

## 綜 説

## 記憶・学習の分子機構：長期増強をモデルとして

鈴木 龍 雄

信州大学医学部附属加齢適応研究センター神経加齢部門・神経可塑性分野

## Molecular Mechanism for Memory and Learning

Tatsuo SUZUKI

*Department of Neuroplasticity, Division of Neuro-aging, Research Center on Aging and Adaptation, Shinshu University School of Medicine*

**Key words:** synaptic plasticity, postsynaptic density (PSD), long-term potentiation (LTP), messengers from synapse to nucleus (MSNs), protein phosphorylation  
 シナプス可塑性, シナプス後肥厚部, 長期増強, シナプス-核間情報伝達分子, タンパク質リン酸化

## I はじめに

記憶, 学習といった脳の機能は複数の神経細胞のシナプス間コミュニケーションの変化に基づく。ある特定の神経回路にしばって言えば, 記憶, 学習はその回路を構成する神経細胞間のシナプス伝達効率が外界からの入力に応じて変化するという神経細胞の性質(シナプス可塑性)に基盤を置いている。この性質は脳における情報の貯蔵, とりわけ「記憶」の基盤であると信じられている。最近ではその電気生理的モデル, 特に海馬での LTP (long-term potentiation, 長期増強)の解析に力が注がれている。LTP とは特定の入力を受けたシナプスで synaptic strength が持続的に増大する現象である。逆に持続的に減少するのが LTD (long-term depression, 長期抑圧)である。LTP は1973年に Bliss と Lomo によって海馬 Perforant path/Dentate Granular cell シナプスにおいて最初に発見された<sup>1)</sup>。LTD についてはよく研究されるようになったのは1990年代になってからである。

LTP は異なる複数のメカニズムによって引き起こされる複合現象で, 時間経過を異にする複数のフェー

ズが存在する。CA1-LTP では, early phase (E-LTP) と late phase (L-LTP) とに分けられ, 研究者によってはさらに細かく分類する。Dentate Granular cell の LTP (DG-LTP) は3つのフェーズ (LTP1, LTP2, LTP3) に分類される<sup>2)</sup>。E-LTP や LTP1 は主としてタンパク質リン酸化反応によってその発現が制御されているが, L-LTP や LTP3 は転写を必要とする過程である。スパイン直下にはポリリボソームが存在するので, 転写を必要としないシナプス後部での局所におけるタンパク質合成の過程の存在も示唆されている。このように, E-LTP や LTP1, 2 はより安定な L-LTP や LTP3 にコンバートされると考えられる。このプロセスは memory consolidation (記憶の固定化)の過程であらう。このようにシナプスの機能的変化による制御から, 構造的な変化に支えら

## 略語

CaM, calmodulin; CaMKII,  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II; IEG, immediate early gene; LTP, long-term potentiation; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MAPKK, MAPK kinase; MSN, messenger from synapse to nucleus; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; NMDA, N-methyl-D-aspartate; mPSDp, major PSD protein; PSD, postsynaptic density

別刷請求先: 鈴木 龍雄

〒390 松本市旭3-1-1

信州大学医学部神経可塑性分野

表1 SJ/PSD proteins

cytoskeletal and cytoskeleton-related proteins	enzymes
actin	protein kinase C ( $\beta$ , $\gamma$ , $\xi$ but not $\alpha$ )
tubulin	CaMKII
fodrin(calspectin)	tyrosine kinases (Fyn, pp60 <sup>src</sup> or pp60 <sup>src(+)</sup> )
$\alpha$ -actinin	B-Raf
$\alpha$ -internexin	MAPK
plectin	MAPKK
myosin	phosphatidyl inositol 3-kinase
$\tau$ -protein	inositol 1, 4, 5-trisphosphate 3-kinase
high molecular weight MAPs	creatine kinase
205k MAP	protein phosphatases (1, 2a, 2b)
gystrophin	protein tyrosine phosphatase
p-140 (tubulin-, fodrin-, CaMKII-binding protein)	adenylyl cyclase
gephyrin (Gly receptor-linker protein)	phosphodiesterase
N-CAM (cell adhesion molecule)	calpain I
Thy 1	Others
densin-180	calmodulin
N-cadherin (pgp130)	RC3 (neurogranin homolog)
telencephalin	Gi
tensin (actin capping protein)	ependymin
receptor proteins	APP (Amyloid protein precursor)
GABA receptor	AKAP 79, 150 (A-kinase anchoring protein)
benzodiazepine receptor	concanavalin A-binding proteins
Glu receptor (NMDA receptors type 1, 2, 3)	82K Protein
(metabotropic Glu receptor)	PSD-95k
$\beta$ -adrenergic receptor	p103
$\kappa$ -opioid receptor	p110 (Protein kinase C-binding protein)
channel proteins	
Ca <sup>2+</sup> -activated K channel (apamine-binding protein)	
voltage-dependent Ca <sup>2+</sup> -channel (nitrendipine-binding protein)	

SJ, synaptic junction

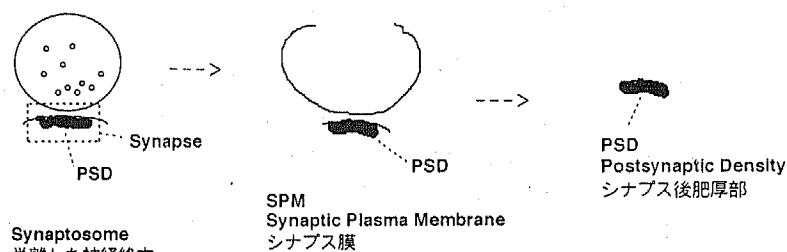


図1 PSDの単離

脳組織を細胞下分画することによりシナプトソーム、シナプス膜、シナプス後肥厚部などの分画が単離される。

れた制御系に移行し、シナプスの消退やシナプス数の増加や発芽といった変化にまで発展すると考えられる。

筆者は記憶や学習のメカニズムに興味を持ってその仕組み、特にLTP現象を分子レベルで説明しようと企ててきた。また、シナプス後肥厚部 (postsynaptic density, PSD) を反応の場とした一連の化学反応が記憶や学習の基本原理の中でも最も重要な部分の一つを

占めると考え、PSDの生化学的解析を行ってきた。シナプス膜直下にあるPSDは、シナプス後部側における神経情報処理の中核であり、そこには神経伝達物質受容体や、タンパク質リン酸化酵素などの情報伝達系の酵素や基質、そのモジュレーターや神経興奮に直接関わるイオンチャンネルが集中して存在している<sup>3)</sup> (表1, 図1)。PSDは特殊な細胞骨格系であるが、

固定不変のものではなく、シナプスでの入力に応じてその形態や数は可塑的に変化するらしい。この変化に伴って記憶や学習の基盤であるシナプス伝達効率の変化が引き起こされると考えられている。本総説では前半で PSD に局在して E-LTP の発現に関わっていると考えられる分子について説明し、後半では L-LTP 発現に関わっている分子について述べる。

## II Early phase LTP の発現を制御する分子： PSD に局在するタンパク質リン酸化酵素群

PSD には、シナプス後神経細胞がニューロトランスミッターを受け取ってからの細胞内シグナル処理に関わる多数の分子が集中して存在していると考えられる。そのうちで、シナプス可塑性の early phase (例えば、LTP 誘発刺激後 1 時間ぐらいまで) でその制御の主役と考えられるタンパク質キナーゼのうち、筆者が直接関わった以下の 4 種について概説する。

### A CaMK II

CaMK II の  $\alpha$  サブユニットはシナプスでは、はじめ major PSD protein (mPSDp) としてその存在が知られていた。単離精製した PSD 標品中に多量に含有される mPSDp は PSD の細胞骨格を構築する主要タンパクとして考えられてきた。<sup>83</sup>年、<sup>84</sup>年に mPSDp が CaMK II の  $\alpha$  サブユニットであることが 3 つの研究グループによって明らかにされた<sup>4)~6)</sup>。これ以後 CaMK II、特にその  $\alpha$  サブユニットは PSD 内では mPSDp として、シナプス機能において重要な役割を担うタンパクとして注目され、そのタンパク化学的な性質が次々と明らかにされてきた。特に重要なのは、Thr286 部位の自己リン酸化により、この酵素の安定な活性化が起きると同時に、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存型酵素への変換が起きることである。この性質がシナプス伝達効率の変調に関係しているのではないかと考えられた。神経細胞が入力を受けずに興奮していない時には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は  $10^{-7}$  以下で CaMK II は不活性であるが、シナプス入力があると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が上がり、CaMK II が活性化される。特に、強い入力刺激では CaMK II の自己リン酸化が起き、CaM が長時間 CaMK II に結合したままの状態になって、CaMK II は positive feedback 的に活性化される。これがひとたび起きると、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が下がってからも入力時の CaMK II 活性が持続されて、シナプス伝達効率の上昇につながる可能性が考えられてきた<sup>7)</sup>。特に、その効果は神経細胞刺激により一過性に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$

濃度上昇が起こった後で再び低下した時に大きく効いてきて、高頻度刺激時 (例えば LTP を引き起こす刺激) に CaMK II が効率よく活性化されるのではないかと考えられている。通常  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 非存在下では CaMK II の活性部位が pseudosubstrate domain でブロックされているため活性がでない。この部に  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM が結合したり、さらに、Thr286 部位にリン酸化が起きると立体構造に変化が起きて、触媒部位が露出され活性がでる。Thr286 部がリン酸化されている限り、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下でも活性が維持される。Thr286 部位の自己リン酸化とそれに伴う  $\text{Ca}^{2+}$ -independent 活性型への変換は、頻回刺激に伴う一時的な著しい量の  $\text{Ca}^{2+}$  流入シグナルを  $\text{Ca}^{2+}$  非依存活性をもつ自己リン酸化型として CaMK II が記憶することになるので、いわば CaMK II の memory property とでも言える性質である。我々は PSD 結合型の CaMK II も自己リン酸化によりカルシウム非依存型になることを明らかにした<sup>7)</sup>。さらに、Thr286 部位が自己リン酸化された CaMK II のみを特異的に認識する抗体を作成した<sup>8)</sup>。この抗体は、Western blotting で自己リン酸化型 CaMK II のみを認識した。また、細胞や組織染色にも使用可能なものであった。実際、興奮性 neurotransmitter の Glutamate で刺激を加えた時に、 $\text{Ca}^{2+}$  流入のあった神経細胞で CaMK II の自己リン酸化の亢進が起きているのを捉えることができた (図 2)。キンドリングを形成したラットの海馬でも CaMK II の自己リン酸化が亢進しているのを捕らえることができた<sup>9)</sup>。さらに最近では、LTP を引き起こす電気刺激により、培養神経細胞の樹状突起上のスパイン部位で CaMK II の自己リン酸化が亢進するのをコンフォカル蛍光顕微鏡で捕らえることに成功している (未発表)。

我々はさらに CaMK II が細胞質から PSD にトランスロケートすることも発見した<sup>10)</sup>。最近の研究によって、このトランスロケーションが CaMK II の自己リン酸化によっておこるらしいこと、また脱リン酸化によって、逆に PSD から細胞質側にトランスロケートするらしいことがわかってきたので、神経伝達やその制御系に CaMK II のトランスロケーションが関わっているかもしれないと考えている。

CaMK II  $\alpha$  サブユニット遺伝子の promotor region の解析も行った<sup>11)</sup>。CaMK II  $\alpha$  サブユニット (mPSDp) は生直後にはほとんど存在せずシナプス形成期に著しく増加するので  $\alpha$  サブユニット遺伝子

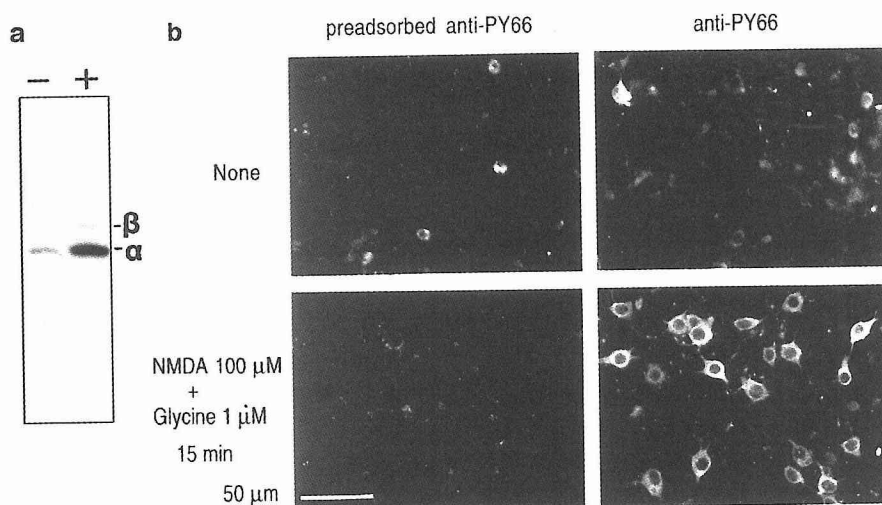


図2 CaMK IIの自己リン酸化を認識する抗体の特性

- a 精製したCaMK IIを *in vitro* で自己リン酸化したもの(+)としないもの(-)のWestern blot解析。 $\alpha$ ,  $\beta$  はそれぞれCaMK IIの $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットを示す。
- b 培養海馬神経細胞をNMDA刺激したもの(下段)としないもの(上段)を抗自己リン酸化抗体(anti-PY66)で染色した。左列は吸収抗体による染色。

をこの時期に一挙に発現させる遺伝子プログラムの存在が示唆されていたからである。解析の結果、転写開始部位から上流163 base目と、異常に離れた部位にconsensus TATA elementを同定した。TATA周辺の配列をCAT reporter plasmidに組み込み、細胞にトランスフェクトして転写活性を測定すると、TATAを含む178 base部分がpromotor部位であることがわかった。

### B Cキナーゼ

LTPがひとたび成立したあと、ある種のprotein kinaseが持続的に働いてLTPを維持しているとも考えられている(persistent kinase説)が、ある特定の条件下で誘起されたLTPでは、persistent kinase活性はCキナーゼに由来する可能性がある。我々はCA1でLTPの成立した海馬の上清画分において、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性のPKC活性の亢進を観察した<sup>12)</sup>。それと同時に膜画分中のPKC- $\beta$ の限定分解が亢進することを見出した(図3)。さらに、 $10^{-5}\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ 存在下で海馬ホモジェネートを $30^\circ\text{C}$ に温置するモデル実験で、上清画分に $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性のPKC活性の亢進と、沈渣画分でPKCの限定分解とが平行することを確認した。この系においてPKCを分解するプロテアーゼはカルパインであることが強く示唆された。このような実験から我々は次のようなモデルを考えている(図4)。

すなわち、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の著しい増加に伴い、シナプス後部細胞内でcalpainとCキナーゼが細胞膜にトランスロケートし、自己リン酸化型Cキナーゼが、活性化されたcalpainにより限定分解を受ける。限定分解の位置はCキナーゼのV3 regionで、それによりCキナーゼはN末側36 kDaのregulatory domainとC末側45 kDaのcatalytic domainに分かれる。限定分解後は、45 kDaのcatalytic domainがシナプス膜から離れて細胞質に遊離し、これはregulatory domainを欠落しているので、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が低くなってからも標的基質のリン酸化反応を行い、それによりLTPの維持がなされるであろう。単離したPSD画分中のCキナーゼ分子をWestern法で調べるとCキナーゼ $\beta$ サブユニットが選択的に限定分解を受けて、36kDの制御ドメインを含む断片と思われるバンドが検出される<sup>13)</sup>ので、通常のシナプス活動およびLTPなどでPKCとカルパインが関係しているのではないかと考えている。

### C MAPキナーゼ

シナプス変調にはMAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase, MAPK)の関与も示唆されている。MAPキナーゼは種々の細胞外刺激によって活性化され、特に転写因子などをリン酸化する。最近の研究でMAPキナーゼカスケードのメンバーである

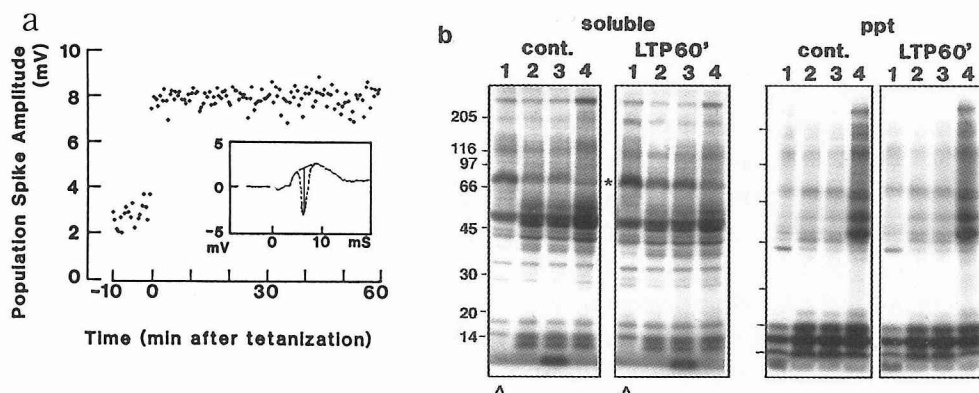


図3 LTP誘導に伴うCキナーゼの変化

a Wistar ラット海馬のCA3 Pyramida cell layerに刺激電極を、CA1 Pyramidal cell layerに記録電極を埋め込んだ。タイム0で1～2秒間50Hzのテタヌ刺激を与えてLTPを誘導した。個々のテスト刺激に対する電位応答のピークの高さ（挿入図，直線部分）をプロットした。

b テタヌ刺激してから60分後に海馬を取り出し，直ちにsoluble fractionと particulate fraction とに分け，それぞれの内在性キナーゼ活性をEGTA存在下(1)， $\text{Ca}^{2+}$ 存在下(2)， $\text{Ca}^{2+}$ /phosphatidylserine存在下(3)， $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin存在下(4)で測定した。この図ではsoluble fraction中の80 kDaバンド(\*)の $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下でのリン酸化が亢進しているのがわかる。contはLTP非誘導サンプル。免疫沈降法によりこのバンドはMARCKS(Cキナーゼ基質)と同定された。また，詳細な検討により，LTPでは $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性のCキナーゼ活性がsoluble fractionで亢進していることが明らかになった。

c 上記で得られたsoluble fraction(sol)とparticulate fraction(ppt)のWestern blot解析。Cキナーゼの $\alpha$ と $\beta$ アイソフォームに対する特異抗体を使用した。Cはコントロールのサンプル，LはLTPを誘導したサンプル。LTPではppt中に36 kDa，Cキナーゼ $\beta$ の限定分解産物（下方の矢印）が検出されているのがわかる。PSD中にもこの分解産物が検出される。

Raf(おそらくB-Raf)，MAPKK(MAPKキナーゼ)，MAPKがシナプ스에局在することが明らかになった。またラットPSD画分中には，MAPKアイソフォームのうちERK1は存在せずにERK2のみが存在しており，同時にまたERK2の特異基質が多数存在している<sup>14)</sup>。これらの基質のうちいくつかはsynaptogenesisと平行した発育変化を示しているのので，実際にシナプスで機能している可能性が高い。

#### D チロシンキナーゼ

脳にはc-Src，c-Src<sup>+</sup>，c-Yes，c-Neu，c-Abl，Elk，Flk，Trk B，Fyn，Lyn等のチロシンキナーゼが存在す

ることが報告されている<sup>15)–17)</sup>。チロシンキナーゼ阻害剤がLTP発現を抑えること，いくつかの非レセプタータイプのチロシンキナーゼ(Abl，Fyn，Src，Yes)を欠損させたマウスのうち，Fynを欠損させたマウスでのみLTP発現と空間学習の障害が観察された<sup>18)</sup>ことから，Fynのシナプス可塑性発現における役割が注目される。筆者らは単離PSD画分中に2種のFyn様分子が高濃度で存在することを明らかにした。またラット脳のシナプス画分のうち，特にPSD画分中にFynの基質が多数存在することが明らかになった。これらの基質は脳の可溶性画分やP<sub>i</sub>画分(細胞断片や

核を含む) 中での基質とは分子量が異なること, synaptogenesis 期に著増することから, シナプス後部で神経伝達やその制御に関わっている可能性が示唆される。事実, これらの基質のうち分子量180kDaのものはNMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプター (NR) サブユニットであるNR2A ( $\epsilon 1$  subunit) とNR2B ( $\epsilon 2$  subunit) であることを我々は明らかにしている<sup>19)</sup> (図5)。NRはNR1と一種ないし複数種のNR2 isoform から構成されるchannel/receptorで, その特性はNR2 subunit により規定されると考えられている。NRの特性はNR2 subunit のリン酸化によってさらに修飾されるのかもしれない。NR2Bは, CaMK II基質であるPSD gp-180と同一分子である<sup>20)</sup>。従ってNR2Bは*in vivo*で少なくとも2種のキナーゼ, FynとCaMK II, によってリン酸化による制御を受けている可能性が考えられる。

### III Late phase LTP 発現の制御

シナプス可塑性の初期過程では主としてタンパク質

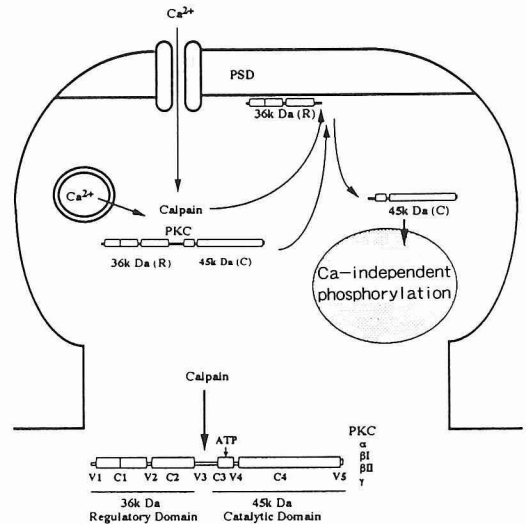


図4 Cキナーゼを介するLTP誘導の機序  
(説明は本文参照)

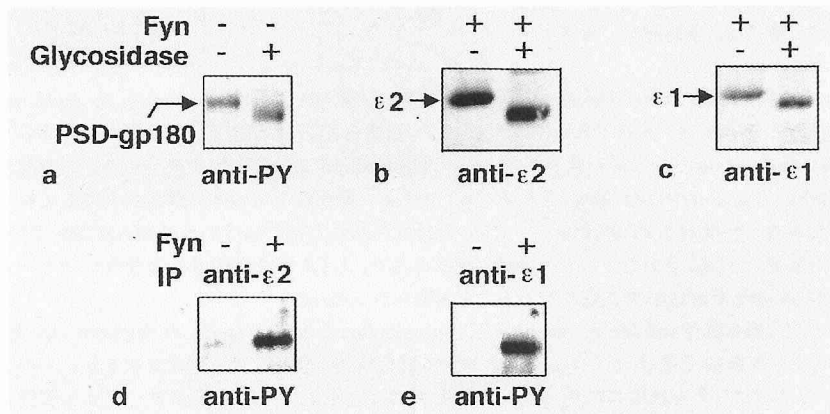


図5 PSDに内在する180 kDa Fyn基質(PSD-gp 180)の同定

- a-c PSDタンパク質をFyn存在下, 非存在下にリン酸化したあと, endoglycosidase F/endofucosidase Fにて糖鎖を切断したのち電気泳動を行った。イモビロンに転写した後, 抗ホスホチロシン抗体 (anti-PY), 抗NMDAレセプター $\epsilon 2$ 抗体 (anti- $\epsilon 2$ ), 抗NMDAレセプター $\epsilon 1$ 抗体 (anti- $\epsilon 1$ )を用いてWestern blot解析を行った。これにより, チロシンキナーゼ基質のPSD-gp 180は $\epsilon 1$ と $\epsilon 2$ を含んでいることが示唆される。
- d, e PSDタンパク質をFyn存在下, 非存在下にリン酸化したあと anti- $\epsilon 2$ , anti- $\epsilon 1$ を用いて免疫沈降を行った後, 抗ホスホチロシン抗体でチロシンリン酸化を検出した。 $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 1$ ともにFynによってチロシンリン酸化されるのがわかる。いずれも180 kDa領域のみを示した。

リン酸化反応が神経伝達を制御しているのに対し、長期過程では新たに合成されたタンパク質の寄与が増大すると考えられる(前述)。シナプス可塑性の発現に伴って誘導されるいくつかの plasticity-related genes が知られている。一般に、シナプス入力に応じてまず *zif 268* などの immediate early genes (IEGs) の発現の誘導が起こり、次いで IEG によって late responding genes の発現が誘導されるという流れが提唱されている。IEG の大部分は転写因子である<sup>21)-25)</sup>。LTP の長期化に伴って誘導される late responding genes 産物としては、チロシン水酸化酵素、CaMK II, GABA レセプター  $\beta 1$  サブユニット、ニコチンアセチルコリン受容体 (nAChR), 電位依存性ナトリウムチャネル、PSD に局在する未知タンパク質 411B protein, Raf などが知られている<sup>26)-28)</sup>。

L-LTP の誘導や維持、さらには記憶の長期安定化(固定化)には PKA が関わっているという報告がある。PKA はおそらく cAMP response element-binding protein (CREB) をリン酸化を介して活性化し、L-LTP や記憶の固定化に関わっているのではないかとされている<sup>29)-31)</sup>。多くの IEG はその転写調節領域に CREB 結合部位を持っているので、おそらく CREB の活性化が先行して起こり、次いで IEG の誘導が起こるのではないかと考えられている<sup>32)</sup>。転写因子 C/EBP (CCAAT enhancer-binding protein) も記憶の固定化に関与していると示唆されている<sup>33)</sup>。これまでに述べたことを図 6 に簡単にまとめてみた。

#### IV PSD に局在するシナプス-核間情報伝達分子 (MSN) の探索

シナプス入力に応じた遺伝子発現が惹起されるためにはシナプス入力情報が核にまで伝達される必要があるが、筆者らはこの核からシナプスへ情報を運ぶ分子

(以後、シナプス-核間情報伝達物質, Messengers from Synapse to Nucleus [MSNs] という) について研究を開始した。MSN は、シナプスに刺激のない状態では PSD にアンカーされているが、何らかの入力刺激で PSD から遊離されたのち核にトランスポートされるのではないかと考えられるので、一種の PSD タンパク質でもある。表 1 を眺めると MAP キナーゼ, Raf (おそらく B-Raf), heat shock タンパク質, CaMK II, 限定分解を受けた C キナーゼフラグメント, A キナーゼの触媒サブユニットなどが MSN の候補として挙げられる。これらの候補分子の詳細については最近の総説を参考にされたい<sup>34)</sup>。これら以外にも PSD タンパク質としては今まで全く検索されてこなかった分子が MSN として働いていることも考えられる。筆者らは遺伝子発現の直接の調節因子である転写因子が PSD に局在して MSN の働きをしている可能性を検証する作業を開始した。ここでは転写因子の NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) とそれを核外に繋ぎ止める作用のある I $\kappa$ B について解説する。

NF- $\kappa$ B は免疫系の細胞でよく研究されてきたが、脳を含む多くの細胞に存在している。NF- $\kappa$ B は種々の遺伝子のプロモーター領域に存在する  $\kappa$ B element と呼ばれる特定の DNA 配列に特異的に結合し、その下流にある遺伝子の発現を制御する。NF- $\kappa$ B は p65 サブユニットと p50 サブユニットから成るヘテロダイマーで、刺激のない状態では通常核外の細胞質に I $\kappa$ B と結合した状態にあり、DNA 結合活性、転写活性は不活性の状態に保たれている。細胞外から種々の刺激があると NF- $\kappa$ B ないしは I $\kappa$ B がリン酸化されることによって NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 間の親和性が弱まり、I $\kappa$ B から離れた NF- $\kappa$ B は核内に移行して転写活性を制御すると考えられている。筆者らはこの NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 系がシナプス-核間でも働いている可能性を検証する

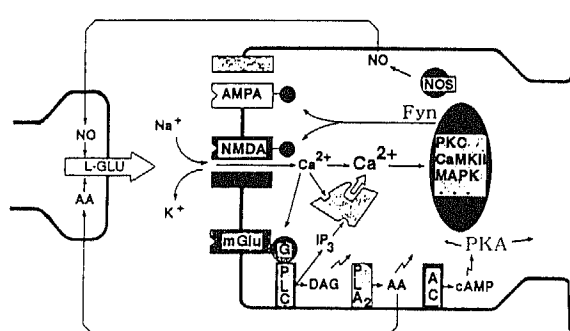


図 6 LTP 発現の分子メカニズム

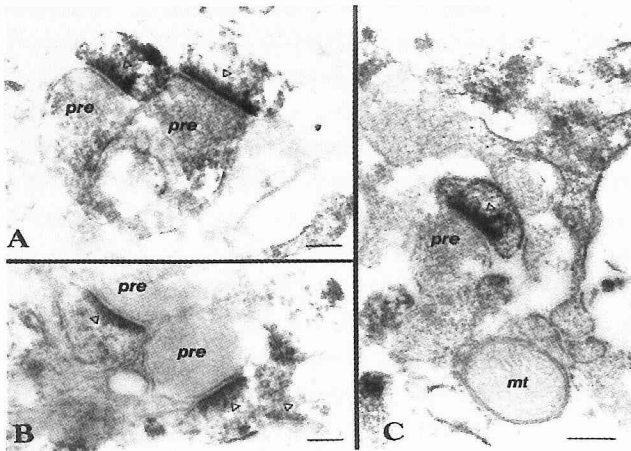


図7 IκB 様分子のシナプス内局在  
A, B ラット大脳皮質, C ラット海馬, PSD は白抜き三角で示す。  
pre, presynaptic terminal; mt, mitochondria, Bars, 200nm.

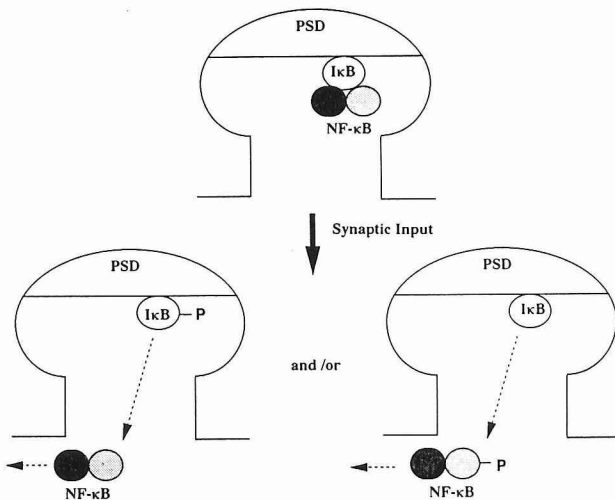


図8 シナプスに局在する NF-κB/IκB の役割 (仮説)

転写因子 NF-κB を不活性化して核外に留める IκB 様分子が PSD にアンカーしている。シナプス入力により NF-κB または IκB がリン酸化を受けると NF-κB が IκB から離れて核へと移行し、特定遺伝子の転写活性を変える。

ためにまず、NF-κB, IκB 分子の PSD 内局在を調べた。抗 IκBα 特異抗体を用いた組織学的検索で、ラット大脳皮質、海馬などの神経細胞細胞体と神経突起が染色された。電顕で観察すると両部位とも神経細胞の樹状突起および棘突起 (spine) の内部、特に PSD が染色された<sup>35)</sup> (図7)。Western blotting では PSD 画分中には 63kD のタンパク質が唯一検出されたので、この分子が PSD の IκB 様免疫活性を担っていると考えている。この 63 kDa タンパク質の性質を明らかにするために現在、抗 IκBα 抗体を用いて cDNA クローニングを試みている。また、2 種類の抗 NF-κB 抗体を用いた免疫組織学的検索においても PSD が特異的に染色された (未発表)。このように NF-κB 様分子、IκB 様分子、ともに PSD に局在することが証明された。従って、シナプス-核間において NF-κB 様

分子が MSN として働いている可能性が高いと考えている (図8)。この他の転写因子については、また別の機会に報告したい。

## V おわりに

記憶や学習のモデルとされる LTP 発現の分子メカニズムについて、筆者の行った実験結果を基に概説した。今後の研究で、LTP 発現のメカニズムをさらに詳しく解明するとともに、新しいシナプス分子の発見に力を注ぎたいと考えている。

文 献

- 1) Bliss TVP, Lomo T: Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 232: 331-356, 1973
- 2) Abraham WC, Mason SE, Demmer J, Williams JM, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M: Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56: 717-727, 1993
- 3) Suzuki T: Protein kinases involved in the expression of long-term potentiation. *Int J Biochem* 26: 735-744, 1994
- 4) Kennedy MB, Bennet MK, Erondy NE: Biochemical and immunochemical evidence that the "major postsynaptic density protein" is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 7357-7361, 1983
- 5) Kelly PT, McGuinness TL, Greengard P: Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 945-949, 1984
- 6) Goldenring JR, McGuire Jr JS, DeLorenzo RJ: Identification of the major postsynaptic density protein as homologous with the major calmodulin-binding subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurochem* 42: 1077-1084, 1984
- 7) Suzuki T, Fujii T, Tanaka R: Independent protein kinases associated with rat cerebral synaptic junction: comparison with cyclic AMP-dependent and  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases in synaptic junction. *J Neurochem* 48: 1716-1724, 1987
- 8) Suzuki T, Okumura-Noji K, Ogura A, Kudo Y, Tanaka R: Antibody reacting specifically to the Thr-286-autophosphorylated  $\alpha$ -subunit of the  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 109-113, 1992
- 9) Zhou X-R, Suzuki T, Shimizu H, Nishino H: Amygdala kindling activates the phosphorylation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 171: 45-48, 1994
- 10) Suzuki T, Okumura-Noji K, Tanaka R, Tada T: Rapid translocation of  $\alpha$ -subunit of cytosolic  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II to particulate fraction after decapitation. *J Neurochem* 63: 1529-1537, 1994
- 11) Olson NJ, Massé T, Suzuki T, Chen J, Alam D, Kelly PT: Functional characterization of the promoter for the  $\alpha$ -subunit of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1659-1663, 1995
- 12) Suzuki T, Okumura-Noji K, Ogura A, Tanaka R, Nakamura K, Kudo Y: Calpain may produce  $Ca^{2+}$ -independent form of kinase C in long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1515-1520, 1992
- 13) Suzuki T, Okumura-Noji K, Tanaka R, Ogura A, Nakamura K, Kudo Y, Tada T: Characterization of protein kinase C activities in postsynaptic density fractions prepared from cerebral cortex, hippocampus and cerebellum. *Brain Res* 619: 69-75, 1993
- 14) Suzuki T, Okumura-Noji K, Nishida E: ERK-2 type mitogen-activated protein kinase (MAPK) and its substrates in postsynaptic density fractions from the rat brain. *Neurosci Res* 22: 277-285, 1995
- 15) Sudol M: Expression of proto-oncogenes in neural tissues. *Brain Res Rev* 13: 391-403, 1988
- 16) Umemori H, Wanaka A, Kato H, Takeuchi M, Tohyama M, Yamamoto T: Specific expressions of Fyn and Lyn, lymphocyte antigen receptor-associated tyrosine kinases, in the central nervous system. *Mol Brain Res* 16: 303-310, 1992
- 17) Woodrow S, Bissoon N, Gurd JW: Depolarization-dependent tyrosine phosphorylation in rat brain

- synaptosomes. *J Neurochem* 59 : 857-862, 1992
- 18) Grant SGN, O'Dell TJ, Karl KA, Stein PL, Soriano P, Kandel R : Impaired long-term potentiation, spatial learning hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* 258 : 1903-1910, 1992
- 19) Suzuki T, Okumura-Noji K : NMDA receptor subunits  $\epsilon 1$  (NR2A) and  $\epsilon 2$  (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 216 : 582-588, 1995
- 20) Moon IS, Apperson ML, Kennedy MB : The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 : 3954-3958, 1994
- 21) Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TVP, Hunt SP : Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4 : 603-614, 1990
- 22) Murphy TH, Worley PF, Nakabeppu Y, Christy B, Gastel J, Baraban JM : Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J Neurochem* 57 : 1862-1872, 1991
- 23) Richardson CL, Tate WP, Mason SE, Lawlor PA, Dragunow LM, Abraham WC : Correlation between the induction of an immediate early gene, zif/268 long-term potentiation in the dentate gyrus. *Brain Res* 580 : 147-154, 1992
- 24) Demmer L, Dragunow M, Lawlor PA, Mason SE, Leah JD, Abraham WC, Tate WP : Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats. *Mol Brain Res* 17 : 279-286, 1993
- 25) Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA : Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus : Correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13 : 4776-4786, 1993
- 26) Bullock S, Lossner B, Krug M, Frey S, Rose SPR, Matthies H : Posttetanic long-term potentiation in rat dentate area increases postsynaptic 411B immunoreactivity. *J Neurochem* 55 : 708-713, 1990
- 27) Mihály A, Oláh Z, Krug M, Kuhnt U, Matthies H, Rapp UR, Joó F : Transient increase of raf protein kinase-like immunoreactivity in the rat dentate gyrus during long-term potentiation. *Neurosci Lett* 116 : 45-50, 1990
- 28) Mackler SA, Brooks BP, Eberwine JH : Stimulus-induced coordinate changes in mRNA abundance in single postsynaptic hippocampal CA1 neurons. *Neuron* 9 : 539-548, 1992
- 29) Frank DA, Greenberg ME : CREB : A mediator of long-term memory from mollusks to mammals. *Cell* 79 : 5-8, 1994
- 30) Stevens CF : CREB and memory consolidation. *Neuron* 13 : 769-770, 1994
- 31) Yin JCP, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T : CREB as a memory modulator : Induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81 : 107-115, 1995
- 32) Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME : Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77 : 713-725, 1994
- 33) Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER : C/EBP is an immediate-early gene required for the consolidation of long-term facilitation in *Aplysia*. *Cell* 76 : 1099-1114, 1994
- 34) Suzuki T : Signal transmission from synapse to nucleus. *Neurosci Res Suppl* 19 : :S162, 1994
- 35) Suzuki T, Mitake S, Okumura-Noji K, Okamoto T : Presence of 63kD I $\kappa$ B-like molecule in the postsynaptic density of the rat brain. *Soc Neurosci Abst* 21 : 594, 1995

(8. 9. 9 受稿)