

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¹⁾ ◇川人 光男²⁾

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ダイナミクスの理解はほとんど進んでいない。本研究では「安定性」や「可塑性」の解析対象として、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する。前者については、主に大脳皮質、海馬の興奮性ニューロンのスパイクタイミング依存性シナプス可塑性（後述）と、小脳のプルキンエ細胞の長期抑圧を取り上げる。また、さらに、一般的なシナプス可塑性の安定性として Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) の双安定性の解析を再構成系を用いて解析する。また、細胞の収縮としては血管内皮細胞の持続的収縮を取り上げて解析する。どちらの場合も、実験観測による *in vivo* ダイナミクスと、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。

<研究開始時の研究計画>

本研究では、シナプス可塑性と細胞収縮を題材として下記の5つのテーマを掲げ、*in vivo* および *in silico* 両方から解析する。

1) スパイクタイミング依存シナプス可塑性(STDP)

生物の脳において、シナプス長期可塑性は記憶や学習の分子的基盤と考えられている。特に、海馬や大脳新皮質ではプレ・ポストシナプスニューロンの発火タイミングの違いに依存して誘導されるスパイクタイミング依存シナプス可塑性 (STDP) が重要である。我々はSTDPの膜電位・シグナル伝達モデルを構築し、複雑なプレ・ポストの発火タイミングにより導かれる長期増強 (LTP) や長期抑圧 (LTD) が説明可能であるかどうか検討する。もし、LTP や LTD の説明のために、新たなシグナル伝達の性質が必要であることが予言された場合は、実験で実証を試みる。さらに、モデルを簡略化して本質を抽出し、ニューロンネットワークのシミュレーションに適用可能な簡易 STDP モデルを提案する。

2) 視覚系神経ネットワークにおける方向選択性の獲得

STDP は、神経ネットワークの再編を通じて生物の記憶・学習を導く。そこで、我々は開発した簡易 STDP モデルをアフリカツメガエルの視覚系神経ネットワークに適用し、STDP による視覚システムの機能獲得過程の解明を試みる。アフリカツメガエルの視覚系神経ネットワークにおいて、視覚刺激は網膜において受容され、視蓋へと伝わる。視蓋ニューロンは、特定方向に動く視覚刺激を検知して発火する性質を持っており、この性質を方向選択性と呼ぶ。方向選択性は、生得的な性質でなく、生後の様々な視覚経験により STDP が生じ、神経ネットワークが変化することで獲得されると考えられている。しかし、神経ネットワークがどのように変化し、方向選択性が獲得されるのか明らかでない。

そこで、アフリカツメガエルの視覚系神経ネットワークをコンピュータ内に再構築し、STDP によって視蓋ニューロンが方向選択性を獲得する過程の解明を試みる。

3) CaMKIIの双安定性の解析

STDP や小脳 LTD のシグナル伝達モデルは、多数のシグナル伝達分子同士の反応をモデル化したものである。したがって、実際に試験管中で精製したシグナル伝達分子を反応させてモデルと比較することで、モデルの妥当性を検証することができる。また、現実の生体シナプスとの比較を行うこともできる。我々は、この再構成系に着目し、まずは CaMKII, protein phosphatase 1 (PP1), calmodulin, Ca²⁺ 間の相互作用のダイナミクスを観測して、LTP の維持メカニズムであると理論モデルから予測されている CaMKII の双安定性の解析を行う。

4) ミオシン軽鎖のリン酸化

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。

5) 小脳LTD

小脳では、平行繊維と登上繊維の同時活性で生じる LTD が重要であり、シグナル伝達機構をシステムのかつ定量的に理解する必要が叫ばれている。我々は、すでに小脳 LTD のシグナル伝達モデルを構築している (Kuroda, S. et al, J. Neurosci., 21, 5693-5702, 2001)。そこで、さらに平行繊維と登上繊維の同時活性から Ca²⁺ 上昇、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。さらに、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のかも計算論的に解析する。

<研究期間の成果>

1) スパイクタイミング依存シナプス可塑性

我々は、STDP モデルを作成し、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 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、STDP 膜電位・シグナル伝達モデルを構築した (図 1a)。モデル中、プレシナプスニューロン発火 (プレ発火) はシナプスへのグルタミン酸刺激により表現し、ポストシナプスニューロン発火 (ポスト発火) は電流入力に伴う膜電位ダイナミクスにより表現した。ポストの膜電位を固定しつつ、一定頻度 (1Hz) のプレ発火を行うと、固定した膜電位に依存して LTP/LTD が入力された。この結果は、実験的に観測されている膜電

位依存シナプス可塑性と一致する。

続いて、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-ポスト）のペア発火による STDP の再現を試みた。その結果、STDP の長期増強（LTP）は再現できたものの、長期抑圧（LTD）を再現することはできなかった（図 1c 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 を導く（ $T_{\text{post}} - T_{\text{pre}} < 10$ 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（ $T_{\text{post}} - T_{\text{pre}} > -30$ ms）。この結果は、実験より示唆されている STDP の LTD を導くメカニズムが不完全であることを示す。実験より、ポスト→プレ発火時には、ポスト発火に伴う膜電位依存 Ca^{2+} チャンネル（VGCC）性の Ca^{2+} シグナルが、プレ発火時の NMDA 受容体の活性を抑圧することで、LTD を導く可能性が示唆されている。しかし、モデルシミュレーションでは、VGCC 性の Ca^{2+} シグナルよりはるかに大きな NMDA 受容体自身の 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った。VGCC 性の小さな Ca^{2+} シグナルは LTD のタイミング検知器として働かなくてはならないが、同時に NMDA 受容体性の大きな Ca^{2+} シグナルはシナプス可塑性の誘導に必要である。シナプスの Ca^{2+} シグナルは、ポスト→プレ発火

のタイミング検知とシナプス可塑性の誘導という 2 つの役割を要求されており、それを分離することができない。

Ca^{2+} シグナルは 2 つの役割を持たなくてはならない。しかし、 Ca^{2+} は一種類の分子であり、この場合空間的に同じ場所で作用している。我々は、矛盾を埋める種々の可能性を検討した結果、NMDA 受容体にアロステリック効果があるのではないかとする仮説にたどり着いた（図 1b）。NMDA 受容体を活性化させるグルタミン酸結合サイトと、活性を抑圧する Ca^{2+} CaM 結合サイトの間にアロステリック効果があると仮定すると、ポスト発火（VGCC 性の Ca^{2+} シグナル）による NMDA 受容体の抑圧を実現しつつ、NMDA 受容体性の Ca^{2+} シグナルによる可塑性の誘導を実現することができる。NMDA 受容体にアロステリック効果をモデルに取り入れてシミュレーションを行うと、STDP の LTD を完全に再現することができた（図 1c 右）。

さらに、我々の STDP モデルは、プレ→ポスト発火やポスト→プレ発火による STDP のみならず、プレ→ポスト→プレ発火、ポスト→プレ→ポスト発火（Triplet）、プレ→ポスト→ポスト→プレ発火（Quadruplet）により誘導されるシナプス可塑性ほか、ありとあらゆるニューロン発火で誘導されるシナプス可塑性を正確に再現することが分かった。さらに、実験で観測される NMDA 受容体抑圧の時間パターンもアロステリック効果の存在を支持することが分かった。ひるがえって、これらの結果は NMDA 受容体の未知のアロステリック効果、あるいはそれに相当する効果が STDP に必要なタイミング検知メカニズムであることを示唆する理論的予言になっていた。

さらに、作成された詳細な STDP モデルを縮約し、本質を抽出した単純 STDP モデルを開発することに成功した。その結果、プレ・ポスト発火の順序にともなう NMDA 受容体の 2 重の役割をより明確にすることができた。この単純 STDP モデルはコンピュータシミュレーションを行う際の計算コストが低いため、多数のシナプスが各々独立に STDP を生ずる神経ネットワーク中における STDP をシミュレーションすることができる。

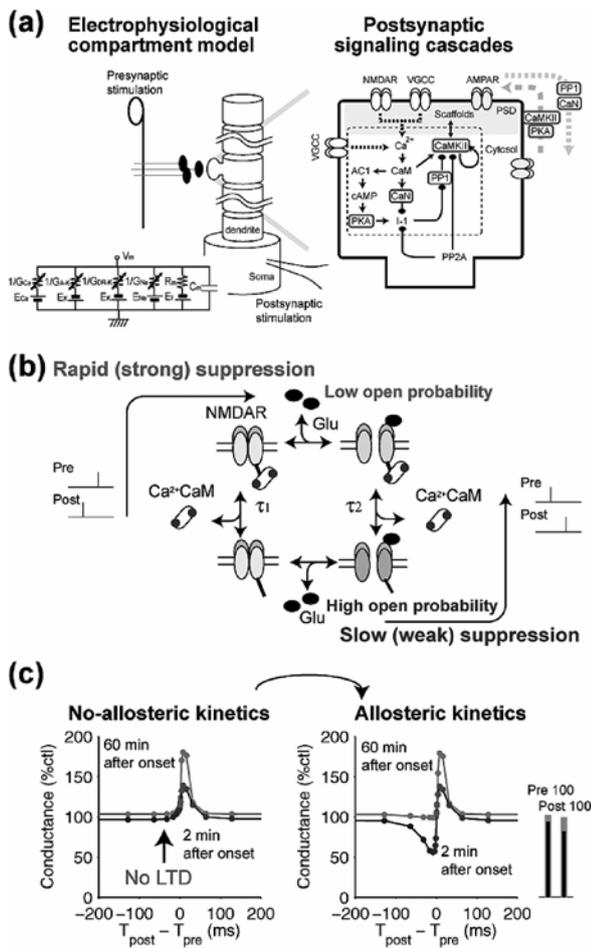


図 1: STDP を説明する NMDA 受容体のアロステリック効果。(A) 作成した膜電位モデル (左) とシグナル伝達モデル (右)。(B) 提案する新規アロステリック効果。NMDA 受容体 (NMDAR) はグルタミン酸 (Glu) によって活性化され、その活性は Ca^{2+} が結合したカルモジュリン (Ca^{2+} CaM) によって抑圧されるが、 Ca^{2+} CaM の結合時定数 (τ_1 , τ_2) は、Glu 酸の有無により変化すると考えた。(C) プレ-ポスト刺激を行った際のシナプス強度変化。横軸はプレ発火 (T_{pre}) とポスト発火 (T_{post}) の相対時刻。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。

2) 網膜視蓋系の方向選択性の獲得

我々は、STDP モデルをアフリカツメガエルの視覚系神経ネットワークに適用し、STDP による視覚システムの機能獲得過程の解明を試みた。その結果、STDP により視覚系ネットワークが方向選択性を獲得するためには、視蓋ニューロン同士の興奮性のシナプス結合が重要な役割を果たすことが分かった。

まず、解剖学や電気生理学の知見に基づいて、視覚系神経ネットワークモデルを構築した（図 2）。このモデルは、網膜神経節細胞が分布する網膜層と、視蓋ニューロンおよび介在ニューロンが分布する視蓋層の二層からなる。網膜神経節細胞は、局所範囲内で光の明暗を検知して発火する（図 2b,e）。網膜神経節細胞の発火は、2 つの経路を通して視蓋ニューロンへ入力する。一つは STDP の生ずる興奮性シナプスを介する直接経路、もう一つは介在ニューロンを経由し、抑制性シナプスを介して視蓋ニューロンへ入力する間接経路である（図 2a）。さらに、視蓋ニューロン同士はお互いに興奮性の相互結合をもつ（図 2a）。つまり、視蓋ニューロンは、網膜神経節細胞からの興奮性入力と近傍の視蓋ニューロンからの興奮性入力、介在ニューロンからの抑制性入力の三つの入力を受ける。このように複雑なアフリカツメガエルの視覚系を、(1) 光刺激に対する網膜神経節細胞の発火の確率モデル（図 2b,e）、(2) 介在ニューロンと視蓋ニューロンの Hodgkin-Huxley 様モデル（図 2d,e）、(3) 単純 STDP モデルの 3 つを組み合わせることで、コンピュータ内に仮想視覚系神経ネットワークとして再現した。

続いて、視蓋ニューロンが方向選択性を獲得するプロセスを明らかにすることを試みた。アフリカツメガエルのオタマジャクシを用いて実験を行った先行研究によると、特定方向 (Training 方向) に移動するバーを繰り返し提示すると (図 2a, 3a)、その後、Training 方向に動く視覚刺激に対してのみ視蓋ニューロンへの入力が増大する (方向選択性、図 3b)。作成した視覚系神経ネットワークモデルに Training 方向に移動するバーを繰り返し提示すると、実験同様、Training 方向に動く視覚刺激に対して視蓋ニューロンへの入力が増大する「方向選択性」の獲得を再現することができた。図 3b, c に示すように、実験・モデル共に Training 方向に対するシナプス入力量は増えるが、それ以外の方向へ動く視覚刺激を提示した時に入力量が変化することはない。モデルにおいて可塑的な変化を与えるものは網膜神経節細胞-視蓋ニューロン間の STDP のみであるため、この方向選択性は STDP により獲得されたものである。

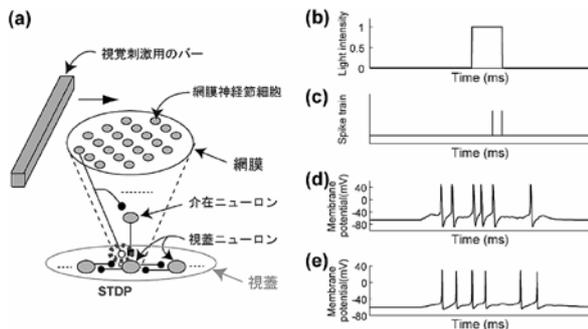


図2: アフリカツメガエル視覚系神経ネットワークモデルの構築。(a) モデルの概要。(b-e) 光のバーを一方方向に一回動かしただけの各ニューロンの応答。(a) 中の矢印で示した網膜神経節細胞が (b) 受容する光の強度変化と、(c) スパイクを発生する時刻。(d) 介在ニューロンの膜電位の時間変化。(e) 視蓋ニューロンの膜電位の時間変化。STDPは赤点線内のシナプ스에서生じる。

では、方向選択性はどのようなプロセスにより獲得されたのであろうか? モデルを用いて解析を行うことの利点として、モデルの内部構造や外挿刺激に対する反応を注意深く観察することで、新たな知見の獲得が可能であることが挙げられる。ここでは、視蓋ニューロンに対する三つの入力をそれぞれ独立に観測していくことで、視蓋ニューロンが方向選択性を獲得する機構として、下記に述べる一連のプロセスを提案した。

1. STDP により、網膜神経節細胞から視蓋ニューロンへの興奮性シナプス入力のうち、バーを提示したとき最初に入力を与えるシナプスは増強し、遅れて入力を与えるシナプスは抑圧される。つまり、視蓋ニューロンへの興奮性入力のタイミングが早くなる。
2. 介在ニューロンを介する抑制性入力に可塑性は生じない。
3. 結果として生じる興奮性入力と抑制性入力のタイミングのズレにより、バー刺激中、視蓋ニューロンは早期に発火し、視蓋ニューロン同士の発火タイミングは同期する。
4. 多数の視蓋ニューロンが早いタイミングで同期発火すると、相互結合により、同期バースト発火が起きる。
5. 他の視蓋ニューロンからのシナプス入力が増加する。

すなわち、方向選択性の獲得は、網膜からのシナプス入力が増大するためではなく、視蓋ニューロン同士の同期発火に伴う、側方からのシナプス入力量の増大によって達成されるのである。このシナリオに沿うことで、他のあらゆる実験と矛盾することなく、アフリカツメガエルの視覚系神経ネットワークにおける方向選択性の獲得を説明できることが明らかとなった。

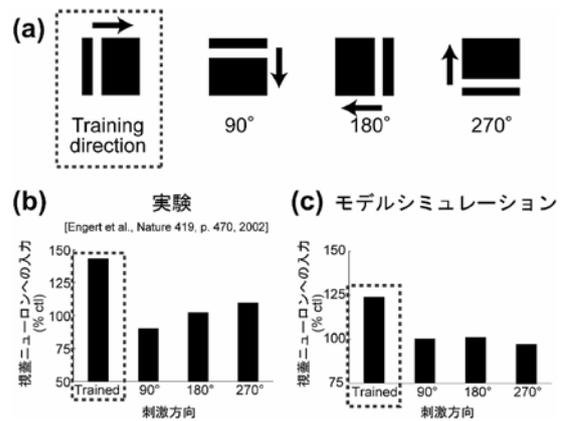


図3: 仮想視覚系神経ネットワークにおける方向選択性の獲得。(a) 提示する視覚刺激。一定方向に動く光のバーを1秒ごとに60回提示してTrainingを行い(赤点線内)、その後、各方向に動く光のバーを提示した時の、視蓋ニューロンへの入力を観測した。(b) 実験結果 (Engert et al., Nature 419, p470, 2002) と、(c) モデルシミュレーションの結果。いずれも Training を行った方向 (Training 方向) の視覚刺激を提示した場合のみ、視蓋ニューロンへの入力量の増加が観測された (赤点線内)。

3) CaMKIIの双安定性の解析

昆虫細胞 Sf21 においてリコンビナント CaMKII を発現させて精製し、同様に E-Coli において PP1 を発現させて精製した。また、calmodulin は精製品を購入した。現在、これらのシグナル伝達分子を様々な濃度、時間順序で反応させ、CaMKII Thr286 のリン酸化を観測してモデルと比較している (図 4)。特に、CaMKII が双安定性を示し、分子メモリとして機能するか否かを明らかにするため、「ヒステリシス性」の観測を試みている。すなわち、CaMKII がリン酸化・非リン酸化した状態から同じ Ca^{2+}

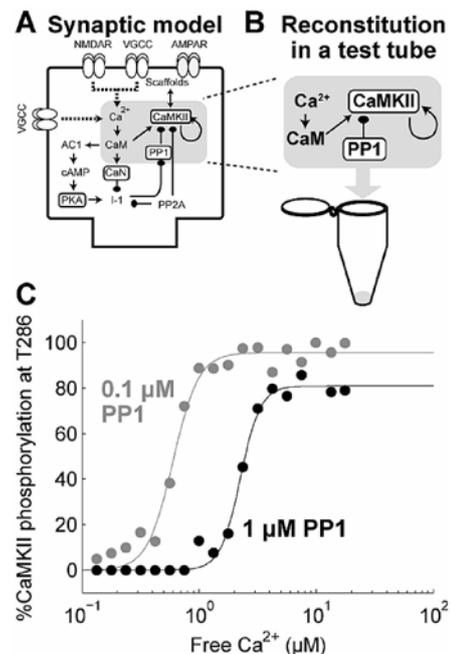


図4: 再構成系における CaMKII 活性の実験。(A) STDP のシグナル伝達モデル。(B) 再構成系。(C) 実験結果の例。ここでは、PP1 の濃度に依存した CaMKII Thr286 リン酸化の割合を示す。PP1 は CaMKII リン酸化の Ca^{2+} 刺激に対するしきい値を変えつつ、最大リン酸化割合を変化させる。

刺激を与え、初期リン酸化状態に依存して定常状態の CaMKII リン酸化割合が異なるか否かを検討している。さらに実験結果をモデルを用いて検討している。これにより、CaMKII 双安定性の分子メモリとしての安定性を明らかにすることを試みている。

さらに、現在 CaMKII リン酸化の空間的広がりをモデル、実験の両面から明らかにすることを試みている。モデルにおいて、CaMKII リン酸化の空間的広がりをシミュレーションすると、CaMKII リン酸化は局在して安定した。この局在は、刺激したシナプスのみで長期可塑性が生じる“シナプス特異性”と関係している可能性がある。そこで、実際の CaMKII リン酸化の局在を観測するために、CaMKII の FRET “Camui” を用いた蛍光観測を企画している。現在、予備実験としてタグ付きの CaMKII を作成し、通常の CaMKII と混ぜることで、CaMKII 分子間の相互作用(自己リン酸化)を明らかにする実験を開始している。

4) ミオシン軽鎖のリン酸化

ミオシン軽鎖のリン酸化シミュレーションモデルについては、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、その結果をシミュレーションモデルに再度反映させることを目指した(図5)。現在、未知の経路の特性としてミオシン軽鎖リン酸化の閾値現象を見出している。これにより、仮に未知の経路を分子レベルで同定しなくてもその特性を明らかにすることに成功した。また、この特性から未知の分子が同定された場合に、迅速にどのような解析を行えばよいのかも明確になりつつある。これらの解析はミオシン軽鎖リン酸化のみならず、さまざまシグナル伝達経路の特性の解析に応用できるものである。今回の成果の一つでもある分子の細胞内での内部状態観測をシミュレーションモデルと比較・検討することによる双方向性の解析手法を用いて、整合性の極めて高いシミュレーションモデルの構築手法が開発できた。実際に細胞運命決定を制御する ERK についても同様の手法で、未知の特性を明らかにすることに成功している。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。これらの成果を論文として発表した。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。

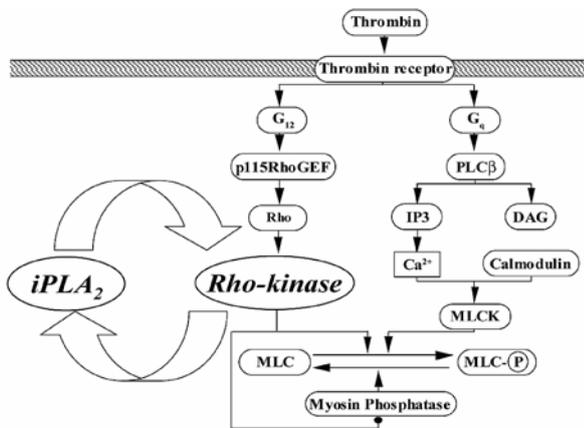


図5: ミオシン軽鎖リン酸化のシグナル伝達カスケード。

5) 小脳LTD

小脳の LTD においては、NO (nitric oxide) の小脳の学習における計算論的役割を解析した。また、小脳 LTD における Ca²⁺ と

LTD の関係についても実験的な検証を開始しつつあり、我々が当初作成した LTD モデルの予測結果と実験結果が驚くほど正確な相関を示すことを見出しつつある(図6)。

小脳の LTD においては、Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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。

<国内外での成果の位置づけ>

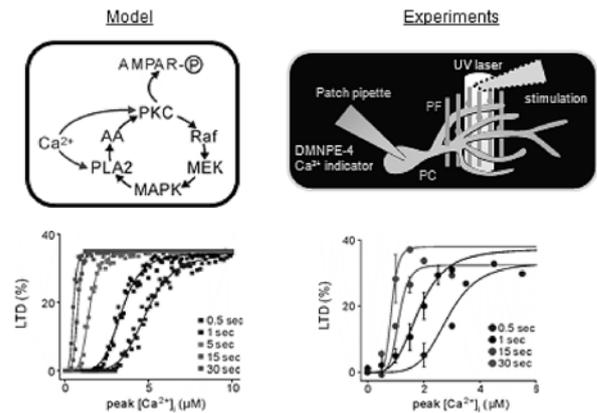


図6: 小脳LTDのシグナル伝達モデル(左)と実験(右)。

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 を再現する膜電位・シグナル伝達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、STDP が現実の神経回路中で記憶や学習を導くプロセスを明らかにする研究として、視覚神経ネットワークにおける方向選択性の獲得のモデルシミュレーションを行い、これに成功した。複雑で理解が難しい哺乳動物ではなく、単純で実験データの豊富なアフリカツメガエル(モデル生物)の視覚系に注目することで、STDP を介した方向選択性獲得のプロセスを具体的に明らかにしたのは、本研究が世界で初めてである。

CaMKII 双安定性の解析は、それがそのまま生物の記憶の理解に結びつくため、インパクトは大きい。コントロールされた環境で行う再構成系での実験と理論モデルを比較する方法は、雑多な作用が混在し、直接の比較が難しい生きた細胞と理論モデルの間をつなぐ一つの方法論になる可能性がある。

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。

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のは我々のグループしかなく、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。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

STDPの膜電位・シグナル伝達モデルにより、NMDA受容体のアロステリック効果が予測された。そこで、電気生理実験のセットアップを行い、予測を直接実験で検証することを試みた。まず、ラット視覚野スライスのII/III層ニューロンにPneumatic picopumpによりNMDA刺激を行い、同時に脱分極を行うことで、プレ・ポスト発火に対応する刺激を再現した。刺激中、NMDA受容体性の電流を観測し、NMDA受容体の活性にアロステリック効果の特徴が現れるか否かを検討した。その結果、そもそもアロステリック効果を観測する上で必要条件である、NMDA受容体のCa²⁺抑圧を観測することができなかった。先行研究においてはNMDA受容体のCa²⁺抑圧は観測されており、NMDA受容体のCa²⁺抑圧自体が実験条件依存的な現象であると考えられる。これは、すなわちSTDP自体が無条件で発生しない可能性を示唆し、新たな実験テーマになりうる。引き続き検証実験を行う場合は、実験計画の再構築、大規模化が必要である。

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おり、同定には至っていない。

<今後の課題、展望>

我々は、STDPの膜電位・シグナル伝達モデルを構築し、NMDA受容体のアロステリック効果を予測した。アロステリック効果の実験による直接の実証は未だできていないものの(上述)、存在そのものが否定されたわけではなく、さらなる検証実験が必要である。現在、Caged-Ca²⁺によりニューロン内Ca²⁺を人工的に上昇させることで、NMDA受容体のCa²⁺抑圧を生じさせる実験を検討している。

一方、視覚系神経ネットワークにおける方向選択性の獲得では、モデル神経ネットワークの解析により、各種実験結果を矛盾無く説明することができた。しかし、モデルが説明する実験データは少なく、信頼性が高いとは呼べない。実験では、提示するバーの動く速度を変化させた場合の方向選択性の学習効率が調べられており、これらの実験データをモデルへの外挿刺激として用いることで、モデルの一般化を試みる予定である。さらに、モデルを拡張して様々な視覚機能獲得のプロセスを明らかにし、実験で検証可能な予測を行うことが今後の課題となる。

また、CaMKIIの双安定性の解析では、CaMKII, PP1, calmodulinといったシグナル伝達分子を精製し、反応させる再構築系の実験系の構築に成功した。しかし、CaMKII双安定性やCaMKIIリン酸化の空間局在の検証、STDPモデルや現実の生体シナプスとの比較といった具体的な成果を挙げるには、未だ時間が不足である。まずは十分な実験データの蓄積を行い、それを元に信頼できるモデルを構築する必要がある。さらに、例えば理論モデルにより予言されている双安定性を実験的に詳細に検討し、もし、双安定性が実現しないのであれば、モデル中不足であった要素が何であるか明らかにする必要がある。

細胞収縮においては、未知の経路の分子を同定することが今後の課題である。分子の同定は従来のロースルーポットな解析を中心としたが現在報告されている関連分子の中には関与する分子がない。しかし、現在はsiRNAライブラリを用いたゲノムワイドのスクリーニングにより持続性で特異的に関与する遺伝子の同定が原理的に可能となってきている。siRNAライブラリを用いて大規模なスクリーニングによる未知の分子の同定とその動態解析が今後

の課題である。

<研究期間の全成果公表リスト>

- 1) 論文
1. 0905071618
Urakubo, H., Honda, M., Tanaka, K., and Kuroda, S.: Experimental and computational aspects of signaling mechanisms of spike-timing-dependent plasticity, *HFSP Journal*, 3, 240-254 (2009)
2. 0804021633
Urakubo, H., Honda, M., Froemke, R.C. and Kuroda, S.: Requirement of an allosteric kinetics of NMDA receptors for spike-timing-dependent plasticity, *J. Neurosci*, 28, 3310-3323 (2008)
3. 0709281803
Ogasawara, H., Doi, T., Doya, K., and Kawato, M.: Nitric oxide regulates input specificity of long-term depression and context dependence of cerebellar learning, 3, e179, (2007)
4. 0709281803
Ogasawara, H., Doi, T., Doya, K., and Kawato, M.: Nitric oxide regulates input specificity of long-term depression and context dependence of cerebellar learning, 3, e179, (2007)
5. 0709281800
Tanaka, K., Khiroug, L., Santamaria, F., Doi, T., Ogasawara, H., Ellis-Davies, G.C., Kawato, M., and Augustine, G.J.: Ca²⁺ requirements for cerebellar long-term synaptic depression: role for a postsynaptic leaky integrator, *Neuron*, 54, 787-800, (2007)
6. 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. Biol.*, 3, e108, (2007)
7. 0607231636
Maeda, A., Ozaki, Y., Sivakumaran, S., Akiyama, T., Urakubo, H., Usami, A., Sato, M., Kaibuchi, K. and Kuroda, S.: Ca²⁺-independent phospholipase A2-dependent sustained Rho-kinase activation exhibits all-or-none response, *Genes Cells*, 11, 1071-1083 (2006)
8. 0607231636
Maeda, A., Ozaki, Y., Sivakumaran, S., Akiyama, T., Urakubo, H., Usami, A., Sato, M., Kaibuchi, K. and Kuroda, S.: Ca²⁺-independent phospholipase A2-dependent sustained Rho-kinase activation exhibits all-or-none response, *Genes Cells*, 11, 1071-1083 (2006)
9. 0507251307
Doi, T., Kuroda, S., Michikawa, T., and Kawato, M.: Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells, *J. Neurosci.*, 25 (4), 950-961, (2005)
10. 0507251258
Ozaki, Y., Sasagawa, S. and Kuroda, S.: Dynamic characteristics of transient responses, *J. Biochem.*, 137, 659-663, (2005)
11. 0507251254
Sasagawa, S., Ozaki, Y. Fujita, K. and Kuroda, S.: Prediction and validation of the distinct dynamics of transient and sustained ERK activation, *Nat. Cell Biol.*, 7, 365-373, (2005)

2) 学会発表

国際学会

1. Hidetoshi Urakubo, Minoru Honda, Shinya Kuroda, Biophysical modeling of spike-timing-dependent plasticity, ASIA SIMULATION CONFERENCE 2009, October 2009, Shiga
2. Minoru Honda, Hidetoshi Urakubo, Shinya Kuroda, Simulation Analysis of Spike-Timing Dependent Synaptic Plasticity from Signal Transduction Pathway to Visual Neuronal Network, The 2nd Taiwan-Japan Young Researchers Conference on Computational and System Biology, November 2008, Tokyo
3. Minoru Honda, Hidetoshi Urakubo, Shinya Kuroda, Encoding of Visual Information into Neuronal Networks by Spike-Timing Dependent Synaptic plasticity, Japan-Taiwan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology, March 2008, Taiwan
4. Hidetoshi Urakubo, Minoru Honda, Robert C. Froemke, and Shinya Kuroda, An allosteric kinetics of NMDA receptors required for spike timing-dependent plasticity, The 37th annual meeting of the Society for Neuroscience, November 2007, San Diego, U.S.A.
5. Shinya Kuroda, Hidetoshi Urakubo and Robert C. Froemke, Prediction and validation of a novel allosteric kinetics of NMDARs as a spike-timing detector, Cosyne 2007 meeting, February 2007, Salt Lake, U.S.A.
6. Shinya Kuroda, Hidetoshi Urakubo and Robert C. Froemke, Systems analysis of spike-timing dependent synaptic plasticity, The seventh International Conference on Systems Biology, October 2006, Yokohama

国内学会

1. Minoru Honda, Hidetoshi Urakubo, and Shinya Kuroda, Acquisition of direction selectivity through STDP in retinotectum, 第32回日本神経科学大会, 2009年9月18日, 名古屋
2. Minoru Honda, Hidetoshi Urakubo, Shinya Kuroda, Simulation Analysis of Spike-Timing Dependent Synaptic Plasticity from Signal Transduction Pathway to Visual Neuronal Network, Joint Computational Science Workshop 2009, 2009年7月9日, 神奈川
3. 黒田真也, スパイクタイミング依存シナプス可塑性による学習, 千里ライフサイエンスセミナー, 2009年3月16日, 大阪
4. 黒田真也, 浦久保秀俊, 本田稔, Robert C. Froemke, Systems biology of Spike-Timing Dependent synaptic Plasticity, 第85回日本生理学会大会, 2008年3月25-27日, 東京
5. 浦久保秀俊, 本田稔, Robert C. Froemke, 黒田真也, スパイクタイミング依存シナプス可塑性のタイミング検知メカニズム, 生命科学研究ネットワークシンポジウム 2007, 2007年9月, 東京

4) データベース/ソフトウェア

1. 0806151330 (データベース)
STDPの電気生理・生化学モデル
<http://www.kurodalab.org/info/STDP/index.html>
2. 0708071208 (データベース)
ミオシンリン酸化反応の生化学反応モデル
<http://www.kurodalab.org/info/myosin>