しかしカルシウム入力に加えてドーパミンを与えると、シナプス伝達効率の変化は少なくなり(図7(a)破線)、より強い5  $\mu\text{M}$  のドーパミン入力をカ



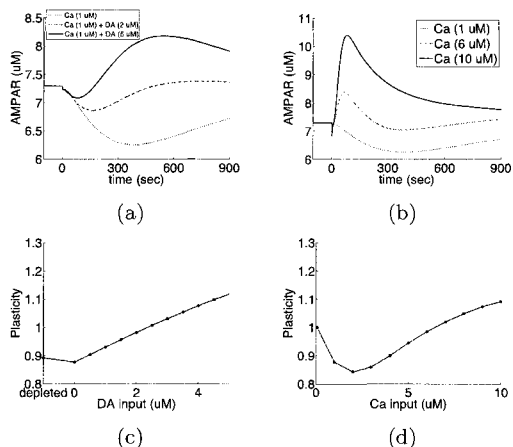


図7 ドーパミン依存とカルシウム依存のシナプス可塑性。(a)(b) シナプス伝達効率の時系列変化。時刻0秒で入力を与えた。縦軸はシナプス伝達効率の入力前と比べてときの倍率を示す。(a) ドーパミン入力が高いほどシナプス伝達効率が増加している。(b) また強い  $Ca^{2+}$  入力(実線)でもシナプス伝達効率の増加が見られる。(c)(d) 入力を与えてから10分時点でのシナプス伝達効率を評価した。(c) ドーパミン濃度は静止状態では  $0.01 \mu M$  で“depleted”はドーパミンを枯渇させたときのシナプス伝達効率の変化。(d) カルシウム入力に対するシナプス伝達可塑性を評価している。カルシウム入力強度によって LTD も LTP も起こる。

ルシウム入力とともに加えるとシナプス伝達効率は上昇する(図7(a)実線)。一方、図7(b)はドーパミン入力のない条件下で、カルシウム入力によって引き起こされる AMPAR の数の増減を示したものである。強いカルシウム ( $10 \mu M$ ) の入力ではシナプス伝達効率は上昇し、この変化はドーパミン入力によるシナプス伝達効率の増加よりも変化が速い。

入力を与えてから10分時点でのドーパミン入力強度によるシナプス伝達効率の変化をまとめると図7(c)のようになった。ドーパミン入力強度によるシナプス伝達効率の上昇がみられる。またドーパミンを枯渇したとき、つまりドーパミン濃度が  $0 \mu M$  のときにカルシウム入力を与えると、シナプス伝達効率の低下が弱まる。これらの結果は Reynolds らの総説と合致する<sup>31)</sup>。しかしドーパミン濃度を枯渇した条件では、細胞内シグナル伝達経路の平衡状態が元の状態から変わっていることに注意したい。

カルシウム濃度の違いによるシナプス伝達効率の変化を調べた結果、カルシウム濃度に応じてシナプス可塑性の方向が逆転し、 $3 \mu M$  付近ではシナプス伝達効率は減少するが  $10 \mu M$  付近では増加する結果が得られた(図7(d))。この結果は実験から報告されている

現象と一致する<sup>4)7)8)</sup>。

#### 4.5 カルシウム依存性シナプス可塑性の分子機構

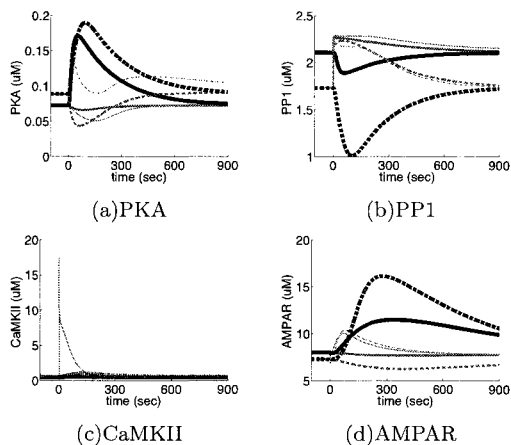


図8 DARPP-32 ノックアウト実験。実線は DARPP-32 をノックアウトした条件、点線はコントロール条件での各分子の活性変化。中線が  $1 \mu M$  のカルシウム入力、細線がカルシウム  $10 \mu M$  の入力、太線はドーパミン  $5 \mu M$  のみの入力を与えたときの各分子活性の時系列変化。

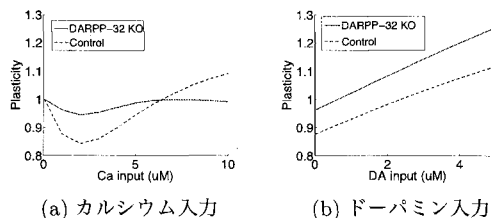


図9 DARPP-32 ノックアウト時のシナプス可塑性。実線が DARPP-32 をノックアウトした実験、点線がコントロール実験での (a) カルシウム入力強度、(b) ドーパミン入力強度に応じたシナプス伝達効率の変化を表している。

線条体シナプス可塑性における DARPP-32 の役割を調べるために DARPP-32 の活性化を阻害したシミュレーション実験を行った。この実験は DARPP-32 の濃度を  $0 \mu M$  にすることによって実現した。図8はその結果を示したものであり、DARPP-32 がいないとカルシウム入力による PP1 活性が弱まり、また強いカルシウム入力時の PKA の活性がなくなった。しかし強いカルシウム入力による CaMKII の活性は残ったままだった。図9は、カルシウム入力強度ごとにシナプス可塑性をまとめたものであり、DARPP-32 ノックアウト条件下ではカルシウム依存性シナプス可塑性はみられなくなった。これは皮質刺激による LTD,

Mg<sup>2+</sup>-free での皮質刺激による LTP が DARPP-32 ノックアウトによって阻害されるという Calabresi らの報告<sup>5)</sup>とも合致している。これらのことから、カルシウム依存シナプス可塑性の LTD には PP1 が、LTP には PKA 活性が効いていることが分かった。

また DARPP-32 の Thr-75 残基は PKA を阻害する。Thr-75 のリン酸化レベルは前述の通りカルシウム入力強度によって双方向に変化する。したがって、PKA 活性にはカルシウム-PP2A-DARPP-32 経路が効いていることが予想される。それを確かめるために経路切断実験を行なった (図 10(a))。経路の切断は、対応する反応速度係数を 0 とすることで実現した。その結果、PP2A-DARPP-32 経路、DARPP-32-PKA 経路のどちらの経路を切断しても強いカルシウム入力による PKA 活性はなくなった。

また、CaMKII は別のモデル研究で双安定性を持つことが示唆されており<sup>19)</sup>、海馬でのシナプス可塑性では重要な役割を果たしていることが知られている。本研究では CaMKII 活性の閾値現象は確認できたものの、DARPP-32 阻害時のシミュレーション結果では、CaMKII の活性に関わらず LTP がみられなかった。

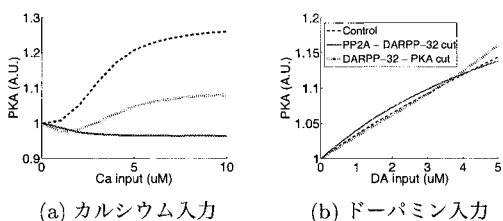


図 10 PKA-PP2A-DARPP-32 ポジティブフィードバックループ切断実験。(a) カルシウム入力と (b) ドーパミン入力に対する PKA 活性の変化の倍率を表している。破線は PP2A から DARPP-32 への経路を切断、点線は DARPP-32 から PKA への経路を切断、実線はコントロール条件での入力後 10 分時点での PKA 活性のシミュレーション結果を表している。

#### 4.6 ドーパミン依存性シナプス可塑性の分子機構

DARPP-32 ノックアウト実験では、ドーパミン入力による PKA 活性が弱まらず (図 8)、ドーパミン依存の LTP は DARPP-32 阻害時でも見られた (図 9(b))。このことから PKA 活性はドーパミン依存の LTP に大きく関わっていると考えられる。また PKA 活性は、PKA、PP2A と DARPP-32 で形成しているポジティブフィードバックループによって増幅されていると考えられる。そこで、このポジティブフィードバックループのドーパミン入力による PKA 活性への

影響を調べるために、ループの切断実験を行った (図 10(b))。経路の切断は、対応する反応速度係数を 0 とすることで実現した。その結果、PP2A から DARPP-32 への経路を切断するとドーパミン入力強度に応じた PKA 活性が抑えられる。このことからポジティブフィードバックループが PKA 活性に効いている可能性が示唆されるが、DARPP-32 から PKA への経路の切断では、PKA 活性はコントロール条件に比べて増加している。これは PKA の濃度に対して DARPP-32 の濃度が 100 倍近く違うため、活性化した PKA がほとんど DARPP-32 によって抑制されてしまうためであると考えられ、結局この濃度差のため、ポジティブフィードバックループは機能しないと考えられる。

なお、Kotaleski らの先行研究<sup>23)</sup>でも、ポジティブフィードバックループの役割を調べているが、ドーパミンだけの入力ときはポジティブフィードバックループを切断すると PKA 活性が強まるとしており、本研究の結果とも矛盾しない。

## 5. まとめ

本研究では皮質線条体シナプス可塑性のシグナル伝達のメカニズムを調べるために、動力学モデルを構築しシミュレーションを行った。

その結果、線条体でみられるカルシウム依存シナプス可塑性には PKA 活性が重要な役割を果たしていることがわかった。PKA 活性にはカルシウム-PP2A-DARPP-32-PKA 経路が効いていて、この経路は強いカルシウム入力で活性化し、逆に弱いカルシウム入力ではカルシウム-PP2B-CK1-Cdk5-DARPP-32 経路が活性化し PKA を抑制する。

ドーパミン依存シナプス可塑性においても PKA は重要な役割を果たしていることがわかった。ドーパミン入力による PKA の活性には PKA-PP2A-DARPP-32 のポジティブフィードバックループが影響を与えていることが考えられるため、ポジティブフィードバックループの切断実験を行ったが、閾値現象、双安定性を示すことは認められなかった。このループの数理的解析は今後の課題としたい。また、本研究では、シミュレーション上での入力をカルシウムをしたが、実際のグルタミン酸の投射、膜電位の状態を考慮したカルシウムダイナミクスを考慮することで、より様々な現象を説明していきたい。

## 参考文献

- 1) Akopian, G., Musleh, W., Smith, R. and Walsh, J.: *Synapse*, Vol. 38, No. 3, pp. 271-80

- (2000).
- 2) Bonsi, P., Pisani, A., Bernardi, G. and Calabresi, P.: *Neuroreport*, Vol. 14, No. 3, pp. 419–22 (2003).
  - 3) Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. and Bernardi, G.: *J Neurosci*, Vol. 19, No. 14, pp. 6102–10 (1999).
  - 4) Calabresi, P., Giacomini, P., Centonze, D. and Bernardi, G.: *Ann Neurol*, Vol. 47, No. 4 Suppl 1, pp. S60–8; discussion S68–9 (2000).
  - 5) Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, A. and Greengard, P.: *J Neurosci*, Vol. 20, No. 22, pp. 8443–51 (2000).
  - 6) Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. and Bernardi, G.: *J Neurosci*, Vol. 12, No. 11, pp. 4224–33 (1992).
  - 7) Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. and Bernardi, G.: *Eur J Neurosci*, Vol. 4, No. 10, pp. 929–935 (1992).
  - 8) Centonze, D., Picconi, B., Gubellini, P., Bernardi, G. and Calabresi, P.: *Eur J Neurosci*, Vol. 13, No. 6, pp. 1071–7 (2001).
  - 9) Charpier, S. and Deniau, J.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 94, No. 13, pp. 7036–40 (1997).
  - 10) Charpier, S., Mahon, S. and Deniau, J.: *Neuroscience*, Vol. 91, No. 4, pp. 1209–22 (1999).
  - 11) Choi, S. and Lovinger, D.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 94, No. 6, pp. 2665–70 (1997).
  - 12) Doi, T., Kuroda, S., Michikawa, T. and Kawato, M.: *J Neurosci*, Vol. 25, No. 4, pp. 950–61 (2005).
  - 13) Fernandez, E., Schiappa, R., Girault, J. and Novère, N.: *PLoS Comput Biol*, Vol. 2, No. 12, p. e176 (2006).
  - 14) Gonon, F., Burie, J., Jaber, M., Benoit-Marand, M., Dumartin, B. and Bloch, B.: *Prog Brain Res*, Vol. 125, pp. 291–302 (2000).
  - 15) Gould, T. and Manji, H.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, No. 2, pp. 253–4 (2005).
  - 16) Greengard, P.: *Biosci Rep*, Vol. 21, No. 3, pp. 247–69 (2001).
  - 17) Greengard, P., Allen, P. and Nairn, A.: *Neuron*, Vol. 23, No. 3, pp. 435–47 (1999).
  - 18) Hakansson, K., Lindskog, M., Pozzi, L., Usiello, A. and Fisone, G.: *Parkinsonism Relat Disord*, Vol. 10, No. 5, pp. 281–6 (2004).
  - 19) Hayer, A. and Bhalla, U.: *PLoS Comput Biol*, Vol. 1, No. 2, pp. 137–54 (2005).
  - 20) Hempel, C., Vincent, P., Adams, S., Tsien, R. and Selverston, A.: *Nature*, Vol. 384, No. 6605, pp. 166–9 (1996).
  - 21) Kotter, R. and Wickens, J.: *J Comput Neurosci*, Vol. 2, No. 3, pp. 195–214 (1995).
  - 22) Kuroda, S., Schweighofer, N. and Kawato, M.: *J Neurosci*, Vol. 21, No. 15, pp. 5693–702 (2001).
  - 23) Lindskog, M., Kim, M., Wikström, M., Blackwell, K. and Kotaleski, J.: *PLoS Comput Biol*, Vol. 2, No. 9, pp. 1045–60 (2006).
  - 24) Liu, F., Ma, X., Ule, J., Bibb, J., Nishi, A., DeMaggio, A., Yan, Z., Nairn, A. and Greengard, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, No. 20, pp. 11062–8 (2001).
  - 25) Nishi, A., Bibb, J., Matsuyama, S., Hamada, M., Higashi, H., Nairn, A. and Greengard, P.: *J Neurochem*, Vol. 81, No. 4, pp. 832–41 (2002).
  - 26) Nishi, A., Bibb, J., Snyder, G., Higashi, H., Nairn, A. and Greengard, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 97, No. 23, pp. 12840–5 (2000).
  - 27) Nishi, A., Watanabe, Y., Higashi, H., Tanaka, M., Nairn, A. and Greengard, P.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 102, No. 4, pp. 1199–204 (2005).
  - 28) Rakhilin, S., Olson, P., Nishi, A., Starkova, N., Fienberg, A., Nairn, A., Surmeier, D. and Greengard, P.: *Science*, Vol. 306, No. 5696, pp. 698–701 (2004).
  - 29) Reynolds, J., Hyland, B. and Wickens, J.: *Nature*, Vol. 413, No. 6851, pp. 67–70 (2001).
  - 30) Reynolds, J. and Wickens, J.: *Neuroscience*, Vol. 99, No. 2, pp. 199–203 (2000).
  - 31) Reynolds, J. and Wickens, J.: *Neural Netw*, Vol. 15, No. 4–6, pp. 507–21 (2002).
  - 32) Sivakumaran, S., Hariharaputran, S., Mishra, J. and Bhalla, U.: *Bioinformatics*, Vol. 19, No. 3, pp. 408–15 (2003).
  - 33) Snyder, G., Galdi, S., Fienberg, A., Allen, P., Nairn, A. and Greengard, P.: *Neuropharmacology*, Vol. 45, No. 6, pp. 703–13 (2003).
  - 34) Spencer, J. and Murphy, K.: *Exp Brain Res*, Vol. 135, No. 4, pp. 497–503 (2000).
  - 35) Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J., Nairn, A. and Greengard, P.: *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, Vol. 44, pp. 269–96 (2004).
  - 36) Wickens, J., Begg, A. and Arbuthnott, G.: *Neuroscience*, Vol. 70, No. 1, pp. 1–5 (1996).