

論文の内容の要旨

論文題目： A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines

(ドーパミンが側坐核スパイン形態可塑性に作用する鋭い時間枠)

氏名： 柳下 祥

条件づけ学習において報酬は強化すべき行動や感覚刺激のすぐ後に与えなければ効果的でないことはソーンダイクやパブロフによって記述されていた。報酬による条件づけ学習には側坐核や線条体といった脳部位が関わりとされ、これらの領域に新皮質、海馬、扁桃体から投射するグルタミン酸作動性のシナプスが、報酬シグナルであるドーパミンにより可塑性制御されることが学習の基盤にあると考えられてきた。動物の行動において報酬のタイミングが強化すべき行動や感覚刺激を決めていることから、ドーパミンの作用にも時間枠があることが予想される。しかし、線条体スライスにおける電気刺激を用いた可塑性実験では、グルタミン酸作動性神経とドーパミン作動性神経を独立して刺激することができなかつたため、時間枠の神経実体は不明であった。

そこで、マウスの脳の側坐核の神経細胞において、2光子刺激により単一のスパインでグルタミン酸のシグナルを、また光遺伝学によりドーパミンのシグナルを、それぞれ独立に操作することによりドーパミンの作用の時間枠を調べた。大脳の興奮性シナプスの後部にはスパインとよばれる構造がある。このスパインの体積と機能は相関しており、さらに、可塑性の刺激をあたえると刺激したスパインに特異的に頭部が増大しグルタミン酸のシグナルにより流れる電流値が増大する。このことから、長期にわたり安定するシナプスの可塑性には形態的な基盤があると考えられている。側坐核の主細胞である中型有棘神経もスパインを有するので、このスパインの形態可塑性がドーパミンにより制御されている可能性を検証した。

1. スパインの頭部の増大を増強するドーパミンの時間枠

ドーパミン報酬作用の神経基盤を明らかにするため、光刺激によりグルタミン酸のシグナルとドーパミンのシグナルとを独立して制御する実験系を構築した。ドーパミン神経特異的に Cre を発現する DAT-Cre マウスに Cre 依存的にチャンネルロドプシン2を発現する AAV を生後 20 日前後において脳注入した。2-3 週後に側坐核を含む脳スライス標本を作製し、青色レーザーによりチャンネルロドプシン2を視野の全体において刺激し、単一のスパインを2光子刺激によるケイジドグルタミン酸の分解により刺激できる系を構築した (図1a)。

側坐核にはドーパミン D1 受容体を発現し直接路を構成する中型有棘神経と、ドーパミン D2 受容体を発現し間接路を構成する中型有棘神経とがあるが、報酬による学習の獲得はドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘神経が中心となることが知られている。そこで、側坐核のドーパミン D1 受容体を発現する中型有棘神経をウイルスにより標識し、このスパインの形態可塑性に与えるドーパミン時間枠を調べた。まず、グルタミン酸の2光子刺激によりスパイクタイミング

依存的可塑性(STDP)刺激を単一のスパインに与えたが、形態可塑性はわずかしみられなかった。しかし、生体における反応を模したドーパミンの一過性の発火刺激を STDP 刺激のすぐあとにあたえたところ顕著な形態可塑性を示した (図 1 b)。STDP 刺激に対して様々な時間枠でドーパミン刺激を与えた結果、STDP 刺激の 0.6 秒後においてもっとも強い反応がみられた (図 1 c)。この形態可塑性はグルタミン酸 2 光子刺激による電流値の増加 (長期増強) をともなっていた。

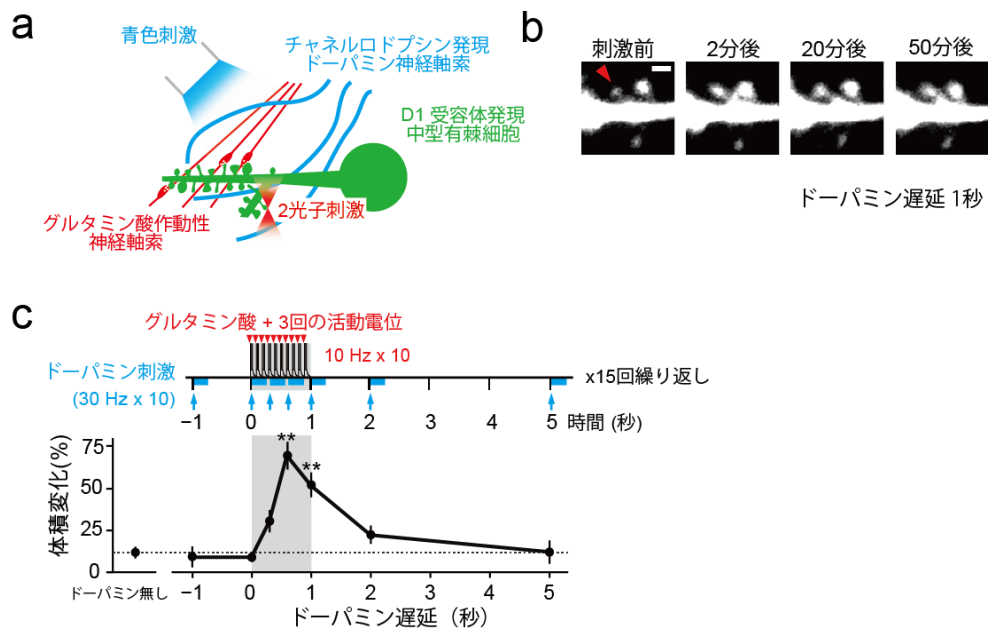


図 1. ドーパミンが側坐核スパイン形態可塑性を増強する時間枠

2. ドーパミンによるスパインの頭部の増大には CaMKII の脱抑制がかかわる

この形態可塑性にかかわるシグナル伝達系を薬理的に調べたところ、NMDA 受容体、CaMKII、タンパク質合成といった、海馬におけるスパインの形態可塑性と同様のシグナル伝達系が必要であった。また、ドーパミン D1 受容体および D1 受容体下流シグナルの PKA も関与していた。

さらにドーパミンが秒単位の時間枠でどのようにこれらシグナル伝達を修飾しているのを調べた。可塑性の修飾のタイミングは秒単位と速かったため、まず Ca^{2+} シグナルが修飾されている可能性を Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いて検討したが、STDP 刺激による Ca^{2+} 濃度の上昇はドーパミンによる明らかな修飾を受けなかった。そこで、 Ca^{2+} の下流である CaMKII の活性を FRET プローブにより測定した。スパインにおいて STDP 刺激だけでは微弱な CaMKII 活性の上昇しか認められなかったが、ドーパミンは可塑性を増強する時間枠と同様の時間枠でのみスパイン CaMKII 活性を増強した。このドーパミンによる CaMKII 活性および形態可塑性の増強作用は PKA 下流シグナルである Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa (DARPP-32)依存的であった。この DARPP-32 は PP-1 を強力に抑制することが知られているが、ドーパミンの作用は Protein phosphatase-1 (PP-1)を阻害することにより置換された。これらのことから、ドーパミンは PKA-DARPP32-PP-1 経路を介して CaMKII の脱抑制をすることで可塑性を制御しているものと考え

られた。

3. 時間枠は細い形状の樹状突起における cAMP の産生と分解の制御により形成される

上記結果より、CaMKII の活性化の時点ですでに時間枠が形成されており、その上流に PKA があることが示唆された。そこで PKA の活性をモニターする FRET プローブを用いて、時間枠を形成する分子基盤について調べた。まず、可塑性が誘発されるタイミングで STDP 刺激とドーパミンの刺激をあたえ、スパインにおける PKA の活性を測定した。すると、グルタミン酸の刺激をあたえたスパインに加え、周囲のスパインや樹状突起においても PKA の活性がみられた。グルタミン酸刺激がなくても、活動電位とドーパミンの刺激のみで PKA の活性は上昇した (図 2a)。しかし、ドーパミンの刺激だけでは PKA の活性の上昇はみられなかったことから、樹状突起における PKA の活性はドーパミンと活動電位に依存することがわかった。そこで、活動電位に対してさまざまな時間枠でドーパミンの刺激をあたえたところ、可塑性の時間枠と類似した時間枠でのみ、PKA の活性がみられた (図 2b)。活動電位とドーパミンの相互作用には、Ca²⁺/カルモジュリンおよび Gs により相乗的に活性化されるアデニル酸シクラーゼ 1 が関与している可能性が考えられたので、その阻害剤である NB001 を投与したところ、PKA の活性もスパインの形態可塑性も阻害された。

樹状突起においてドーパミンの刺激だけでは PKA の活性が上昇しなかったことは意外であり、これまでの細胞体観察の報告とは一致しなかった。そこで、細胞の全体においてドーパミンの刺激をあたえたときの PKA の活性を測定してみると、細胞体においては活動電位がなくても PKA の活性の上昇がみられた (図 2c)。活動電位をあたえると細胞体における PKA の活性も上昇したが、その程度は小さかった (図 2d)。つまり、樹状突起ではドーパミンの刺激だけでは PKA の活性は上昇しないことから、樹状突起は活動電位による PKA の活性の制御の幅が広く、ドーパミンの刺激と活動電位のタイミングを鋭敏に検出できると考えられた。このように、ドーパミンの刺激だけでは PKA の活性が上昇しない理由として、cAMP の分解が高い可能性が考えられた。そこで、線条体に多く存在するホスホジエステラーゼ 10A に対する阻害剤であるパパベリンを投与すると、ドーパミンの刺激だけで樹状突起の PKA の活性の上昇がみられた。ホスホジエステラーゼ 10A は細胞膜に一様に分布していることが報告されており、その細胞内局在は樹状突起における強い作用を説明できない。ホスホジエステラーゼは細胞膜に局在するが cAMP は細胞質にあるので、細い形状をもつ樹状突起においては膜体積比が高いため cAMP を効率的に分解できる可能性が考えられた。実際に、樹状突起の太さとドーパミン単独での PKA の活性の上昇には相関関係があったことから、この仮説は支持された。興味深いことに、中型有棘神経においては、スパインは細い樹状突起にしか存在せず、スパインはドーパミンによる制御が効果的な部位にだけ存在していることが示唆された。

結論

この研究により、単一のスパインにはドーパミンが強化的に作用できる時間枠があり、その時間枠の形成には cAMP の産生および分解が関与していることがわかった。この時間枠は動物の個体において報酬が作用できる時間枠に似ており、ドーパミンのもつ報酬作用はこのシナプス基盤によると考えられた。この時間枠は強化学習理論において長年にわたり実態が不明であった

Eligibility trace に対応する。スパインは、適切なタイミングでドーパミンがあたえられると PKA の活性が上昇し、これが CaMKII を活性化する。NMDA 受容体-CaMKII というシグナル伝達経路は Hebb の学習則である同期発火によるシナプスの可塑性 (Hebb の可塑性) において中心的な役割を担う。一方、ドーパミンによる強化作用は Hebb の学習則とは異なり、シナプス後細胞の発火をともなわず Hebb の可塑性を制御している。この 2 つの学習機構の協調により樹状突起の全体に広がる PKA の活性の上昇が特定のスパインだけを強化することができ、報酬シグナルであるドーパミンが直前に活動した単一のスパインだけを強化できる (図 2e)。このように、単一のスパインのレベルにおいて強化的な可塑性の分子基盤および細胞基盤が明らかにされた。

