



Potassium and calcium channel involvement in induction of long-lasting synaptic enhancement by calyculin A, a protein phosphatase inhibitor, in rat hippocampal CA1 region

村上, 直也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1457

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001457>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	むら かつ なお や 村 上 直 也	（兵庫県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第989号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成8年3月31日	
学位論文題目	Potassium calcium channel involvement in induction of long-lasting synaptic enhancement by calyculin A, a protein phosphatase inhibitor, in rat hippocampal CA 1 region. （ラット海馬CA1領域において蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤カリクリンAにより誘発される長期増強様現象はK ⁺ およびCa ²⁺ チャンネルが関与して導入される）	
審査委員	主査 教授 中井久夫 教授 齋藤尚亮	教授 岡田安弘

論文内容の要旨

目的

脳での最も重要な機能である記憶、学習は、シナプス伝達の繰り返しによる伝達効率の変化に基づくと考えられている。そのモデルとされている長期増強は主として海馬において研究され、NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体の活性化と蛋白質リン酸化酵素が制御する細胞内情報伝達系が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。しかし、神経伝達の制御における蛋白質脱リン酸化酵素の関与についてはまだ十分に解明されていない。今回、我々は、ラット海馬CA1領域において、蛋白質脱リン酸化酵素1, 2A型の阻害剤であるカリクリンAのシナプス伝達に対する効果を検討した。

方法

シャフファー側枝-CA1系における集合電位とグルタミン酸遊離に対するカリクリンAおよび種々の薬物の効果は、雄性ウィスター系ラットより作成した海馬スライス標本（厚さ約400 μ m）を用いて調べた。人口脳脊髄液で灌流した記録槽内で、シャフファー側枝を1分毎に刺激し、誘発される集合スパイク及び集合EPSPs (excitatory postsynaptic potentials) をCA1領域より記録して時間経過を追った。また、シナプスの伝達効率を電気生理学的に計測すると同時に、スライスを灌流した人口脳脊髄液を5分間ずつ15分毎に回収し、その中に含まれるグルタミン酸をHPLC (high-performance liquid chromatography) によって計測した。

活動電位に対するカリクリンAの効果は、ラット海馬CA1領域から急性単離した錐体細胞に対して、ホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。

結果

(1) カリクリンA 500nMを15分間海馬スライスに灌流適用すると、集合スパイクの振幅および集合EPSPsの傾きはともに増大し、適用終了後も増大作用は持続し、長期増強様現象 (CLLP:

calyculinA-induced long-lasting potentiation) を引き起こした。

(2) CLLPにともない、一過性のグルタミン酸遊離の有意な増加が見られた。

(3) CLLPの成立は、プロテインキナーゼ阻害剤であるスタウロsporin 100nMにより阻害された。

(4) CLLPは、L型電位依存性 Ca^{2+} channelブロッカーであるニカルジピン 10 μM の同時投与によって阻害されたが、NMDA受容体拮抗薬であるAPV (DL-2-amino-5-phosphonovalerate) 100 μM の投与においては阻害されなかった。

(5) カリクリンA 500nMは、ラット海馬CA1領域の錐体細胞において、一過性に活動電位の再分極、後過分極の早期成分を抑制し、発火頻度を増加させた。この効果は、従来報告されてきた Ca^{2+} -activated K^{+} channelの阻害薬であるチャリブドトキシシン (CTX) の効果と同様であった。

(6) CTX 10nMを15分間海馬スライスに灌流適用すると、カリクリンAと同様に一過性のグルタミン酸遊離の有意な増加が見られた。

考察

今回、我々の行った実験では、シャファー側枝-CA1錐体細胞間シナプスにおいて蛋白質脱リン酸化酵素1, 2 A型はシナプスの可塑性に関与しており、その阻害によってNMDA非依存性に長期増強様現象 (CLLP) を引き起こすことが明らかとなった。

Ca^{2+} -activated K^{+} channelの阻害薬であるCTXは、海馬CA1領域の錐体細胞において、活動電位の再分極、後過分極の早期成分を抑制し、発火頻度を増加させることが知られている。CA1錐体細胞の活動電位に対するカリクリンAの効果もCTXと同様であったことから、カリクリンAは Ca^{2+} -activated K^{+} channelを阻害することが推測された。

Ca^{2+} -activated K^{+} channelは前シナプスに存在することが知られており、CTXにより一過性にグルタミン酸遊離の増加が引き起こされたことから、CLLPで見られたグルタミン酸遊離の増加は Ca^{2+} -activated K^{+} channelの一過性阻害によるものと推測された。TEA (tetraethylammonium), MCD (mast cell degranulating) ペプチドおよび4-aminopyridineなどの K^{+} チャンネルを阻害する薬物によって、NMDA非依存性に長期増強様現象 (LTP_k) が起きるという報告があり、一過性のグルタミン酸遊離の増加と電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化が確認されている。CLLPにおいても、L型電位依存性 Ca^{2+} channelブロッカーであるニカルジピンの投与によって阻害されたことから、CLLPはNMDA非依存性 LTP_k の一つのタイプであり、その導入において、 Ca^{2+} -activated K^{+} channelの一過性阻害、グルタミン酸遊離の一過性増加と電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化が引き金になったと考えられた。

一方、CLLPの維持相が蛋白質リン酸化酵素阻害剤スタウロsporinによって抑制されたことは、CA1錐体細胞におけるグルタミン酸レセプターを介するシナプスの伝達効率亢進の維持には、蛋白質リン酸化酵素の活性化が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

海馬が記憶の形成に重要な働きをしていることは、多くの実験動物を用いた研究や記憶障害を起こした患者の臨床神経心理学的な検討から示唆されている。海馬の長期増強は、記憶や学習の基礎過程を反映するシナプスの可塑性モデルとして精力的に研究されてきた。その中でも長期増強の機構を理

解するうえで要となっているのは、グルタミン酸受容体、特にNMDA受容体の関与、シナプス後細胞の Ca^{2+} 濃度上昇の必要性、セカンドメッセンジャーと蛋白キナーゼの関与などの発見であろう。長期増強の誘発や維持には、Cキナーゼ、CaMキナーゼII、Aキナーゼ、チロシンキナーゼなどが関与することを示唆する数多くの報告がある。蛋白質脱リン酸化酵素はキナーゼによってリン酸化の修飾を受けた機能蛋白質を元の状態に戻す働きがあるが、長期増強の発生にあたって脱リン酸化酵素の作用を示す知見はまだない。学位申請者は本研究において、シナプス伝達における蛋白質脱リン酸化酵素の作用に着目し、海馬におけるシャファー側枝-CA1系のシナプス伝達に対する、蛋白質脱リン酸化酵素1, 2A型の阻害剤であるカリクリンAの効果を調べた。

実験は、雄のウィスター系ラットより得た海馬スライスをを用い、シャファー側枝を刺激した際に得られる集合電位をCA1領域から記録することにより行った。また、電気生理学的なシナプス伝達効率の計測と同時に、スライスを灌流した人口脳脊髄液に含まれるグルタミン酸量をHPLC (high-performance liquid chromatography) を用いて計測した。カリクリンAは、シナプス伝達効率を増大させて長期増強様現象 (calyculin A-induced long-lasting potentiation, CLLP) を引き起こした。CLLPの成立は、一過性のグルタミン酸遊離の増加を伴い、蛋白キナーゼ阻害剤のスタウロスポリンあるいは電位依存性 Ca^{2+} チャンネル阻害剤のニカルジピンによって拮抗されたが、NMDA受容体拮抗薬であるAPVは、CLLPに対し影響を与えなかった。さらに、CA1領域の錐体細胞を用いてホールセルパッチクランプ法を行い、活動電位に対するカリクリンAの効果を検討し、カリクリンAが一過性に活動電位の再分極、後過分極の早期成分を抑制し、発火頻度を増加させることを見いだした。この効果は、従来報告されてきた Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネル阻害薬であるチャリブドトキシシン (CTX) の効果と同様であり、またCTXを海馬スライスに投与すると、カリクリンAと同様に一過性のグルタミン酸遊離の増加を引き起こした。

以上の結果から、シャファー側枝-CA1錐体細胞間シナプス伝達において蛋白質脱リン酸化酵素1, 2A型はシナプスの可塑性に関与しており、その阻害によってNMDA受容体を介さずに長期増強様現象を引き起こすことが明かとなった。さらに、CLLPの成立は、一過性の Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャンネルの阻害とグルタミン酸遊離の増加および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの活性化によって誘導され、その後の蛋白キナーゼ活性の増加によって維持されることが示唆された。

以上、本研究は、シナプスの可塑性について、従来知られていなかった蛋白質脱リン酸化酵素の関与を明らかにしたものである。蛋白質脱リン酸化酵素の阻害によって長期増強様現象が誘導、維持されるメカニズムを解明したことは、シナプス伝達の調節機構について重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。