

## 小脳プルキンエ細胞における PKC トランスロケーション波とその数理モデル.

東北大学・大学院情報科学研究科 片山 統裕 (Norihiro Katayama)

Graduate School of Information Sciences,  
Tohoku University

### 1 はじめに

中枢神経系の情報処理においてはニューロンの電氣的・化学的活動が重要な役割を果たしている. 活動電位などの電氣的活動は, イオンチャネルやトランスポーターなどの機能分子の活性によるが, これらは細胞内シグナル伝達系とよばれる分子反応カスケードによる複雑な調整を受けている. そのため, ニューロン興奮性の調整メカニズムを解明するには, 細胞内でシグナル分子がどのように活性化しているか, その時空間ダイナミクスを明らかにする必要がある.

細胞内シグナル伝達分子のひとつである C 型タンパク質リン酸化酵素 (PKC) はニューロンの興奮性の調節に関与していることが知られている. PKC は活性化すると, 細胞内空間における分布が基質タンパク質の存在する場所に集中するという性質 (トランスロケーション) がある. そのため, PKC の空間分布を観測することによってその活性化ダイナミクスを解析することが可能であると考えられる.

本稿では, 小脳プルキンエ細胞の樹状突起において観察される PKC 活性の時空間ダイナミクスと, その現象に関連していると考えられている細胞内カルシウムダイナミクスのモデルについて述べる.

### 2 プルキンエ細胞樹状突起における PKC $\gamma$ のトランスロケーション波

Sakai らは, PKC のサブタイプのひとつである PKC  $\gamma$  と, 蛍光タンパク質 GFP を融合したタンパク質を中枢ニューロンに特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作成し, その小脳スライス標本を用いて PKC  $\gamma$  の時空間動態を蛍光イメージング法により観察した[1]. その結果, プルキンエ細胞の樹状突起において, 平行線維シナプス入力によって PKC  $\gamma$  のトランスロケーションが誘発され, 樹状突起の幹を波状に伝播する現象を発見した (図 1). この現象には代謝型グルタミン酸受容体の活性化が関与しており, 伝播速度が  $4\sim 10\mu\text{m/s}$  程度であった. また, 30 分程度の不応期がみられた. ホールセルクランプ法を用いた電気生理学的計測により, トランスロケーション波を誘発するには, ニューロンが発火しない程度に脱分極した状態で 1 Hz 10 発以上の平行線維入力が必要であることが示唆された.

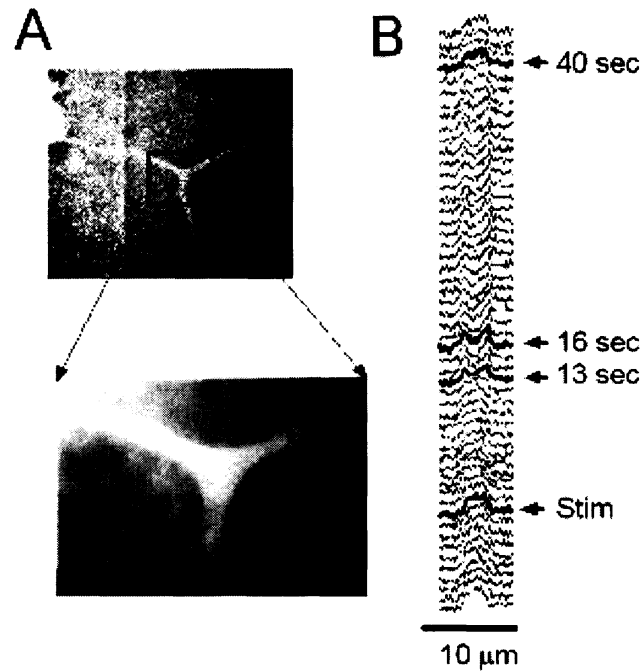


図1：プルキンエ細胞樹状突起における PKC トランスロケーション現象。A: プルキンエ細胞樹状突起における PKC $\gamma$ -GFP の蛍光顕微鏡画像。B: 図 A の点線部分における蛍光強度分布の時間経過。平行線維に 20 Hz 20 発の電気刺激を与えてから 13 秒後に、樹状突起幹の中央部の蛍光強度が小さくなるとともに細胞外に近い領域の蛍光強度の増加が一過性に観察された。文献[3]より許可を得て転載。

### 3 プルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウム波

PKC の活性は細胞内の遊離カルシウムイオンやジアシルグリセロールなどによって調節されている。分散培養細胞を用いた研究によれば、細胞内カルシウム濃度の増加に対しては秒オーダーでトランスロケーションが誘発されることが報告されている[2]。プルキンエ細胞樹状突起における PKC のトランスロケーションも細胞内カルシウム濃度の増加と関連している可能性が考えられる。そこで、坪川らは PKC $\gamma$ -GFP トランスジェニックマウスの小脳スライスにおいて、GFP を発現しているプルキンエ細胞樹状突起のカルシウム動態を蛍光イメージング法によって観察した。その結果、刺激条件によって、伝播速度  $100\mu\text{m/s}$  程度の速いカルシウム波と、 $10\mu\text{m/s}$  程度の遅いカルシウム波の 2 種類のカルシウム波が生じうることを見出した(図 2) [3]。特に、遅いカルシウム波の伝播速度が PKC トランスロケーション波と同程度で、また 30 分程度の不応期を持つことから、このカルシウム波が PKC トランスロケーション波を誘導している可能性が強く示唆された。

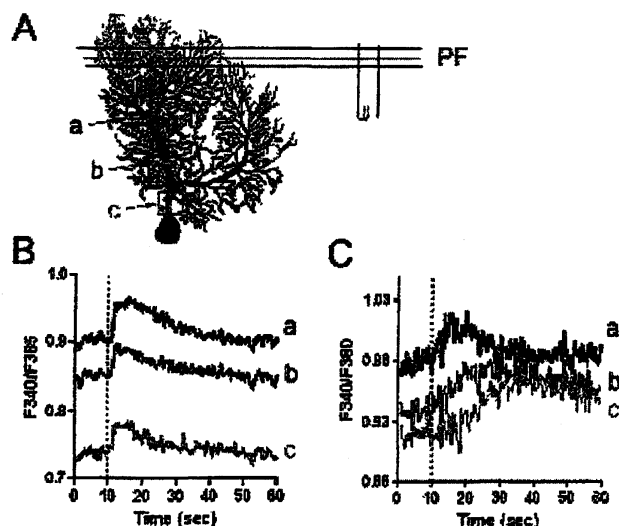


図 2: A: プルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウム濃度の蛍光観察. PF は平行線維を表す.  
B: 速いカルシウム波. C: 遅いカルシウム波. グラフ中の点線は刺激タイミングを表す. 文献[3]  
より許可を得て転載.

### 3 樹状突起におけるカルシウム波のモデル

以上の実験結果から、プルキンエ細胞樹状突起における PKC $\gamma$  トランスロケーション波が遅いカルシウム波に誘発されて生じている可能性が示唆された。しかしながら、実験的検証を進めるにはいくつかの技術的限界があった。すなわち、(1) トランスロケーション波は細胞膜への機械的刺激によっても誘発されることがあるため、パッチクランプなど電気生理学的記録の適用が極めて困難であること、(2) GFP とカルシウム感受性色素の蛍光スペクトルの重なりが無視できない程度存在するため同時イメージングが困難であること等である。これらの課題は、培養細胞系に比べ実験手法の制約が多い脳スライス実験系では解決が難しい。一方、培養細胞系では同時イメージングがすでになされており、PKC の細胞内動態と細胞内カルシウム濃度変動とはほぼ平行していることが明らかにされている[2]。そこで、われわれは PKC $\gamma$  のトランスロケーション波が遅いカルシウム波によって誘発されているという作業仮説を、プルキンエ細胞のマルチ・コンパートメントモデルを用いた数値解析により検討した。

ニューロンの樹状突起は複雑な分岐構造を持ったチューブ状の細胞膜構造である。簡単のため、樹状突起の各枝の断面方向においてはカルシウム濃度は均一であると仮定した。また、樹状突起内部（細胞内）のカルシウムイオンの濃度変化が次の 4 つの要因によって支配されていると仮定した（図 3）。すなわち、(i) 樹状突起長軸方向の拡散、(ii) 形質膜を横切る細胞外と細胞室内間の流動、(iii) 小胞体やミトコンドリアなどの細胞内貯蔵庫と細胞室内の流動、(iv) 細胞内のカルシウム結合タンパク質（カルシウムバッファ）との結合解離反応である。これらを考慮し、次式のように定式化した。

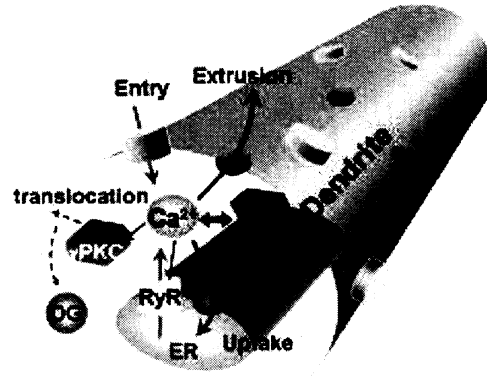


図3：ニューロン樹状突起におけるカルシウム制御機構の模式図。文献[3]より許可を得て転載。

$$\begin{aligned}\frac{\partial c}{\partial t} &= D_c \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + f(c) + g(b, c) \\ \frac{\partial b}{\partial t} &= D_b \frac{\partial^2 b}{\partial x^2} + h(b, c)\end{aligned}\quad (1)$$

ここに、 $t$ は時間、 $x$ は樹状突起の長軸方向の距離、 $c$ は遊離カルシウムイオン濃度、 $b$ はカルシウムバッファと結合したカルシウムイオン濃度を表す。 $D_c$ および $D_b$ は遊離カルシウムおよびカルシウムバッファの拡散定数である。 $f(c)$ は(ii)および(iii)の項、 $g(b, c)$ および $h(b, c)$ は(iv)の項を表す。

形質膜および細胞内貯蔵庫と細胞質間のカルシウム移動を表す関数 $f(c)$ は次式で与えた。

$$f(c) = -k_{p1}c + k_{p2}(c_o - c) - k_{s1}c + \left( k_{s2} + \frac{k_{s3}c^n}{c^n + K_{CICR}} \right) (c_s - c) \quad (2)$$

ここに、 $k_{p1}$ 、 $k_{p2}$ 、 $k_{L1}$ 、 $k_{L2}$ は速度定数、 $c_o$ は細胞外カルシウム濃度である。最後の項はカルシウム濃度に依存した細胞内貯蔵庫からのカルシウム放出機構（Calcium-induced Calcium Release, CICR）を表し、自己再生的なカルシウム濃度増加をもたらす[4]。 $K_{CICR}$ はCICRチャネルとカルシウムの結合解離定数、 $n$ はヒル定数、 $c_s$ は貯蔵庫内のカルシウム濃度を表す。

カルシウムイオンとカルシウムバッファとの結合解離反応は一次反応を仮定した。



$P$ と $B$ はそれぞれ遊離状態およびカルシウムイオンと結合した状態のカルシウムバッファを表す。カルシウム濃度を $c$ 、 $B$ の濃度を $b$ 、バッファの総量を $b_t = P + B$ とおくと、反応速度式は

$$g(b, c) = -h(b, c) = k_-b - k_+(b_t - b)c \quad (4)$$

で与えられる。

反応拡散方程式(1)を構成する各項のオーダーには大きなばらつきがあるため、数値的に解くのは簡単ではない。しかしながら、カルシウムバッファについていくつかの仮定をおけば、次の1本の近似式にまとめることができ、数値解析がかなり容易になる[5]。

$$\left(1 + \frac{b_i}{K}\right) \frac{\partial c}{\partial t} = D_c \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} - f(c) \quad (5)$$

ここに  $K = k_-/k_+$  である．なお，ここで用いた仮定とは，カルシウムバッファとカルシウムイオンの結合解離反応が他に比べ十分速く ( $g(b, c) \approx 0$ )，カルシウムイオンとの親和性が低く ( $K \gg c$ )，さらに拡散が遅い ( $D_c \gg D_b$ ) というものである．実験データから推定されたモデル・パラメータの値を考慮すると，遅いカルシウム波についてはこれらの仮定が成立していることが期待できるので，本研究では式(5)を用いた．

樹状突起におけるカルシウム波をシミュレーションするためには，枝の太さや長さ，分岐構造などの形態情報が必要である．そこで，ニューロン形態データベースで公開されている C57BL6 系統マウス小脳プルキンエ細胞の 3 次元形態情報[6,7,8]を基に，約 5000 個の円柱（コンパートメント）で構成されたマルチ・コンパートメントモデルを構築した．偏微分方程式の数値解法としてはクランク・ニコルソン法を用いた．

#### 4 数値解析の結果

図 4 に，小脳プルキンエ細胞樹状突起におけるカルシウム波の数値シミュレーション結果の一例を示す．平行線維入力を模擬するために，樹状突起末端部にカルシウム電流を注入した．局所カルシウム濃度がある閾値以上に達すると，自己再生的なカルシウム濃度上昇が生じ，波状に樹状突起を伝播する様子が観察された．このカルシウム波の発生には CICR チャネルの活性化が必須であった．カルシウム波が発生するカルシウム濃度の閾値および伝播速度は CICR チャネルの結合解離定数に強く依存していた．細胞外からのカルシウム流入はカルシウム波発生に必要であるが，カルシウム波を直接駆動しているわけではないことが示唆された．

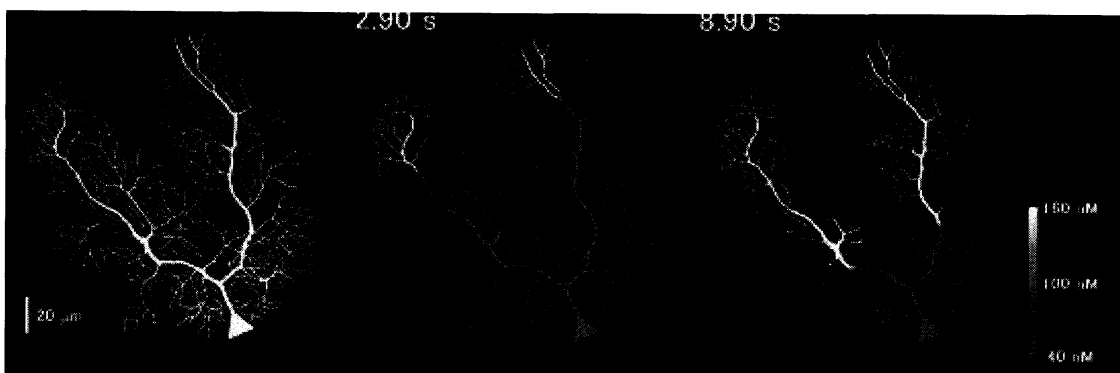


図 4：小脳プルキンエ細胞における遅いカルシウム波の数値シミュレーション結果．時刻 1 s に樹状突起末端領域にカルシウム電流を注入した．カルシウム濃度レベルを濃淡で表現した．左端：モデルプルキンエ細胞の形状．中央：シミュレーション時刻 2.9 s におけるカルシウム濃度分布．右端：8.9 s におけるカルシウム濃度分布．この例では伝播速度はおおよそ  $10 \mu\text{m/s}$  であった．

## 5 議論

数理モデル解析により、遅いカルシウム波における CICR メカニズムの関与が示唆された。このことを実際のプルキンエ細胞で確認するために2つの実験を行った。(1) まず、細胞外カルシウム濃度を 0.5 mM まで下げて平行線維に電気刺激を与えたところ、コントロールと同様の PKC  $\gamma$  トランスロケーション波が観察された。(2) つぎに、CICR に関与していることが知られるリアノジン受容体を活性化するカフェインを樹状突起末端部へ局所投与したところ、同様のトランスロケーション波が誘導されることが確認された。

以上の結果から、小脳プルキンエ細胞の樹状突起を伝播する PKC  $\gamma$  トランスロケーション波は、CICR が関与した遅いカルシウム波によって誘発されているという仮説が支持された。PKC  $\gamma$  トランスロケーション波の生理学的意義は未だ不明であるが、大脳皮質の錐体細胞等と比べてアクティブ・コンダクタンスに乏しい小脳プルキンエ細胞の樹状突起においては、樹状突起全域に分布するシナプス後部を調節する際に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

謝辞 本研究は、東北福祉大学の坪川宏教授、東北大学の中尾光之教授、神戸大学バイオシグナル研究センターの斉藤尚亮教授と柏木香博士の協力の下に行われました。ここに謝意を表します。

## 参考文献

- [1] Sakai N, Tsubokawa H, Matsuzaki M, Kajimoto T, Takahashi E, Ren Y, Ohmori S, Shirai Y, Matsubayashi H, Chen J, Duman RS, Kasai H, Saito N: Propagation of gamma-PKC translocation along the dendrites of Purkinje cell in gamma-PKC-GFP transgenic mice. *Genes to Cells*, 9 (10): 945-957 (2004)
- [2] Oancea E, Meyer T: Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals, *Cell*, 95 (3): 307-318 (1998)
- [3] 片山統裕, 斉藤尚亮, 横山弘之, 坪川宏: 小脳プルキンエ細胞における PKC  $\gamma$  の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性ダイナミクス, 第 24 回生体・生理工学シンポジウム論文集, 171-172 (2008)
- [4] Friel D:  $[\text{Ca}^{2+}]$  oscillations in sympathetic neurons: an experimental test of a theoretical model, *Biophys. J*, 68: 1752-1766 (1995)
- [5] Keener J, Sneyd J eds, *Mathematical Physiology*, Springer-Verlag, New York (1998)
- [6] Martone ME, Zhang S, Gupta A, Qian X, He H, Price DL, Wong M, Santini S, Ellisman MH: The cell-centered database: a database for multiscale structural and protein localization data from light and electron microscopy, *Neuroinformatics*. 1(4):379-95 (2003)
- [7] Ascoli GA: Mobilizing the base of neuroscience data: the case of neuronal morphologies. *Nature Rev. Neurosci.*, 7: 318-324 (2006)
- [8] NeuroMorpho.Org, URL: <http://neuromorpho.org>