



博士 (人間科学) 学位論文 概要書

小脳プルキンエ細胞における
Ca²⁺シグナリングカスケードの果たす役割

1999年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

廣野 守俊

指導教授 吉岡 亨

運動学習を司るとされる小脳プルキンエ細胞には GTP 結合蛋白質 (G タンパク) と共役するメタボトロピックグルタミン酸受容体の 1 型 (mGluR1) が平行線維-プルキンエ細胞間のシナプスに豊富に存在することが知られており、この mGluR1 を介して生じるシナプス電流、slow EPSC は平行線維を頻回刺激した時に記録されることは既に知られている。しかし、この slow EPSC の発生に関する生理的機序やその生理的役割は未だ不明な点が多い。その主な理由として mGluR1 の活性化に伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が 10^{-7} M から 10^{-6} M へと約 10 倍上昇することが挙げられる。

これまでに知られている mGluR1 のシグナリング経路は以下のようになっている。即ち、mGluR1 はアゴニスト刺激により活性化されると G タンパクの $G_{q/11}$ を活性化し、その後イノシトールリン脂質代謝回転を促進して一過性に $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。この上昇した $[Ca^{2+}]_i$ によって Na^+/Ca^{2+} 交換体の活性化や Ca^{2+} 依存性の非選択的陽イオンチャネルの活性化が起こり、これにより slow EPSC が発生するものと考えられてきた。

しかし 1996 年に Batchelor らが mGluR1 を介した電氣的応答は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を伴わなくても記録されると報告したことにより、 Ca^{2+} が原因となって slow EPSC が発生するという仮説は成り立たなくなった。そこで本研究では先ず細胞内情報伝達経路に着目しながら、この slow EPSC と同様な興奮性内向き電流を、mGluR1 のアゴニストである 1S,3R-ACPD 投与によって再現し、この内向き電流の発生メカニズムの解明を試みた。

この結果 slow EPSC は mGluR1 と共役する G タンパクが直接非選択的陽イオンチャネルを活性化することにより誘起されることが示唆された。

Ca^{2+} シグナリングカスケードという視点から見るともしこれが事実ならば G タンパクの下流に位置づけられる Ca^{2+} 動員はどのような役割を果たしているの

かそれを明らかにしておく必要がある。そのために本研究では GH₃ クローン細胞を用いて G タンパクより下流の Ca²⁺シグナリングの研究を行った。GH₃ 細胞は小脳切片中のプルキンエ細胞と同様の情報伝達装置を所有しているにも拘わらず、培養細胞であるために、神経支配はもとより、隣接するグリア細胞からの影響も排除して単一神経細胞としての実験が可能である。この細胞を用いて行なった一連の研究の結果、以下のような諸事実が明らかになり Ca²⁺シグナリングの生理的役割に対する理解が一段と進んだ。

- (1) Ca²⁺シグナリングは[Ca²⁺]_i オシレーションを利用して細胞全体に伝播していくと考えられるが、そのオシレーションの発生には Ca²⁺チャネル (Ca²⁺活動電位) を介した細胞外 Ca²⁺の流入と Ca²⁺-ATPase ポンプによる小胞体への Ca²⁺取り込み、そして CICR (Ca²⁺-induced Ca²⁺ release) による増幅効果が重要であることがわかった。
- (2) イノシトールリン脂質代謝回転の促進によって自発的な Ca²⁺活動電位頻度の上昇が見られたが、これはおそらく Ca²⁺依存性 K⁺チャネルコンダクタンスの低下によると考えられ、それにはある種の低分子量 G タンパクが寄与することが示唆された。
- (3) この Ca²⁺依存性 K⁺チャネルは charybdotoxin によって阻害されることはすでに知られているが、センチニクバエから単離された毒素 sapecin B もこのチャネルを完全に阻害し、さらに急速活性化型 K⁺電流に対しても抑制効果を持つことが示された。

以上の結果より神経細胞における mGluR1 の役割は三量体 G タンパクを活性化することにより、

- (1) 直接 slow EPSC を発生させる。
- (2) 引き続いて上昇する Ca²⁺は CICR によってさらに増幅され、最終的に K⁺

チャンネルコンダクタンスを修飾する。これにより slow EPSC の波形に影響を与え得る。

といった結論が自然に導かれた。小脳プルキンエ細胞では charybdotoxin 感受性 K^+ チャンネルの存在が既に明らかとなっているので、このシグナリング経路が実際に働いている可能性は高い。尚、この K^+ チャンネルはシナプス可塑性を支配する charybdotoxin 感受性 K^+ チャンネルと同一である可能性が高いことを指摘しておきたい。

このように脳切片中の神経細胞における情報伝達機構を解明する際、シグナリングの経路の途中を抽出して研究を行うには GH_3 細胞などいわゆる神経細胞様クローン細胞を用いることは極めて有効であることが分かった。