

# シグナル伝達ネットワークの安定性と可塑性の解析

●黒田 真也<sup>1)</sup> ◆川人 光男<sup>2)</sup>

1) 東京大学大学院 理学系研究科 生物化学 2) ATR 脳情報研究所

## <研究の目的と進め方>

シグナル伝達ネットワークは「安定性」や「可塑性」といったシステムとしての特性により、異なる生命現象を共通のネットワークを用いて動的に制御していると考えられるが、その分子基盤に基づく動的特性の理解はほとんど進んでいない。本研究ではシナプス可塑性や細胞の収縮・弛緩などの生命現象にフォーカスして、実験的による *in vivo* ダイナミクス観測に加えてコンピュータシミュレーションを用いた *in silico* ダイナミクスの両方を解析することにより、シグナル伝達ネットワークの「安定性」や「可塑性」といったシステムとしての特性を分子基盤に基づいて明らかにする。

## <2007 年度の研究の当初計画>

本研究では、シナプス可塑性と細胞収縮を題材にする。シナプス可塑性については1) 海馬、大脳皮質のスパイクタイミング依存シナプス可塑性と小脳の LTD を、細胞収縮については2) ミオシン軽鎖のリン酸化を、それぞれ *in silico* と *in vivo* の両方から解析する。

1) 我々の脳における記憶や学習は、シナプス伝達効率の活動依存的変化、すなわちシナプス可塑性によって達成される。特にプレ・ポストシナプスニューロンの正確な発火タイミングの違いに依存するスパイクタイミング依存シナプス可塑性 (STDP: spike-timing dependent plasticity) は、神経回路の情報符号化のメカニズムに深く関わっていると考えられることから、大きな注目を集めてきた。しかし、STDP を導くシグナル伝達機構、システムのかつ定量的な理解は未だなされていない。そこで、我々はシナプス可塑性の入力から出力までを一組の数理モデルで表現し、STDP の生成機序をシステムとして理解することを試みた。すなわち、一連のシナプス可塑性シグナル伝達機構を、膜電位のマルチコンパートメントモデルと生化学反応モデルの組み合わせとしてコンピュータ内に再構築して、実験による STDP のシナプス可塑性を再現することを試みるとともに、STDP のメカニズムを定量的に明らかにする。

また、小脳の LTD については、申請者はすでに小脳 LTD モデルを構築している (Kuroda, S. et al, J. Neurosci., 21, 5693-5702, 2001)。本年は実験により小脳 LTD モデルが誘導されるまでの  $Ca^{2+}$  刺激から小脳 LTD 発現までの経路が leaky integrator として説明可能かどうか検討する。あわせて、NO (nitric oxide) が小脳 LTD における入力特異性や文脈依存性学習を制御しているかどうかを計算論的に解析する。

2) 我々はすでに、ミオシン軽鎖リン酸化のシミュレーションモデルから未知のシグナル伝達経路の存在を予測している。さらに、準備的ではあるもののミオシン軽鎖リン酸化の継続相は双安定性を示すことを実験的に見出している。本研究では、未知の経路探索を行うと同時に双安定性の分子メカニズムを解き明かすことを目標とする。まず、シミュレーションから予測された継続相に必要な未知の分子ネットワークの探索を実験的に試みて、その分子ネットワークの同定を試みる。さらに、実験により持続性ミオシンリン酸化の特性を明らかにする。

## <2007 年度の成果>

1) 我々の STDP モデルは、大脳皮質 II/III 層錐体ニューロンにおいて、あらゆる発火パターンにより入力される LTP/LTD をほぼ完全に再現することに成功した。また、STDP の入力には、NMDA 受容体のアロステリック効果が必要であることを示した。

まず、既知の STDP 生成機序に基づいたモデルを作り、プレシナプスニューロン-ポストシナプスニューロン (プレーポスト) のペア発火による STDP の再現を試みた。その結果、STDP の LTP (long-term potentiation) は再現できたものの、LTD (long-term depression) は再現できなかった (図 b 左)。多くの実験において、プレ発火後 10 ms 以内にポスト発火する場合には LTP を導き ( $T_{post} - T_{pre} < 10$  ms)、ポスト発火後 30 ms 以内にプレ発火する場合には LTD を導く ( $T_{post} - T_{pre} > -30$  ms)。この結果は、提案されている STDP の LTD を導く機序が不完全であることを示す。ポスト→プレ発火時には、ポスト発火に伴う VGCC (voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel) 性の  $Ca^{2+}$  シグナルが、プレ発火時の NMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体の活性を抑制することで、LTD が導かれるとする報告がある。しかし、実際には NMDA 受容体の活性により導かれる  $Ca^{2+}$  シグナルが、タイミング非依存的に NMDA 受容体自身を抑圧し、ポスト発火による  $Ca^{2+}$  シグナルの検知を妨害してしまう。そこで、我々は NMDA 受容体の  $Ca^{2+}$  抑制の時定数がプレ発火の前後、すなわち神経伝達物質グルタミン酸の有無により違うのではないかと考えた (図 a、アロステリック

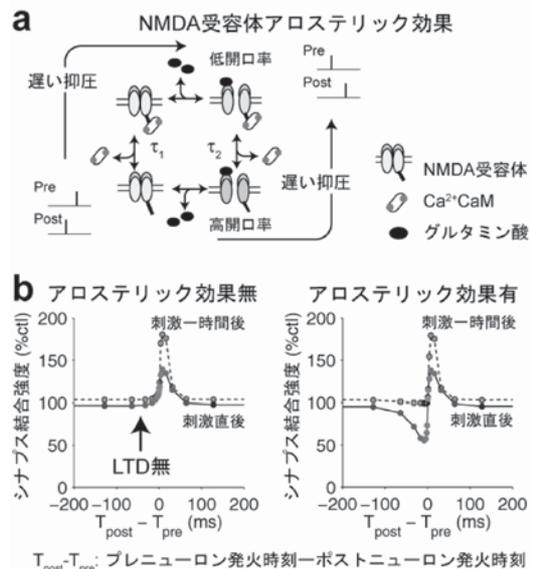


図: STDP を説明する NMDA 受容体のアロステリック効果。(a) 提案する新規アロステリック効果。NMDA 受容体はグルタミン酸によって活性化され、その活性は  $Ca^{2+}$  が結合したカルモジュリン ( $Ca^{2+}/CaM$ ) によって抑制されるが、 $Ca^{2+}/CaM$  の結合時定数が、グルタミン酸の有無により変化すると考えた。(b) プレーポスト刺激を行った際のシナプス強度変化。横軸はプレ発火 ( $T_{pre}$ ) とポスト発火 ( $T_{post}$ ) の相対時刻。左図はアロステリック効果なし。右図はアロステリック効果あり。

ク効果)。グルタミン酸結合時の  $\text{Ca}^{2+}$  抑圧の時定数 ( $\tau_2$ ) を非結合時の時定数 ( $\tau_1$ ) より 100 倍以上遅いと仮定すると、STDP の LTD が形成される (図 b 右)。これは、NMDA 受容体の抑圧がプレ→ポスト発火時には遅く、ポスト→プレ発火時には速いことが、VGCC 性の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルによる NMDA 受容体の抑圧を可能にしている為である。アロステリック効果の仮定は、単純なプレ→ポストのペア発火による STDP のみならず、triplet や quadruplet など、あらゆる発火パターンにより入力される LTP/LTD をほぼ完全に再現した。さらに、ポスト→プレ発火時に観測される NMDA 受容体性 EPSP の抑圧パターンは、アロステリック性の存在を支持した。これらの結果は、NMDA 受容体の単純なアロステリック効果が、脳の複雑なスパイク活動を可塑性へコードするカギとなっている可能性を示唆する。

また、小脳の LTD においては、 $\text{Ca}^{2+}$  刺激から小脳 LTD を誘導する経路は、入力刺激の積分効果と漏れ (leak) がある経路と見なせば、一見複雑な  $\text{Ca}^{2+}$  刺激から小脳 LTD の関係を一意に説明できることを見出した。また、シミュレーションモデルを用いて NO (nitric oxide) の小脳の学習における計算論的役割を解析し、NO が小脳 LTD における入力特異性や文脈依存性学習を制御していることを予測した。

2) 細胞収縮においては、未知の経路の分子として iPLA2 を同定することに成功した。また、ミオシン軽鎖の持続性リン酸化は閾値現象を示すが、これも Rho-kinase と iPLA2 のどちらにも依存することを見出した。阻害剤を用いた positive feedback の特性の一つである hysteresis の観測を試みたが、hysteresis は観測されなかった。

#### <国内外での成果の位置づけ>

1) まず、大脳皮質 II/III 層錐体ニューロンにおいあらゆる発火パターンにより入力される LTP/LTD を完全に再現する電気生理学的・生化学的モデルの構築に成功したのは、世界初の快挙である。これまで、発火パターンと LTP/LTD の関係を現象論的に求めたモデルはあるものの、分子メカニズムとの対応はついていなかった。このモデルを手がかりに、薬理阻害や疾患がシナプス可塑性の入力にどのような影響を与えるか明らかにすることができる。特に、NMDA 受容体のアロステリック効果が、スパイクタイミングを可塑性へコードするとした仮説は、実験で検証されるべき重要な理論的予測である。また、実際の神経回路においてランダムに発火するニューロンが、どのようなアルゴリズムでシナプス強度の空間パターンを変更し、記憶として埋め込んでいるのかを計算論的研究で明らかにすることができる。このように、本研究で得られた成果は、実験研究と理論研究の交点に位置し、大変ユニークであると共に重要である。

また、小脳の LTD においても実験とモデルの両方をフィードバックさせているグループは我々しかなく小脳のシナプス可塑性におけるシステム生物学の分野を大きくリードしている。

これまでシナプス可塑性のシミュレーションモデルは数多く提案されているものの、実験との整合性が非常によく合うモデルは上記のモデルしかなく、この分野をリードしている。

2) 細胞収縮においては、シミュレーションモデル単独でも、それを実験とフィードバックさせることも、安定性の解析もこれまで例を見ない。したがって、細胞収縮におけるシステム生物学の分野において大きくリードしていると考えられる。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

1) 我々の STDP モデルは、あらゆるタイミングのスパイクによる LTP/LTD の入力を再現することに成功した。しかし、長期可塑性の維持、特に LTD の維持を再現することは出来なかった (図 b 右)。このことは、これまでの知見では説明できない未

知の経路の存在を示唆する。既知の知識を組み合わせ、一見説明できない現象や、複雑な現象の全体像を明らかにするシミュレーション研究は、その要素すら明らかでない現象に対しては有効でない。長期可塑性の維持については、現在、多くの研究グループが実験的知見を積み上げている段階であり、特に遺伝子発現によるタンパクの合成が、深く関わっていると考えられる。また、アロステリック性についても膜電位に依存する可能性など他の可能性も考慮していく必要がある。

2) 細胞収縮においては、未知の経路の分子として iPLA2 を同定することに成功したが、すべての分子経路を同定するにはいたっていない。特に、細胞外因子が関与していることまでは同定しているものの、その物質が非常に不安定で精製することに困難を極めている。

#### <今後の課題>

1) 我々は、STDP の解明を目指す過程で NMDA 受容体のアロステリック効果の必要性を発見した。しかし、このアロステリック効果の直接の検証はされたとはいえない。そこで、我々はアロステリック性の存在を直接的に実証するために、パッチクランプ法などを用いて解析することを検討している。一般にイオンチャネルの開閉パターンには、チャネルが持つ動的特性の多くの部分が含まれる。現在、NMDA チャネル記録に現れるアロステリック効果を解析するための理論的枠組みの構築を進めており、近い将来実験データの解析へと繋げる予定である。

また、NMDA 受容体のアロステリック性に依存した STDP の学習における役割を検討するために、実験により STDP により学習が制御されていることが分かっている視覚系の網膜視蓋経路のモデル化を行い、STDP によりどのような視覚刺激を網膜視蓋経路が学習するのかを検討する。小脳 LTD においては、LTD の本体が PKC と MAPK による positive feedback であることを予測しているが、これを実験的に検証する。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文

- 0704221627  
Otsuji, M. Ishihara, S. Co C. Kaibuchi, K. Mochizuki, A. and Kuroda, S.: A Mass Conserved Reaction & Diffusion System Captures Properties of Cell Polarity. PLoS. Comput. Biol3 (6), e108 (2007)
- 0709281800  
Tanaka K, Khiroug L, Santamaria F, Doi T, Ogasawara H, Ellis-Davies GC, Kawato, M, Augustine, G. J:  $\text{Ca}^{2+}$  requirements for cerebellar long-term synaptic depression: role for a postsynaptic leaky integrator, Neuron, 54(5), 787-800, (2007)
- 0709281803  
Ogasawara H, Doi T, Doya K, Kawato M.: Nitric oxide regulates input specificity of long-term depression and context dependence of cerebellar learning PLoS. Comput. Biol. 3(1), e179, (2007)

##### 2) データベース

- 0708071208  
ミオシンリン酸化反応の生化学反応モデル公開ホームページ