

博士論文

小脳長期抑圧のシグナル伝達経路の
計算機シミュレーション

土居 智和

2006年3月15日

奈良先端科学技術大学院大学
情報科学研究科 情報生命科学専攻

本論文は奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科に
博士(理学) 授与の要件として提出した博士論文である。

土居 智和

審査委員：

石井 信 教授 (主指導教員)

湊 小太郎 教授 (副指導教員)

作村 諭一 特任助教授 (副指導教員)

川人 光男 客員教授 (副指導教員)

銅谷 賢治 客員助教授 (副指導教員)

小脳長期抑圧のシグナル伝達経路の 計算機シミュレーション*

土居 智和

内容梗概

細胞シグナル伝達反応の計算機シミュレーションによって、小脳プルキンエ細胞のシナプス可塑性が記憶・学習に果たす役割を明らかにした。

小脳プルキンエ細胞は平行線維と登上線維から入力を受けている。平行線維入力後に登上線維入力という入力順序で、 Ca^{2+} 濃度が著しく上昇し、長期抑圧 (LTD) というシナプス可塑性が誘導されることが実験で示されていた。小脳 LTD における Ca^{2+} 濃度上昇のシグナル伝達経路は詳しく分かっているにもかかわらず、 Ca^{2+} 応答が平行線維入力と登上線維入力の時間順序を検出する仕組みは不明であった。私は、小脳 LTD の Ca^{2+} シグナルの数理モデルを作り、 Ca^{2+} ダイナミクスを検証した。平行線維入力の代謝系経路に時間遅れがあり、細胞内 Ca^{2+} ストア上の IP_3 受容体が、平行線維入力による IP_3 産生と登上線維入力による Ca^{2+} 流入の同時性を検出することを示した。また、 IP_3 受容体が放出する Ca^{2+} によって自身がさらに活性化される、正のフィードバックが閾値現象を生み出すことを確かめた。

また、 Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係を、黒田らによる LTD モデルの Ca^{2+} シグナル下流の部分を使って再現した。

前述の Ca^{2+} ダイナミクスモデルでは、線維入力による Ca^{2+} 流入量を微妙に調整しないと Ca^{2+} 応答の線維入力順序依存性を再現できなかった。実際の脳で Ca^{2+} 流入量を巧みに調整する仕組みを調べるために、 Ca^{2+} ダイナミクスモデ

*奈良先端科学技術大学院大学 情報科学研究科 情報生命科学専攻 博士論文, NAIST-IS-DD0361024, 2006年3月15日.

ルと黒田らによる小脳 LTD モデルを統合し、さらに改良を加え、線維入力から AMPA 受容体数減少までの完全版 LTD モデルを作成した。完全版 LTD モデルに自発発火入力を長時間与え続けると、AMPA 受容体数の初期値にかかわらず、発火頻度依存で AMPA 受容体数が一定の範囲に収束した。AMPA 受容体数が多いと自発的発火によって Ca^{2+} 濃度が上昇しやすくなり、 Ca^{2+} 依存性酵素が活性化して AMPA 受容体を抑えて Ca^{2+} 流入量が減るという負のフィードバック機構が AMPA 受容体数を調節していた。自発発火頻度が高いほど AMPA 受容体数が少なく抑えられ、そのあと平行線維と登上線維の組み合わせ入力でも LTD を誘導するにはより激しい平行線維入力バーストが必要になった。自発発火頻度が高い入力は感覚刺激時のバースト入力も激しいと仮定すると、自発発火による AMPA 受容体数の収束は、平行線維と登上線維の組み合わせ入力でも特異的に LTD が誘導されるように Ca^{2+} 流入量を調節しておくメタ可塑性といえる。

キーワード

小脳長期抑圧, システム生物学, シミュレーション, シグナル伝達経路, ダイナミクス

Computational Simulation of Signaling Pathways for Cerebellar Long-term Depression*

Tomokazu Doi

Abstract

I have revealed roles of synaptic plasticity for learning and memory in the cerebellum by computational simulation.

A Purkinje cell in the cerebellum receives inputs from parallel and climbing fibers. A Ca^{2+} imaging studies have shown that Ca^{2+} concentration and subsequent long-term depression (LTD) are induced when parallel fiber input precedes climbing fiber input. Although the Ca^{2+} signaling pathway in cerebellar LTD has extensively studied, the timing-detection mechanisms for parallel and climbing fiber inputs are unknown. I developed a mathematical model for Ca^{2+} signaling pathways for cerebellar LTD, and analyzed the Ca^{2+} dynamics. The Ca^{2+} dynamics model predicted a delay in the metabotropic pathway activated by the parallel fiber input. The simulation demonstrated IP_3 receptors is a coincidence detector for IP_3 production by parallel fiber input and Ca^{2+} influx via climbing fiber input. Furthermore, I confirmed a threshold phenomenon emerged by a positive feedback loop of regenerative Ca^{2+} release from IP_3 receptors.

Additionally, I simulated quantitative relationship between Ca^{2+} stimulation and LTD by the Ca^{2+} downstream in LTD model developed by Kuroda and colleagues.

*Doctoral Dissertation, Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology, NAIST-IS-DD0361024, March 15, 2006.

The Ca^{2+} dynamics model requires a rigorous tuning of the amount of Ca^{2+} for timing detection of parallel and climbing fiber inputs. To explore biological mechanisms of such tuning in the cerebellum, I combined my Ca^{2+} dynamics model and the Kuroda LTD model created with further improvement to develop a novel model for cerebellar LTD whose inputs are from fibers and output is the endocytosis of AMPA receptors. As a result in the novel LTD model exposed to spontaneous firing activity, the number of AMPA receptors converged in a range of amount, dependent on the frequency of spontaneous firing activity but independent of the initial numbers of the AMPA receptors. If the number of AMPA receptors is large, spontaneous firing activity often evokes large Ca^{2+} increase and activated Ca^{2+} -dependent kinases, resulting in a decrease of Ca^{2+} influx because of a reduction of AMPA receptors. This negative feedback loop regulates the number of AMPA receptors. Spontaneous firing activity at a higher rate suppressed the number of AMPA receptors, which required stronger bursts of parallel fibers for LTD induction by conjunctive parallel and climbing fibers activation. If the frequency of spontaneous firing activity reflects the input intensity evoked by sensory stimulation, regulation of the amount of AMPA receptors in spontaneous firing activity can be a form of metaplasticity for a selective induction of LTD by conjunctive activation of parallel and climbing fibers.

Keywords:

cerebellar long-term depression, systems biology, simulation, signaling pathways, dynamics

目次

1. 小脳回路と小脳長期抑圧 (LTD)	1
1.1 小脳の回路構造	1
1.2 小脳学習理論	1
1.3 シグナル伝達研究の進展	2
1.4 以降の章の構成	3
2. 小脳 LTD のシグナル伝達経路	4
2.1 Ca^{2+} ダイナミクス	4
2.2 PKC と MAP の正のフィードバックループ	5
2.3 一酸化窒素経路	6
2.4 AMPA 受容体調節	7
2.5 シグナル伝達反応研究の問題点	7
3. シグナル伝達反応の数式化	8
3.1 生化学反応	8
3.1.1 平衡状態と Hill 式	10
3.1.2 生化学反応が解析的に解ける特殊例	12
3.2 酵素反応	13
4. パラメタ値の検索方法	16
4.1 反応時定数の検索方法	16
4.2 解離定数と Michaelis 定数の検索方法	16
4.3 酵素活性の検索方法	17
4.4 分子濃度の検索方法	17
5. Ca^{2+} ダイナミクスモデルの作成	19
5.1 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの構造	19
5.2 Ca^{2+} ダイナミクスの生化学反応モデル	20
5.3 Ca^{2+} ダイナミクスモデルにおけるモデル入力の表現	21

5.4	IP ₃ 受容体モデル	21
5.4.1	IP ₃ 受容体モデルの構造	21
5.4.2	IP ₃ 受容体モデルのパラメタ値推定	22
5.5	Ca ²⁺ ダイナミクスモデルのパラメタの種類	25
5.6	未知パラメタの決め方	26
5.6.1	未知の反応時定数	26
5.6.2	未知の親和性	26
5.6.3	未知の酵素最大速度	26
5.6.4	未知の分子初期濃度	27
5.6.5	シミュレーションの初期状態	27
5.7	シミュレータと数値計算法	27
6.	Ca ²⁺ ダイナミクスモデルによる PF と CF の入力順序検出の再現	28
6.1	PF と CF の入力順序と LTD 誘導	28
6.2	はじめに	28
6.3	非線形的な Ca ²⁺ 上昇の再現	29
6.4	経路切断シミュレーション	30
6.5	時間窓の再現	33
6.6	Ca ²⁺ 応答時間窓と Ca ²⁺ バッファー	36
6.7	まとめ	36
7.	Ca ²⁺ ダイナミクスの感受性解析	38
7.1	IP ₃ 経時変化の感受性解析	38
7.2	Ca ²⁺ 応答時間窓の感受性解析	39
7.3	まとめ	46
8.	Ca ²⁺ ダイナミクスの閾値解析	52
8.1	食い違う Ca ²⁺ 上昇と LTD 誘導実験	52
8.2	Ca ²⁺ ダイナミクスの相平面解析	52
8.3	様々な実験の統一的説明	55

9. Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係	58
9.1 ケージド Ca^{2+} 光分解と LTD	58
9.2 モデルの作成	58
9.3 Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係の再現	61
10. 完全版 LTD モデルの作成	63
10.1 完全版 LTD モデル作成の意義	63
10.2 シミュレーションモデルの構成	63
10.3 前研究との整合性	65
10.4 GENESIS/kinetikit シミュレータ	65
10.5 1 週間シミュレーションでの計算量節約	66
10.6 入力刺激パラメタ	67
11. 自発発火によるメタ学習のシミュレーション	69
11.1 はじめに	69
11.2 自発発火による AMPA 受容体調節	70
11.3 自発発火頻度と最終 AMPA 受容体数	75
11.3.1 自発的発火頻度と LTD 誘導の PF 強度	75
12. シミュレーションのまとめと考察	80
12.1 タイミング検出機構のまとめ	80
12.2 シミュレーションの予測と検証実験	80
12.2.1 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの予測	80
12.2.2 IP_3 の時間遅れの測定	83
12.2.3 メタ学習の予測する現象	83
12.2.4 AMPA 受容体数の安定化の速さ	84
12.3 シミュレーション結果と小脳学習理論	85
12.3.1 Ca^{2+} ダイナミクスと小脳学習理論	85
12.3.2 メタ学習と教師あり学習	85
12.3.3 メタ学習とメタ可塑性の関係	86

13. 一般的な議論	88
13.1 複雑なモデルの問題	88
13.2 モデルの単純化の試み	88
13.3 決定論的な微分方程式と確率的な遷移方程式	90
13.4 空間的拡散	92
13.5 反応速度論や生化学パラメタの妥当性	93
13.6 数理モデルの意義	94
業績	95
謝辞	97
参考文献	98
付録	110
A. シグナル伝達反応の詳細図	110
B. パラメタ表	122
B.1 分子濃度パラメタ	122
B.2 反応速度パラメタ	127
B.3 パラメタの分類	131

目 次

1	プルキンエ細胞とその入力	2
2	小脳 LTD のシグナル伝達経路	5
3	Hill 式の例	11
4	Ca^{2+} ダイナミクスモデルのブロック線図	20
5	IP_3 受容体モデル	23
6	Ca^{2+} ダイナミクスモデルの経時変化	29
7	経路切断実験	32
8	入力タイミングと Ca^{2+} 経時変化	34
9	Ca^{2+} 応答時間窓の再現	35
10	時間窓とバッファの影響	37
11	パラメタ値を振ったときの IP_3 経時変化の例	39
12	反応時定数を変えたときの IP_3 経時変化	40
13	解離定数または Michaelis 定数を変えたときの IP_3 経時変化	41
14	酵素最大速度を変えたときの IP_3 経時変化	42
15	初期分子濃度を変えたときの IP_3 経時変化	43
16	IP_3 経時変化に影響の大きかった未知パラメタ	44
17	パラメタ値を振ったときの Ca^{2+} 応答時間窓の例	45
18	Ca^{2+} 応答時間窓の正規分布関数フィッティング	45
19	反応時定数を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓	47
20	解離定数または Michaelis 定数を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓	48
21	酵素最大速度を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓	49
22	初期分子濃度を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓	50
23	時間窓の特徴量の感受性	51
24	Ca^{2+} ダイナミクスの相平面解析	54
25	Ca^{2+} ダイナミクスの等高線	55
26	Ca^{2+} と LTD の定量的関係のシミュレーションによる再現	59
27	Ca^{2+} 入力の面積と時間と LTD の定量的関係	62
28	完全版 LTD モデルの AMPA 受容体調節	64

29	完全版 LTD モデルの Ca^{2+} 時間窓再現	66
30	完全版 LTD モデルの LTD 再現	67
31	自発発火下の経時変化その 1	72
32	自発発火下の経時変化その 2	74
33	PF と CF のランダム入力に対する Ca^{2+} 応答	76
34	自発発火頻度別の経時変化	77
35	自発発火刺激後の LTD 誘導例	78
36	自発発火刺激後の特異的な LTD 誘導	79
37	閾値によるタイミング検出説明	81
38	ブロック線図によるタイミング検出説明	81
39	メタ学習と教師あり学習	87
40	シグナル伝達経路の減衰時定数の定義	89
41	シグナル伝達経路の時定数	91
42	mGluR 受容体	110
43	PLC β	111
44	IP $_3$ 分解	112
45	IP $_3$ 受容体	113
46	Ca^{2+} 放出、漏れ、汲み出し	114
47	Ca^{2+} バッファー	115
48	NO/cGMP/PKG	116
49	Ras	117
50	MAPK カスケード	118
51	PLA $_2$ のアラキドン酸産生	119
52	PKC	120
53	AMPA 受容体	121

表 目 次

1	Ca^{2+} ダイナミクスモデルのパラメタの種類	25
---	------------------------------------	----

4	Ca^{2+} ダイナミクスモデルのパラメタ分類の内訳	131
---	--	-----

1. 小脳回路と小脳長期抑圧 (LTD)

1.1 小脳の回路構造

小脳は単純で画一的な神経回路構造をしているということで、古くから科学者たちの興味を引いてきた。単純で画一的というのは、小脳の部位や投射先の場所にかかわらず、回路構造が同じであるという意味である。小脳皮質にはたった5種類の神経細胞しかない。顆粒細胞、プルキンエ細胞、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞である。主要な経路を担う細胞は顆粒細胞とプルキンエ細胞で、ゴルジ細胞、バスケット細胞、星状細胞は介在性抑制ニューロンである。プルキンエ細胞は樹状突起を平面上に扇状に広げていて、小脳皮質では、プルキンエ細胞は扇を積み重ねたように規則的に並んでいる [47]。

プルキンエ細胞は小脳皮質の唯一の出力細胞で、顆粒細胞から 10 万から 20 万本の平行線維 (parallel fibers, PFs) と下オリーブ核からたった 1 本の登上線維 (climbing fiber, CF) の興奮性入力を受けている [82]。PF 入力は比較的弱く、プルキンエ細胞を発火させるにはある程度の PF がまとまって入力する必要がある。他方、CF 入力は樹状突起全体に非常に強い脱分極を与え、必ずプルキンエ細胞を発火させる。

1.2 小脳学習理論

Marr と Albus は、小脳プルキンエ細胞の線維入力が多数の弱い入力と 1 つの強い入力組み合わせという点で人工パーセプトロンモデルと類似していることに気付き、小脳は教師あり学習をしているのではないかと提唱した [5, 75]。CF 入力が誤差信号を伝えて、PF とプルキンエ細胞とのシナプス伝達効率を変化させると予言した。伊藤正男は PF 刺激と CF 刺激を組み合わせたときに、小脳長期抑圧 (long-term depression, LTD) が起きることを電気生理実験により確かめた [45]。

現在では、小脳 LTD とは、PF-プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率が長期に渡って減少することと定義される。小脳 LTD は、記憶・学習の生化学的・細胞形態学的基盤であると信じられている [5, 47, 68, 75]。小脳運動学習理論によると、

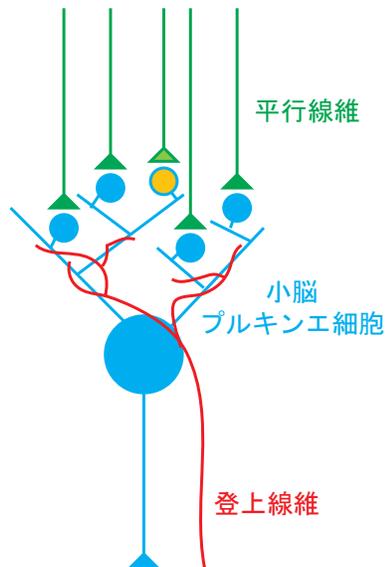


図 1 プルキンエ細胞とその入力

PF は運動指令に必要な文脈情報を伝え、CF は誤差情報を伝える [46, 53, 103]。誤差情報は、外界からのフィードバックの遅れがあるので、CF 入力は PF 入力より遅れる。つまり、理論は、LTD が誘導されるタイミングは PF 刺激が CF 刺激より先行したときと予言している。

この LTD 誘導のタイミングは複数の実験で示されているが [17, 89, 99]、他方で、それ以外の条件でも LTD が誘導できることが示されている。例えば、PF を強く刺激すると、CF 刺激なしでも、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し LTD が誘導される [26, 39]。

1.3 シグナル伝達研究の進展

1980 年代から、シナプス可塑性にかかわるシグナル分子やタンパク質が次々と同定されてきた。細胞内には、さまざまなタンパク質が外界の情報を受け取って処理している。細胞外のシグナル分子が細胞膜の受容体と結合すると、受容体は細胞内の標的タンパク質を活性化し、つづいて標的タンパク質は細胞内の酵素を活性化してシグナルを伝え、最終的に遺伝子発現や細胞構造変化などが起こる。簡

単に説明すると、プルキンエ細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇が引き金になって、後シナプスの AMPA 受容体が減少することが、LTD の正体である。ただし、小脳 LTD に不可欠な分子は他にもたくさんあり、複雑なネットワークを形成している [48]。刺激入力から LTD 誘導までのシグナル伝達経路を同定して経路図を描くだけでは、シグナル伝達経路がどのように働いているのか理解することが困難になってきている。そこで、シグナル伝達経路の数理モデルを作成し、数理モデルのダイナミクスを解析することで、実際のシグナル伝達の振る舞いを予測することが出来る。

1.4 以降の章の構成

2, 3, 4 章は、シグナル伝達の数理モデル作成に必要な知識をまとめてある。2 章で、本論文でモデル化の対象とした小脳 LTD のシグナル伝達経路の生化学的・分子生物学知見を解説する。3 章で、生化学反応式に基づいた連立微分方程式の作成法を解説する。4 章で、数理モデルに必要なパラメタ値を実験論文から探し出す方法を説明する。

5, 6, 7, 8 章は、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルのシミュレーションである。5 章で、 Ca^{2+} モデルの概要と作成方法を、 IP_3 受容体モデルを重点的に解説する。6 章で、 Ca^{2+} イメージング実験の再現を行う。7 章で、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの感受性を調べ、8 章で、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの閾値解析、相平面解析について述べる。

9 章で、共同研究先で得られた Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係を、シミュレーションで再現する。

10, 11 章は、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルと黒田 LTD モデル [60] による Ca^{2+} 下流のシグナル伝達経路をつなぎ合わせた完全版 LTD モデルのシミュレーションである。10 章で、完全版 LTD モデルの概要、作成方法の詳細を説明する。11 章で、自発発火によって、AMPA 受容体数が教師あり学習に適切な値に収束することを示す。

12 章で、シミュレーション結果のまとめと考察を行う。13 章で、シミュレーションの考察を踏まえて、一般的な議論をまとめる。

2. 小脳 LTD のシグナル伝達経路

小脳 LTD は記憶・学習の分子的・細胞的基盤であると信じられている。小脳 LTD のシグナル伝達機構については非常に詳しく解析されている。図 2 にあるように、数多くのシグナル分子や酵素が LTD に関わっていることが分かっている。これらのシグナル分子は他の細胞現象にも使い回されており、元々は神経科学以外の分野で発見された分子も多い。本論文では、他分野のことに話を広げることは避け、小脳 LTD に関係する部分だけを取りあげる。解説上の便宜のため、小脳 LTD のシグナル伝達経路を 4 つに分けて扱う。

2.1 Ca^{2+} ダイナミクス

CF 入力は強い脱分極を発生させてスパインの電位依存性 Ca^{2+} チャネルを開き、 Ca^{2+} 流入を起こす [80]。PF も最終的には後シナプス Ca^{2+} 濃度を上昇させるが、経路はより複雑である。まずグルタミン酸を放出して、 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体と代謝型グルタミン酸受容体 (metabotropic glutamate receptors, mGluRs) という 2 種類のグルタミン酸受容体を活性化させる。AMPA 受容体の下流では、AMPA 受容体が開くと Na^+ イオンが流入し、シナプス膜電位が上昇して電位依存性 Ca^{2+} チャネル (voltage-gated Ca^{2+} channels, VGCCs) が開く [26]。細胞外の Ca^{2+} イオンが VGCCs を介して流入する。代謝型経路では、PF シナプス末端から放出されたグルタミン酸が mGluR 受容体を活性化し、mGluR 受容体は三量体 G タンパク (trimeric G-protein q type, Gq) を活性化する。Gq の α サブユニットはホスホリパーゼ C (phospholipase C, PLC) と結合し、PLC を活性化させる。PLC はホスファチジルイノシトール二リン酸 (phosphatidylinositol biphosphate, PIP_2) を加水分解して、1,4,5-三リン酸 (1,4,5-trisphosphatate, IP_3) とジアシルグリセロール (diacylglycerol, DAG) を産生する [49, 93, 95]。 IP_3 は後シナプス膜から細胞質に拡散する。そして、小胞 Ca^{2+} ストアの Ca^{2+} チャネルである IP_3 受容体が IP_3 と結合して開き、 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} を放出する [33]。

細胞内の IP_3 は IP_3 3-キナーゼ (IP_3 3-kinase) と IP_3 5-ホスファターゼ (IP_3

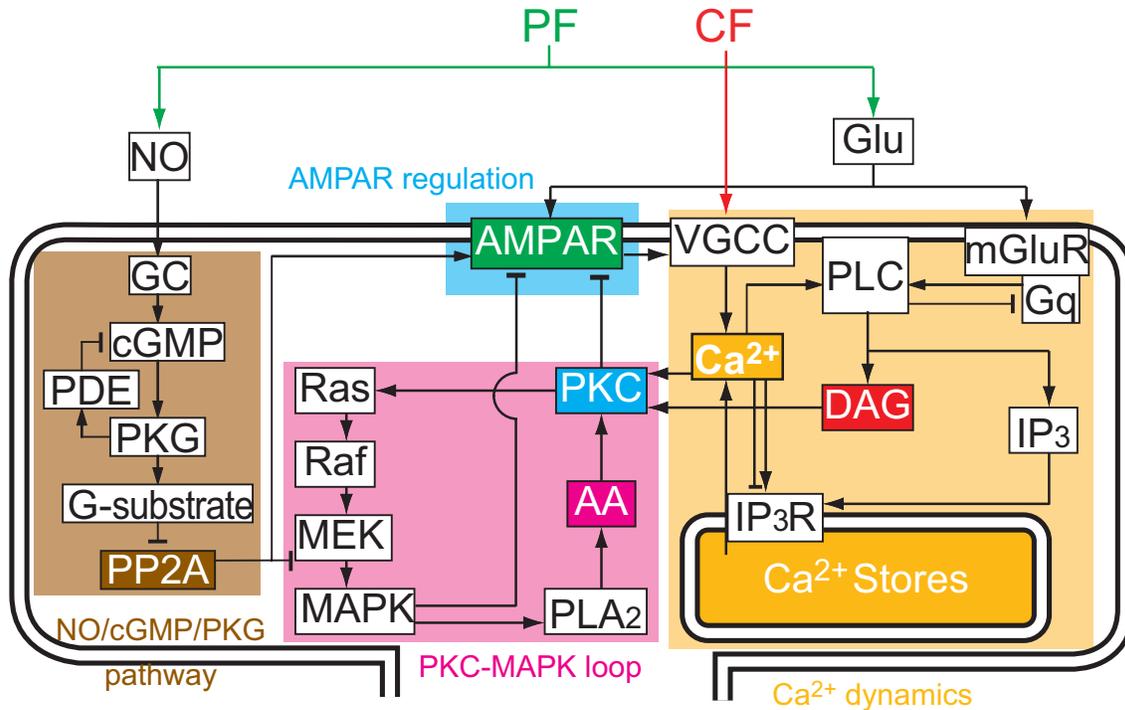


図 2 小脳 LTD のシグナル伝達経路

5-phosphatase) によって数秒で分解される [25, 44]。細胞内の遊離 Ca^{2+} は内因性 Ca^{2+} バッファーによって吸収される。プルキンエ細胞内の代表的なバッファーとして、高親和性の parvalbumin、calbindin が知られている [4, 97]。その他に、特定されていない低親和性のバッファーの存在も示唆されている [72]。細胞内 Ca^{2+} は細胞膜上にある $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger, NCX) や Ca^{2+} ポンプ (plasma-membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA)、小胞上にある Ca^{2+} ポンプ (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) によって汲み出される [31, 102]。

2.2 PKC と MAP の正のフィードバックループ

タンパクキナーゼ C (protein kinase C, PKC) は多くの標的を持つリン酸化酵素である。PKC は Ca^{2+} 、DAG、アラキドン酸 (arachidonic acid, AA) によって活性化される。最近、PKC は活性化すると細胞質から細胞膜に移行することが可

視化された。Ca²⁺ 刺激を与えると、数秒で細胞膜へ移行する [83]。DAG のアナログであるホスホエストラジオール刺激では移行に数分かかる。このことから、PKC はセカンドメッセンジャーのシグナルの復号器という考え方もある。PKC は MAPK (mitogen-activated protein kinase) カスケードを活性化する。活性化型 Raf は MEK (MAPK kinase) の 2 箇所をリン酸化する。リン酸化された MEK は MAPK の 2 箇所をリン酸化する。活性化された MAPK は核にシグナルを送り、遺伝子発現を誘導する [16]。この Raf-MEK-MAPK のシグナルは MAPK カスケードと呼ばれている。過去の生化学実験によると、PKC は Raf を直接リン酸化するとされていた [58]。最近では、PKC が Raf を活性化するには、Ras の活性化が必要ということも示されている [73]。PKC と MAPK は正のフィードバックループにより互いに活性化する [11]。MAPK はホスホリパーゼ (phospholipase A₂, PLA₂) を活性化し、PLA₂ は AA を産生する [63]。活性化反応と同じように、不活性化反応も重要である。MAPK カスケードはタンパクホスファターゼによって脱リン酸化される。MEK はタンパクホスファターゼ 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) によって脱リン酸化され [61]、MAPK は MKP (MAPK phosphatase) によって脱リン酸化される [94]。MAPK 活性化は、LTD が維持されるのに必要である。MAPK 活性化がないと、シナプス伝達効率が 30 分程度減少した後で元の伝達効率に戻ってしまう。

2.3 一酸化窒素経路

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は PF の前シナプス末端で合成される [90]。グルタミン酸などの他の神経伝達物質とは違って、NO は細胞質や細胞膜を自由に透過するため、シナプス小胞に NO を貯めておくことはできない。NO 合成酵素 (NO synthesis protein, NOS) により NO が合成されるや否や、NO はどんどん拡散していってしまう [13]。NO はプルキンエ細胞でグアニル酸シクラーゼ (guanylyl cyclase, GC) に捕らえられ、GC は GTP から環状 GMP (cyclic GMP, cGMP) を合成する [64]。cGMP はホスホジエステラーゼ (phosphodiesterase, PDE) によって分解される [34, 50]。タンパクキナーゼ G (protein kinase G, PKG) は cGMP 結合により活性化し、PKG 基質 (G-substrate) をリン酸化する [100]。リン酸化さ

れた G-substrate はタンパクホスファターゼ 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) と結合し、PP2A の活性を抑える [29]。

2.4 AMPA 受容体調節

小脳プルキンエ細胞の AMPA 受容体においては、GluR2 が支配的に発現している。アミノ酸配列で 880 番目のセリン残基のリン酸化が小脳 LTD 発現と小脳運動学習にとって不可欠な過程であることが確かめられている [18]。AMPA 受容体のリン酸化そのものはシナプス伝達効率変化に影響しない。すなわち、AMPA 受容体のコンダクタンスや開閉のキネティクスにリン酸化反応は関係しない [67]。AMPA 受容体がリン酸化されると AMPA 受容体と GRIP (glutamate receptor interacting protein) との結合が外れやすくなる [77]。GRIP は、シナプス後膜の PSD (postsynaptic density) 構造の構成要素であり、AMPA 受容体をシナプス膜上にとどめる働きを持つ。GRIP との結合が外れると、AMPA 受容体に protein interacting with C kinase (PICK1) が結合して、AMPA 受容体はシナプス膜から細胞内に移行される。また、リン酸化された AMPA 受容体は PP2A によって脱リン酸化される [62]。

(海馬のシナプス可塑性を知っている者への注意。海馬とは違って、小脳 LTD においては、AMPA 受容体のリン酸化はシナプス伝達効率の減少につながる)

2.5 シグナル伝達反応研究の問題点

あるタンパク質を遺伝的に欠損させると小脳学習ができなくなるといったノックアウトマウス研究は数多くあり、シグナル伝達反応が細胞情報処理機構の正体であることを私たちに強く確信させる。しかし、シグナル伝達経路は複雑にクロストークしており、経路の詳細が明らかになっても、経路が担っているはずの情報処理の仕組みを想像することが難しい。そこで、シグナル伝達反応を数理モデルで表現し、実験から推測されるアイデアを試すことが有用になってくる。既知の経路だけで興味のある細胞現象を再現できるか試してみることで、シグナル伝達経路のネットワークの情報処理機構の完全な理解に近づくことができる。

3. シグナル伝達反応の数式化

この章では、シグナル伝達反応の数理モデル化で用いる反応速度論 (rate theory) を扱う。

3.1 生化学反応

簡単な生化学反応を考えよう。分子 A と分子 B が結合して分子 AB になる反応を考える。



各分子の濃度変化は次の微分方程式で与えられる。

$$d[A]/dt = -k_f[A][B] + k_b[AB] \quad (2)$$

$$d[B]/dt = -k_f[A][B] + k_b[AB] \quad (3)$$

$$d[AB]/dt = +k_f[A][B] - k_b[AB] \quad (4)$$

ここで、 k_f と k_b はそれぞれ正反応 (forward reaction) と逆反応 (backward reaction) の反応速度定数 (rate constants) である。

これらの式はあくまでも経験則から得られたものであるが、次のような解釈もできる。分子がランダムに衝突している均一な溶液中では、分子 A 1 個の立場で見ると、微小時間 dt で分子 B と衝突する確率は、分子 B の濃度に比例する。逆も同様で、分子 B 1 個の立場で見ると、微小時間 dt で分子 B と衝突する確率は、分子 A の濃度に比例する。したがって、衝突する頻度が正反応に比例すると仮定すると、正反応速度は、分子 A と分子 B の濃度に比例する。また、逆反応は、分子 AB が過去の履歴に依存せずに一定確率で分解すると考えると、逆反応速度は分子 AB の濃度に比例する。

この式は物質不変の法則を満たしている。A と AB が A の総量、B と AB が B の総量だが、式 (2) 式 (3) 式 (4) から、

$$d[A]/dt + d[AB]/dt = 0 \quad (5)$$

$$d[B]/dt + d[AB]/dt = 0 \quad (6)$$

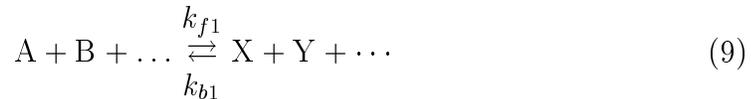
となるので、

$$[A] + [AB] = \text{const} \quad (7)$$

$$[B] + [AB] = \text{const} \quad (8)$$

であり、物質ごとに質量が保存されていることが分かる。

分子 A と分子 B... が反応して分子 X と分子 Y... ができる一般的な生化学反応式



において、分子 A の濃度変化の微分方程式は次のように表される。

$$d[A]/dt = -k_{f1}[A][B] \dots + k_{b1}[X][Y] \dots \quad (10)$$

他の分子の濃度変化の微分方程式は、

$$d[B]/dt = -k_{f1}[A][B] \dots + k_{b1}[X][Y] \dots \quad (11)$$

$$\vdots \quad (12)$$

$$d[X]/dt = +k_{f1}[A][B] \dots - k_{b1}[X][Y] \dots \quad (13)$$

$$d[Y]/dt = +k_{f1}[A][B] \dots - k_{b1}[X][Y] \dots \quad (14)$$

$$\vdots \quad (15)$$

のようになる。全ての式を足し合わせると、

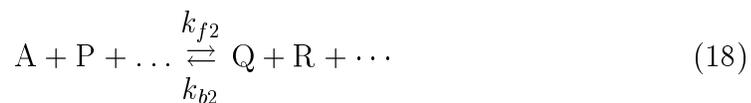
$$d[A]/dt + d[B]/dt + \dots + d[X]/dt + d[Y]/dt \dots = 0 \quad (16)$$

となるので、

$$[A] + [B] + \dots + [X] + [Y] + \dots = \text{const} \quad (17)$$

であり、質量が保存されていることが分かる。

一般に、シグナル伝達反応は多数の生化学反応を含んでいる。複数の反応の場合の微分方程式はどのようになるのだろうか？ 生化学反応式 (9) と平行して



という反応も起こっている場合を考える。この生化学反応 (18) は

$$d[A]/dt = -k_{f2}[A][P] \cdots + k_{b2}[Q][R] \cdots \quad (19)$$

である。懸念されるのは、微小時間 dt において、式 (10) と式 (19) の相互作用で $d[A]$ に与える影響である。ところが、その影響は $o(t^2)$ のオーダーなので、 $O(t)$ で抑え込むことができる。したがって、式 (10) と式 (19) の右辺をそのまま足し合わせればよい。つまり、

$$d[A]/dt = -k_{f1}[A][B] \cdots + k_{b1}[X][Y] \cdots - k_{f2}[A][P] \cdots + k_{b2}[Q][R] \cdots \quad (20)$$

さらに他の反応が存在する場合も、右辺をそのまま足しあわせればよい。

3.1.1 平衡状態と Hill 式

平衡状態を考えると、微分方程式を解く必要はない。式 (2) 式 (3) 式 (4) を例にとると、平衡状態では分子濃度の変化は無いので、

$$d[A]/dt = -k_f[A][B] + k_b[AB] = 0 \quad (21)$$

$$d[B]/dt = -k_f[A][B] + k_b[AB] = 0 \quad (22)$$

$$d[AB]/dt = k_f[A][B] - k_b[AB] = 0 \quad (23)$$

これを AB について解くと、

$$\frac{[AB]}{[A] + [AB]} = \frac{[AB]}{[A_{\text{all}}]} = \frac{[B]}{k_b/k_f + [B]} = \frac{[B]}{K_d + [B]} \quad (24)$$

ここで、 K_d は解離定数とよばれ、 $K_d = k_b/k_f$ で定義される。 K_d は濃度の次元を持つ。実験的には、 K_d は A の半分が B と結合する B の濃度という意味がある。

いままで A と B が 1 対 1 で結合する場合を考えてきたが、1 つの A に複数の n 個の B が結合する反応もある。



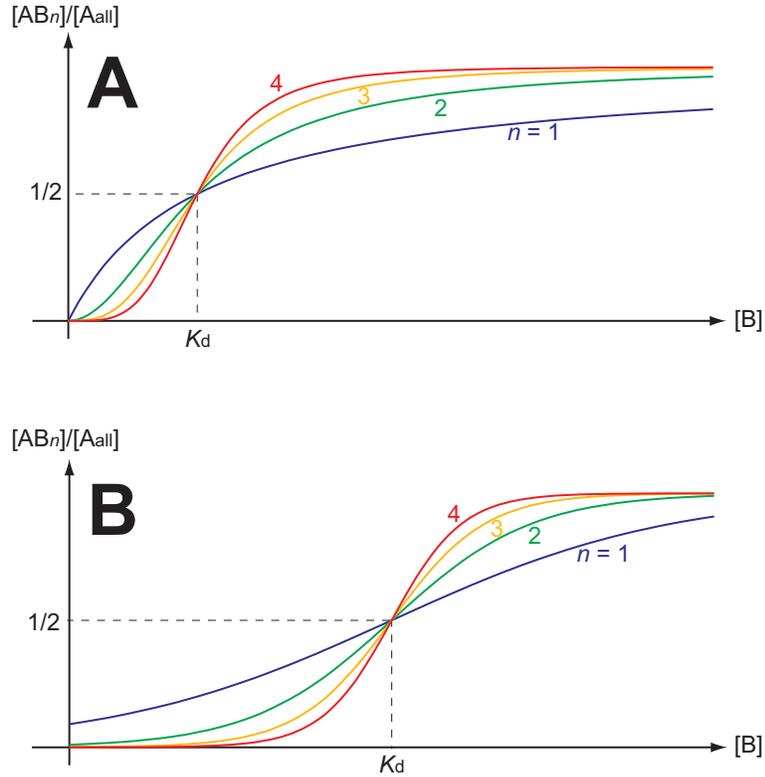


図 3 Hill 式に従って、 $n = 1, 2, 3, 4$ を図示した。A では横軸を実数軸にとり、B では横軸を対数軸に取った。縦軸はどちらも実数軸。

この平衡状態の式は、

$$\frac{[AB_n]}{[A_{all}]} = \frac{[B]^n}{K_d^n + [B]^n} \quad (26)$$

となる。この式を Hill 式といい、 n を Hill 係数 (Hill coefficient) と呼ぶ。 n の値が大きいほど、閾値現象が強くなる (図 3)。

この考えからすると、 n は必ず整数になるはずだが、実際にはそうはならない。なぜなら、反応式は A と複数の B が同時に反応することを仮定しているが、B との結合は 1 つずつ進んでいくからである。見かけ上の Hill 係数 (apparent Hill coefficient) は B の分子数よりも小さい非整数値になる。

例えば、2段階の反応



の、全体に対する AB_2 の割合は、

$$\frac{[AB_2]}{[A_{\text{all}}]} = \frac{[B]^2}{K_1 K_2 + K_2 [B] + [B]^2} \quad (29)$$

となる。ここで、 $K_1 = k_{b1}/k_{f1}$ 、 $K_2 = k_{b2}/k_{f2}$ である。分母の $K_2[B]$ という項が、見かけ上の Hill 係数を 2 より小さくする。もし、 $K_1 \gg K_2$ かつ $K_2 \ll [B]$ 、すなわち、1段階目の反応が2段階目の反応より極端に起こりにくく、1段階目の反応が進めば2段階目の反応がほぼ必ず起こるとき、式(29)は、

$$\frac{[AB_2]}{[A_{\text{all}}]} = \frac{[B]^2}{K^2 + [B]^2} \quad (30)$$

となり、Hill 式と合致する。ただし、 $K = \sqrt{K_1 K_2}$ とした。拘束条件 $K_1 \gg K_2$ かつ $K_2 \ll [B]$ の意味を考えると、2つの反応が必ず連続して起こることを表しているので、Hill 式(26)の仮定を満たしていることが分かる。

3.1.2 生化学反応が解析的に解ける特殊例

一般に、式(10)は解析的に解けない。右辺に $[A]$ と $[B]$ の積があり、非線形になっていることが障害になっている。何らかの解析解を得るためには仮定が必要である。 $[B]$ が一定で、かつ $[A]$ よりも遙かに大きい場合を考えよう。言いかえると、 A が B に結合しても B の濃度にほとんど影響を与えない場合を考える。分子 A の総濃度 $[A_{\text{all}}] = [A] + [AB]$ は定数であることを利用すると、

$$d[AB]/dt = k_f([A_{\text{all}}] - [AB])[B] - k_b[AB] \quad (31)$$

$$= -(k_f[B] + k_b)[AB] + k_f[A_{\text{all}}][B] \quad (32)$$

と整理できる。この微分方程式を解くと、

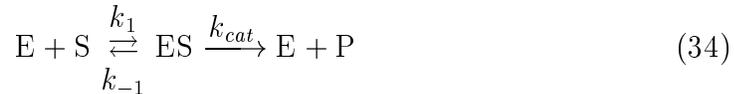
$$[AB] = (1 - \exp(-t/(k_f[B] + k_b))) \frac{[B]}{K_d + [B]} [A_{all}] \quad (33)$$

つまり、反応は時定数 $1/(k_f[B] + k_b)$ で平衡状態に近づく。時間が充分経過すると $\exp(-t/(k_f[B] + k_b)) \rightarrow 0$ なので、平衡状態の式を満たしていることが分かる。困ったことに、時定数には B が含まれているので、A と B の結合反応の時定数を B の濃度抜きで表すことができない。

3.2 酵素反応

酵素とは、特定の反応を触媒するタンパク質のことである。自身は触媒反応の前後で変わらずに、通常では無視できるような遅い反応を劇的 (10^7 から 10^{20} 倍) に速める働きがある。

1919年、Michaelis と Menten は酵素反応を二段階の生化学反応で記述した。酵素 E (enzyme) が基質 S (substrate) を生成物 P (product) に変える酵素反応は次のように定義される。



各状態の濃度変化を表す微分方程式は、

$$d[E]/dt = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (35)$$

$$d[S]/dt = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (36)$$

$$d[ES]/dt = +k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] \quad (37)$$

$$d[P]/dt = +k_{cat}[ES] \quad (38)$$

となる。中間体 ES が前半と後半の反応式をつなげる役割をしている。後半の反応は不可逆反応で表されている。後半の反応が可逆である酵素反応も存在するが、ほとんどの酵素反応は不可逆として実験結果をよく説明できる。酵素反応が測定されるときには、この Michaelis-Menten 式が正しいという仮定の下で測定されている。

回転率 (turn over) k_{cat} は、1 分子の酵素が 1 秒あたり触媒することのできる分子数の最大値を表している。酵素最大速度 V_{max} とは $V_{max} = k_{cat}[E_{all}]$ の関係がある。

多くの酵素反応では、前半の反応は後半に比べてすぐ平衡状態に達する。すなわち、 $k_{-1} \gg k_{cat}$ である。それから長い時間をかけて生成物 P が生成される。このとき、 $[ES]$ の変化はほぼ 0 とみなせるので、式 (40) から、

$$d[ES]/dt = +k_1[E][S] - (k_{-1} + k_{cat})[ES] = 0 \quad (39)$$

$$\therefore \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \equiv K_m \quad (40)$$

Michaelis 定数 $K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$ は、酵素 E と基質 S との親和性を表す。酵素の総濃度 $[E_{all}]$ を用いると、 $[E] = [E_{all}] - [ES]$ だから、式 (40) から $[E]$ を消去できる。

$$\frac{[S]([E_{all}] - [ES])}{[ES]} = K_m \quad (41)$$

または

$$[ES] = [E_{all}] \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (42)$$

を得る。式 (42) から式 (38) を引いて $[ES]$ を消去すると、

$$V = k_{cat}[E_{all}] \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (43)$$

この式は V は $[S]$ に依存することを表している。酵素最大速度 V_{max} は $[S]$ が E を飽和するほど存在するとき、すなわち $[S] \gg K_m$ のときに得られる。つまり、

$$V_{max} = \lim_{[S] \rightarrow \infty} V = k_{cat}[E_{all}] \lim_{[S] \rightarrow \infty} \frac{1}{1 + K_m/[S]} = k_{cat}[E_{all}] \quad (44)$$

式 (43) と式 (44) を用いて $k_{cat}[E_{all}]$ を消去すると Michaelis-Menten 式が得られる。

$$V = V_{max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (45)$$

$[S] = K_m$ のとき、 $V = \frac{1}{2}V_{max}$ となる。

なお、シグナル伝達系が閾値現象を示すとき、式 (45) を拡張して、

$$\text{Response} \propto \frac{[\text{Stimulus}]^n}{K^n + [\text{Stimulus}]^n} \quad (46)$$

で刺激 (stimulus) と応答 (response) の関係を近似し、 n の大きさを閾値現象の強さとすることがある。ただし、近似式として Hill 式 (46) を使うことには、慣習的意味しかない。2 酵素の相互抑制の例ですら、一般形は複雑な形になる [7]。

4. パラメタ値の検索方法

この章では、計算に必要なパラメタ値を生化学などの実験論文から調べる方法について論じる。

4.1 反応時定数の検索方法

平衡に近づく反応の場合、反応が $1 - 1/e = 63.2\%$ まで (半分を過ぎて) 進む時間が時定数である。結合反応速度の時定数を計測している生化学論文はほとんど無い。その主要な原因は技術的に困難というよりも、生化学実験者が結合反応速度に関心がないからである。タンパク質の結合反応は酵素反応よりも極めて速いため、経路全体としての反応速度は、酵素反応が律速になってほぼ決まってしまう。つまり、酵素反応を含む経路では反応時定数は重要ではないと予想されるのだが、測定データがないということは、反応時定数は未知のパラメタとして残ってしまう。

一方で、タンパク質と低分子、例えばチャネルなどの受容体とリガンドの結合は比較的計測されているものが多い。最近では、蛍光エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) などの 1 分子イメージング技術でタンパク質の結合反応の素過程を見ることができ、反応速度が報告されていることもあるので、注目したい。

4.2 解離定数と Michaelis 定数の検索方法

ほとんどの解離定数と Michaelis 定数は生化学論文で報告されている。よく、親和性 (affinity) という単語が使われる。生化学者は結合親和性をタンパク質の特徴を表す主要なパラメタとして考えている。受容体とリガンドの解離定数については、特に詳しく調べられている。とりわけ、薬理学にとって解離定数は意味があり、さまざまなアゴニストとアンタゴニストについて網羅的に調べられている。データが乏しいのは、酵素活性が基質以外の物質から影響を受ける場合である。生理的に有り得ないほどの濃度 1 点だけで測定して、影響を定性的に示す論文が

多い。影響があることだけを証明するのならそれで十分だが、パラメタに必要な測定値が得られないままなので、モデル作成には不都合である。

4.3 酵素活性の検索方法

酵素を単離したときに、生化学者は酵素反応速度を $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ という単位で報告する。この単位の意味は、1 mg の酵素が1分間に何 μmol の生成物を作るかという意味である。シミュレーションにおいては、酵素反応速度の単位は $\#/\text{sec}/\#$ である。その意味は、1個の酵素が1秒間に何個の生成物を作るかである。 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ は分子量/60,000 を掛けることで $\#/\text{sec}/\#$ に換算される。なぜならば、

$$\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg protein} \quad (47)$$

$$= 10^{-6} \text{ mol} \times \frac{1}{60 \text{ sec}} \times \frac{1}{10^{-3} \text{ mol}/\text{分子量}} = \text{分子量}/60000 \#/\text{sec}/\# \quad (48)$$

となるからである。分子量は酵素が単離されるときには必ず報告されている。論文の題名には、単離 (purification)、同定 (identification)、測定 (measurement) という単語がよく使われる。

4.4 分子濃度の検索方法

酵素濃度は、酵素を単離して活性を測定したときの副産物として得られる。濃度を割り出すのに必要な情報は、サンプルの初期体積、タンパク総質量の初期値と最終値、さらに酵素活性の回収効率である。

しかし、そのように計算された酵素濃度をそのまま使えないときも多い。酵素活性測定では、細胞をすりつぶして均一にしてから測定するのだが、免疫組織化学により、酵素が特定の細胞に集中して発現していることがしばしば発見されるからである。IP₃ 3-キナーゼのように小脳全体をすりつぶして単離された酵素が、プルキンエ細胞に特に発現していることがある。免疫組織化学には定量性がないため、図の濃淡から酵素濃度を割り出すこともできない。したがって濃度を

単離測定実験から何倍かする段階で恣意性が入ってくる。とはいうものの、そのままの濃度を使うよりかは、適当でも数倍した方が真の濃度に近づくはずである。

別の方法として、電子顕微鏡の金コロイドを数える方法がある。特異性の高いモノクローナル抗体を使えば、標的のタンパク質があれば抗体は必ず結合し、標的以外とは結合しない。抗体の金コロイドによる1点がタンパク分子1個と数えることができる。ただし、タンパクが複数のサブユニットから構成される場合はサブユニットに抗体が結合すると考える必要がある。電子顕微鏡写真の興味のある範囲内の金コロイド数と、標本の薄さが分かれば、濃度を算出することができる。

5. Ca^{2+} ダイナミクスモデルの作成

5.1 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの構造

プルキンエ細胞の樹状突起スパイン 1 個をモデル化した。スパインは細胞質、後シナプス細胞膜、小胞 Ca^{2+} ストアの 3 つのコンパートメントで構成された。体積は、電子顕微鏡のスパイン連続切片観察から [38]、それぞれ、 $0.1 \mu\text{m}^3$ 、 $0.002 \mu\text{m}^3$ 、 $0.02 \mu\text{m}^3$ とした。スパイン外部の体積は $10 \mu\text{m}^3$ とした。スパインの体積は非常に小さいため、中の分子はコンパートメント毎に均一に混じっていると仮定した。分子の空間拡散は、 IP_3 と Ca^{2+} が細胞質と PSD を行き来する以外は、すべて Ca^{2+} チャネルと Ca^{2+} ポンプを介してなされる。 IP_3 と Ca^{2+} の拡散はとても速い反応なので (IP_3 の拡散定数は $283 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ [6]、 Ca^{2+} の拡散定数は $220 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ [57])、小さなスパイン体積内のコンパートメント間の拡散は 1 ミリ秒以内で完了するはずである。したがって、この 2 つのコンパートメントの IP_3 と Ca^{2+} 濃度は時定数 1 ミリ秒で平衡状態に達すると決めた。この時定数は、 Ca^{2+} シグナル経路の大部分の結合反応より速い。

樹状突起や細胞体の Ca^{2+} 濃度はモデル化しなかった。なぜなら、スパインは樹状突起から生化学的にほぼ完全に独立しているからである。スパイン内の Ca^{2+} イオンはスパイン首部を通過して拡散することはほとんどない [87]。小脳プルキンエ細胞は他の細胞よりも内因性 Ca^{2+} バッファーを大量に含んでいるためである [32, 72]。簡単のため、スパインの外から入ってくる Ca^{2+} 流入はすべてスパイン上の VGCC からの流入と細胞膜からの Ca^{2+} 漏洩だけであるとした。

プルキンエ細胞では、樹状突起のケーブル特性により細胞体の活動電位が樹状突起の先やスパインまで逆伝播しないので [92, 98]、スパインへの Ca^{2+} 流入は PF と CF の発火が主原因となる。スパインと樹状突起との細胞内 Ca^{2+} の拡散は、無視できるほど少ない。

AMPA 受容体や VGCC の開閉はモデル化せずに、PF 入力または CF 入力があったときに一定量の Ca^{2+} 流入がスパイン内に与えられるとした。PF を強く刺激すると Ca^{2+} 流入量が飛躍的に増えるが [99]、シミュレーションでは、強い PF 入力は使わないので問題ない。PF がくり返し発火すると脱分極や過分極が原因

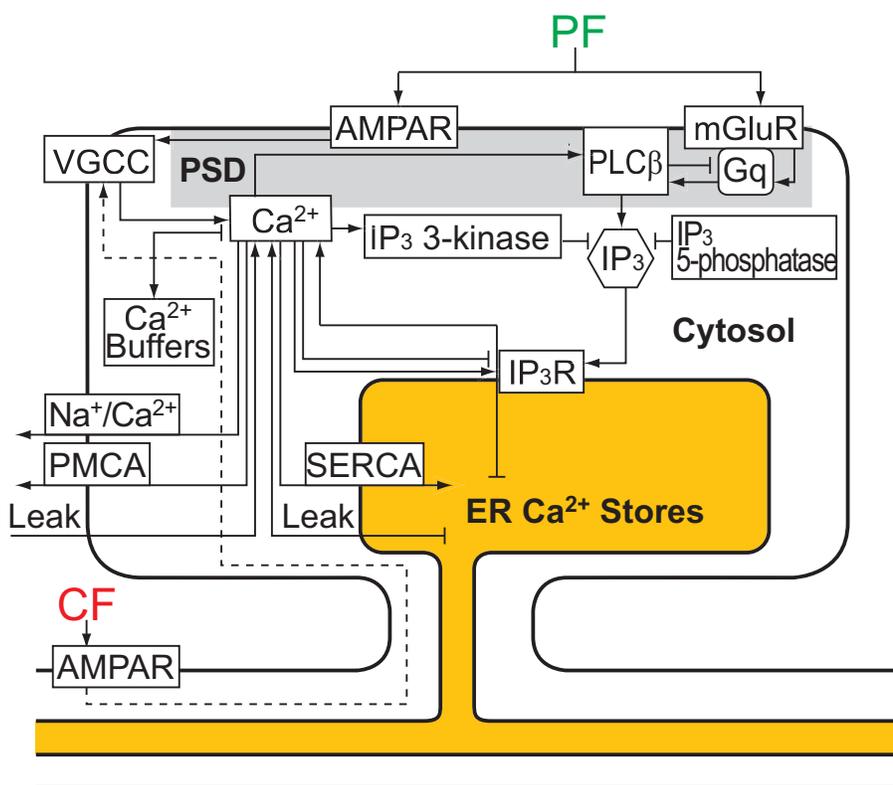


図 4 プルキンエ細胞のスパインの Ca^{2+} ダイナミクスのシグナル経路のブロック線図。点線で示してあるのは、CF 刺激による脱分極が樹状突起からスパインまで届いていることを示してある。このモデルでは、分子がスパイン首部を通過して拡散することはないと考えている。

で他のシナプスと一緒に Ca^{2+} 流入が強まったり弱まったりする可能性も考えられるが、そのような短期増強や短期抑圧は無視した。

5.2 Ca^{2+} ダイナミクスの生化学反応モデル

総説などの文献を元にして [22, 30, 48, 55, 86]、プルキンエ細胞の樹状突起スパイン内の Ca^{2+} シグナル伝達経路のブロック線図を作成した。図 4 は Ca^{2+} ダイナミクスモデルの大まかな分子反応を表している。これらの相互作用はシミュレーション上では生化学反応の組み合わせでモデル化されている。反応経路は 2 章 1

節で説明されている。付録 A で詳細な生化学経路を示してある。

5.3 Ca^{2+} ダイナミクスモデルにおけるモデル入力の実現

Ca^{2+} 流入は、AMPA 受容体や VGCC のチャネルの反応をモデル化するのではなく、VGCC が開いた結果による Ca^{2+} 流入を Ca^{2+} 矩形波入力を細胞質に与えた。CF 入力の代わりとして、2 ミリ秒の間に 5,000 個の Ca^{2+} イオンを与えた（つまり、1 ミリ秒毎 2,500 個の矩形波の Ca^{2+} 流入ということである）。PF 入力は 100 Hz の 5 本のスパイクから成るバースト刺激である。AMPA 受容体下流の代わりとして、1 ミリ秒の間に 1,500 個の Ca^{2+} イオンを与えたこの Ca^{2+} 流入量は脱分極によって VGCC を介してスパインに 1,000 個の Ca^{2+} イオンが流入すると結論した過去の推定と整合する [88]。

PF 入力によってシナプス間隙に放出されるグルタミン酸については、300 個のグルタミン酸分子だけがグルタミン酸と mGluR 受容体の結合反応に関わると仮定した。なぜなら、mGluR 受容体は PSD 構造の端に位置しているため、PSD 構造の中央よりも伝達物質濃度が低い [35, 76]。グルタミン酸は、グルタミン酸トランスポーターによって 5 ミリ秒の減衰時定数で回収されるとした。

Ca^{2+} ダイナミクスモデルの全ての生化学反応は付録図にてイラストで描かれている。パラメタの値とその決め方については、付録 B にすべてまとめられている。

5.4 IP_3 受容体モデル

5.4.1 IP_3 受容体モデルの構造

IP_3 受容体の結合反応モデルを、最近の Ca^{2+} 放出の測定 [74] と概念的なモデル [2] にもとづいて作成した。 IP_3 受容体は 1 つの IP_3 活性化部位、1 つの Ca^{2+} 活性化部位、4 つの Ca^{2+} 不活性化部位があるとした。 IP_3 が結合しているか否かで Ca^{2+} イオンが 1 つの活性化部位に結合するか、4 つの不活性化部位に結合するかが決まる（図 5A）。定常状態では、ほとんどの IP_3 受容体はどのリガンドとも結

合していない(図5A、状態R)。IP₃が結合するとIP₃受容体のCa²⁺活性化部位が露出する。したがって、IP₃受容体が開くには1個のIP₃が結合してそれから1個のCa²⁺イオンが結合しなければならない(図5A、R → RI → RIC)。他方で、IP₃がIP₃受容体に結合していないならば、4つのCa²⁺不活性化部位が露出する。1つ以上のCa²⁺イオンがIP₃受容体に結合すると、IP₃はIP₃活性化部位に結合することができない(図5A、R → RC → RC2 → RC3 → RC4) [2, 74]。IP₃受容体モデルは、平衡状態のIP₃受容体開確率が細胞内Ca²⁺濃度に対してベル型になることを再現した。開確率が最大になるCa²⁺濃度は0.2-0.3 μMである [9, 36]。Ca²⁺活性化部位とCa²⁺不活性化部位の個数は開確率の関数の勾配に影響を与える。ベル型の開確率関数をフィッティングすると、Ca²⁺活性化部位が1つで不活性化部位が4つであればIP₃受容体の実験値を満足することが分かった(図5C)。不活性化部位が4つというのは、IP₃受容体が同一の4つのサブユニットで構成されていることから考えても納得がいく。活性化部位が1というのは、4つのサブユニットのうち、どれか1つにCa²⁺が結合すればIP₃受容体が開くという解釈である。

5.4.2 IP₃受容体モデルのパラメタ値推定

一般的に、生化学反応は正反応速度定数 k_f と逆反応速度定数 k_b の2つのパラメタで特徴づけられる。この k_f と k_b を一意に定める解離定数 K_d と反応時定数 τ を推定した。

IP₃依存の活性化は、IP₃とIP₃受容体の解離定数が生体外と生体内の測定で大きくかけ離れている。単離したIP₃受容体を人工脂質二重膜上で測定するとIP₃に対する親和性 K_d は1 μMである [9]。ところが、プルキンエ細胞でのケージドIP₃光分解実験ではIP₃濃度を10 μM以上にしないと、IP₃誘導Ca²⁺放出が観察されなかった [54]。つまり、細胞内でのIP₃に対するIP₃受容体の親和性はもっと低いはずだと示唆されている。さらに、IP₃受容体によるCa²⁺ストア内のCa²⁺枯渇をプルキンエ細胞内で測定した実験があって、 K_d 値は25.8 μMと推定されていたので [36]、この値を使うことにした。さらに他のプルキンエ細胞のケージドIP₃光分解実験によると、IP₃を与えてからCa²⁺放出までに50から400ミリ

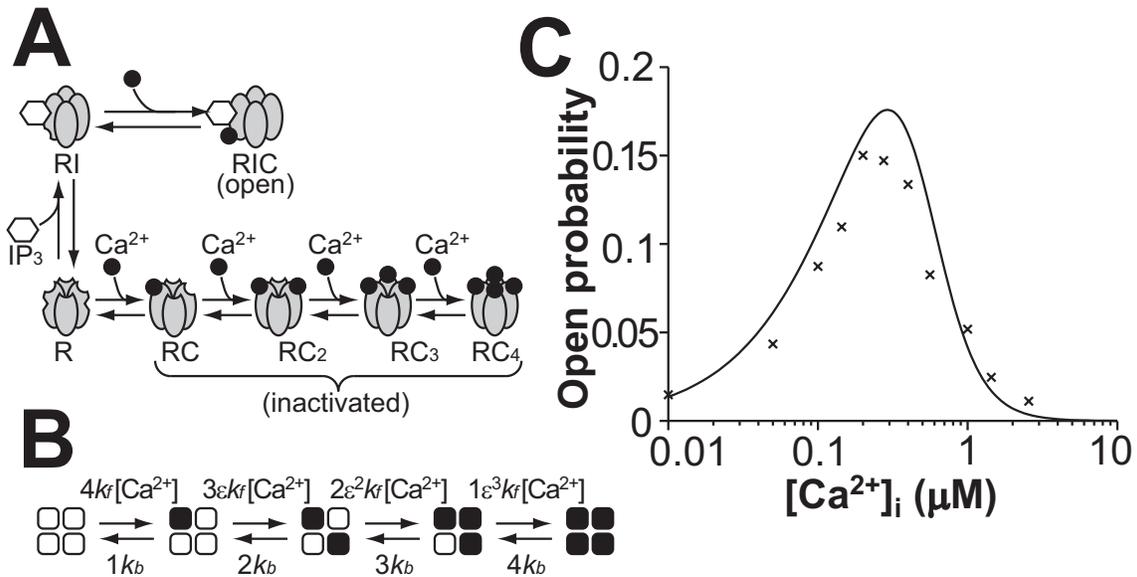


図 5 IP₃ 受容体モデル。(A) 安定状態では、90% 以上の IP₃ 受容体はどのリガンドとも結合していない (R)。IP₃ 受容体が開くには、IP₃ と Ca²⁺ の両方が必要で、Ca²⁺ 活性部位は IP₃ が IP₃ と結合するまで現れない。まず IP₃ が IP₃ 受容体に結合して、それから Ca²⁺ が結合すると IP₃ 受容体が開く (R→RI→RIC)。Ca²⁺ は IP₃ 受容体を活性化させるだけでなく、IP₃ 受容体に IP₃ が結合していないときは不活性化させる (R→RC→RC₂→RC₃→RC₄)。IP₃ はこれら 4 つの不活性状態にある IP₃ 受容体に結合することができない。Ca²⁺ 上昇により、IP₃ 受容体は活性化してから不活性化する。Ca²⁺ による IP₃ 受容体不活性化は Ca²⁺ による活性化よりもはるかに遅いと仮定してあるので、Ca²⁺ 誘導 Ca²⁺ 放出の正のフィードバック作用がまず働くからである。(B) Ca²⁺ による IP₃ 受容体不活性化過程におけるパラメタの削減。白四角は何とも結合していない IP₃ 受容体のサブユニット、黒四角は不活性化されたサブユニット。8 つの IP₃ 受容体不活性化の反応速度パラメタが k_f 、 k_b 、 ϵ の 3 つにまで削減された。(C) 細胞内 Ca²⁺ 濃度と IP₃ 受容体の開確率。実線はモデルで IP₃ 濃度は 10 μ M、×は再構成された平坦脂質二重膜での IP₃ 受容体の実験値で IP₃ 濃度は 2 μ M [9]。比較する IP₃ 濃度が違うのは、構成された脂質二重膜よりもプルキンエ細胞内のほうが IP₃ に対する IP₃ 受容体の感受性が低いため [36, 54]。

秒の遅れがあるので、IP₃ 結合は遅いはずであると推論されている [74]。しかし、Ca²⁺ ダイナミクスモデルでは IP₃ 結合が速くても Ca²⁺ 放出の遅れを再現できている (図 24C 右、黒線)。この遅れは Ca²⁺ 誘導 Ca²⁺ 放出の正のフィードバックループに由来する。IP₃ 受容体が開くには IP₃ だけでなく Ca²⁺ による活性化が必要なため、IP₃ を与えるだけでは瞬間的に完全に IP₃ 受容体の Ca²⁺ 放出を活性化することはできない。

Ca²⁺ 依存の活性化は、解離定数 K_d は脂質二重膜上の IP₃ 受容体開確率 [9]、およびプルキンエ細胞内の Ca²⁺ 放出のベル型 Ca²⁺ 濃度依存性 [36] から推定した。特に Ca²⁺ 活性化について報告した論文がなかったため、Ca²⁺ による活性化は速い (反応時定数 $\tau < 10$ ミリ秒) とした。

Ca²⁺ 依存の不活性化は、複数の段階の Ca²⁺ 依存の不活性化があると仮定した。モデルの構造から、Ca²⁺ 依存の活性化より段階数が多いと、Ca²⁺ 濃度を高くしたときに IP₃ 受容体が完全に不活性化する現象 [9,36] を再現できない。4 つの不活性化部位は対等であるとした。つまり、Ca²⁺ に結合した Ca²⁺ 不活性化部位の数だけが問題で、結合の順番や位置は考えなくてよいということである。4 つの不活性化部位の Ca²⁺ 結合反応は合計 8 つのパラメタによって性質が決まる。すなわち、4 つの正反応速度定数 k_f と 4 つの逆反応速度定数 k_b 、もしくは 4 つの解離定数 K_d と 4 つの反応時定数 τ である (図 5B を見よ)。簡単のため、1 個の Ca²⁺ イオンが結合するたびに k_f 値が ε 倍すると仮定した (ε は cooperative factor と呼ばれる)。 $\varepsilon = 1$ のときは協調作用が正でも負でもなく、他のサブユニットの状態に関係なくそれぞれのサブユニットは不活性化反応が起こる。 $\varepsilon > 1$ のときは他のサブユニットの Ca²⁺ 依存性の不活性化反応が進んでいるほど不活性化反応が起こりやすくなる。この単純化はパラメタ数を減らすためのもので、実験的には何も確かめられていないことに注意されたい。単純化の結果、8 つのパラメタは 3 つにまで減少した (図 5B の k_f 、 k_b 、 ε)。図 5C のベル型にフィッティングすると、 $k_b/k_f = 2.25 \mu\text{M}$ 、 $\varepsilon = 3$ という結果になった。反応時定数 τ は、前もって高 Ca²⁺ 濃度に晒すと Ca²⁺ 放出が妨げられる実験 [2] から、 $k_f = 2.22 / \text{sec}/\mu\text{M}$ 、 $k_b = 5 / \text{sec}$ と推定した。これは、Ca²⁺ 依存の不活性化は IP₃ 依存の活性化と Ca²⁺ 依存の活性化よりも極めて遅くなっている。反応時定数がかけ離れ

	既知				未知	合計
	プルキンエ細胞内	他の細胞内	試験管内	他のサブタイプから		
時定数 τ	0	2	5	0	27	34
解離定数 K_d と Michaelis 定数 K_m	6	6	9	5	3	29
酵素最大速度 V_{max}	0	3	5	1	3	12
初期分子濃度 []	7	7	3	1	3	21
合計	13	16	24	7	36	96

表 1 (プルキンエ細胞から)パラメタ値をプルキンエ細胞の測定から取ったもの(他の細胞から)プルキンエ細胞を測定した論文がなかったため、パラメタ値を海馬神経細胞などプルキンエ細胞以外の測定から取ったもの(試験管内から)細胞内で測定した論文がなかったため、単離した分子の試験管内の生化学測定から取ったもの(他のサブタイプから)他のサブタイプの測定値を流用したもの具体的には、PLC β 4の定量的な測定データがなかったため、代わりにPLC β 1のものを使った。

ているお陰で、IP $_3$ 受容体はまず活性化されてから徐々に不活性化されるようになる。

5.5 Ca $^{2+}$ ダイナミクスモデルのパラメタの種類

Ca $^{2+}$ ダイナミクスモデルには、53個の変数(各状態の分子濃度)と96個のパラメタがあった。モデルを実際のプルキンエ細胞の動態に近づけるために、パラメタ値はプルキンエ細胞内で測定された値を優先的に利用した。そのようなデータがない場合は、他種類の細胞内の測定値、試験管内の測定値、類似したサブタイプの測定値の順番で使った。各パラメタがそれぞれどこに該当するかは、付録Bを参照されたい。

そのようにして何らかの測定データからパラメタ値を入手できたものを既知パラメタ、そうでないものを未知パラメタと定義する。

5.6 未知パラメタの決め方

5.6.1 未知の反応時定数

反応時定数は、文献で報告されていないパラメタの大部分を占めていた。反応の中に遅い時定数のものが含まれていると、シグナルは遅延して伝わる。未知の時定数は、十分に速い (< 10 ミリ秒) 反応だと仮定した。この時定数を数倍変えても、 Ca^{2+} 経時変化にまったく影響を与えなかった。

5.6.2 未知の親和性

29 個の解離定数 K_d と Michaelis 定数 K_m のうち、3 個 (特定されていない 2 種類の低親和性の細胞内 Ca^{2+} 結合タンパクの親和性と Glu が無い状態での mGluR と Gq との親和性) は報告がなかった。 Ca^{2+} 結合タンパクの親和性は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i = 10 \mu\text{M}$ を超えると流入する Ca^{2+} 量に対して Ca^{2+} 上昇が鈍くなる [72] ように決めた。mGluR と Gq の親和性が高いとグルタミン酸放出以前に mGluR 受容体と Gq が結合して、低いとグルタミン酸放出以前に結合しない。どちらに転んでもいいように半分の mGluR が Gq と結合するようにした。

5.6.3 未知の酵素最大速度

12 個の酵素最大速度 V_{\max} のうち、3 個 (Glu と結合した mGluR の Gq を活性化させる効率、Gq が結合せず Ca^{2+} が結合しているときの PLC の IP_3 産生効率、 IP_3 3-キナーゼの IP_3 分解効率) は報告はなかった。Glu と結合した mGluR の Gq に対する活性値は、PF による IP_3 産生のピーク値に大きく影響を与える。 IP_3 ピーク値が高いと、PF 入力だけ $10 \mu\text{M}$ 以上の大きな Ca^{2+} 上昇が起きてしまうし、 IP_3 ピーク値が低いと、PF と CF の組み合わせ入力をどのような時間差で与えても $2 \mu\text{M}$ 程度の小さな Ca^{2+} 上昇しか起こらない。PF 単独入力後に Ca^{2+} が $1 \mu\text{M}$ まで上昇しないように、PF と CF の組み合わせ入力で Ca^{2+} が $5 \mu\text{M}$ を超えるまで上昇するように調整した。PLC と IP_3 3-キナーゼの効率については、静止状態で $[\text{IP}_3] = 0.1 \mu\text{M}$ となるように推定した。時間窓が Ca^{2+} 実験結果と合うよう

に、PF 入力後の IP_3 の減衰を調整した。結局、 Ca^{2+} イメージングの結果 [99] が再現できるように酵素最大速度を決めた。しかしながら、この IP_3 の強さはケージド IP_3 光分解に対する Ca^{2+} 応答のイメージング実験 [33] と整合性がある。その研究ではケージド IP_3 光分解と PF 刺激での Ca^{2+} 応答を比較している。それによると、AMPA 受容体阻害剤下で 60 Hz の 16 発の PF 刺激で $10 \mu M$ から $20 \mu M$ 程度の IP_3 が産生されると見積もっている。 Ca^{2+} ダイナミクスモデルでは、16 発の PF 刺激を与えると $10.3 \mu M$ まで IP_3 濃度が上昇する。 IP_3 の産生と分解は、定常状態で IP_3 濃度が $0.1 \mu M$ になるように、また、 Ca^{2+} イメージング実験 [99] での時間窓の幅が再現できるように決めた。

5.6.4 未知の分子初期濃度

21 個の分子初期濃度のうち、3 個 (SERCA、PMCA、NCX) は報告がなかった。それぞれの阻害剤を用いたときの Ca^{2+} 排出の貢献度 [31] から、SERCA、PMCA、NCX の相対量を割り出した。これら 3 つの全体量は、静止状態で、 $[Ca^{2+}]_i = 0.06 \mu M$ になるようにした。

5.6.5 シミュレーションの初期状態

静止状態を、PF と CF の入力はずっとないときの安定平衡状態と定義する。シミュレーションは全てこの静止状態から開始した。細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 IP_3 濃度は静止状態でそれぞれ $0.06 \mu M$ と $0.1 \mu M$ に収束した。この静止状態の IP_3 濃度が $0.1 \mu M$ というのは、アフリカツメガエル卵で細胞内 IP_3 濃度を計測値である $0.04 \mu M$ [70] と整合性がある。

5.7 シミュレータと数値計算法

モデルは GENESIS シミュレータの Kinetikit インターフェイス [10] 上で作成した。数値計算法として、exponential Euler 法 [71] を用いた。数値計算の刻み時間幅は 1 マイクロ秒とした。

6. Ca^{2+} ダイナミクスモデルによる PF と CF の入力順序検出の再現

6.1 PF と CF の入力順序と LTD 誘導

小脳 LTD に必要な Ca^{2+} シグナル上昇は、PF 入力 が CF 入力 より 50 から 200 ミリ秒先行するとき誘導されることが知られており [99]、この実験結果は小脳学習理論と整合性がある。しかし、他の実験報告では、PF 入力 と CF 入力の入力順序と LTD 誘導が関係なさそうであったり [51]、刺激が強ければ PF 入力だけ (CF 入力なし) でも Ca^{2+} 上昇 [26] や LTD 誘導が起こったりした [39]。これらを踏まえて、私は小脳プルキンエ細胞のスパインの Ca^{2+} ダイナミクスの生化学反応モデルを作成した。シミュレーションでは、PF 入力の下流にある代謝型経路で IP_3 産生に時間遅れがあった。この IP_3 上昇の遅れが、PF と CF の最適な入力タイミングの時間窓を生み出していた。 IP_3 受容体は、PF 入力による IP_3 産生と CF 入力による Ca^{2+} 流入の同時性を検出していた。

6.2 はじめに

小脳の LTD 誘導にはたくさんのシグナル分子やタンパク質が関与しているが、 Ca^{2+} シグナルが PF と CF のタイミングを検出しているのではないかと提案されている [8,99]。

多光子 Ca^{2+} イメージングでプルキンエ細胞の樹状突起スパインを測定した実験によると [99]、PF 刺激の後に CF 刺激という順序が「非線形の」 Ca^{2+} シグナルを得るのに最適で、そのとき LTD も誘導されるという。ここで、「非線形の」というのは、PF と CF の組み合わせ入力による Ca^{2+} 応答が、PF 入力のみによる Ca^{2+} 応答と CF 入力のみによる Ca^{2+} 応答の線形和より大きいということである。 IP_3 受容体が非線形の Ca^{2+} 上昇の同時検出器であると唱えられている [8]。 IP_3 受容体は細胞内にある Ca^{2+} チャンネルであり、 IP_3 と Ca^{2+} によって活性化される。 IP_3 受容体は LTD 誘導に不可欠である [33,43]。PF 入力は代謝系経路により IP_3 産生を引き起こす [33] のに対して、CF 入力は強い脱分極を与えて、VGCC が

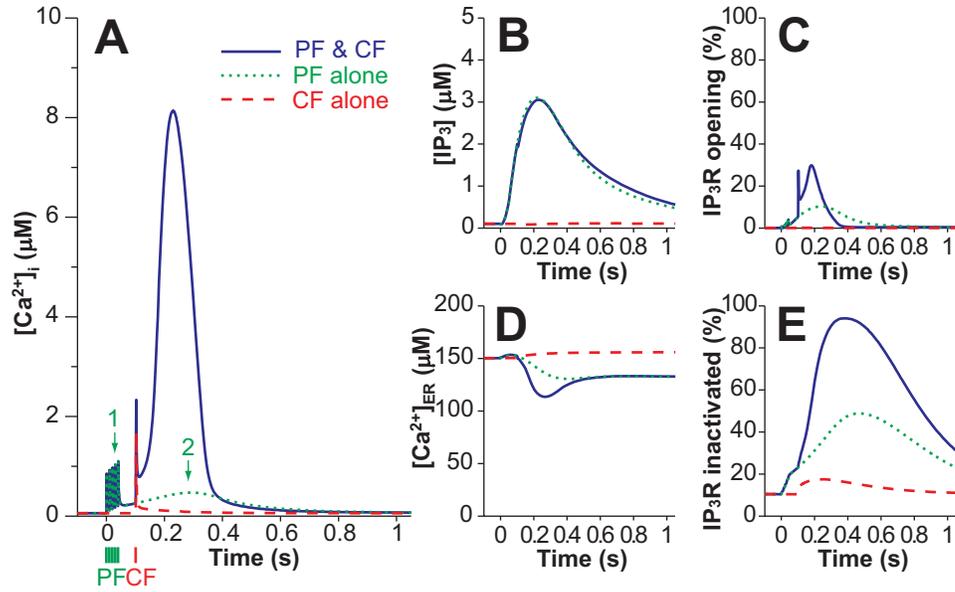


図 6 PF 入力のみ（緑色）、CF 入力のみ（赤色）、PF と CF の組み合わせ入力（青色）を与えたときの分子濃度の経時変化。PF 入力を時刻 0 ミリ秒、CF 入力を時刻 100 ミリ秒に与える。（A）細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)、（B） IP_3 濃度 ($[\text{IP}_3]$)、（C）開状態の IP_3 受容体の割合、（D） Ca^{2+} ストア内の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$)、（E）不活性化状態の IP_3 受容体の割合。

開いてプルキンエ細胞の樹状突起スパインに Ca^{2+} が流入する [80]。しかし、 IP_3 受容体が同時検出機構があるというアイデアは PF 入力と CF 入力の時間差検出という見地からさらに検証される必要がある。

6.3 非線形的な Ca^{2+} 上昇の再現

Ca^{2+} ダイナミクスモデルにおいて、PF と CF の組み合わせ入力により、 Ca^{2+} 応答が非線形に上昇することを確認した。モデルの生化学反応経路とパラメタ値は、付録を参照されたい。

図 6A は、PF 入力を時刻 0 ミリ秒、CF 入力を時刻 100 ミリ秒に与えたときの Ca^{2+} 応答である。PF 入力のみ、CF 入力のみ、それらの組み合わせ入力の 3 条件を試した。PF 入力のみでは、AMPA 受容体下流の Ca^{2+} 流入で Ca^{2+} 濃度がスパ

イク状に $1 \mu\text{M}$ まで5回上昇した(図6A、緑色矢印1)。その後が続いて、mGluR受容体下流の IP_3 産生(図6B)によってゆっくりと Ca^{2+} が上昇した(図6A、緑色矢印2)。CF入力のみでは、一過性の Ca^{2+} 上昇が起こり、ピークは $2 \mu\text{M}$ だった(図6A、赤色)。PFとCFの組み合わせ入力では、線形和を超えるシグナルが起こり(図6A、青色)1秒以内で元の状態に戻った。シミュレーションで得られた非線形性は Ca^{2+} イメージング実験[99]で得られたものと似ていたが、全く同じというわけではなかった。ちなみに、 Ca^{2+} 濃度が $1 \mu\text{M}$ 以下の場合、蛍光量(F/F_0)増加は Ca^{2+} 濃度上昇にほぼ比例し、その比は1%の F/F_0 あたり $0.2 \mu\text{M}$ の Ca^{2+} 濃度である。

細胞内 IP_3 は、PF入力の後から徐々に蓄積していき(220ミリ秒で $3.1 \mu\text{M}$ のピーク、図6B、緑色)、CF入力は IP_3 のダイナミクスにはほとんど影響がなかった(図6Bの青色と緑色を比較せよ)。開状態の IP_3 受容体はPFとCFの組み合わせ入力では30%に達したが(図6C、青色)、PF入力のみでは10%(図6C、緑色)、CF入力のみでは10%(図6C、赤色)までしか達しなかった。したがって、PF入力をもたらす Ca^{2+} 流入は、 IP_3 が上昇しているときのみ IP_3 受容体を開かせるということになる。非線形の Ca^{2+} 応答は、 IP_3 受容体が開いて小胞体 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出でもたらされた。これは、 IP_3 受容体の開状態の増加(図6C、青色)と小胞 Ca^{2+} 濃度の減少(図6D、青色)から示される。PFとCFの組み合わせ入力のあと、90%以上の IP_3 受容体が不活性化された(図6E、青色)。このことは IP_3 受容体不活性化が非線形の Ca^{2+} シグナルを止めていることを示唆する。

6.4 経路切断シミュレーション

非線形な Ca^{2+} ダイナミクスはシグナル伝達経路の正のフィードバックループによるかもしれない。ブロック線図(図4)から見受けられる正のフィードバックループで非線形な Ca^{2+} シグナルに関与しそうなものは2つあった。1つは、 Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体活性化ループである。 Ca^{2+} 上昇により IP_3 受容体が開いて、さらなる Ca^{2+} 上昇を引き起こすかもしれない($\text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{IP}_3$ 受容体 $\rightarrow \text{Ca}^{2+}$)。もう1つは、 Ca^{2+} 依存性のPLCの IP_3 産生のループである。 Ca^{2+} 上昇によりPLC

の IP_3 産生効率が上がって、 IP_3 が上昇して IP_3 受容体が小胞から Ca^{2+} を放出してさらに Ca^{2+} 濃度が上昇するかもしれない ($Ca^{2+} \rightarrow PLC \rightarrow IP_3 \rightarrow IP_3$ 受容体 $\rightarrow Ca^{2+}$)。また、ブロック線図によると、 Ca^{2+} 放出を止める可能性のある2つの負のフィードバックループがあった。高 Ca^{2+} 濃度になると、 Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体不活性化が IP_3 受容体が開くのを抑制するかもしれない。そうではなくて、 Ca^{2+} 放出により小胞 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} が枯渇してしまうかもしれない。

Ca^{2+} ダイナミクスに主要な経路を同定するために、1つの反応を切断する(図7A)。切断は、反応の上流側の分子濃度を初期濃度のままにしておくことで実現した。例えば、 IP_3 依存の IP_3 受容体活性化を切断するには(図7B)、 IP_3 受容体は初期濃度 IP_3 と反応するようにして、他の IP_3 が関わる反応(IP_3 3-キナーゼと IP_3 5-ホスファターゼによる IP_3 分解)は普段通り計算して求めた IP_3 濃度で反応させる。

最初に IP_3 と IP_3 受容体の結合反応を切断してみた。 IP_3 上昇による IP_3 受容体活性化が起こらないようにした。まったく非線形な Ca^{2+} 応答が見られなくなったので(図7B)、非線形な Ca^{2+} シグナルは IP_3 上昇が必要なことがわかる。 IP_3 受容体の Ca^{2+} 依存性の活性化反応に対する Ca^{2+} 濃度を固定すると、非線形の Ca^{2+} 応答は完全に消えた(図7C)。一方で、PLCの Ca^{2+} 依存性の活性化反応に対する Ca^{2+} 濃度を固定しても、非線形の Ca^{2+} 応答はほとんど消えなかった。(図7D)。これらの結果は、PFとCFの組み合わせ入力に対する Ca^{2+} 応答は、再帰的な過程で、 IP_3 受容体による Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出の正のフィードバックループによってもたらされることを示している。

IP_3 受容体の Ca^{2+} 依存性の不活性化反応を切断すると、 Ca^{2+} 上昇は劇的に大きくなり、長く続いた(図7E)。最後に、小胞 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} 濃度を静止状態の $150 \mu M$ に固定した。小胞 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} 濃度を保つために、 IP_3 受容体の Ca^{2+} 放出による損失や、 Ca^{2+} ポンプによる Ca^{2+} 汲み上げの効果などをなくした。小胞 Ca^{2+} ストア内の Ca^{2+} 濃度を固定しても細胞内 Ca^{2+} 濃度の経時変化にはほとんど効果がなかった(図7F)。つまり、小胞内の Ca^{2+} 枯渇ではなく、 Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体不活性化が、 Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出を止めるのに必要かつ十分ということである。

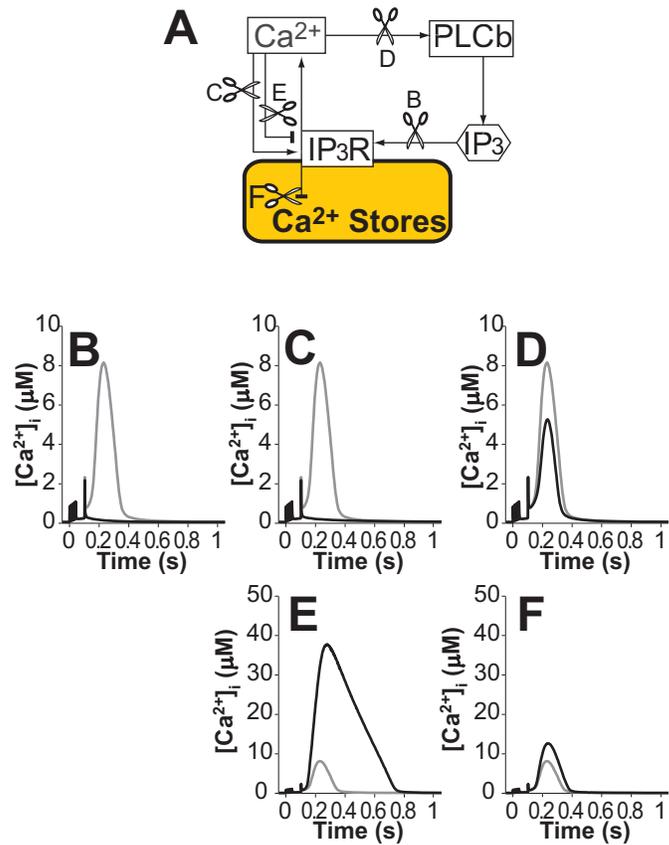


図 7 PF 入力と CF 入力はそれぞれ 0 ミリ秒と 100 ミリ秒で与える。経路切断は CF 入力時から始まる。分子 A (上流側) が分子 B (下流側) に影響を与えるという反応を切断するために、A の濃度を静止状態に固定した。B と AB の濃度変化は普段通り計算する。上流側の分子が Ca²⁺ のように複数の反応に関与する場合、切断対象の反応だけ分子濃度が静止状態のまま一定になるようにした。その他の反応における分子濃度は普段通り変化する。(A) 線図で切断する特定の反応を図示してある。B から F において、黒色線は経路切断時の細胞内 Ca²⁺ 濃度の経時変化で、灰色線は対照条件 (図 6 と同一)。(B) IP₃ 依存の IP₃ 受容体活性化の経路を切断。(C) Ca²⁺ 依存の IP₃ 受容体活性化の経路を切断。(D) Ca²⁺ 依存の PKC 活性化の経路を切断。(E) Ca²⁺ 依存の IP₃ 受容体不活性化の経路を切断。(F) 小胞 Ca²⁺ ストア内の Ca²⁺ 濃度を静止状態のまま一定にした。

6.5 時間窓の再現

入力タイミング検出を担う分子機構を探するため、図8にあるように、PFとCFの組み合わせ入力を、PFとCFの時間差を様々に変えた。PF入力から300ミリ秒以内にCF入力があったときにCa²⁺応答は少なくとも5 μMまで届いた(図8A)。PFとCFの入力順序を逆にすると再帰的なCa²⁺放出は得られなくなった。IP₃濃度の経時変化はPFとCFの時間差が変わっても変化せず、PF入力に対して常に決まった時間波形だった(図8B)。

PFとCFの時間差の関数としてCa²⁺応答を定量的に評価するために、Ca²⁺応答の時間窓関数を、最初の入力から最後の入力の500ミリ秒後まで時間積分した蛍光強度変化($\Delta F/F_0$)と定義した(図9Aに例がある)。この定義はCa²⁺イメージング実験結果の解析手法と同じである[99]。

Ca²⁺イメージング実験では蛍光強度変化からCa²⁺濃度を算出するが、シミュレーションでは逆の操作、Ca²⁺濃度から蛍光強度変化を算出する。蛍光強度変化は次式で与えられる。

$$\Delta F/F_0 = \frac{[\text{MgGreen}] + [\text{MgGreen-Ca}^{2+}](F_{\max}/F_{\min})}{[\text{MgGreen}]_0 + [\text{MgGreen-Ca}^{2+}]_0(F_{\max}/F_{\min})} - 1 \quad (49)$$

分子は現在の蛍光強度、分母は静止状態の蛍光強度である。MgGreenとあるのは、遊離状態の蛍光指示薬 Magnesium Green 1で、MgGreen-Ca²⁺とあるのは、Ca²⁺と結合した Magnesium Green 1である。F_{max}とF_{min}は、それぞれ蛍光強度の最大値と最小値。

シミュレーションで得られた時間窓は図9Bに実線で描かれたものである。時間窓は0から300ミリ秒の間で大きい応答だった。正規分布関数に合わせるとピーク時刻は114ミリ秒、半値幅は170ミリ秒となり、Ca²⁺イメージング実験(ピーク時刻92ミリ秒、半値幅212ミリ秒)[99]と合致した。 $\Delta F/F_0$ でなくて、細胞内Ca²⁺濃度でCa²⁺応答を評価しても極めて似た時間窓が得られた(図示していない)。したがって、非線形のCa²⁺応答は蛍光指示薬が飽和することではないと結論できる。

このCa²⁺応答の時間窓から外れたCa²⁺流入は、小胞からのCa²⁺放出を引き出すことはできなかった。時間窓と遅いIP₃応答には時間の類似性が見られた(図

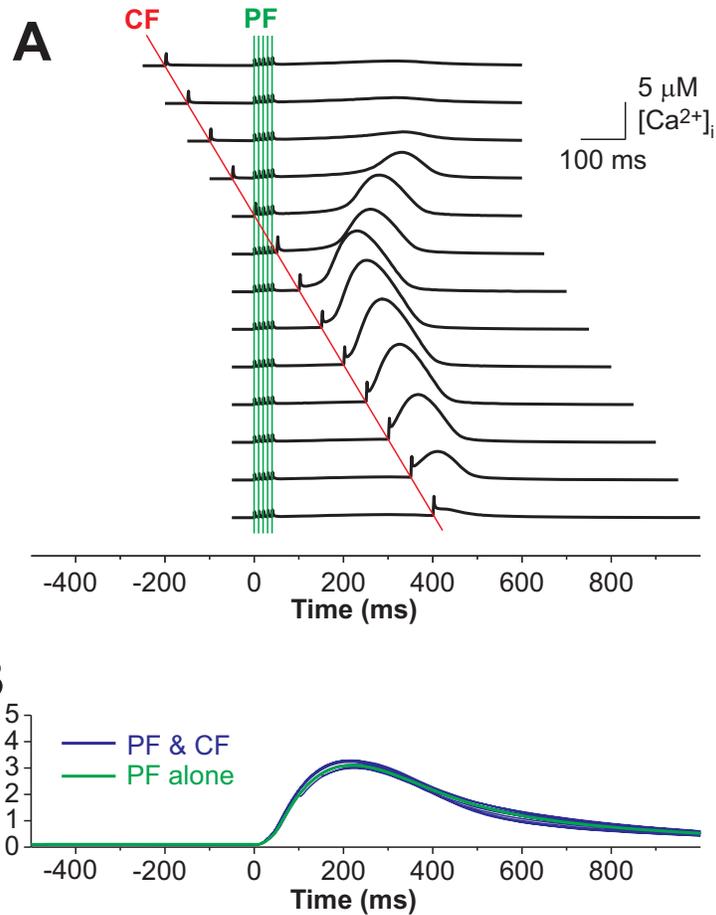


図 8 再帰的な Ca^{2+} 上昇は PF と CF の入力タイミングに依存する。(A) PF と CF の組み合わせ入力をさまざまな間隔で与え、 Ca^{2+} 応答を調べた。PF 入力とは 5 本の緑色線にあるように、時刻 0 ミリ秒から与えた。CF 入力は 1 本の赤色線にあるように、時刻 -200 ミリ秒から +400 ミリ秒の間で与えた。(B) 様々なタイミングでの PF と CF の組み合わせ入力での IP_3 経時変化の重ね合わせ。

9B、C で、実線同士を比較せよ)。このことは、 IP_3 経時変化がスパイクタイミング検出に関わっていることを示唆する。 IP_3 経時変化が確かに Ca^{2+} 応答の時間窓を決定することを体系的に調べるために、以下に述べる 2 つの酵素活性を意図的に変えて時間窓を調べた。PLC には GAP (GTPase activation protein) 活性があり、 G_q 不活性化を速める。 IP_3 ピーク時刻を早くするために GAP の最大酵素速度を 5 倍にし、それと共に、 Ca^{2+} 応答の時間窓のピーク値を保つために Ca^{2+}

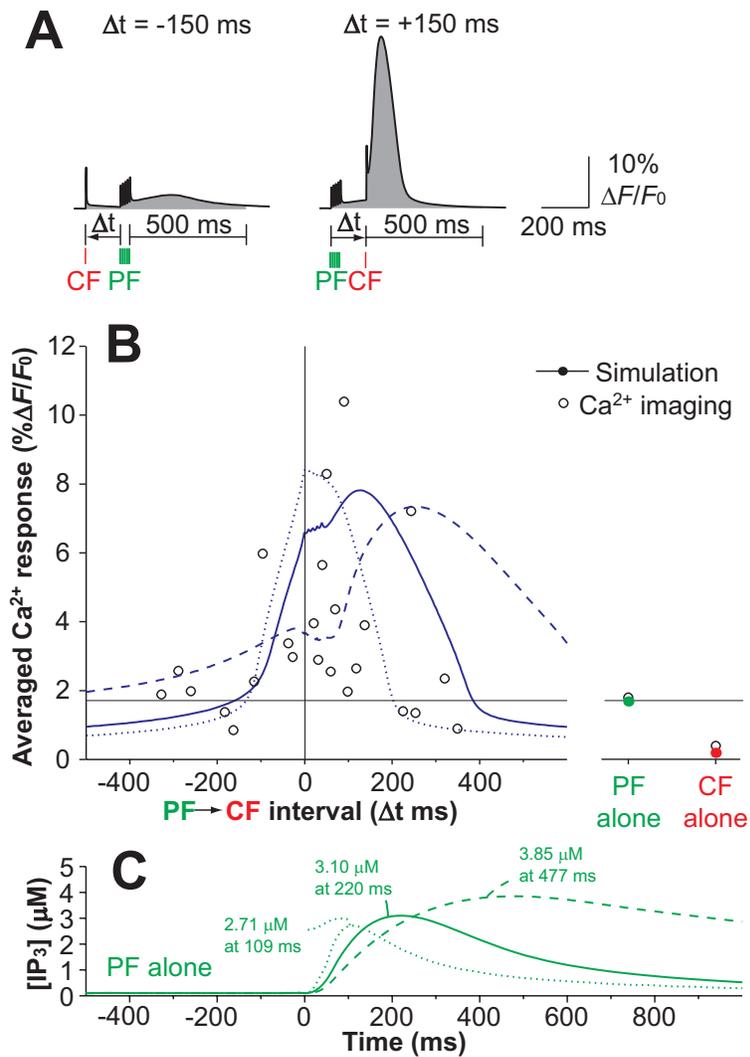


図 9 IP_3 の経時変化によって Ca^{2+} 応答の時間窓が制御される。(A) PF と CF による Ca^{2+} 応答を時間積分する例。PF と CF の入力時間差 Δt は、PF 入力の開始と CF 入力の開始時間の差として定義される。 Ca^{2+} 応答は、最初の刺激から最後の刺激の 500 ミリ秒後までの蛍光増加量 ($\Delta F/F_0$) 平均として定義される。(B) PF と CF の入力時間差の関数としての Ca^{2+} 応答の時間窓が、 IP_3 の経時変化で制御される。PF 入力のみと CF 入力のための Ca^{2+} 応答はシミュレーションは、 Ca^{2+} イメージング実験は右に示してある。シミュレーションで得られた時間窓 (実線) と Ca^{2+} イメージング [99] のデータ (○) を直接比較した。点線と破線は、酵素活性のパラメータを変えて、PF 入力のための IP_3 のピーク時刻を早く、あるいは遅くしたもの。

と G_q と結合した PLC の IP_3 産生効率を 3.5 倍に高めた。すると、時間窓は幅が狭くなり早い時刻に動いた (図 9B、C、点線)。今度は IP_3 ピーク時刻を遅くするために、GAP 活性と IP_3 産生効率をそれぞれ 0.2 倍、0.5 倍にした。時間窓は幅が広がり遅い時刻に動いた (図 9B、C、破線)。したがって、 Ca^{2+} 応答の時間窓関数は IP_3 経時変化に依存することが分かった。

6.6 Ca^{2+} 応答時間窓と Ca^{2+} バッファー

小脳プルキンエ細胞には calbindin や parvalbumin のような高親和性の Ca^{2+} バッファーが高濃度で存在する [31,72]。これらのバッファーは $1 \mu M$ 以下の Ca^{2+} 濃度では Ca^{2+} 上昇を妨げるが、 Ca^{2+} 濃度が $1 \mu M$ 以上になると飽和してしまう。これらの高親和性バッファーをシミュレーションで無くして、 Ca^{2+} 応答の時間窓に与える影響を調べた。Calbindin を無くしたとき、PF 入力または CF 入力どちらでも $5 \mu M$ まで達する大きな Ca^{2+} 上昇が生じた (図 10A)。 Ca^{2+} 応答の時間窓には 2 つのピークがあった。PF と CF の入力時間差が 0 ミリ秒と 500 ミリ秒のところである (図 10B)。先のピークは calbindin が PF と CF の組み合わせ入力の Ca^{2+} 流入だけで再帰的な Ca^{2+} 上昇を生まれることを防いでいることを示している。後のピークが表れたのは PF 入力から 500 ミリ秒では IP_3 上昇はまだ残っているのに IP_3 受容体は不活性化から回復しているからである。シミュレーションではもう 1 つの高親和性バッファーである parvalbumin をなくしても、 Ca^{2+} 応答にほとんど影響を与えなかった (図 10B)。したがって、calbindin が時間差検出に必要なことが分かった。

6.7 まとめ

本章では、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルを用いて、入力タイミング検出機構を探した。非線形的な Ca^{2+} 応答は、 IP_3 上昇中に IP_3 受容体が Ca^{2+} 依存で開くことで起こった。 Ca^{2+} 応答の時間窓は IP_3 濃度の経時変化で決まっていた。

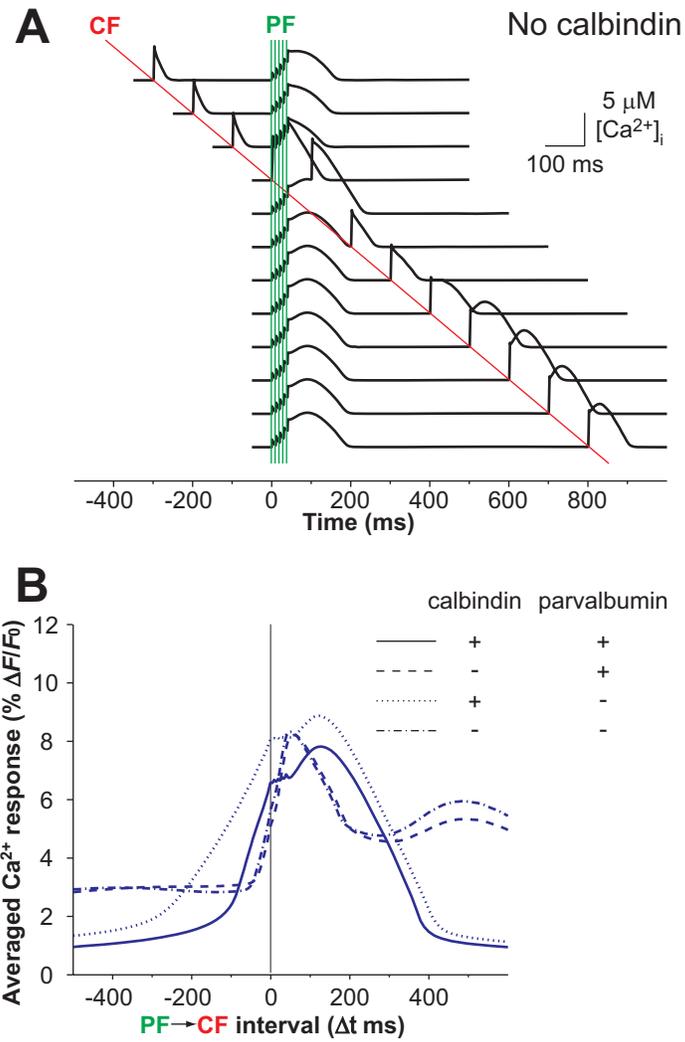


図 10 Ca²⁺ バッファーはCa²⁺ 応答の時間窓を強めることに寄与する。(A) Calbindin を無くして、PF と CF の組み合わせ入力をさまざまなタイミングで与えたときの Ca²⁺ 応答。高親和性 Ca²⁺ バッファーである calbindin が無い以外は、図 8 と同一である。(B) Calbindin と parvalbumin の片方、あるいは両方を無くしたときの Ca²⁺ 応答の時間窓。

7. Ca^{2+} ダイナミクス感受性解析

7.1 IP_3 経時変化の感受性解析

PF と CF の入力タイミングに対する Ca^{2+} 応答は、PF 入力と IP_3 濃度のピークとの遅れに原因があった (図 9B、C)。それぞれのパラメタ値を変えたときの IP_3 経時変化の頑強性を検証した。それぞれのパラメタ値を元の値から 1/100 倍から 100 倍まで変えて、他の全てのパラメタ値は元の値のままにした。すべての既知パラメタと未知パラメタ (全部で 96 個) について感受性を調べた。 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの全てのパラメタ値 (元々の値) は付録 B に載っている。パラメタ値を変えた IP_3 経時変化の例として、グルタミン酸と結合した mGluR 受容体が G_q を活性化する酵素反応の酵素最大速度を変えたときの IP_3 経時変化を図 11 に示す。

それぞれのパラメタを変えたときの IP_3 経時変化を、 IP_3 経時変化のピーク時刻とピーク値を評価基準にしてパラメタの種類別に図示した。反応時定数は図 12、解離定数と Michaelis 定数は図 13、酵素最大速度は図 14、分子初期濃度は図 15 にまとめてある。

記号の形はパラメタ値を変えた倍率を表す。 は 1/2 倍または 2 倍、 は 1/5 倍または 5 倍、 は 1/10 倍または 10 倍、 は 1/20 倍または 20 倍、 は 1/50 倍または 50 倍、 は 1/100 倍または 100 倍。薄い色ではパラメタ値を小さくし、濃い色ではパラメタ値を大きくした。青色は既知のパラメタ、赤色は未知のパラメタである。

IP_3 経時変化はほとんど全てのパラメタ変動に対して頑強だったが、酵素最大速度 (V_{\max}) に関するいくつかのパラメタに関しては IP_3 ピーク時刻は大きく影響を受けた。グルタミン酸と結合した mGluR 受容体の G_q 活性化 (付録のパラメタ ID では a5 にあたる)、 G_q と結合した PLC の IP_3 産生 (パラメタ ID は b6)、 G_q と結合していない PLC の IP_3 産生 (パラメタ ID は b7)、PLC の GAP 活性 (パラメタ ID は b10、b11、b12)、 IP_3 3-キナーゼの IP_3 分解 (パラメタ ID は c3) である。パラメタが未知のものは a5、b6、c3 の 3 つだけであった。パラメタ a5 は ケージド IP_3 光分解の Ca^{2+} 応答 [33] に合わせて、代謝型経路が 16 発 100 Hz の

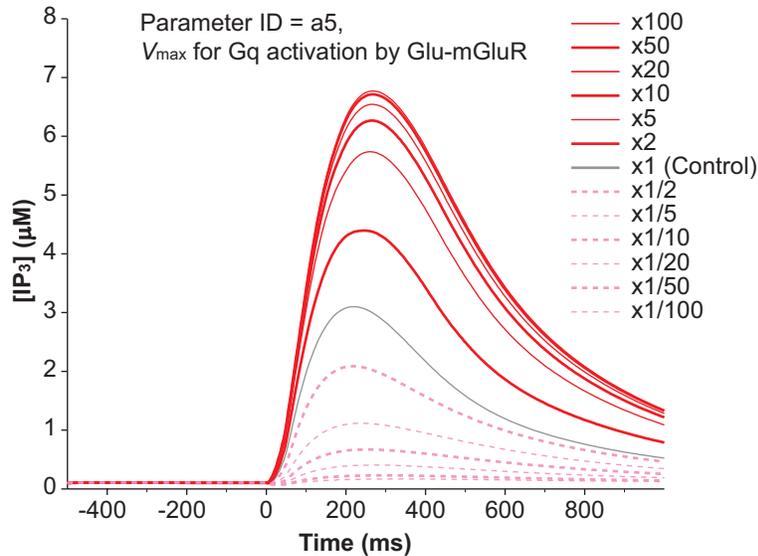


図 11 グルタミン酸と結合した mGluR 受容体が Gq を活性化する酵素反応の酵素最大速度を 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍（赤色実線）、1/2 倍、1/5 倍、1/10 倍、1/20 倍、1/50 倍、1/100 倍（桃色破線）に変えたときの IP₃ 経時変化。

連続 PF 入力で 10 μM の IP₃ を産生するように決めた。パラメタ b6 と c3 は静止状態の IP₃ 濃度が 0.1 μM になるように決めた。図 16 はこの 3 つの未知パラメタについて、パラメタ値を 1/10 倍から 10 倍したときの IP₃ 濃度の経時変化を示している。グルタミン酸と結合した mGluR 受容体の Gq 活性化 (a5) は IP₃ 濃度のピーク値に影響を与えたが、ピーク値はあまり変わらなかった (図 16A)。Gq と結合した PLC の IP₃ 産生 (b6) を 10 倍にすると、IP₃ 応答が長引いた (図 16B)。IP₃ 3-キナーゼの IP₃ 分解 (c3) はピーク値にもピーク時刻にも影響を与えた。パラメタ値を大きくすると、ピーク値は小さくなりピーク時刻は早くなった。

7.2 Ca²⁺ 応答時間窓の感受性解析

次に、PF と CF の入力タイミングの Ca²⁺ 応答時間窓のパラメタ感受性について調べた。IP₃ 経時変化の感受性解析と同じように、他のパラメタ値はそのまま、それぞれのパラメタを 1/100 倍から 100 倍まで振って、Ca²⁺ 応答時間窓を調べた。

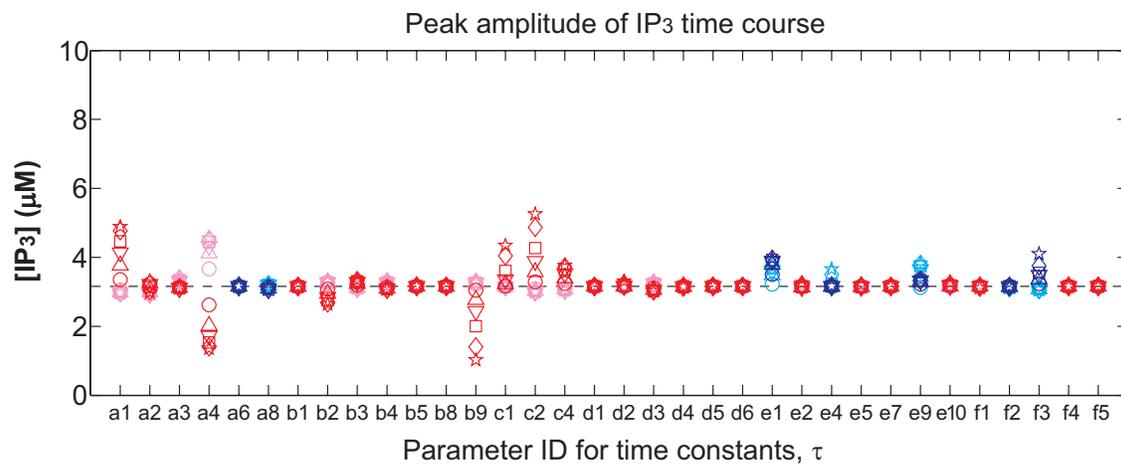
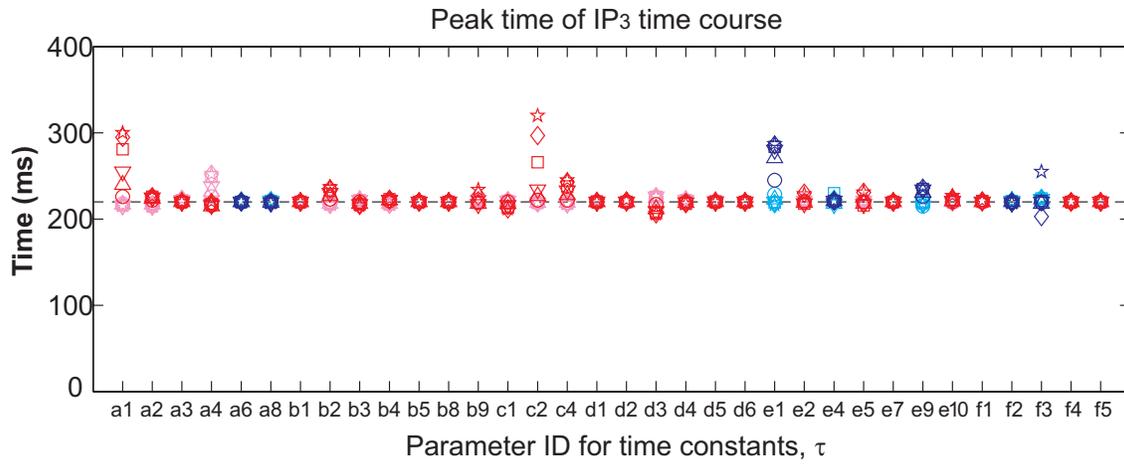


図 12 反応時定数を変えたときの IP₃ 経時変化

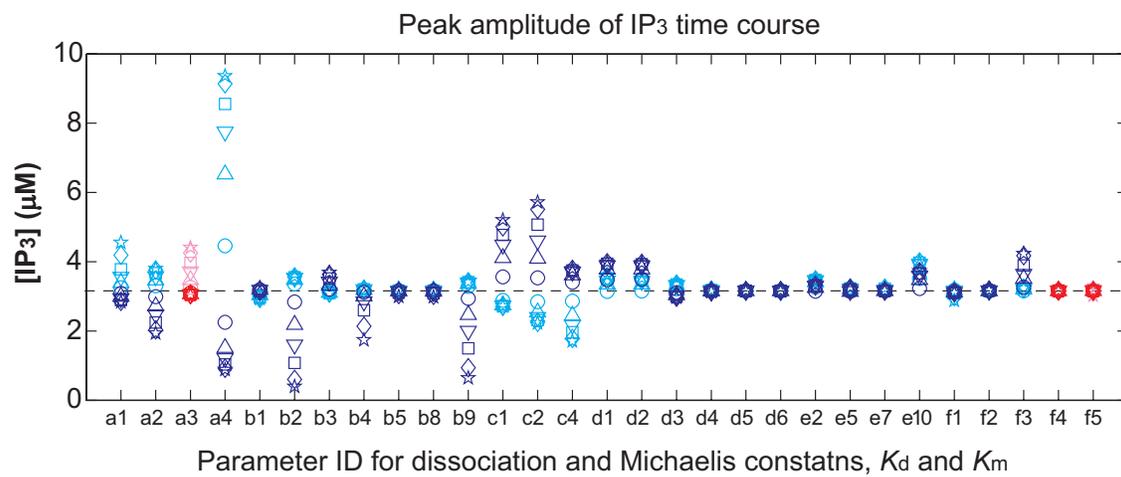
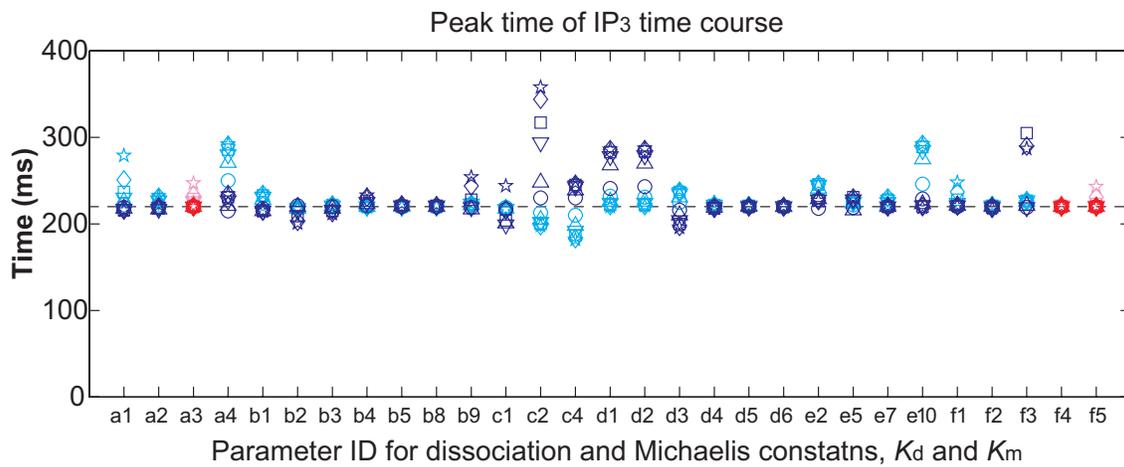


図 13 解離定数または Michaelis 定数を変えたときの IP₃ 経時変化

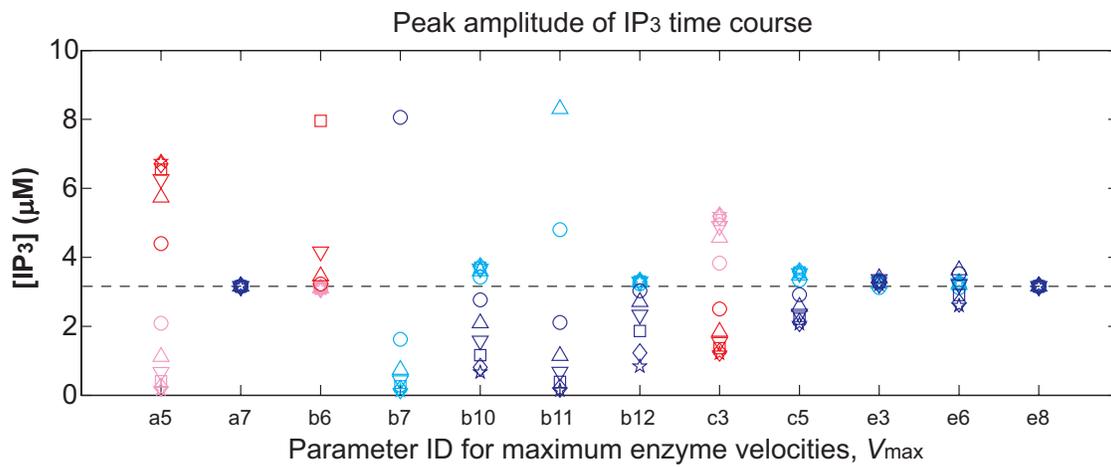
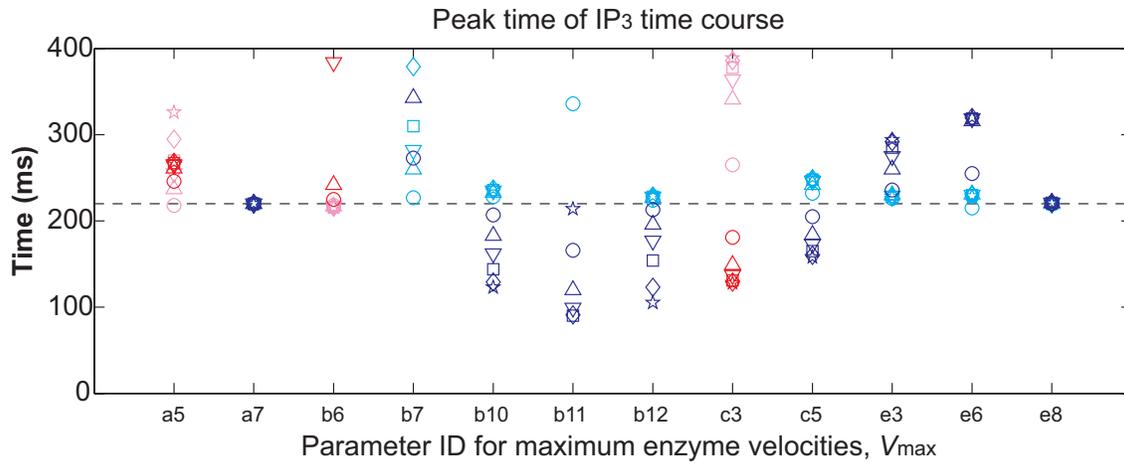


図 14 酵素最大速度を変えたときの IP₃ 経時変化

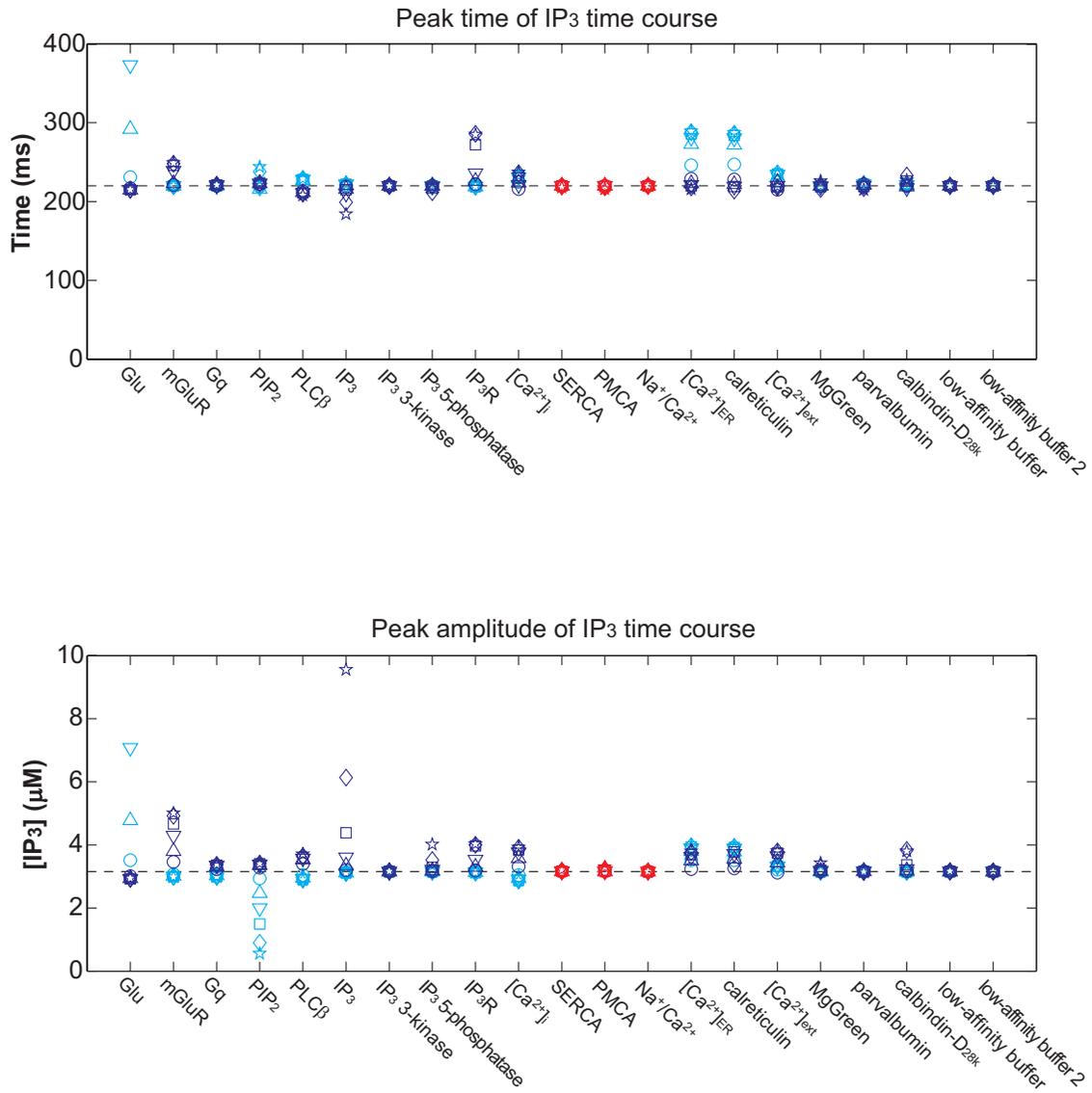


図 15 初期分子濃度を変えたときの IP₃ 経時変化

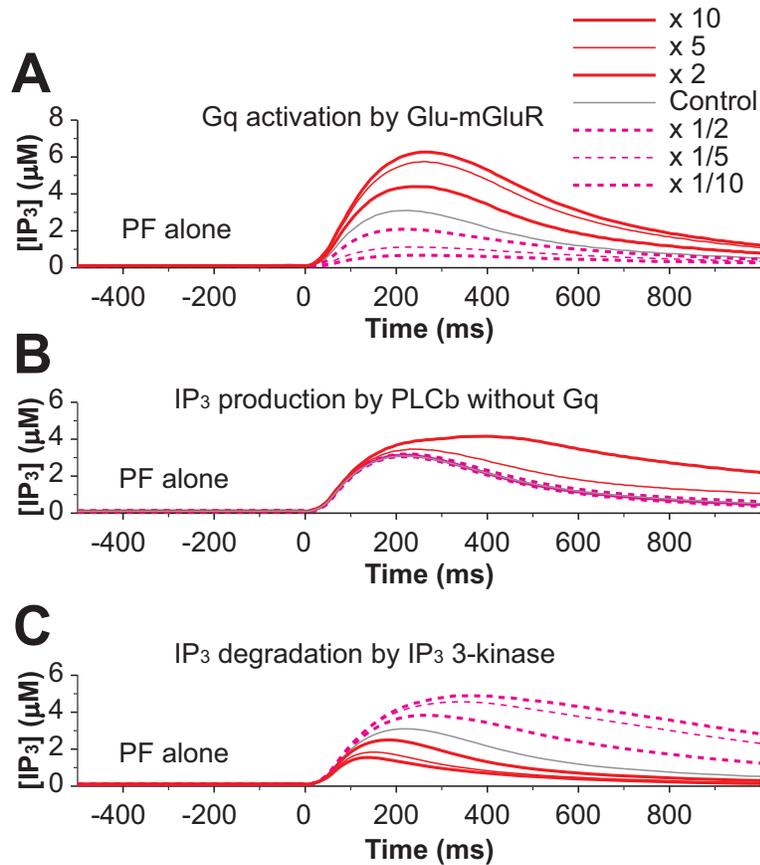


図 16 パラメタ値変動に対する IP₃ 経時変化の感受性。IP₃ 経時変化に影響を及ぼす 3 つの未知の最大酵素活性を例として示す。パラメタ値は 1/10 倍から 10 倍まで振った。(A) グルタミン酸と結合した mGluR 受容体の Gq 活性化 (パラメタ ID は a5)、(B) Gq と結合した PLC の IP₃ 産生 (パラメタ ID は b6)、(C) IP₃ 3-キナーゼの IP₃ 分解 (パラメタ ID は c3)。

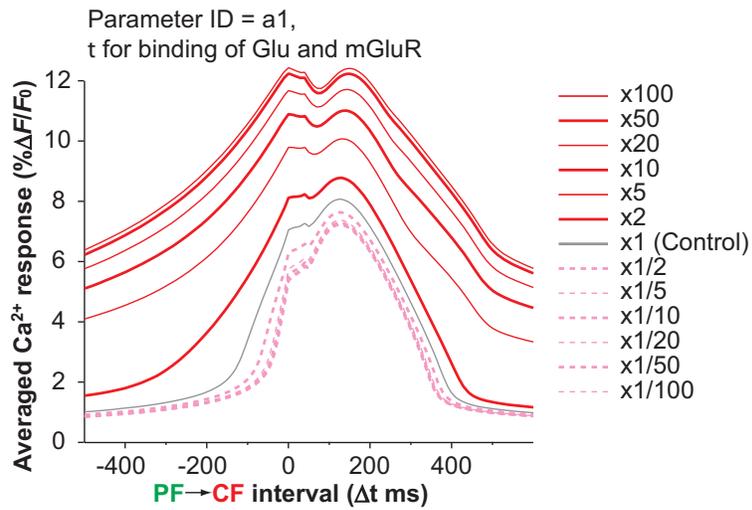


図 17 例として、グルタミン酸と mGluR 受容体の結合反応時定数 (パラメタ ID は a1) を酵素最大速度を 2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍 (赤色実線)、1/2 倍、1/5 倍、1/10 倍、1/20 倍、1/50 倍、1/100 倍 (桃色破線) に変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓。

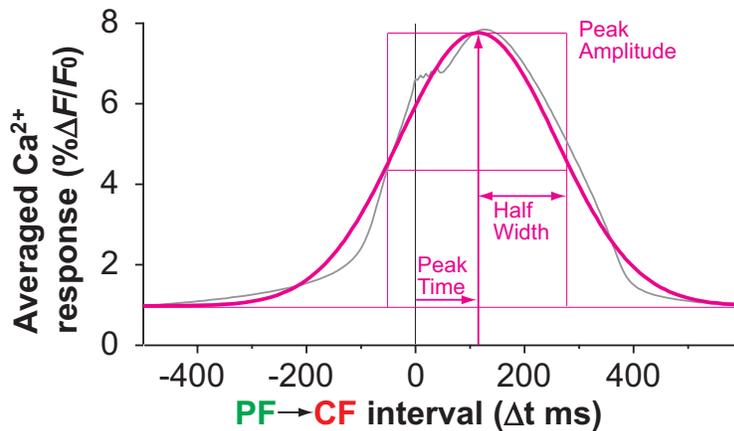


図 18 時間窓の特徴を定量的に評価するために、正規分布関数に時間窓をフィッティングした後のピーク時刻、半幅値、ピーク値を指標にした。時間窓は-500 ミリ秒から 600 ミリ秒をフィッティング対象にした。

次に、PF と CF の入力タイミングの Ca^{2+} 応答時間窓の感受性を解析した。他のパラメタ値はそのまま、それぞれのパラメタ値を 1/100 倍から 100 倍まで振った。時間窓を正規分布関数にフィッティングさせた後のピーク時刻、半値幅、ピーク値を評価基準としてパラメタの種類別に図示した。反応時定数は図 19、解離定数と Michaelis 定数は図 20、酵素最大速度は図 21、分子初期濃度は図 22 にまとめてある。

モデルのパラメタを、反応時定数、解離定数と Michaelis 定数、最大酵素速度、初期分子濃度の 4 つに分類した。図 23 は、さらに未知と既知に分けた 4 種類のパラメタについての時間窓の特徴量に対する平均と標準偏差を示している。未知（赤色）でも既知（青色）でも同じような傾向を示した。時間窓の 3 つの特徴量はパラメタ値を少し（1/2 倍や 2 倍）振ってもあまり変化しなかった。重要なことは、パラメタ値を極端に（1/100 倍や 100 倍）振ってもピーク値と半値幅はほとんど変化しなかったことである。ただし、ピーク値は激しく変わるものもあった。入力タイミング検出は時間窓の形（ピーク値と半値幅）で特徴づけられるので、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルは入力タイミングを非常に頑強に検出できると言える。

7.3 まとめ

感受性解析の結果から、入力タイミング検出機構はパラメタ値ではなく、速い電気的な Ca^{2+} 流入と遅い生化学的な IP_3 産生というモデル構造が原因であることが分かった。ただし、シミュレーションは IP_3 産生の遅れで入力タイミング検出機構を説明できる仮説を支持するものの、他の伝達経路がその機構を担っているという可能性は否定しないことには指摘に値するだろう。

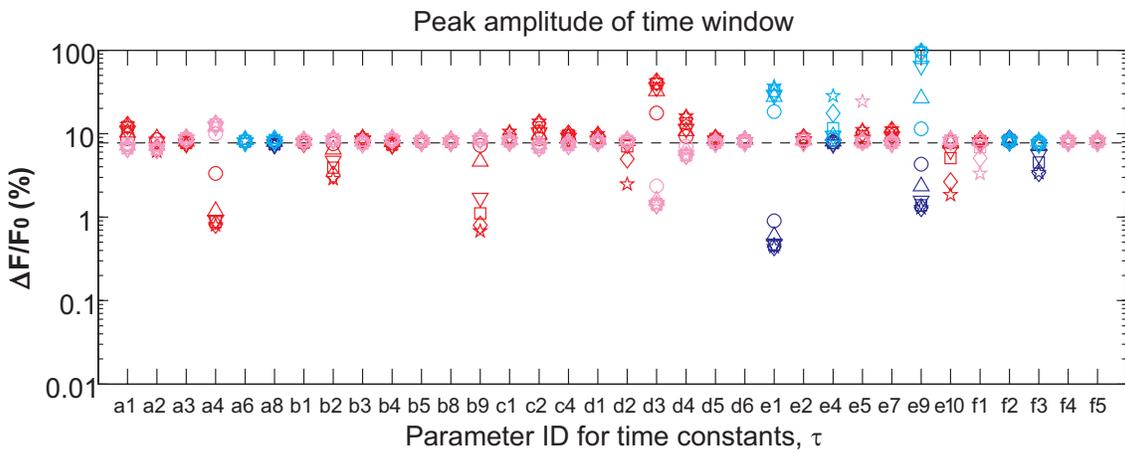
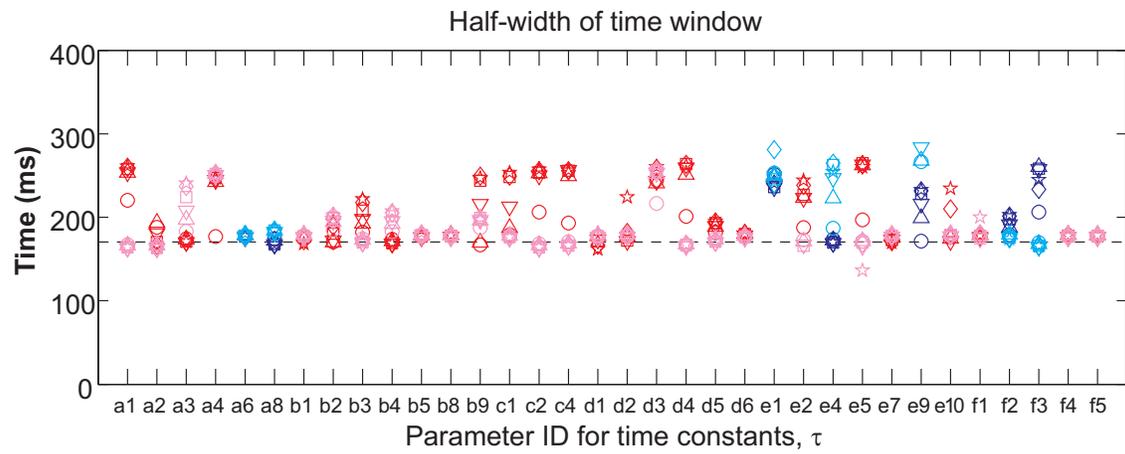
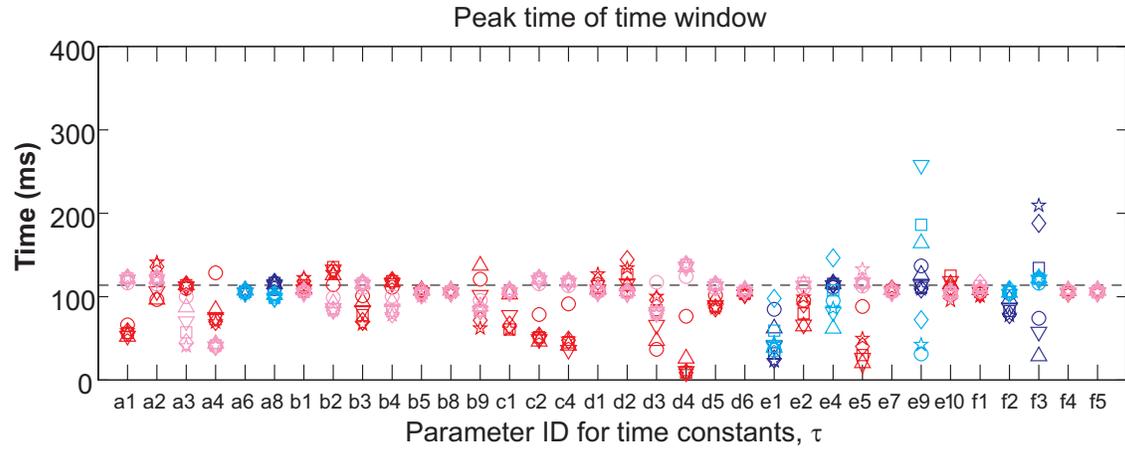


図 19 反応時定数を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓

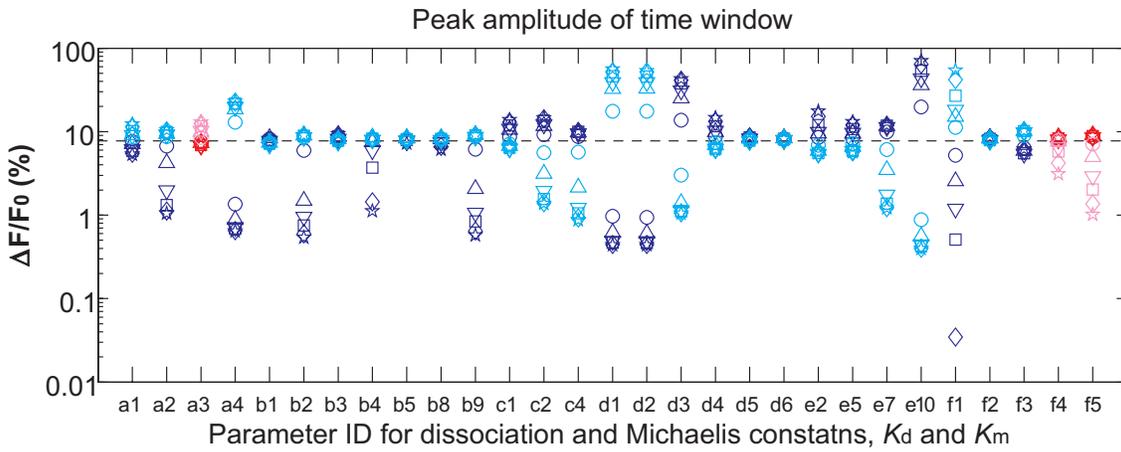
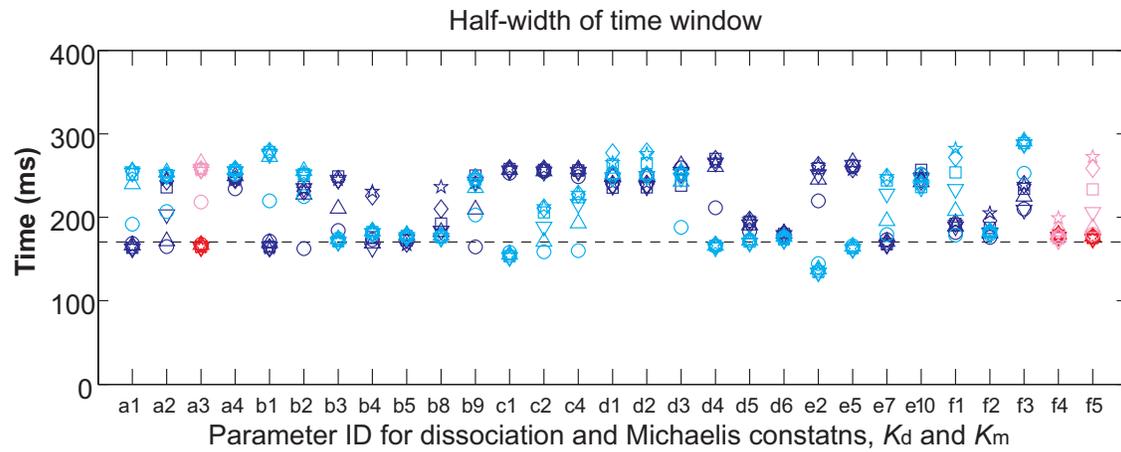
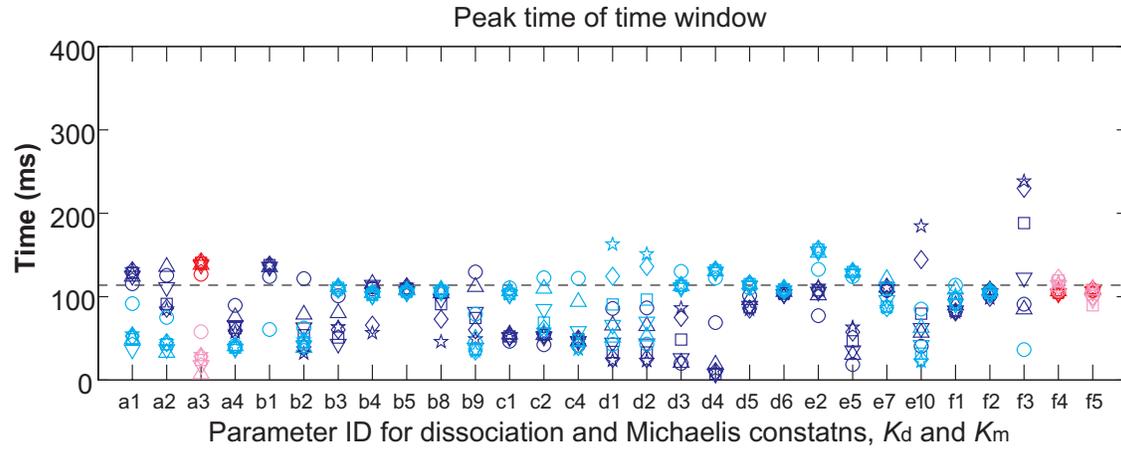


図 20 解離定数または Michaelis 定数を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓

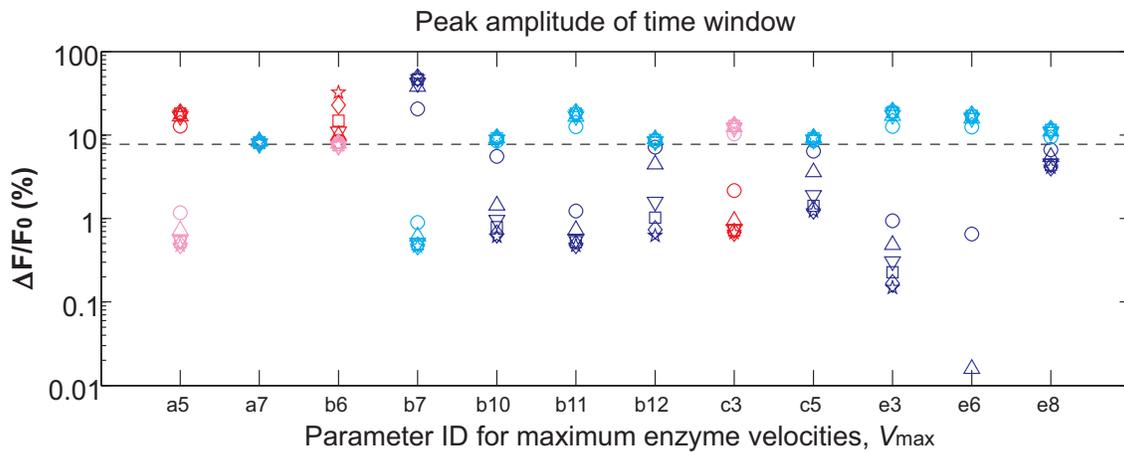
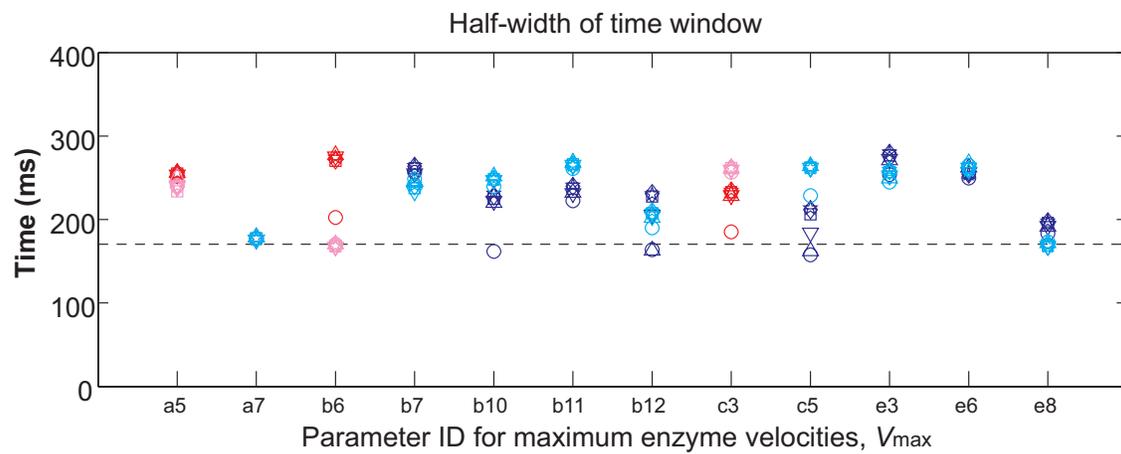
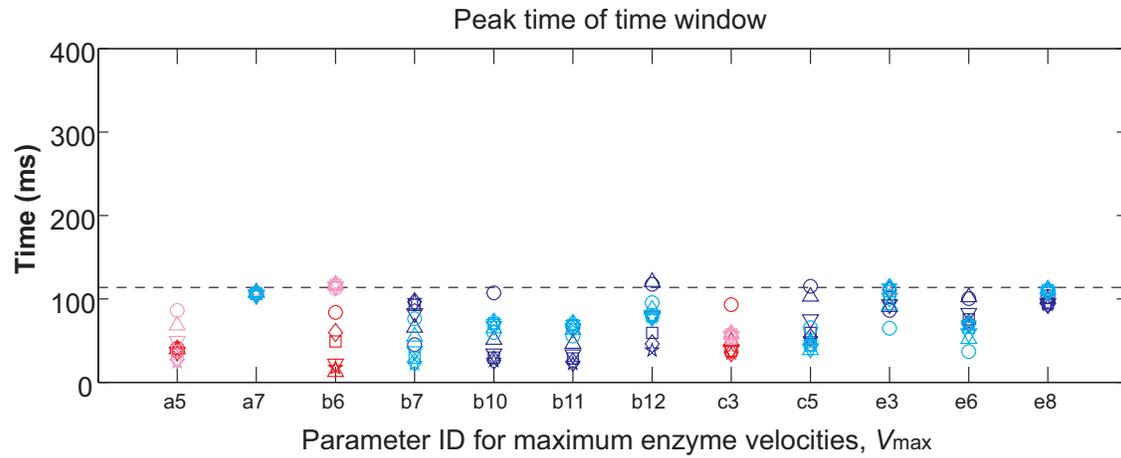


図 21 酵素最大速度を変えたときの Ca^{2+} 応答時間窓

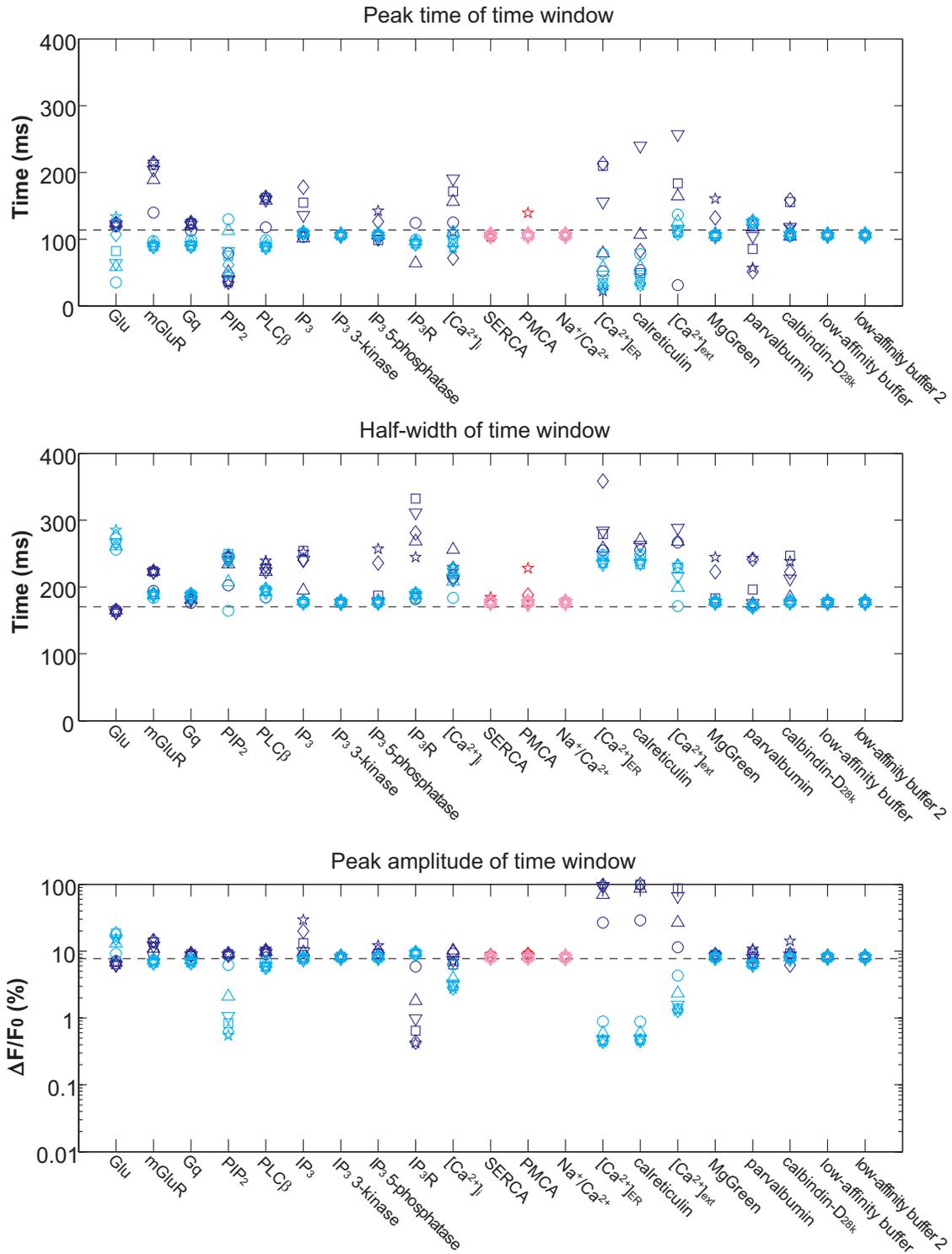


図 22 初期分子濃度を変えたときの Ca²⁺ 応答時間窓

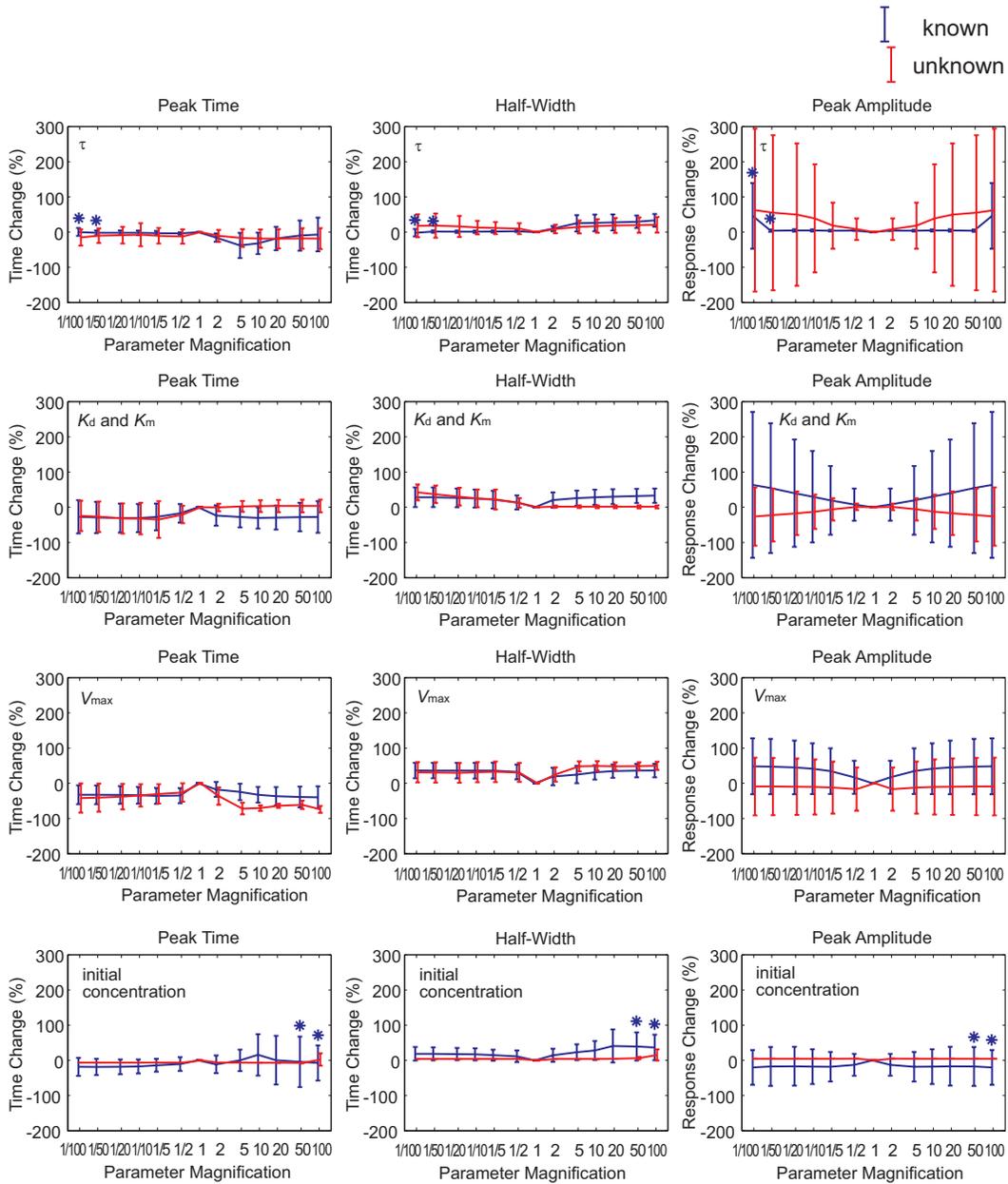


図 23 時間窓を正規分布関数でフィッティングした後のピーク時刻 (左)、半値幅 (中)、ピーク値 (右) を評価基準としてパラメタの種類別に加算平均して、平均値 \pm 標準偏差を示した。反応時定数は一段目、解離定数と Michaelis 定数は二段目、酵素最大速度は三段目、分子初期濃度は四段目。未知パラメタは赤色、既知パラメタは青色。*は 1 つまたは 2 つのパラメタについて数値計算が発散して除外したものを表す。

8. Ca^{2+} ダイナミクスの閾値解析

8.1 食い違う Ca^{2+} 上昇と LTD 誘導実験

小脳教師あり学習理論によると、小脳 LTD は PF の後で CF という入力タイミングでのみ誘導されるはずである。ところが、それ以外の条件でも LTD が誘導できる報告が複数ある [17, 27, 51]。さらには、LTD は PF に強い刺激を与えるとケージド Ca^{2+} 光分解 [81] やケージド IP_3 光分解 [33] だけでも誘導できてしまう。これらの実験から、小脳 LTD という現象は実は小脳教師あり学習とは関係ないのではないかという疑念が持ち上がっている [23, 69]。

モデル研究の役割として、異なる条件で得られた様々な実験結果を統一的に説明するというのがある。私は、小脳プルキンエ細胞の Ca^{2+} 上昇は閾値現象であることを示し、閾値現象が IP_3 濃度によって変わること、様々な実験結果を説明することを試みた。

8.2 Ca^{2+} ダイナミクスの相平面解析

IP_3 濃度によって Ca^{2+} ダイナミクスが異なる振る舞いを見せる様子を、網羅的に解析した。結果の評価を容易にするため、PF と CF の組み合わせ入力よりもっと単純な組み合わせ刺激を与える。PF 入力の代わりに、ステップ状に IP_3 濃度を上昇させることにした (図 24)。なぜなら、PF 入力による IP_3 応答は Ca^{2+} 応答よりもきわめて遅いからである (図 8B)。3 種類の IP_3 濃度 ($0.1 \mu\text{M}$ で変化なし、 $2.5 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、図 24A) に対する Ca^{2+} 変化を解析した。1 番目の $0.1 \mu\text{M}$ というのは、静止状態と同じである。2 番目の $2.5 \mu\text{M}$ は、PF 入力から 100 ミリ秒後の IP_3 濃度に対応する (図 6B)。3 番目の $10 \mu\text{M}$ という高濃度は、ケージド IP_3 光分解で得られるような濃度である [33, 54]。基底状態の $0.1 \mu\text{M}$ から、 IP_3 濃度を 3 つのうちどれか 1 つの濃度にステップ状に変えて一定に保った (図 24A)。

IP_3 をステップ状に変えるのと同時に、2 ミリ秒間の Ca^{2+} 流入を量を変えて与えた (図 24B)。2 ミリ秒というのは、CF の Ca^{2+} 流入の時間と同じである。細胞内 Ca^{2+} 濃度と IP_3 受容体不活性化の経時変化が図 24C、D に図示されており、

横軸を細胞内 Ca^{2+} 濃度、縦軸を IP_3 受容体不活性化にとった相平面上でたどる軌跡は図 24E に描かれている。異なる Ca^{2+} ピーク値を与える Ca^{2+} 入力の色を変えて図 24B に表されており、それらによる応答も図 24C、D、E で色別になっている。

IP_3 濃度が $0.1 \mu\text{M}$ の場合は、細胞内 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 流入のあと単調に減少した (図 24C 左、E 左)。 Ca^{2+} 流入が強いほど、 Ca^{2+} ピークは高くなり、 IP_3 受容体不活性化は多くなった (図 24C 左、D 左)。 相平面での軌跡はほぼ等間隔に平面上に広がっていたので (図 24E 左)、 Ca^{2+} 流入に対してほぼ線形の応答をしていることが分かる。

IP_3 濃度が $2.5 \mu\text{M}$ の場合は、 Ca^{2+} 流入直後の Ca^{2+} 濃度が、 $2 \mu\text{M}$ のときは Ca^{2+} 濃度は単調に減少するにもかかわらず、 $3 \mu\text{M}$ 以上のときは Ca^{2+} 濃度はいったん落ちるもののそれから上昇して $10 \mu\text{M}$ 以上にもなった (図 24C 中の円内)。つまり、 Ca^{2+} ダイナミクスは $2 \mu\text{M}$ と $3 \mu\text{M}$ の間にある閾値によって閾値より上か下かに分かれる。閾値付近の軌跡は平面上で離れていることから (図 24E 中、紺色線と水色線を比較せよ)、やはり非線形的な閾値現象であることが分かる。

IP_3 濃度が $10 \mu\text{M}$ になると、 Ca^{2+} 流入を与えなくても細胞内 Ca^{2+} 濃度は $15 \mu\text{M}$ よりも大きく上昇した (図 24C 右)。このことは、 IP_3 濃度が高いときには、基底状態の細胞内 Ca^{2+} 濃度でも再帰的な Ca^{2+} 放出を引き起こすのに十分であることを示している。 Ca^{2+} 流入を与えなかったときには、 50 ミリ程度の Ca^{2+} 応答の潜時があった (図 24C 右、黒色線)。この潜時は、再帰的 Ca^{2+} 放出の正のフィードバックループが低い Ca^{2+} 濃度から完全に活性化状態になるには比較的長い積み立ての時間が必要であることを示している。大きい Ca^{2+} 流入を与えると Ca^{2+} 応答のピークが高くなり潜時が短くなるのは (図 24C 右、違う色のピークと潜時を比較せよ)、ケージド IP_3 光分解の Ca^{2+} 上昇の実験結果と合致する [33, 54]。

図 25 は刺激から 500 ミリ秒間の Ca^{2+} 応答を平均し、固定した IP_3 濃度を横軸、 Ca^{2+} 入力の直後の Ca^{2+} ピーク値を (図 24C 中の円内のピークを見よ) 縦軸にとって、色付の等高線図で表したものである。まず最初に言えることは、 Ca^{2+} ピーク値と IP_3 濃度が大きくなると平均 Ca^{2+} 応答は大きくなる、ということである。しかしながら、 Ca^{2+} ダイナミクスは図 24 で示したように、小中大の IP_3

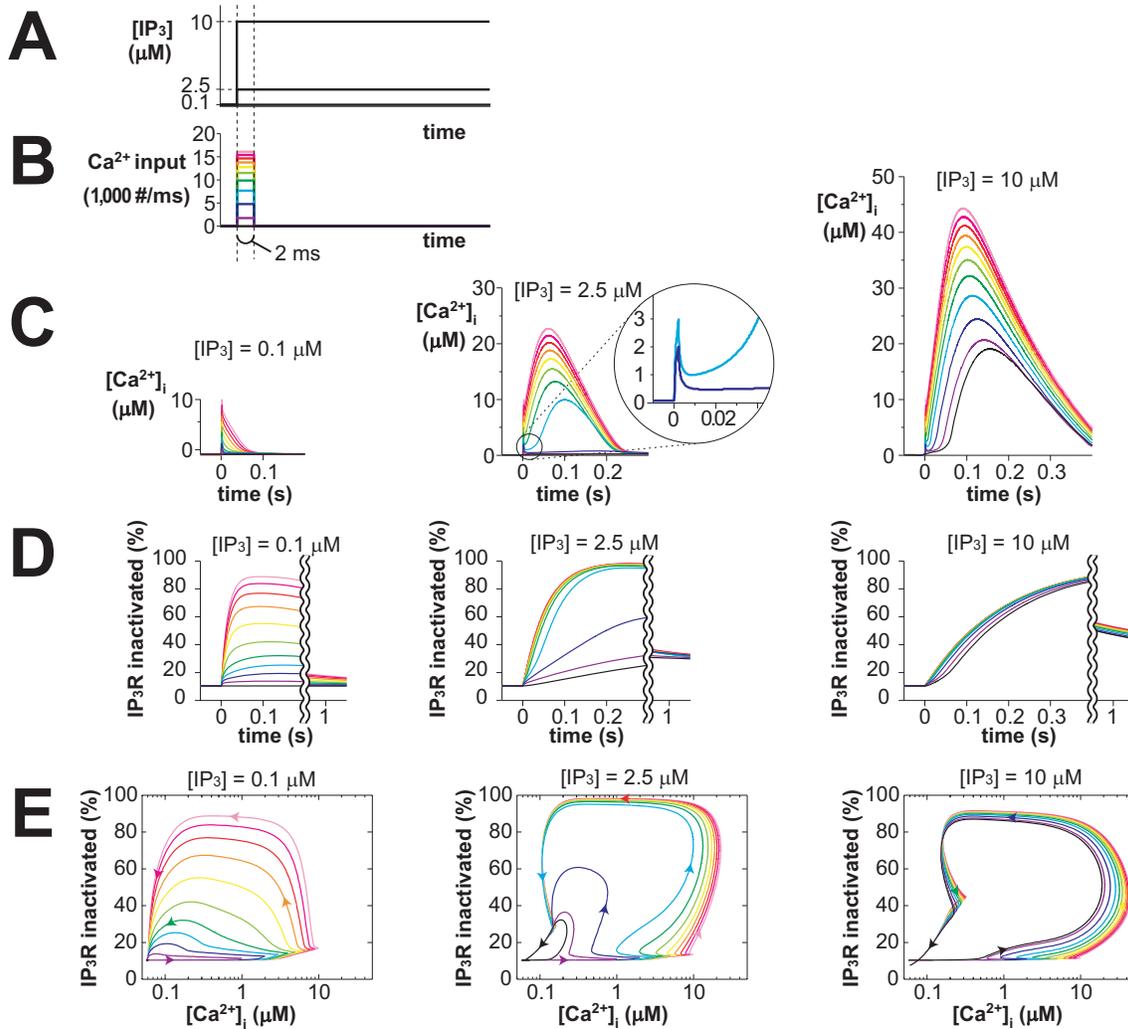


図 24 (A) IP₃ 濃度を静止状態から時刻 0 ミリ秒から 0.1、2.5、10 μM とステップ状に変える。(B) 2 ミリ秒の Ca²⁺ 流入を同じく時刻 0 秒から始める。2 ミリ秒の一過性の Ca²⁺ ピークが 1 μM (紫色)、2 μM (紺色)、3 μM (水色)、4 μM (緑色)、5 μM (黄緑色)、6 μM (黄色)、7 μM (橙色)、8 μM (赤色)、9 μM (マゼンタ色)、10 μM (桃色) になるように Ca²⁺ 流入量を調節した。黒色では Ca²⁺ 流入は与えなかった。(C) ステップ状の IP₃ 濃度変化と Ca²⁺ 流入に対する細胞 Ca²⁺ 濃度の応答。中の円内は、IP₃ 濃度を 2.5 μM で Ca²⁺ 流入による Ca²⁺ ピーク値を 2 μM (紺色) と 3 μM (水色) にしたときの拡大図。(D) ステップ状の IP₃ 濃度変化と Ca²⁺ 流入に対する IP₃ 受容体不活性化の応答。(E) C ($t-x$ 平面) と D ($t-y$ 平面) の経時変化を細胞内 Ca²⁺ 濃度と IP₃ 受容体不活性化の相平面 ($x-y$ 平面) 上に軌跡を投射した。矢印は時間経過に伴い軌跡が進む方向を示す。

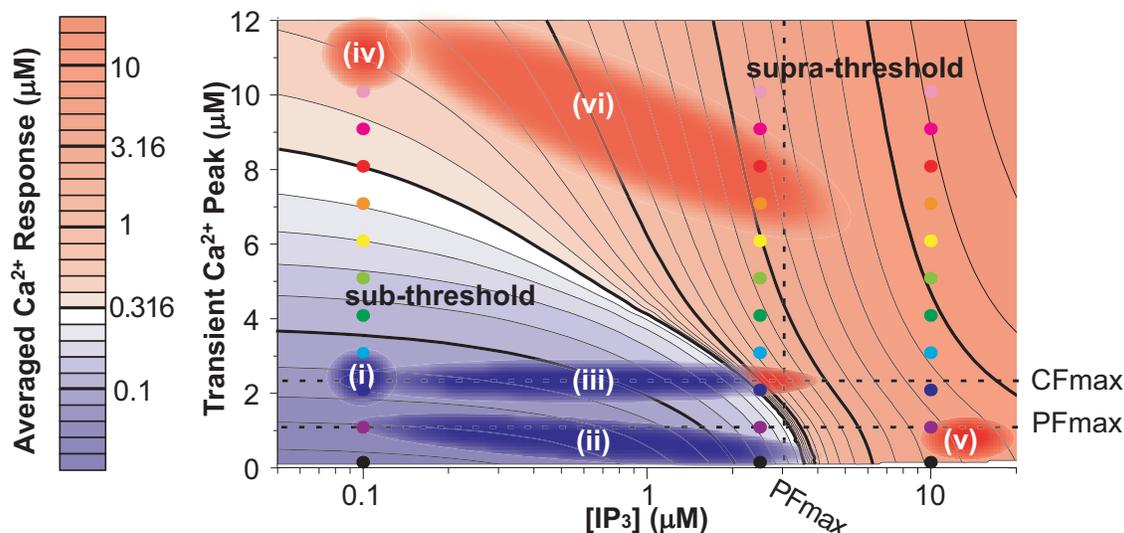


図 25 入力から 500 ミリ秒までの Ca^{2+} 応答を IP_3 濃度と最初の Ca^{2+} ピーク値の関数として色付等高線図に表示した。左の色付の縦棒は Ca^{2+} 応答の時間平均の対数目盛である。薄い赤色の範囲は閾値より下の応答で、薄い青色の範囲は閾値より上の応答である。3 つの破線は PF によって達する Ca^{2+} 応答のピーク値（下水平線）、CF によって達する Ca^{2+} 応答のピーク値（上水平線）、PF によって達する Ca^{2+} 濃度（垂直線）を表す。領域 (i) - (vi) の意味については、本文 8.3 を参照せよ。

濃度で定性的に異なる。 IP_3 濃度が $0.1 \mu\text{M}$ の場合は、等高線はほぼ水平になっているので平均 Ca^{2+} 応答は Ca^{2+} 流入量でほぼ決まっていることになる。 IP_3 濃度が $10 \mu\text{M}$ の場合は、等高線はほぼ垂直になっているので平均 Ca^{2+} 応答は IP_3 濃度でほぼ決まっていることになる。 IP_3 濃度が $1 \mu\text{M}$ から $4 \mu\text{M}$ の場合だけ、等高線は右下斜めになっているので、 Ca^{2+} 流入量と IP_3 濃度のどちらも平均 Ca^{2+} 応答に影響を与えていることになる。さらに、この領域でのみ等高線が密集しているので、 Ca^{2+} 放出の閾値がここにあることが分かる。

8.3 様々な実験の統一的説明

黒田らは小脳 LTD のシグナル伝達経路のモデルを作成した。そのモデルには、NO/cGMP/PKG 経路、MAPK カスケード、PKC の活性化、AMPA 受容体のリン酸化など、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルにはない経路を含んでいる。黒田らは、PF

と CF の組み合わせ入力で得られる非線形的な Ca^{2+} 上昇が LTD 誘導に必要であることを示した [60]。しかし、黒田らのモデルでは、 Ca^{2+} 上昇は実験結果をそのまま用いただけで、生化学シミュレーションによるモデル化はしていなかった。したがって、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルと黒田らのモデルは Ca^{2+} シグナルの上流と下流を互いに補完しあい、包括的な LTD シグナル伝達経路を完成させるはずである。PF 入力と CF 入力による Ca^{2+} 上昇は Ca^{2+} ダイナミクスモデルが担当し、 Ca^{2+} 上昇による AMPA 受容体リン酸化は黒田らのモデルが担当する。この 2 つのモデルを合体させるのは次章になるが、ここで、 Ca^{2+} が上昇すれば LTD が起きると単純に考えて、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルだけで様々な LTD の説明をしてしまおう。

IP_3 濃度によって Ca^{2+} ダイナミクスが見せた様々な振る舞いは、様々な LTD 実験を首尾一貫して説明することができる。

第一に、領域 (i) は静止状態の IP_3 濃度だが、CF 入力のみでは小さな ($2 \mu\text{M}$) Ca^{2+} スパイクを得るだけで、平均 Ca^{2+} 応答は Ca^{2+} 閾値を超えることができない。また、領域 (i) は mGluR 受容体の下流の IP_3 産生がなくなれば LTD が妨げられることも示している。mGluR1 欠損のノックアウトマウスでは、LTD 誘導が起らず、運動学習にも支障が出ている [3, 21]。

第二に、領域 (ii) は PF 入力のみでは、 Ca^{2+} ピークが $1 \mu\text{M}$ になる Ca^{2+} 流入とその後に IP_3 上昇が得られることを示している。斜め横に伸びた領域 (ii) は、PF 入力以後の Ca^{2+} ダイナミクスの変遷を表している。はじめは Ca^{2+} 流入があった左端で、それから IP_3 濃度が上昇するにつれ、 Ca^{2+} ダイナミクスは右に移動する。しかしながら、どの瞬間においても Ca^{2+} ダイナミクスは閾値より下なので、非線形の Ca^{2+} 上昇はない。

第三に、横に水平に伸びた領域 (iii) は PF と CF の組み合わせ入力のタイミングが Ca^{2+} ダイナミクスにとって重要であることを示している。PF 入力後、 IP_3 濃度は最高 $3 \mu\text{M}$ まで上がって、それから静止状態まで下がる (図 6B)。領域 (iii) は PF によって IP_3 濃度は時間とともに変化するが、CF による Ca^{2+} 流入は同じ高さの Ca^{2+} ピークを与えること (図 8A) を表している。もし CF 入力がある瞬間に領域 (ii) 右から領域 (iii) 右の赤色部分に移

る]、CFの Ca^{2+} 流入により Ca^{2+} ダイナミクスは閾値を超える。このタイミングは、図8Aにあるように、PF入力から300ミリ秒以内である。もしCF入力が IP_3 上昇を外したら、CFの Ca^{2+} 流入でも Ca^{2+} ダイナミクスは閾値に届かない[システムが領域(ii)左から領域(iii)左の青色部分に移る]したがって、PFとCFの組み合わせ入力が限られた時間窓でだけLTDを誘導できるのは、PF入力による IP_3 上昇が Ca^{2+} 閾値を下げているときにCF入力が非線形な Ca^{2+} 上昇に必要なからである。

第四に、領域(iv)は、 IP_3 濃度上昇(とそれに続く IP_3 受容体による Ca^{2+} 放出)が無くても、 Ca^{2+} 濃度さえひたすら上げてやればLTD誘導が起こることを示している。これは、小脳プルキンエ細胞のスパインに Ca^{2+} ストアがないノックアウトマウスでも、ケージド Ca^{2+} 光分解の繰り返しでLTDが誘導できると合致する[81]。

第五に、領域(v)はケージド IP_3 光分解で、CF刺激や脱分極を与えなくても IP_3 受容体による Ca^{2+} 放出とLTDが誘導できることに対応する[33, 54]。

第六に、これが最後だが、領域(vi)は多数のPFに強い刺激を与えるとCF入力なしでも大きな Ca^{2+} 上昇が得られることを示している[39, 99]。 IP_3 濃度上昇も Ca^{2+} 応答に影響はあるのだが、 Ca^{2+} 流入だけでも Ca^{2+} ダイナミクスが閾値に届くのに十分な Ca^{2+} を与えている。

9. Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係

ケージド Ca^{2+} 光分解において、光強度と刺激時間を調整することで、 Ca^{2+} 入力のパラメタを調節することが可能である。本章では、ケージド Ca^{2+} 光分解で小脳 LTD を誘導したときの定量的関係をシミュレーションにより再現し、閾値現象の原因が PKC-MAPK ループであることを確かめた。

9.1 ケージド Ca^{2+} 光分解と LTD

プルキンエ細胞内にケージド Ca^{2+} 化合物と Ca^{2+} 蛍光指示薬を注入する。紫外線を一定の強さで照射すると、一定効率で細胞内に遊離 Ca^{2+} を与えることになる (図 26A)。 Ca^{2+} 濃度は Ca^{2+} 蛍光指示薬の光強度により算出することができる。

Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係を調べたところ、刺激時間が同じならば、ピーク値の高い (光刺激強度が強い) ほど LTD が誘導されやすくなる。 Ca^{2+} ピーク値に対して LTD 応答は S 字カーブを描いているので、かなり強い閾値現象 (Hill 係数は 5 程度) である。同じ Ca^{2+} ピーク値で比較すると、刺激時間が長いほど LTD 応答が最大の半分になる K_{Ca} 値が小さくなっている。ただし、刺激時間を 2 倍にしても、LTD 誘導の程度は 2 倍より低い。また、Hill 係数と LTD の最大値は、刺激時間に関係なく一定である。この Ca^{2+} 刺激と LTD の関係をシミュレーションで定量的に再現できるよう試みた。

9.2 モデルの作成

黒田 LTD モデル [60] の変更点ができるだけ少なくなるように、シミュレーションが実験データを定量的に再現できるよう試みた (図 26B)。もともとの黒田 LTD モデルでは、PKC が活性化になると、0.004 /sec の速度で分解するとしていた。今回用いたモデルでは、この活性化後の分解を廃止した。PKC 活性が静止状態に戻る代わりにの機構として、アラキドン酸の分解速度を黒田らの 0.0001 /sec [60] から Bhalla and Iyenger の最初の PKC-MAPK モデルのパラメタ値 0.4 /sec [10] に

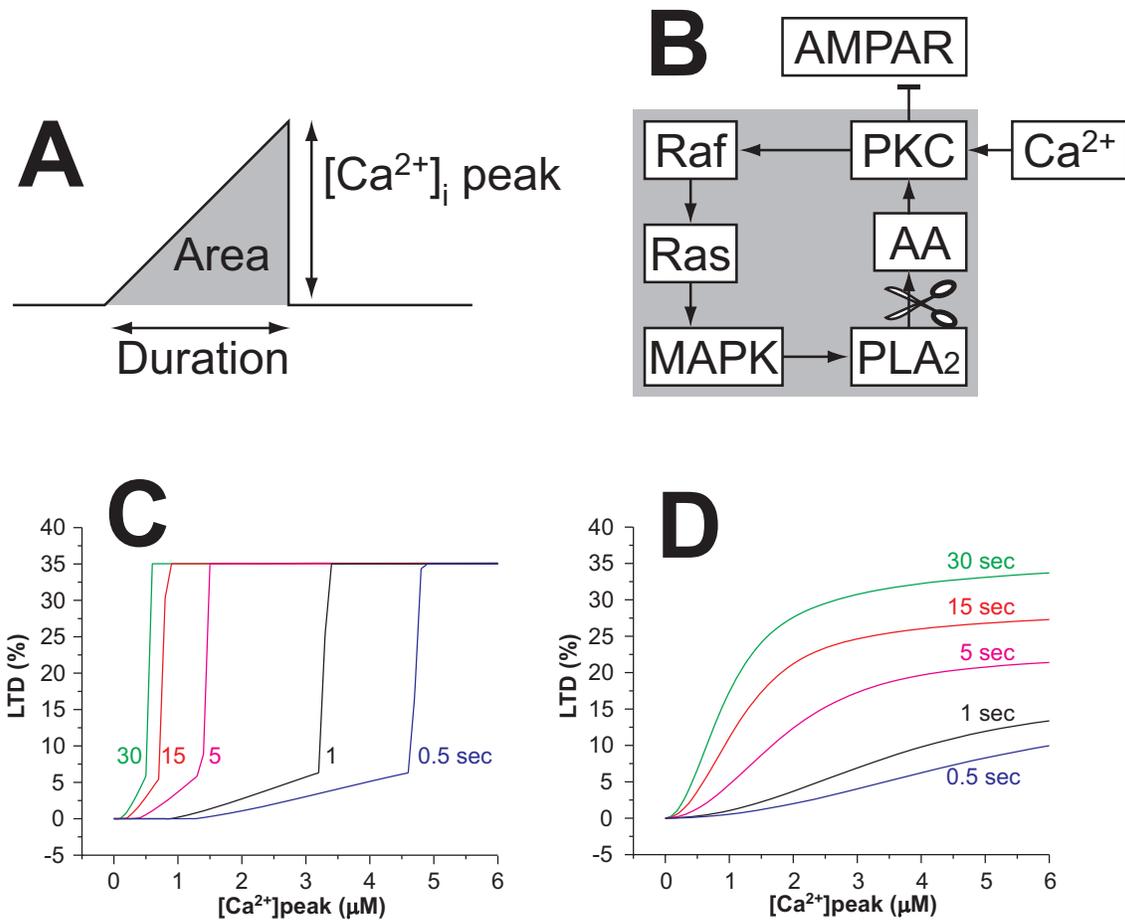


図 26 Ca^{2+} と LTD の定量的関係のシミュレーションによる再現。(A) ケージド Ca^{2+} 光分解によって与えられる Ca^{2+} 入力の波形。光刺激のあいだ濃度は線形上昇し続け、光刺激を止めると濃度が瞬時に 0 に戻る。(B) シミュレーションで用いた LTD モデルのブロック線図。ハサミは PKC-MAPK の正のフィードバックループを切断した箇所。(C) A の入力を与えたときのシミュレーション結果。(D) B で図示された箇所で PKC-MAPK ループを切断したときのシミュレーション結果。

戻した。黒田 LTD モデルでは、NO 入力により、PP2A の静止状態の $2.7 \mu\text{M}$ から $0.1 \mu\text{M}$ まで抑制され、入力後も 1 時間以上抑制状態が続く。NO 入力をなくすと、PP2A が抑制されないので、PKC-MAPK の正のフィードバックループが活性化されず、PF と CF の組み合わせ入力でも LTD を誘導することができない [60]。ところが、ケージド Ca^{2+} 光分解では NO 入力はないので PP2A を抑制するものがないにもかかわらず、LTD が誘導できる。しかも、通常の電極刺激 LTD 誘導実験では $10 \mu\text{M}$ 近くの Ca^{2+} 入力を 300 回与えて LTD が誘導されるのに対し、ケージド Ca^{2+} 光分解では数 μM の Ca^{2+} 刺激 1 回だけで LTD が誘導できる。すなわち、共同研究のケージド Ca^{2+} 光分解は通常の線維刺激の LTD 誘導実験よりも、ずっと LTD の起こりやすい環境にあると考えられる。したがって、PP2A 濃度を $2.7 \mu\text{M}$ から $0.045 \mu\text{M}$ にした。さらに、PKC の Ca^{2+} に対する感受性を $10 \mu\text{M}$ から $2 \mu\text{M}$ に高め、Hill 係数を 1 から 2 に変更した。感受性を高めたのは、黒田 LTD モデルよりもケージド Ca^{2+} 光分解のほうが低濃度 Ca^{2+} で LTD を誘導できるからである。Hill 係数を大きくしたのは、閾値現象を出しやすくするためである。PKC に Ca^{2+} 結合部位が 2 個あることにも合致する。また、PKC-MAPK の正のフィードバックループが活性化したときに興奮性後シナプス電流 (excitatory postsynaptic current, EPSC) 低下が 45% の値を示すように、PKC の AMPA 受容体のリン酸化の k_{cat} 値を $0.05 / \text{sec}$ に変更した。

少なくとも 1 秒間の紫外線照射刺激においては、図 26A のように、刺激を与えている間は線形に Ca^{2+} 濃度が増加して、刺激を止めるとすぐに静止 Ca^{2+} 濃度に戻ることなので (私信)、シミュレーションの入力は、入力開始から Ca^{2+} ピークまで線形に Ca^{2+} 濃度が増加して、刺激終了直後に Ca^{2+} 濃度が 0 になる三角波とした (図 26A)。ただし、技術的に Ca^{2+} 濃度を長時間観測することは Ca^{2+} 蛍光色素の劣化によりできない。短時間では Ca^{2+} 濃度は線形増加に見えても、長時間では Ca^{2+} 濃度が飽和している可能性もある。ケージド Ca^{2+} 化合物は、十分量細胞内に与えてあり枯渇しない。したがって、光強度と Ca^{2+} 供給量、光刺激時間と Ca^{2+} 供給量は比例すると考えて良い。すべてのシミュレーション実験において、シミュレーション時間 6,000 秒内でリン酸化 AMPA 受容体が最大値をとったときのリン酸化 AMPA 受容体が AMPA 受容体全体に対する割合をシ

ミュレーションの出力とした。

9.3 Ca^{2+} 刺激と LTD の定量的関係の再現

シミュレーションにより、 Ca^{2+} 刺激と LTD の関係を定量的に再現した (図 26C)。LTD 誘導はほぼ全か無かになり、ケージド Ca^{2+} 実験よりも、その間の値をとることは少なかった。閾値よりも低い値で少しずつ上昇しているのは、閾値下のシミュレーション結果では、 Ca^{2+} 入力直後に表れる AMPA 受容体リン酸化のピークが LTD_{max} に反映されるからである。PKC-MAPK の正のフィードバックループの閾値を超えたならば AMPA 受容体リン酸化は LTD_{max} に到達して安定した。そうでなければリン酸化は元の 0 に戻った。LTD 誘導は、論文として報告されている限りでは、通常の線維刺激では伝達効率が半分程度に落ちるか、全く落ちないかのどちらかである。

ケージド Ca^{2+} 光分解と同じように、時間が一定のときは刺激が強いほど LTD 応答が大きく、 Ca^{2+} ピーク値が同じときは刺激時間が長いほど LTD が誘導されやすくなった。

PKC-MAPK ループの影響を調べるために、アラキドン酸の濃度を $0 \mu\text{M}$ に固定することで、PKC-MAPK ループを切断した。すると、閾値現象がなくなり Ca^{2+} と LTD の関係は滑らかになった (図 26D)。

すべての面積において、面積が一定ならば、強い刺激を短い時間与えたほうが LTD を誘導しやすいことが分かった (図 27)。この点では、PKC-MAPK の正のフィードバックループは減衰積分器 (leaky integrator) と見なすことができるかもしれない。

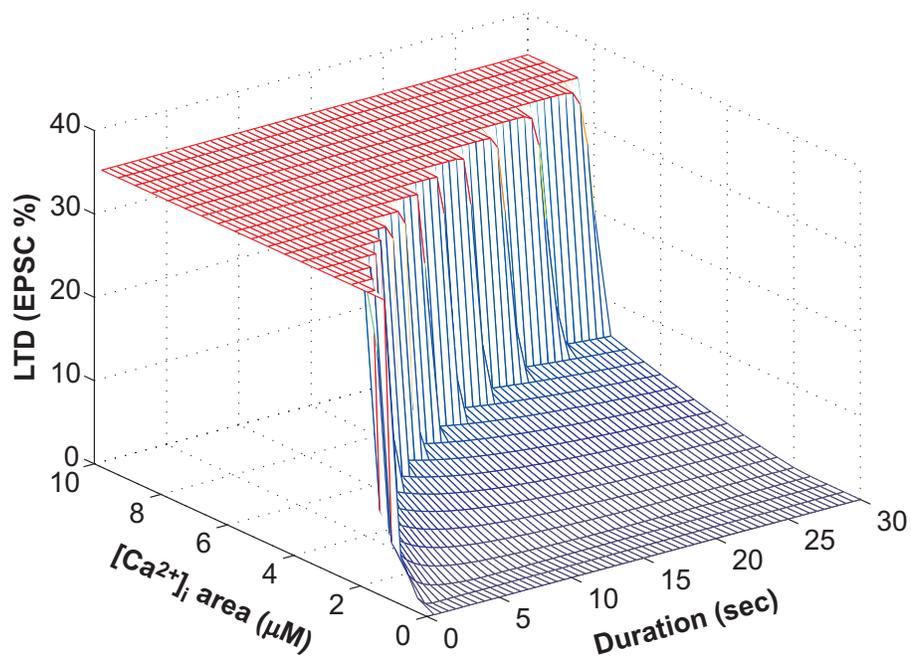


図 27 Ca^{2+} 入力面積と時間と LTD の定量的関係の 3 次元プロット。面積 = $1/2 \times$ 時間 \times ピーク値なので、同じ面積で刺激時間が短いと、ピーク値は高い。

10. 完全版 LTD モデルの作成

10.1 完全版 LTD モデル作成の意義

以前の研究で、私たちのグループは小脳 LTD に関する 2 つのモデルを作成した。1 つは、 Ca^{2+} ダイナミクスモデル [24] である。PF と CF の組み合わせ入力、PF-プルキンエ細胞シナプスのスパインの Ca^{2+} 濃度が非線形に上昇する閾値現象を明らかにした。もう 1 つは、線維入力を置き換えた Ca^{2+} と NO 濃度上昇から AMPA 受容体リン酸化までの小脳 LTD モデル [60] であるが、 Ca^{2+} ダイナミクスは含まれていなかった。これらの 2 つのモデルを統合してさらに発展させることで、PF と CF 入力からシナプス膜上の AMPA 受容体減少までの完結した LTD モデルを作成した。

10.2 シミュレーションモデルの構成

小脳 LTD モデル [60] の中に Ca^{2+} ダイナミクスモデル [24] を組み込んで、PF-プルキンエ細胞シナプスにおける小脳 LTD シグナル伝達の生化学反応の完全版モデルを作成した。 Ca^{2+} モデル [24] は、PF 入力による Ca^{2+} 流入と IP_3 産生、CF 入力による Ca^{2+} 流入により、 IP_3 受容体が活性化される。 IP_3 受容体が細胞内ストアから Ca^{2+} を放出すると、細胞内 Ca^{2+} 上昇によりさらに IP_3 受容体が開きやすくなる、正のフィードバック作用が閾値現象を生み出した。黒田らの LTD モデル [60] は、PF 入力と CF 入力から AMPA 受容体のリン酸化までの全体的な小脳 LTD のモデルであるが、 Ca^{2+} ダイナミクスは計算していなかった。PF 入力または CF 入力どちらか一方だけでは、PKC-MAPK の正のフィードバックループが活性化せず、PF と CF の組み合わせ入力で活性化することを示した。また、NO は MAPK カスケードの活性化を許すゲート機能として働くことを示した。

完全版モデルの PF と CF 入力から Ca^{2+} ダイナミクスの部分は Ca^{2+} ダイナミクスモデルが担当し、それ以外の部分は小脳 LTD モデルが担当する。統合モデルは、 Ca^{2+} ダイナミクス、PKC-MAPK の正のフィードバックループ、NO/cGMP/PKC 経路、AMPA 受容体調節の 4 つのモジュールから成る (図 2)。今回の完全版モデ

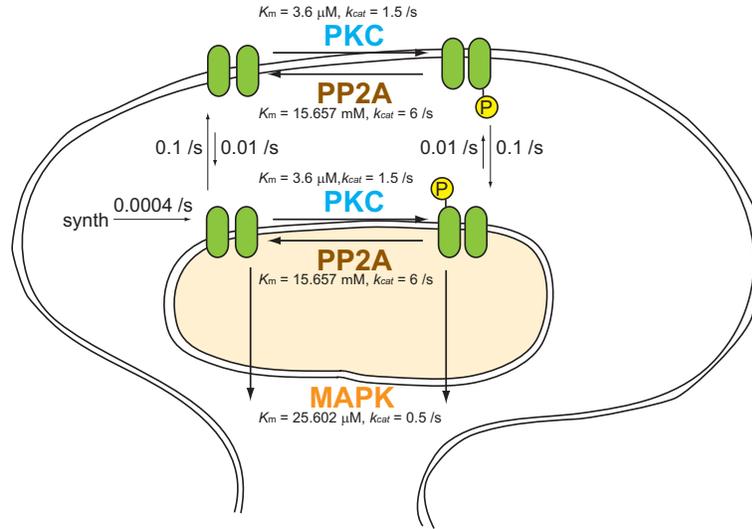


図 28 完全版 LTD モデル内の AMPA 受容体調節に関する反応。活性型 PKC は AMPA 受容体をリン酸化する。NO 経路から抑制を受けていない PP2A は AMPA 受容体を脱リン酸化する。リン酸化を受けると、AMPA 受容体はシナプス膜上から細胞質内に移行する。MAPK より下流の遺伝子発現がシナプス可塑性に長期に作用するのを反映させるために、活性型 MAPK は細胞質内の AMPA 受容体数を減少させるとしている。

ルでは、AMPA 受容体のリン酸化に加え、AMPA 受容体の細胞内取り込み、膜挿入、タンパク合成、MAPK 活性依存の LTD 保持まで含めたモデルにした (図 28)。前回の LTD モデルでは AMPA 受容体のリン酸化をモデルの最終出力としていたが、今回の完全版モデルでは、シナプス膜上 AMPA 受容体 (リン酸化はあってもなくてもシナプス膜上であれば同じように VGCC による Ca^{2+} 流入に貢献する) をモデルの最終出力とした。

AMPA 受容体がリン酸化されるとシナプス膜から細胞質内に移行し、細胞質内の AMPA 受容体が分解作用を受ける過程までモデル化した。LTD の証拠とされる EPSC 低下は、シナプス膜上の AMPA 受容体数の減少が原因である [77, 101]。AMPA 受容体は、PKC によってリン酸化され [18, 28]、PP2A によって脱リン酸化される [62]。リン酸化された AMPA 受容体は細胞質内に移行する [77]。脱リン酸化された AMPA 受容体はシナプス膜上に移行すると仮定した。定常状態のときのシナプス膜上と細胞質内の AMPA 受容体量の割合は、リン酸化されていない AMPA 受容体は、シナプス膜上 : 細胞質内 = 10:1 [19]、リン酸化された

AMPA 受容体は、シナプス膜上：細胞質内=1:10 と仮定している。シナプス膜上の AMPA 受容体の数に比例して、PF 入力による Ca^{2+} 流入量が決まると仮定している。小脳 LTD が維持されるには MAPK 依存の遺伝子発現必要なことが分かっている [28, 52]。遺伝子発現から下流の経路が未知なため、簡単のために、活性化した MAPK が細胞質内の AMPA 受容体を分解するとモデル化した。詳しいシグナル伝達経路とパラメタ値については、付録 A,B を参照されたい。

10.3 前研究との整合性

完全版モデルは、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルと小脳 LTD モデルでそれぞれ実現できていた Ca^{2+} 応答と LTD を再現できている。くり返し刺激で、PF 入力の後に CF 入力というタイミングで Ca^{2+} 応答が大きくなっている (図 29)。また、PF 入力と CF 入力の組み合わせの繰り返しで小脳 LTD が誘導され、PF 入力または CF 入力どちらか片方では LTD が誘導されないことも再現できている (図 30)。ただし、完全版モデルには MAPK 依存の AMPA 受容体減少が含まれているので、AMPA 受容体の減少は維持しつづける (図 30)。完全版モデルから MAPK 依存の AMPA 受容体数減少を除いたときは、前の LTD モデルのリン酸化されなかった AMPA 受容体と同じように、シナプス膜上の AMPA 受容体が入力 30 分後に半分程度に落ちたあと、元に戻った (図 30)。また、アラキドン酸濃度を $0 \mu\text{M}$ にして PKC と MAPK の正のフィードバックループを切断すると、くり返し刺激終了直後から AMPA 受容体数は元に戻り始め、中期相も後期相も見られなかった (図示していない)。

10.4 GENESIS/kinetikit シミュレータ

シミュレーションは、GENESIS/kinetikit で行った [10]。反応過程は決定論的で、分子数は整数値に限らず連続値をとることを許している。

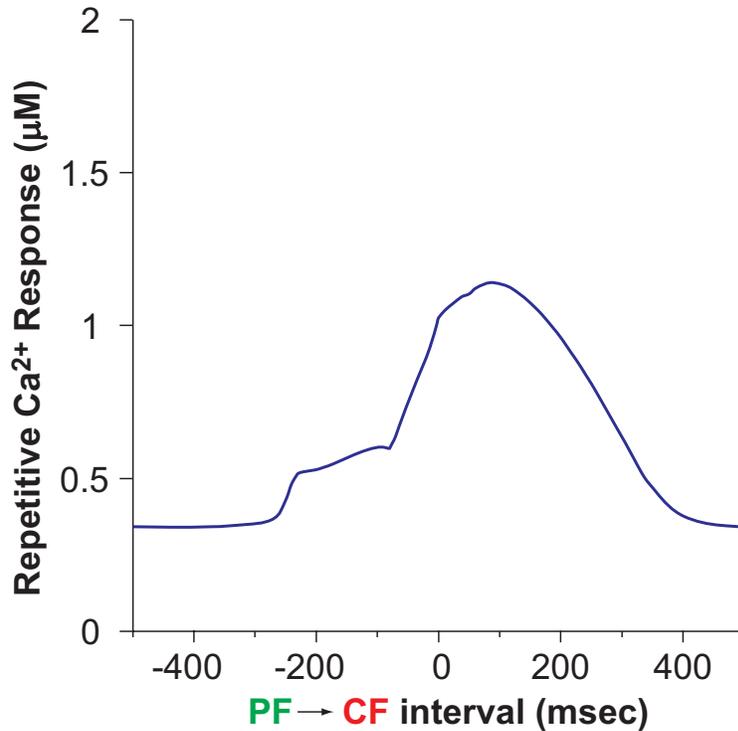


図 29 PF と CF の入力タイミングと Ca^{2+} 応答。PF と CF の組み合わせ入力を 1 Hz で繰り返し与える。PF は 100 Hz で 5 本のスパイクで構成されている。時間差は、PF の最初のスパイク時刻と CF の時刻の差で、PF より CF が早いと正值になる。平均 Ca^{2+} 応答は、9 秒から 11 秒までの Ca^{2+} 濃度の平均。

10.5 1 週間シミュレーションでの計算量節約

シミュレーション時間で 1 週間分の計算が必要な場合には、計算時間を節約するために、シミュレーションモデルの中で比較的反応の遅いモジュール、すなわち Ca^{2+} ダイナミクス以外のモジュールの反応速度 (k_f , k_b , k_1 , k_{-1} , k_{cat}) を一律に 20 倍した。これで、シミュレーション時間を $1/20$ に節約できることになる。

この手法を用いても、反応速度を変えない通常の計算と同じ平衡状態が得られる。興味があるのは平均頻度が一定の Poisson 過程の刺激下における平衡状態である。力学系が 1 つの平衡安定点を持つならば、モデルのあるモジュール部分の速度を一律に何倍しても、行き着く平衡安定点は変わらない。ただし、平衡安定点に達する軌跡は異なる。

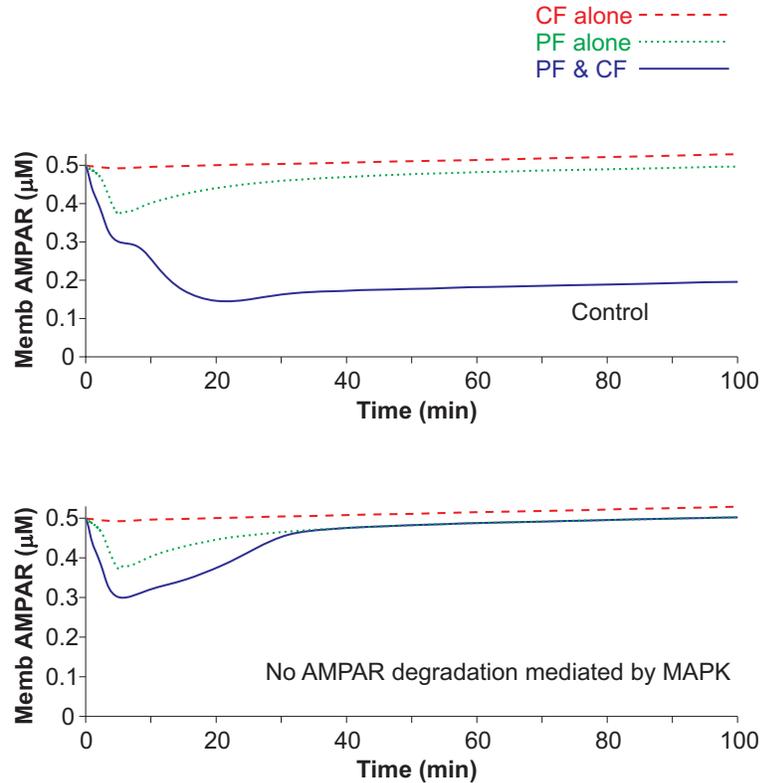


図 30 PF と CF の組み合わせ入力 1 Hz で 300 回 (すなわち、5 分間) 与えたときの、シナプス膜上の AMPA 受容体数の経時変化。シナプス膜上の AMPA 受容体数の初期値は 30 個 ($0.5 \mu\text{M}$) で、黒田ら [60] と同じ。点線は PF のみ入力、破線は CF のみ入力、実線は PF と CF の組み合わせ入力。上図は、MAPK 活性依存の AMPA 受容体減少を含んでいて、下図は含んでいない。

10.6 入力刺激パラメタ

自発発火は、PF 入力 が 0.2、0.5、または 1.0 Hz [15]、CF 入力 が 0.1 Hz [14] とした。入力パターンは Poisson 過程で与えた。組み合わせ入力は、小脳 LTD 誘導によく使われる PF 連続入力と CF 入力の組み合わせ刺激を繰り返し与えた。刺激頻度は規則的に 1 Hz、300 回 (5 分)。PF 連続入力は、バースト状に 0-10 発のスパイクで構成されている。PF バースト内では、10 ミリ秒間隔でスパイクが与えられた。CF 入力は PF 連続入力開始 100 ミリ秒後に与えられた。

線維入力 で与えた刺激パラメタについて。PF 入力により、Glu 放出、AMPA

受容体量依存の Ca^{2+} 流入、NO 放出が起こる。CF 入力により電位依存の Ca^{2+} 流入が起こる。Glu 放出と Ca^{2+} 流入は以前の Ca^{2+} モデル [24]、NO 放出は以前の LTD モデル [60] と同じ値を用いている。Glu は AMPA 受容体と mGluR 受容体を活性化させる。ただし、AMPA 受容体および膜電位依存の Ca^{2+} 流入のダイナミクスは計算しておらず、シナプス膜上の AMPA 受容体 1 個が 50 個の Ca^{2+} 流入を仲介すると仮定している。Glu 放出は PF 入力 1 発につき 300 個放出されるとした。Glu は放出されてから時定数 5 ミリ秒で指数関数的に減衰する。NO 放出は PF 入力 1 発につき 2.4 nM 放出されるとした。NO は放出されてから時定数 1/6 秒で指数関数的に減衰する。CF 入力は 5,000 個の Ca^{2+} イオン入力とした。

11. 自発発火によるメタ学習のシミュレーション

11.1 はじめに

小脳の PF-プルキンエ細胞シナプスでは、PF と CF の組み合わせ入力でも LTD が誘導される [47, 48]。小脳が教師あり学習をしているのなら、小脳 LTD は PF と CF の組み合わせ入力でも誘導されるはずであり [5, 46, 75]、多数の実験により示されている [17, 99]。ところが、CF 入力が無くて PF 入力だけで Ca^{2+} 濃度上昇が起こり [26]、LTD が誘導される [39] という報告もある。教師信号を伝えているはずの CF 入力が無くて LTD が誘導されることから、De Schutter は、小脳 LTD の役割は教師あり学習ではなく、シナプス伝達効率が大きすぎるシナプスを抑える規格化であると唱えた。De Schutter は、PF 入力だけで誘導される LTD は教師あり学習に必要な LTD と対立すると主張した [23]。また、Llinas らは、今までの LTD 実験を振りかえり、小脳運動学習と小脳 LTD の関係がまだ明確に得られていないと指摘した [69]。私は、スパインの局所的な Ca^{2+} 濃度上昇が引き金になって小脳 LTD は誘導されること [81, 99] に着目して、 Ca^{2+} ダイナミクスのシミュレーション研究を行った。そして、 Ca^{2+} ダイナミクスに閾値現象があり、組み合わせ入力でも非線形的に Ca^{2+} 濃度が上昇する仕組みを明らかにした [24]。ただし、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルで、PF と CF の組み合わせ入力によって引き起こされる LTD を説明し、LTD が教師あり学習の分子過程であると考えするためには、以下に述べる微妙なパラメータ調節が必要であった。

組み合わせ入力でも非線形な Ca^{2+} 上昇が得られるためには、 IP_3 受容体を活性化させるための IP_3 産生量と Ca^{2+} 入力量が限られた範囲にある必要があった。CF 入力の有無による Ca^{2+} 流入量の小さな差が Ca^{2+} 応答の大きな差として表れるには、PF のみの入力による Ca^{2+} 応答は閾値下で、CF 入力が増えると Ca^{2+} ダイナミクスの閾値を超えるように、PF 入力による IP_3 産生と Ca^{2+} 流入量が調整されている必要があった。このように組み合わせ入力でも特異的に LTD が起こることが難しいということは、実際の脳で組み合わせ入力も検出されている可能性が低いことを示唆する。微妙なパラメータを調整する仕組みがあればよいのだが、小脳はどのようにしているのだろうか？

Ca^{2+} ダイナミクスモデル [24] は、扱う対象を Ca^{2+} 濃度上昇までに限定していて、 Ca^{2+} から下流のシグナル伝達経路を含んでいなかった。一方、黒田らは PF と CF の組み合わせ入力による小脳 LTD のシグナル伝達経路モデル [60] を作ったが、 Ca^{2+} ダイナミクスを含んでいなかった。また、*in vitro* の電気生理実験で観察された実験結果を再現したが、*in vivo* での自発発火などは考慮していなかった。そこで、私は 2 つのモデルを統合し、さらに AMPA 受容体の細胞内取り込み、挿入のモデルを追加した新しいモデルを作った。*in vivo* の状態を想定して自発発火を長時間与え続けると、自発発火頻度が高いほど AMPA 受容体数が小さい状態に収束した。自発発火頻度の高さと、PF と CF の組み合わせ入力での LTD が誘導するときに必要な PF のバースト強度とは正の関係があった。この自発発火によるメタ可塑性 [1, 85] は、教師あり学習としての小脳 LTD を補強することになる。私たちは、シミュレーションで、この 2 つの LTD が両立できることを見つけた。De Schutter の唱える LTD によって AMPA 受容体数を調整され、PF と CF の組み合わせ入力で特異的に LTD が誘導されるようになる。この過程は、教師あり学習のための学習ということで、メタ学習と呼べる。

11.2 自発発火による AMPA 受容体調節

何もタスクをしていない状態を想定して、自発発火が続いたときのシグナル伝達経路の経時変化を調べた。PF 入力の自発発火頻度は、*in vivo* の小脳顆粒細胞の活動測定から、Poisson 過程で 0.5 Hz とした [15]。CF 入力の自発発火頻度は Poisson 過程で 0.1 Hz とした [14]。AMPA 受容体の初期値は 0 個とした。PKC を活性化するシグナル分子は、 Ca^{2+} 、DAG、アラキドン酸の 3 種類である。3 種類とも PF 下流のセカンドメッセンジャーで、PF 入力のたびにスパイク状の応答をする。また、 Ca^{2+} 流入は PF 入力だけでなく CF 入力によってももたらされるので、 Ca^{2+} は PF または CF 入力のどちらでもスパイク状の応答をする。0-1 日では、 Ca^{2+} スパイクは $1 \mu\text{M}$ を超えることはなかったが、1 日後以降から $5 \mu\text{M}$ を超えるスパイクが時々見られた (図 31A)。DAG は PF 入力のたびスパイク状の応答をした。時間経過が原因でピーク値の傾向が変わることはなかった (図 31B)。アラキドン酸は、何も入力がない場合は $1 \mu\text{M}$ で、0-1 日では入力に対するピー

ク値が $2 \mu\text{M}$ であった。1 日後以降は $3 \mu\text{M}$ に近い応答が時々見られるようになった (図 31C)。PKC は、 Ca^{2+} 、DAG、アラキドン酸のいずれかと結合すると活性化される (図 31D-G)。たまに PKC の一過的な活性化が見られたが、それらは Ca^{2+} スパイクのタイミングと一致した (図 31A、D)。PP2A は、PF 入力による NO 経路により入力開始直後から 5 分後まで活性が急速に落ち、活性化状態の PP2A は $0.13 \mu\text{M}$ で安定した (図 31H)。AMPA 受容体は、0-1 日は一定速度の供給によりほぼ線形に増加し、1 日後以降から 40 個あたりで飽和するようになった (図 31J)。時々 AMPA 受容体がシナプス膜上から細胞質内に一過的に移行する現象 (図 31J、K) は、 Ca^{2+} による PKC の一過的な活性化 (図 31D) のタイミングと一致していた。

次に、AMPA 受容体の初期値を 200 個にした以外は、図 31 と同じ条件でシミュレーションを試みた。 Ca^{2+} は、40 分以前では頻繁に $5 \mu\text{M}$ を超えていたが、40 分以後は $5 \mu\text{M}$ を超えることが少なくなった (図 32A)。DAG は PF 入力のためにスパイク状の応答を示した。時間経過とスパイクのピーク値には関係はなかった (図 32B)。アラキドン酸は、20 分から 40 分にかけて徐々に上昇して $3 \mu\text{M}$ に達し、40 分から 60 分にかけて徐々に下降し、以後は $1-2 \mu\text{M}$ に落ち着いた (図 32C)。PKC の活性化は、 Ca^{2+} 依存性、DAG 依存性、アラキドン酸依存性の 3 つを足しあわせたものになる (32D-G)。セカンドメッセンジャーの揺れの激しい経時変化を、PKC が時間平均したようになっている。 Ca^{2+} によって活性化された PKC は、最初の 40 分間はほとんど $0.05 \mu\text{M}$ より大きいが、それ以降は $0.03 \mu\text{M}$ 付近で揺れていた (図 32D)。DAG による PKC 活性化は、PF 入力があったときは $0.02 \mu\text{M}$ の一過性の応答を示し、PF 入力がないときは活性はなかった (図 32E)。アラキドン酸による PKC 活性化は比較的緩やかな変化を示している (図 32F)。PP2A は NO 経路により徐々に不活性化され、5 分以降には $0.13 \mu\text{M}$ に落ち着いた (図 32H)。MAPK は 20 分から活性化が始まり、40 分にピークに達し、ふたたび元に戻るといって、アラキドン酸とほぼ同じ変化をした (図 32C、I)。シナプス膜上にある AMPA 受容体は単調に減少し、120 分後には 100 個まで減少した (図 32J)。細胞質内の AMPA 受容体は、はじめの 20 分は PKC による AMPA 受容体のリン酸化と細胞内取り込みによって増加したが、そのあとは MAPK が

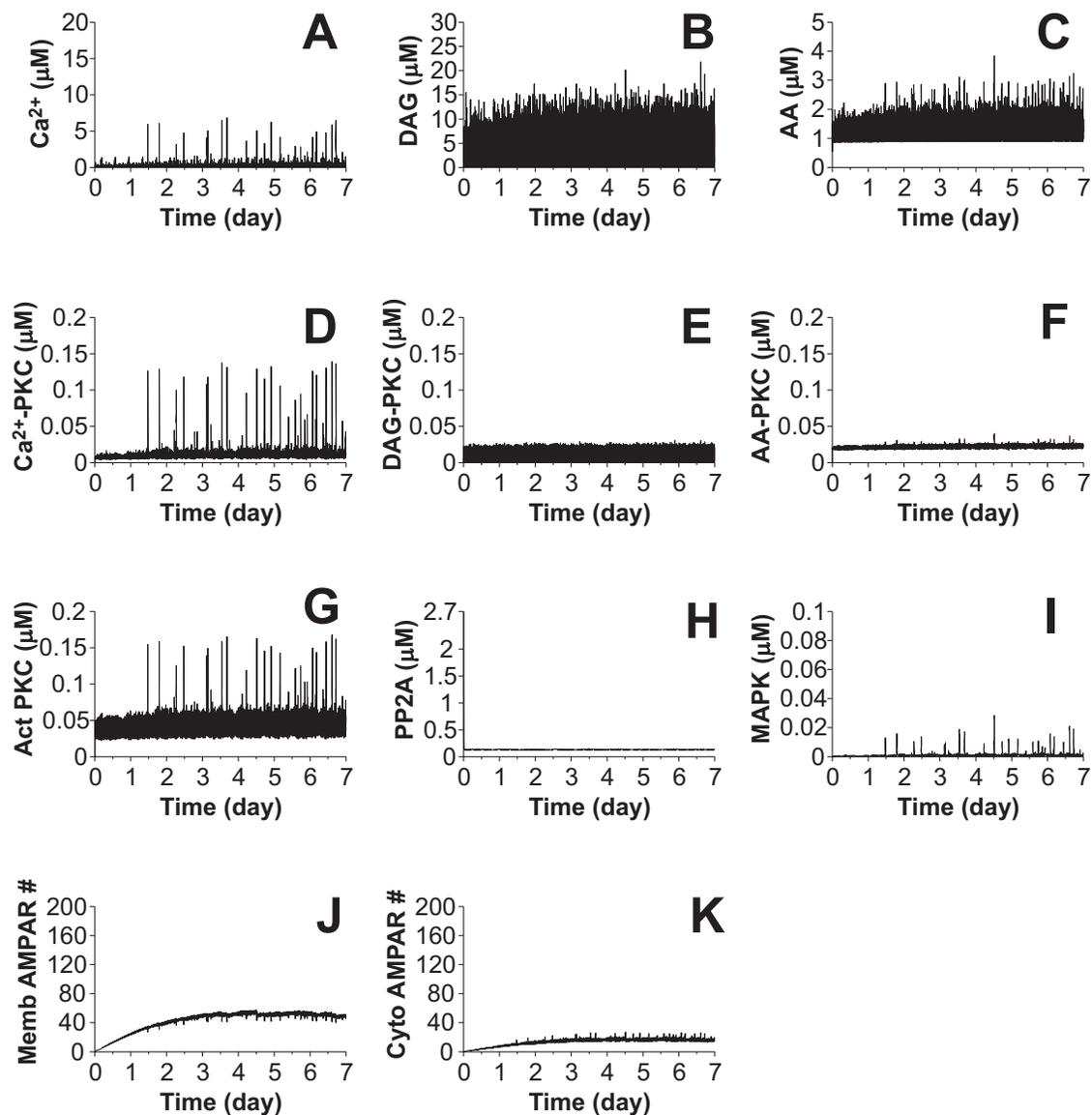


図 31 自発発火下における、シグナル伝達反応の経時変化。AMPA 受容体数の初期値は 0。(A-C) PKC を活性化するセカンドメッセンジャー濃度。(A) Ca^{2+} 、(B) DAG、(C) アラキドン酸。(D-F) PKC の活性化の内訳。(D) Ca^{2+} によって活性化された PKC、(E) DAG によって活性化された PKC、(F) アラキドン酸によって活性化された PKC。(G-I) AMPA 受容体数調節にかかわる酵素。(G) 活性化 PKC で、D-F の総和で与えられる。(H) 活性化型の PP2A。(I) MAPK 活性。(J,K) AMPA 受容体。(J) シナプス膜上の AMPA 受容体数。(K) 細胞質内の AMPA 受容体数。

らのシグナルにより AMPA 受容体が減少した (図 32H)。AMPA 受容体数が 120 個程度になった 40 分以降からランダム入力で Ca^{2+} が $5 \mu\text{M}$ に達することが少なくなった。PKC と MAPK の活性が落ち、アラキドン酸濃度も定常状態に落ち着いた。線維入力は Poisson 過程で与えているため、入力がたまたま密になることがある。たまたま入力が連続したとき Ca^{2+} 上昇が数 μM まで上昇し、PKC によるリン酸化により AMPA 受容体数が一過的に低下する現象が見られた。120 分後以降もシナプス膜上の AMPA 受容体数は徐々に減り続けた。7 日後には、シナプス膜上の AMPA 受容体数は 44 個になった (図 32J)。

以上の AMPA 受容体数が安定化するメカニズムをまとめると次のようになる。シナプス膜上の AMPA 受容体数が少ないと、徐々に AMPA 受容体数が増加する (図 31J)。AMPA 受容体数が増えると、自発発火で高いピーク値を持つ Ca^{2+} スパイクが発生しやすくなる (図 31A)。 Ca^{2+} スパイクにより、PKC と MAPK が活性化し (図 31G、I)、増加した AMPA 受容体が減少する (図 31J)。AMPA 受容体数が多いと (図 32J)、PF 入力による Ca^{2+} 流入量が大きいので (図 32D)、PKC と MAPK の活性が増加し (図 32G、I)、AMPA 受容体数が減る (図 32J)。すなわち、AMPA 受容体数増加 → PF 入力による Ca^{2+} 流入量増加 → PKC と MAPK 活性化 → AMPA 受容体数減少という、負のフィードバックループが働いて、AMPA 受容体数を安定化させる機構となっていた。

メタ学習前後の PF および CF の入力 1 発の Ca^{2+} 応答を調べた。同一のランダム Poisson 過程の PF と CF 入力において (図 33A)、自発発火を与える前または後、AMPA 受容体の初期値が 0 または 200 の 2×2 の 4 条件で、 Ca^{2+} 応答の違いを見た。AMPA 受容体が 0 個のとき、スパイク状の Ca^{2+} 増加は CF 入力のみ見られ、PF 入力に対する応答は mGluR 受容体下流依存のゆっくりとした Ca^{2+} 上昇だった (図 33B)。自発発火を 7 日間与え続けた後では、PF と CF どちらにも $2 \mu\text{M}$ 程度の Ca^{2+} スパイク応答をした (図 33C)。AMPA 受容体が 200 個の場合、PF 入力 1 発に対して $4 \mu\text{M}$ の Ca^{2+} スパイク応答が見られ、PF 入力が密になると $5 \mu\text{M}$ をこえた (図 33D、51 秒)。自発発火を 7 日間与え続けた後では、AMPA 受容体数初期値が 0 個の 7 日後とほとんど同じ応答をした (図 33E)。このことは、AMPA 受容体数の初期値が異なっているにもかかわらず、やがては同じ応答をす

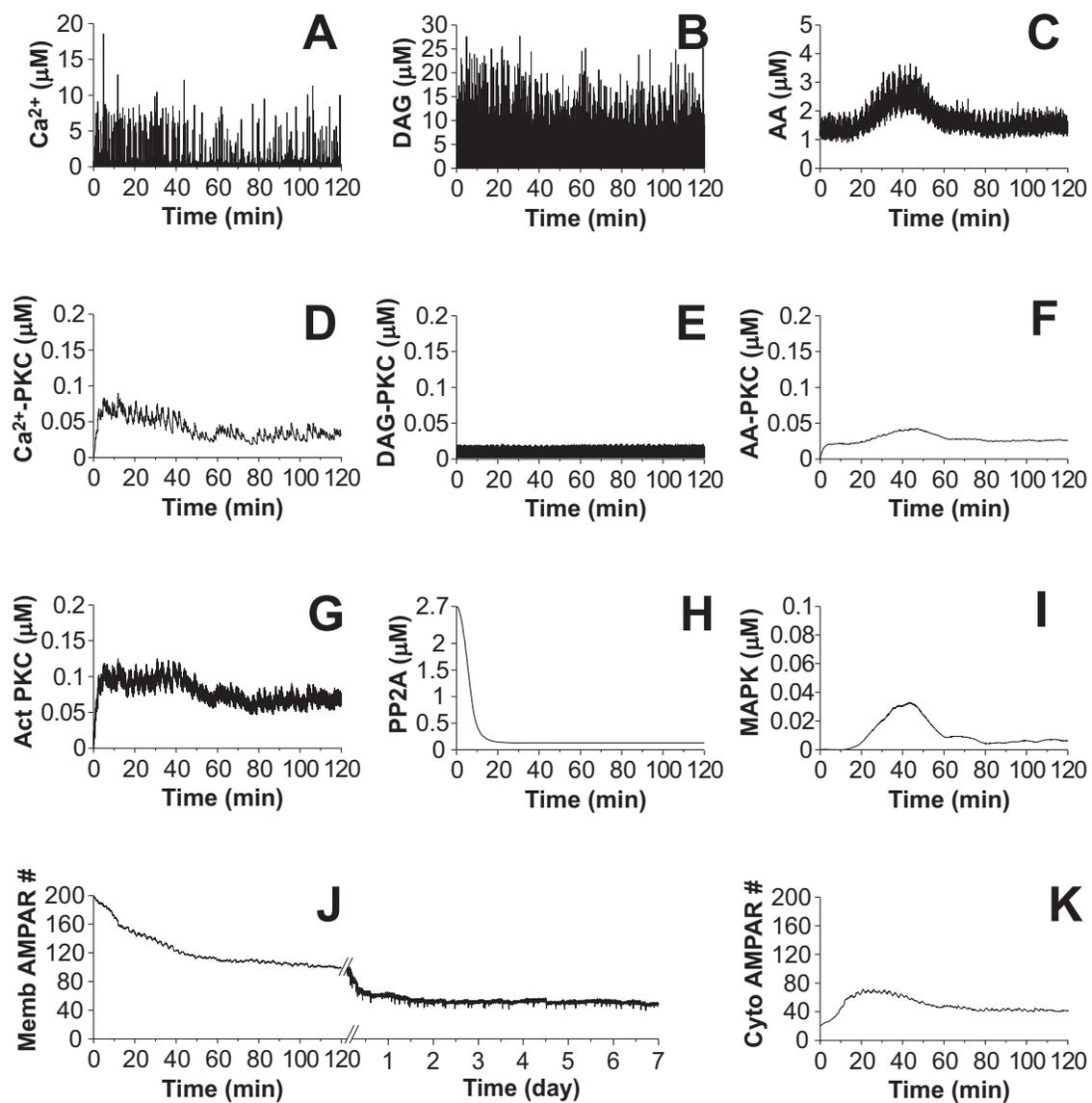


図 32 自発発火下における、シグナル伝達反応の経時変化。AMPA 受容体の初期値を 200 に変えた以外は、図 31 と同一。(J) だけは、7 日間のシナプス膜上の AMPA 受容体数を追加している。

るまで AMPA 受容体数が同じ値に向かうことを示している。

11.3 自発発火頻度と最終 AMPA 受容体数

次に、自発発火頻度と AMPA 受容体数の初期値を変えて、最終的な AMPA 受容体数を調べた。自発発火頻度を 0.2 Hz (低め)、0.5 Hz (標準)、1.0 Hz (高め) の 3 種類を試みた [15]。AMPA 受容体数はやがて平衡状態に達した。自発発火頻度が高いほど、1 週間後の AMPA 受容体数は少なくなった。

同じ発火頻度で異なる 10 種類のパターンの PF と CF 入力を試しても、平衡状態の AMPA 受容体数は自発発火頻度に支配されていた (図 34 黒色。PF 自発発火頻度 0.2 Hz のとき 120.18 ± 29.12 個、0.5 Hz のとき 49.01 ± 10.39 個、1.0 Hz のとき 10.26 ± 4.17 個。PF 自発発火頻度別にそれぞれ 10 試行、SEM)。次に PF と CF の入力パターンは同じままで AMPA 受容体の初期値を 200 個の場合を試してみた。最終的な AMPA 受容体数は、初期値が 0 個の場合とほぼ同じになった。(図 34 灰色。0.2 Hz のとき 122.63 ± 32.28 個、0.5 Hz のとき 48.97 ± 10.40 個、1.0 Hz のとき 10.27 ± 4.17 個。PF 自発発火頻度別にそれぞれ 10 試行、SEM)。

11.3.1 自発的発火頻度と LTD 誘導の PF 強度

メタ学習によって AMPA 受容体数が調節された後、PF と CF の組み合わせの繰り返し入力により、さらに LTD が誘導されるか調べた。PF 入力は 100 Hz のバースト状のスパイクで、バースト内のスパイク本数を変えた。自発発火頻度が 0.5 Hz だった場合には、PF バースト中のスパイクが 3-4 本のときに組み合わせ入力で LTD が誘導されて、PF 単独または CF 単独の入力だと LTD は誘導されなかった (図 35B、C)。スパイクが 2 本だと PF と CF と組み合わせ入力でも LTD を誘導できなかった (図 35A)。5 本だと PF 単独入力でも LTD を誘導できた (図 35D)。PF バーストのスパイク本数を 0 から 10 まで変えて、組み合わせ入力特異的に LTD を誘導できる PF バーストの本数が自発発火頻度依存になっていることを調べた。組み合わせ刺激開始から 60 分後のシナプス膜上の AMPA 受容体数を指標にして、LTD 誘導に必要な PF バーストを評価した (図 36)。まず、自発

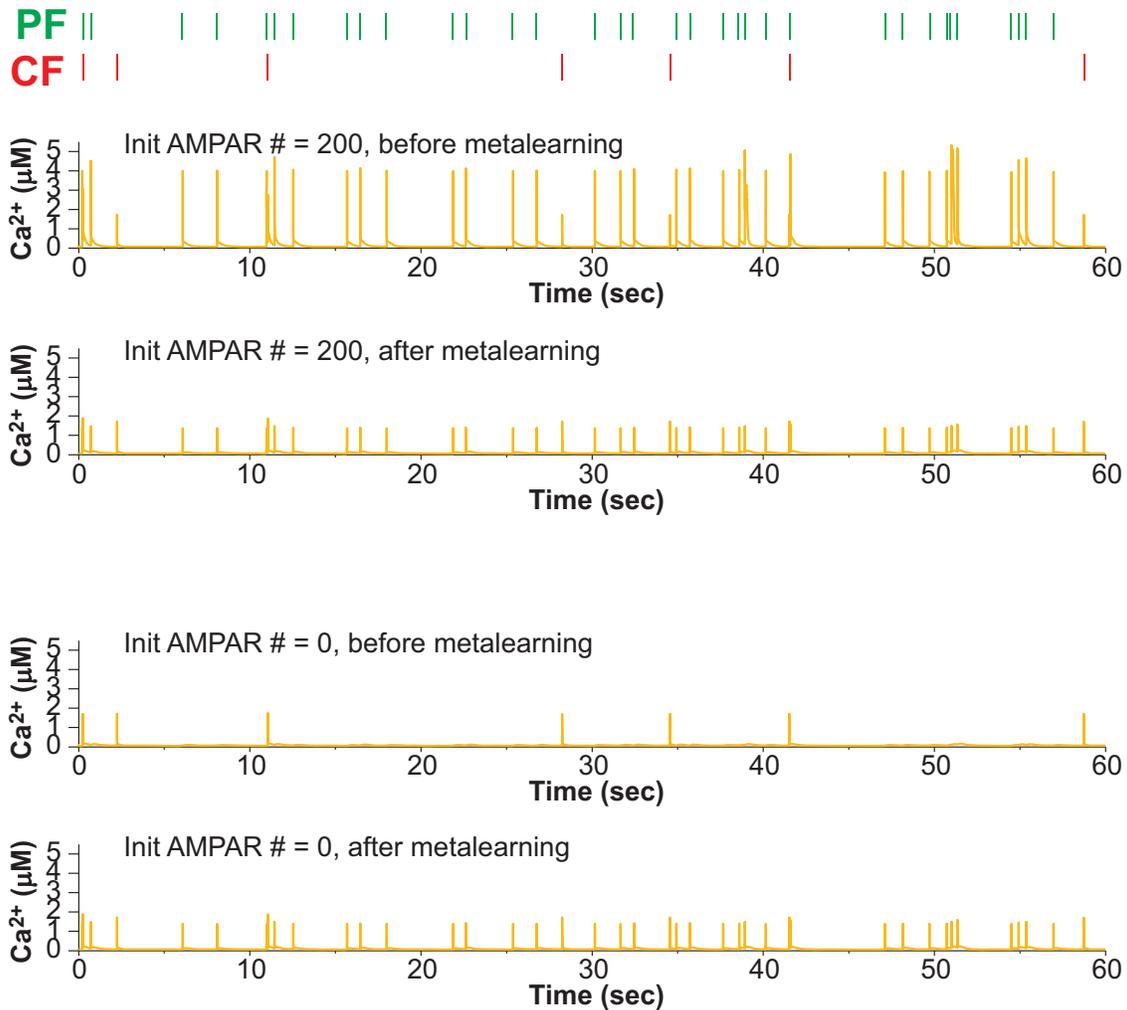


図 33 PF と CF のランダム入力に対する Ca^{2+} 応答。平均発火頻度は PF は 0.5 Hz、CF は 0.1 Hz。同一のランダム入力を用いた。異なるのは初期値だけで、全てのシグナル伝達反応を計算している。(A) AMPA 受容体数が 0 個の場合。(B) A に図 31 のように自発発火を 7 日間与え続けた後の場合。(C) AMPA 受容体数が 200 個の場合。(D) C に図 32 のように自発発火を 7 日間与え続けた後の場合。

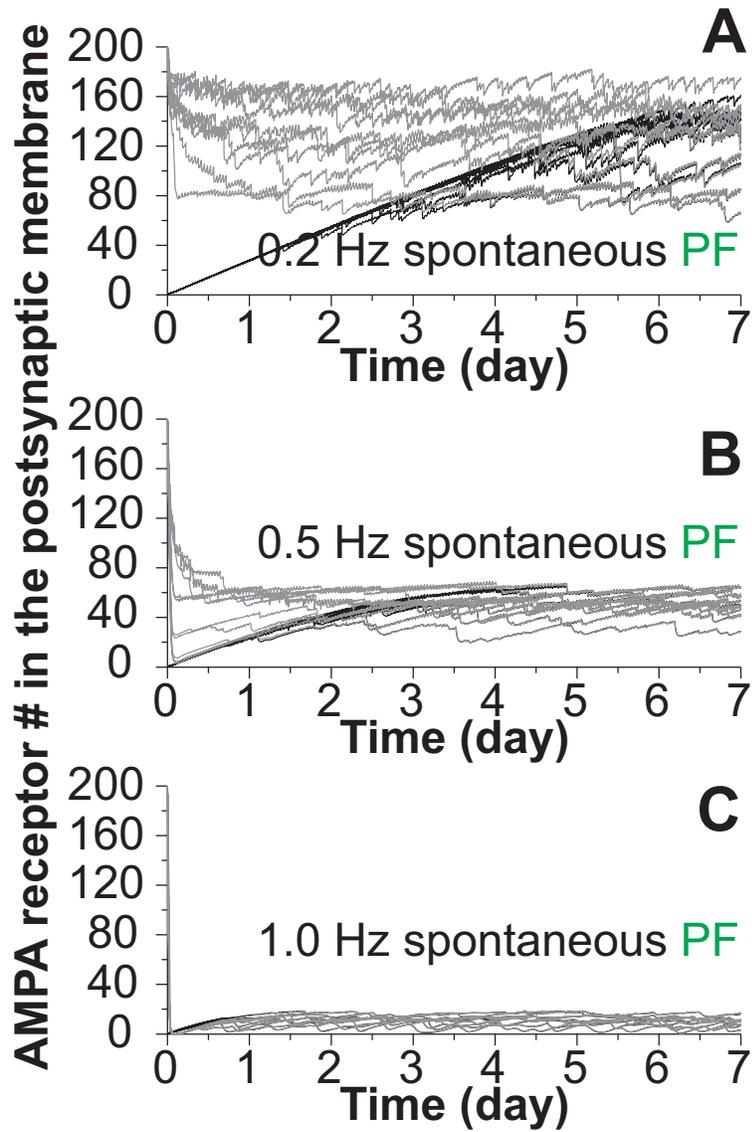


図 34 自発発火頻度依存で AMPA 受容体数が調節される。PF 発火頻度は、(A) 0.2 Hz、(B) 0.5 Hz、(C) 1.0 Hz。CF 発火頻度はどれも 0.1 Hz。初期状態の AMPA 受容体数は 0 個 (黒色) と 200 個 (灰色)。A、B、C でそれぞれ、頻度は同じで乱数種が異なる 10 種類の Poisson 過程のパターンを使った。

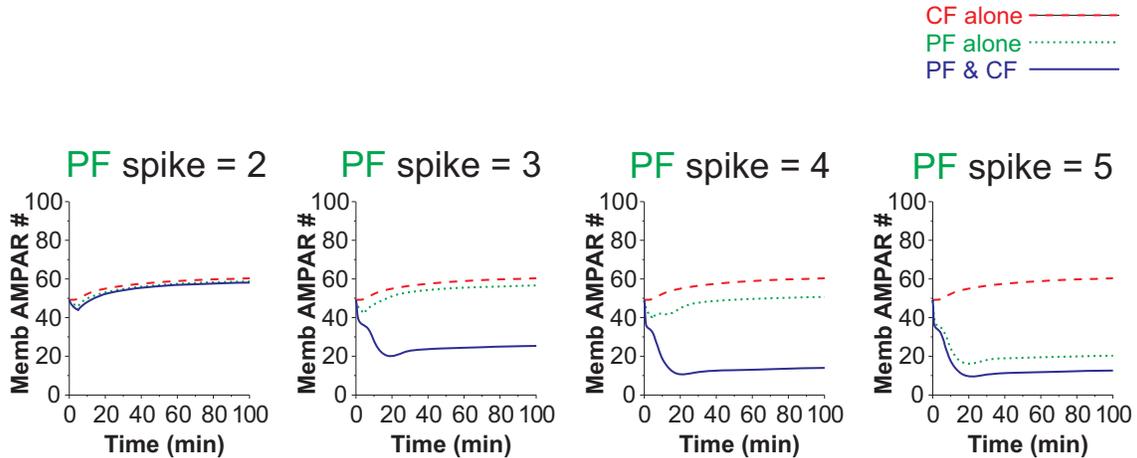


図 35 メタ学習後に、教師あり学習として PF バーストおよび CF 入力のくり返し刺激 (1 Hz、300 回) を与えたときの LTD 誘導。初期条件は 1 週間の自発発火 (PF は 0.5 Hz、CF は 0.1 Hz) を与えた 10 試行の中で最も平均値に近いものの最終値を使った。PF 入力のバースト本数を 2 から 5 まで変えて、色々な PF 入力の強さを試した。

発火頻度の違いに関係なく共通して言えることは、PF バーストのスパイク本数が多いほど LTD は誘導されやすくなることである。PF バーストを全く与えないと (PF spikes in a burst = 0)、AMPA 受容体数はほとんど変化しなかった。PF バーストのスパイク本数が多く与えると (PF spikes in a burst = 10)、必ず LTD が誘導された。この間に、CF 入力の有無で LTD が誘導されるか否か決まるスパイク数が存在し、以前与えていた自発発火頻度に依存していた。自発発火頻度が高いほど、PF バーストのスパイク数が多い場合に組み合わせ入力による特異的な LTD 誘導が起きた。自発発火頻度が 0.2 Hz だったときは PF バーストのスパイク数は 2 本、1.0 Hz のときは 8 本以上のときに組み合わせ特異的な LTD 誘導が起きた。AMPA 受容体数が低く抑えられていたとき (1.0 Hz)、LTD を特異的に誘導できる PF スパイク数の範囲が比較的広い理由は、PF 入力依存の Ca^{2+} 流入量が CF 依存の Ca^{2+} 流入量と比較して極めて小さくなっているからである。

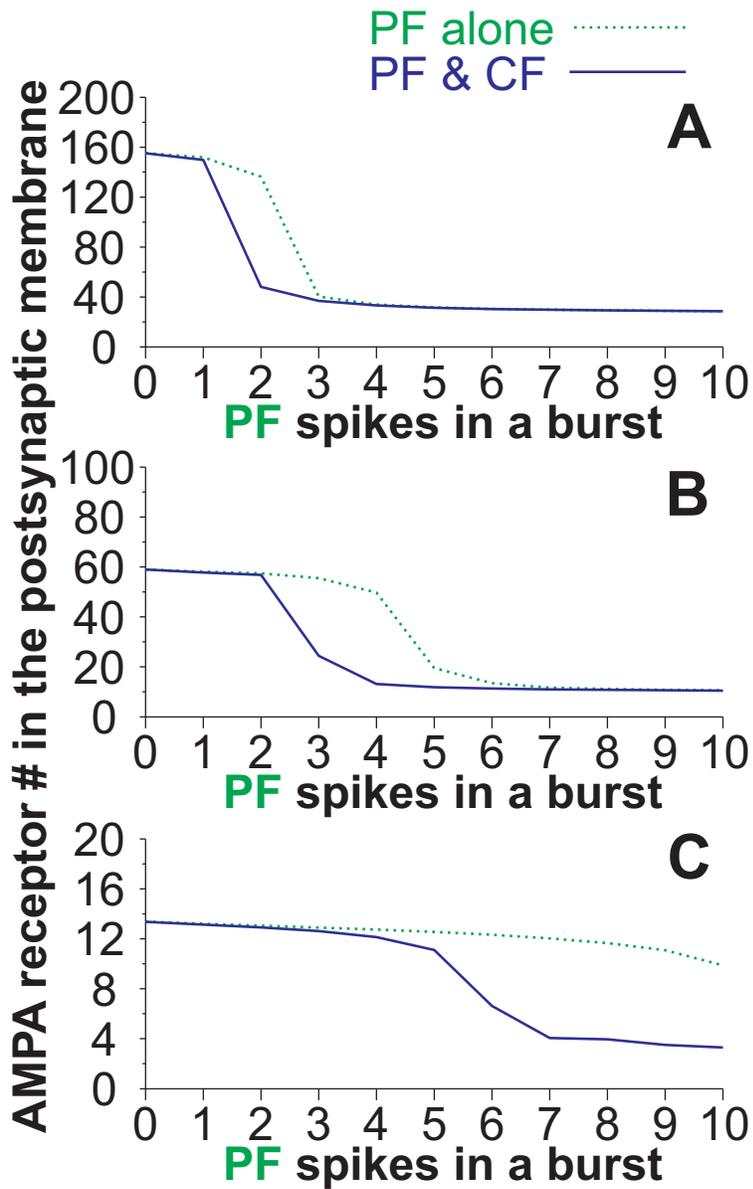


図 36 過去に与えた自発発火頻度に依存して、小脳 LTD 誘導に適切な PF バーストのスパイク数が変わる。過去に与えた自発発火頻度は、PF が (A) 0.2 Hz、(B) 0.5 Hz、(C) 1.0 Hz で、CF 発火頻度はどれも 0.1 Hz。くり返し入力開始から 60 分後のシナプス膜上の AMPA 受容体数を、小脳 LTD の指標として使った。点線が PF のみ入力、実線が PF と CF の組み合わせ入力。

12. シミュレーションのまとめと考察

12.1 タイミング検出機構のまとめ

Ca^{2+} ダイナミクスモデルによって、PF 入力から IP_3 濃度上昇までに時間遅れがあり、 IP_3 受容体が PF 入力下流の IP_3 と CF 入力下流の Ca^{2+} の同時性を検出していることが明らかになった。

図 37 に、その瞬間の IP_3 濃度で大きな Ca^{2+} 上昇に必要な Ca^{2+} ピークを、 IP_3 依存性の Ca^{2+} 閾値として示してある。この閾値の定義は、その瞬間の IP_3 濃度において、平均 Ca^{2+} 応答が $3.16 (= \sqrt{10} = 10^{0.5}) \mu\text{M}$ を超えるために必要十分な、 Ca^{2+} 流入直後の Ca^{2+} 濃度である (図 25、薄い青色の範囲と薄い赤色の範囲を隔てる黒色太線)。 IP_3 濃度に依存して閾値が変わる (図 8B)。 Ca^{2+} 閾値は、もしその瞬間に CF 入力のような Ca^{2+} 流入があったときに、大きな Ca^{2+} 上昇を得るのに必要な Ca^{2+} 上昇を表している。この閾値で、再帰的な Ca^{2+} 応答を得るのに最適な PF と CF のタイミングについて説明することができる。 PF 入力から 300 ミリ秒以内の CF 入力は、 Ca^{2+} 閾値を超えるのに必要な Ca^{2+} 上昇を得られる (図 37、黒色実線)。 そうではなくて、CF 入力が PF 入力より先行したり (図 37、灰色太実線)、CF 入力が PF 入力より遅すぎたりすると (図 37、灰色細点線) CF の Ca^{2+} 流入では閾値まで Ca^{2+} 濃度を届かせることができない。

IP_3 受容体による再生的な Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出が Ca^{2+} シグナルの非線形性を生み出していた。まず、 Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出は IP_3 上昇がある時に CF 由来の Ca^{2+} 流入によって始まり、 Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体活性化の正のフィードバックループにより加速される。そして最後には Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体不活性化の負のフィードバックループによって Ca^{2+} 放出が止まる (図 38)。

12.2 シミュレーションの予測と検証実験

12.2.1 Ca^{2+} ダイナミクスモデルの予測

PF 入力と CF 入力のタイミングを検出するところは、PF 入力の下流と CF 入力の下流の合流点であるはずである。黒田らが作成した小脳 LTD のシグナル伝

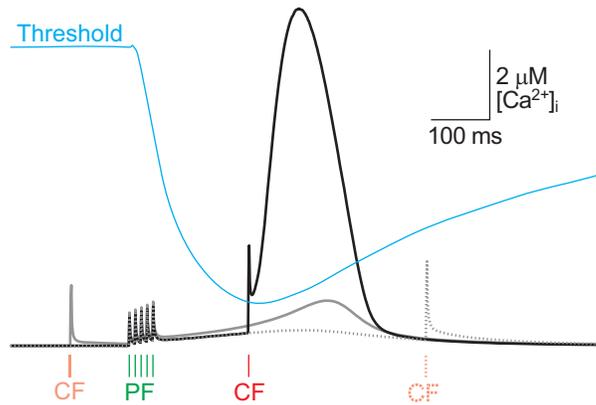


図 37 PF と CF の組み合わせ入力を、時間差を-100 ミリ秒（灰色太実線）、+200 ミリ秒（黒色実線）、+500 ミリ秒（灰色細点線）で与えたときの Ca^{2+} 濃度経時変化。水色の閾値は、その瞬間の PF 入力のための IP_3 濃度（図 6B、緑色）で、平均 Ca^{2+} 応答（図 25）が $3.16 (= \sqrt{10} = 10^{0.5}) \mu\text{M}$ となるような Ca^{2+} 流入による Ca^{2+} 応答。もし、一過的な Ca^{2+} 応答が Ca^{2+} 閾値に届いたなら、再帰的な Ca^{2+} 放出が引き起こされ、非線形な Ca^{2+} 応答が生じる。

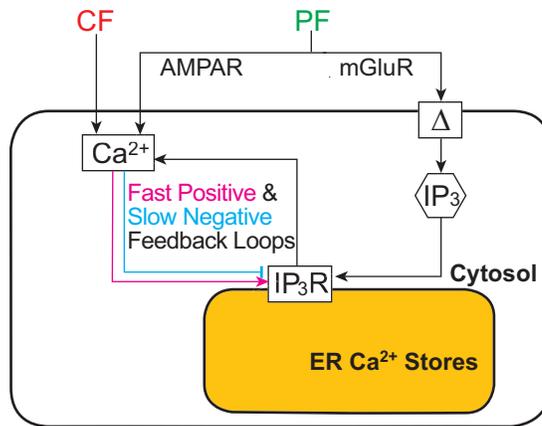


図 38 代謝型経路には PF 入力から IP_3 蓄積まで時間遅れ Δ がある。 Ca^{2+} 放出は Ca^{2+} 上昇によって活性化もされるし、不活性化もされる。もし十分量の IP_3 があれば、 Ca^{2+} 依存の IP_3 受容体活性化の正のフィードバックループによって Ca^{2+} 流入は再帰的な Ca^{2+} 放出を引き起こす。 Ca^{2+} 上昇後、遅い負のフィードバックループが Ca^{2+} 放出を止める。

達経路のモデル [60] によると、IP₃ 受容体以外には MAPK カスケードが合流点になる。CF は MAPK カスケードを上流から活性化し、PF は NO/cGMP/PKG 経路を活性化する。NO/cGMP/PKG 経路は MAPK カスケードの活性化を抑える PP2A の働きを妨げる。しかしながら、NO/cGMP/PKG 経路の反応は数分のオーダーで、Ca²⁺ シグナルに比べてとても遅いため、秒より速いタイミングを検出できるとは思えない [40]。Wang らは、IP₃ 受容体自身が IP₃ と IP₃ の時間差を検出するのではと考えた [99]。IP₃ 受容体は不活性化されると、PF による IP₃ 上昇の前に CF による Ca²⁺ 流入によって不活性化されるのかもしれない。というのは、前もって IP₃ 受容体を高い Ca²⁺ 濃度に晒すと IP₃ 上昇による Ca²⁺ 上昇は抑えられるからである [2, 54]。したがって、IP₃ 受容体が PF の後に CF という入力順序のときに活性化されるという説明がつく。しかし、シミュレーションによると CF 入力のみによる Ca²⁺ 応答はとても弱く (図 6A、赤線)、高い Ca²⁺ 濃度に晒す実験とは比べものにならない (10 μM または 100 μM の Ca²⁺ 濃度を 1 秒)。したがって、この可能性はタイミング検出を説明できそうにない。そうではなくて、IP₃ が IP₃ 受容体に結合する反応が遅いため、IP₃ 受容体が開くには時間差がなければならないのかもしれない。これは、ケージド IP₃ 光分解で Ca²⁺ 放出が起こるには 50 ミリ秒の潜時があったという実験 [54, 74] に支持されている。しかし、Ca²⁺ ダイナミクスモデルでは IP₃ と IP₃ 受容体の結合は速いとしているにもかかわらず、同じような潜時が再現できている (図 24 右、黒色線)。したがって、ケージド IP₃ 光分解という手法では、タイミング検出の 2 つの可能性を選り分けることができない。

この 2 つの可能性を明確に分けるには、ケージド IP₃ 光分解とケージド Ca²⁺ 光分解による Ca²⁺ 応答を測定すればよい。分解する光波長が異なるケージド化合物を使うと、IP₃ と Ca²⁺ 濃度を別々に操作することが可能になる。ケージド IP₃ 光分解は、遅れを伴って Ca²⁺ 上昇を得るのに対して (図 24C 右、黒線)、ケージド Ca²⁺ 光分解は、遅れなしで Ca²⁺ 上昇を得るはずである (図 24C 左)。ケージド IP₃ 光分解とケージド Ca²⁺ 光分解の組み合わせでは、非線形な Ca²⁺ 応答が見られるはずである。すなわち、ケージド IP₃ 光分解のみによる Ca²⁺ 応答とケージド Ca²⁺ 光分解のみによる Ca²⁺ 応答の線形和よりも、ケージド IP₃ 光分解と

ケージド Ca^{2+} 光分解の組み合わせの Ca^{2+} 応答のほうが大きい。また、ケージド IP_3 光分解の後にケージド Ca^{2+} 光分解を与えた方が同時に与えるより Ca^{2+} 応答が強くなったなら、モデルの予測は棄却される。ケージド IP_3 光分解とケージド Ca^{2+} 光分解の組み合わせのタイミングを変えて与えても、PF と CF の組み合わせ入力とは違って、光分解を同時に与えたときに最も強い Ca^{2+} 応答が出るはずである。なぜなら、代謝系経路とは違って、光分解に時間遅れはない(ナノ秒の反応)からである。

12.2.2 IP_3 の時間遅れの測定

PLC の PIP_2 と結合する PH ドメインに蛍光タンパク GFP をつなげた GFP-PHD を遺伝子組み換え技術で発現させて、 IP_3 の細胞膜から細胞質への拡散を可視化した研究がある [84]。GFP-PHD は、静止状態では細胞膜の PIP_2 と結合しているが、 IP_3 の親和性が PIP_2 より 20 倍程度高いために、 IP_3 が産生されると IP_3 と結合する。 IP_3 は細胞膜から細胞質に拡散する様子を、GFP-PHD の移動として可視化することができる。GFP-PHD の実験によると、プルキンエ細胞樹状突起では、PF 連続刺激と GFP-PHD の変化に数 100 ミリ秒の遅れがある。 Ca^{2+} ダイナミクスモデルはスパインを扱っており、樹状突起とは環境は異なるが、PF 刺激に対する IP_3 応答に時間遅れがあるという実験結果は、mGluR 受容体活性化から IP_3 産生まで時間遅れがあるというモデルの予測と合致するものである。

12.2.3 メタ学習の予測する現象

AMPA 受容体数調節は日オーダーの長い現象であるので、直接的な証拠を見つけるのは難しい。スライス実験の環境は生体内とは異なるので、シナプス可塑性が観察されたとしても、それが生体内でも起こりうる現象なのか、培養系のアーチファクトなのか分からない。

しかし、調節済みのシナプスを観測することはできる。スパインの大きさと AMPA 受容体数は高い相関があるので [79]、スパイン形態を観察するだけでシナプス伝達効率を予想できる。マウスに gabazine (GABA_A 受容体阻害剤) を投与

して自発発火頻度を大きくすれば、スパインの大きさが通常より小さくなっているはずである。さらに、そのようなマウスから取り出した小脳スライスではLTDを誘導するのに必要なPFバースト数も増えているだろう。(注:テトロドトキシンで電気活動を抑制すると、CFとプルキンエ細胞の結合がなくなってしまうので、テトロドトキシンは使えない [41])

PF-プルキンエ細胞シナプスは、マウスでは出生後から1週間で形成される。電子顕微鏡で抗AMPA受容体抗体を数えた論文によると、出生直後はAMPA受容体が多く発現している [105]。それからシナプスが成熟するとAMPA受容体数が減少している。このことは、小脳で活動依存的にAMPA受容体数が調整されていることを支持する。

12.2.4 AMPA受容体数の安定化の速さ

完全版LTDモデルでは、AMPA受容体数が少なくても多くても、時間があれば自発的発火により同じ数に調節されることを示した(図34)。モデルではAMPA受容体供給は一定速度であると仮定した。 Ca^{2+} 濃度が大きいときにAMPA受容体数を減少させる機構はあっても、 Ca^{2+} 濃度があまり大きくないときにAMPA受容体数を増加させる機構はない。そのため、AMPA受容体数が多い場合は数時間でAMPA受容体数がある程度まで減少するのとは違って、AMPA受容体数が少ない場合では平衡状態まで日オーダーで時間がかかった。

最近、後シナプスでLTPが発現するという報告もある [20,65]。海馬LTP/LTDでの場合とは逆で、 Ca^{2+} 上昇が中途半端な場合は後シナプスでLTPが起こるという報告がある [65]。そのLTPの分子メカニズムがはっきりしていないのでモデルには組み込まなかった。小脳LTPをモデルに組み込めば、AMPA受容体数が少ない場合でも迅速に平衡状態に達するだろう。

12.3 シミュレーション結果と小脳学習理論

12.3.1 Ca^{2+} ダイナミクスと小脳学習理論

小脳学習理論によれば [46, 53, 103]、LTD は PF 入力 が CF 入力を先行したときに誘導されなければならない。複数の研究グループがいろいろな実験方法を用い、様々な LTD 誘導の時間窓を報告している [17, 27, 51, 103]。さらには、小脳運動学習理論は、LTD 誘導に CF 入力 が必ずしも要らないことをうまく説明することが難しい。IP₃ 依存 Ca^{2+} 閾値は強い PF 刺激だけでも再帰的 Ca^{2+} 放出を引き出せることを示唆している (図 25、領域 (vi))。LTD は CF 入力なしでも強い PF 刺激があれば誘導されることが実験により示されているが [39]、この種の LTD は生理的な刺激条件下で見られるものではなく、小脳教師あり学習に関係するとは思えなさそうである。

De Schutter は PF 入力だけで誘導される LTD は、PF 入力による Ca^{2+} 流入量を規格化する働きがあると唱えている [23]。もし、PF 入力のみで LTD を誘導できるほど強かった場合、AMPA 受容体は抑えられて、 Ca^{2+} 応答が Ca^{2+} 閾値にまで届かなくなる。この LTD は小脳教師あり学習を効率よくするための前段階の学習なのかもしれない。

12.3.2 メタ学習と教師あり学習

De Schutter は PF のみ入力での小脳 LTD 誘導は、教師あり学習と相容れないと考え、小脳 LTD の役割は大きすぎるシナプス伝達効率を抑えることであると唱えた [23]。私は、シナプス伝達効率が強い場合の自発発火でも、シナプス伝達効率が自発発火によって抑えられた後の組み合わせ入力でも LTD が起こることをシミュレーションにより示した。私は、どちらの LTD も計算論的に意味のある LTD と考える。De Schutter の提唱した LTD の役割は教師あり学習の準備段階としてのメタ学習として役立っている。

図 39 のように、最初、PF-プルキンエ細胞間のシナプス伝達効率がばらばらな場合を考える。図 31 と図 32 のように、自発発火入力で、負のフィードバックループ作用によりシナプス伝達効率が調節されて、PF と CF の組み合わせ入力で特

異的に LTD が誘導されるようになる。メタ学習の仕組みがあると、シナプス伝達効率を遺伝的に決めなくて良いという利点がある。シナプスが受ける入力頻度や伝達効率は小脳部位、シナプス、タスク毎に異なるはずである。1つ1つのシナプスが入力刺激に柔軟に対応して教師あり学習が成立する環境を整える必要がある。また、自発発火頻度が高い PF は、外部刺激時の発火頻度も高く、バースト内のスパイク数も多いはずである。したがって、自発発火頻度を手がかりにして感覚刺激が来たときのバーストのスパイク数を粗く見積もることができる。自発発火でぎりぎり LTD が起きないところまでシナプス伝達効率を保っておけば、刺激によるバースト発火を鋭敏に検出することができる。メタ学習の LTD も教師あり学習の LTD も、分子メカニズムは共通のものを使っていることは、教師あり学習が使うシグナル伝達経路をメタ学習が使った上で調整していると解釈できる。

ただし、このメタ学習は、過去のシナプス伝達効率に関係なく現在のシナプス伝達効率を決めてしまうので、忘却ともいえる。出生直後などシナプス形成の直後で、何も学習していない場合に、このメタ学習は必要だろう。学習した内容を忘れたい場合、書き換えたい場合にも必要である。逆に、保持し続けたい記憶には、このメタ学習は適応されるべきではない。

12.3.3 メタ学習とメタ可塑性の関係

メタ可塑性や恒常可塑性は、可塑性と同じようにシナプスや細胞の活動で誘導されるが、LTP や LTD などのシナプス可塑性に必要な刺激の閾値を変化させる [1, 56, 85]。可塑性と同じように、メタ可塑性の分子メカニズムも Ca^{2+} 濃度上昇が引き金となる。メタ可塑性の効果の 1 つとして、シナプス刺激によってもたらされる Ca^{2+} 流入量の調節がある。シナプス恒常性のシミュレーション研究 [91, 104] で、彼らは NMDA 受容体のダイナミクスと現象論的な Ca^{2+} 濃度依存の伝達効率変化を定義した。前シナプス入力頻度と、前シナプスと後シナプスの発火の時間差によってシナプス伝達効率が両方向に変化することを示した [91]。さらに、NMDA 受容体のコンダクタンスが変化することで、 Ca^{2+} 流入量が調節されるメタ可塑性のシミュレーションをした [104]。

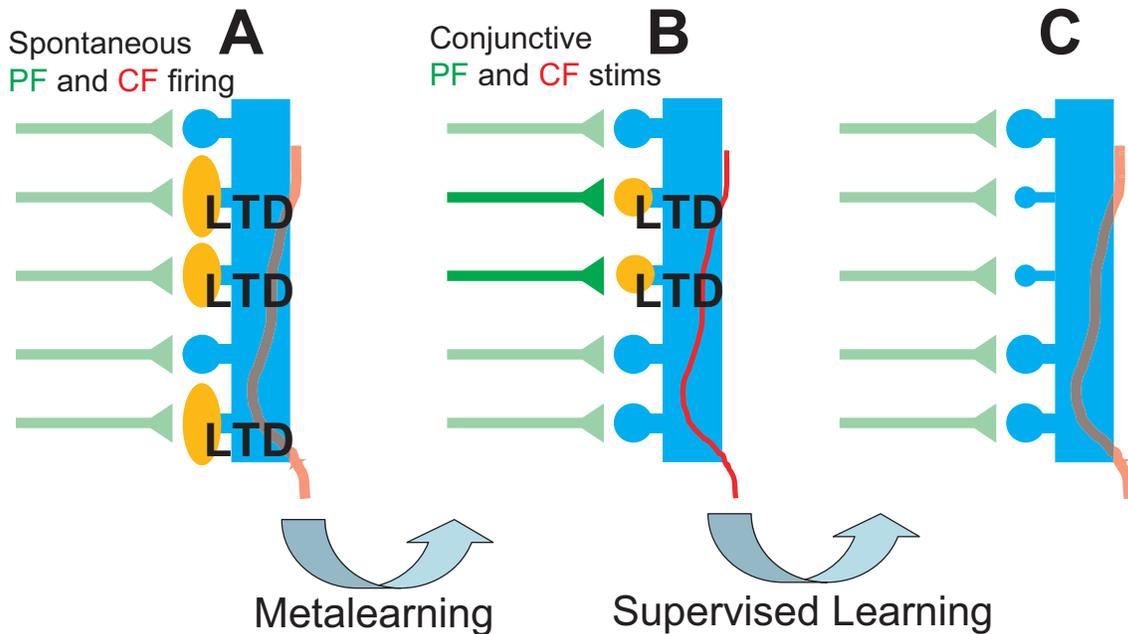


図 39 小脳 LTD がメタ学習と教師あり学習の役割を持つ。(A) はじめ、シナプス伝達効率、すなわち AMPA 受容体数はシナプス毎にバラバラである。AMPA 受容体数が多いシナプスについては、自発発火だけでも、LTD が誘導されるほど後シナプス Ca^{2+} が上昇する。AMPA 受容体数が少ないシナプスについては、(B) LTD によって AMPA 受容体数が抑えられ、自発発火ではもはや LTD は起こらなくなった状態。今後、PF と CF の組み合わせ入力のみで LTD が誘導され、小脳教師あり学習が成立する。(C) PF 入力を受けたシナプスだけ選択的に LTD が起こり、教師あり学習が成立した状態。

海馬 LTP/LTD のシミュレーションと本研究の共通点は、メタ可塑性がシナプス入力による Ca^{2+} 流入量を調節して、Hebb 学習が成立するようになること、メタ可塑性が Ca^{2+} 依存のメカニズムで起こることである。メタ学習では、学習過程に関する何らかのパラメタを学習する。本研究のシミュレーションでは、教師あり学習が成立するように AMPA 受容体数を入力環境に応じて調節するので、メタ可塑性の過程を、学習のための学習、メタ学習と呼べる。違う点は、海馬 CA1 野の LTP/LTD では、シナプス伝達効率変化は AMPA 受容体依存で、メタ可塑性は NMDA 受容体依存の Ca^{2+} 上昇である。本モデルでは、両方とも AMPA 受容体数の変化としている。

13. 一般的な議論

13.1 複雑なモデルの問題

完全版 LTD モデルの微分方程式の数（すなわち、分子状態の数）は 96 個、パラメタ数は 203 になった。モデルが大規模になると、色々と障壁が発生する。

1 つ目に、計算時間が飛躍的に増大することが挙げられる。何も工夫をしないならば、タイムスケールの異なる反応を同時に計算するには、数値計算の時間の刻み幅はもっとも細かい反応に合わせ、全体のシミュレーション時間はもっとも長い反応に合わせなければならない。結果として、膨大な計算時間が必要になる。本研究では、回避策として、反応の速い Ca^{2+} 上流とそれ以外にモデルを分け、 Ca^{2+} 上流以外のすべての反応比例定数を一律に 20 倍することで、計算時間を $1/20$ に節約した。

2 つ目に、モデルの可搬性が問題になる。モデルが複雑になると、他のシミュレータに移すことが技術的に困難になるばかりでなく、他の人にモデルを使い回してもらえ可能性が低くなる。既存のモデルを採用する前に、そのモデルの特徴を理解しなければならない。簡単なモデルだと、モデルの全容を数式だけ見て理解することも可能である。しかし、複雑なモデルでは、丁寧な説明がモデルの全容を理解させるために必要で、それをもってしても理解の容易さは簡単なモデルにかなわないだろう。

13.2 モデルの単純化の試み

生化学反応式で定式化した数理モデルを、性質を保ったままで単純な数式に落とすことができれば理想的である。まず、計算が速くなり、モデルが簡単になって説明しやすくなる、という実用的な点がある。さらに、単純化の過程で、モデルの重要な部分や無視できる部分を選り分けることになるので、モデルの本質をより深く理解することが出来る。

Ca^{2+} ダイナミクスモデルにおいて値を変えることで結果が大きく変わるパラメタは、全 96 個中わずかであった。このことは、モデルの性質を保ったまま少

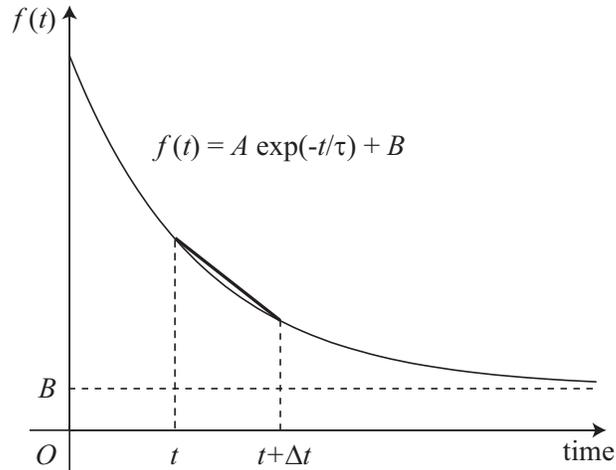


図 40 シグナル伝達経路の減衰時定数の定義。現在の分子濃度が静止状態の分子濃度 B に指数関数的に近づいてゆくと仮定する、すなわち $f(t) = A \exp(-t/\tau) + B$ に従うと仮定すると、各瞬間の微分から時定数を求めることができる。

ない数式に単純化できることを表しているのかもしれない。私の実感でしかないが、本当に重要なパラメタは 10 個程度だと思われるので、上手くやれば、その程度の個数の微分方程式に単純化できるのかもしれない。幾度か単純化を試みたが、明確な方針が立たず、定量性を保ったままモデルを単純化することにも失敗した。天下りの単純化することがどうしても必要になるのだが、良い方法を見つけることができなかった。

このような複雑なモデルの、直感的な認識の方法として、シグナルが経路を伝わっていく過程を減衰積分器 (leaky integrator) の積み重ねだと考えることが有用であるかもしれない。減衰積分器の減衰時定数を定義し、いろいろなシグナル伝達経路で比較することで何かわかるかもしれない。上流のシグナル伝達経路の時定数は速く、下流に行くほど遅いことが予想される。

ここでの時定数の定義を、以下のように定義する。図 40 のように、分子反応経時変化で静止状態に近づく現象が、減衰指数関数で表されると仮定する。すなわち、経時変化が

$$f(t) = A \exp(-t/\tau) + B \quad (50)$$

で表されるとする。ここで、 A は比例定数、 B は静止状態の分子濃度、 τ がその

時刻での時定数である。天下りのだが、 $f(t) - B$ と $f(t + \Delta t) - B$ を用いると、時刻 t における時定数 τ を A に関係なく求めることができる。

$$\frac{f(t + \Delta t) - B}{f(t) - B} = \frac{A \exp(-(t + \Delta t)/\tau)}{A \exp(-t/\tau)} = \exp(-\Delta t/\tau) \quad (51)$$

左辺の $f(t)$ と $f(t + \Delta t)$ はシミュレーション結果で求まっているので既知、 B は静止状態を調べれば分かるので既知、 Δt も既知なので、 τ が求まる。

Ca^{2+} は 250-350 ミリ秒後に 20-50 ミリ秒の時定数、 IP_3 は 300-500 ミリ秒後に 300-400 ミリ秒の時定数、MAPK は 20-40 分後に 2-5 分の時定数、PP2A は 20-40 分後に 10-30 分の時定数になった (図 41)。これらの時定数は、直感的な時間スケールと合致する。

簡易な単純化手法は、比較的速い反応の時定数を 0 と考えてしまって、平衡状態を表す Hill 式で記述することである。ただし、式が 1 個と時定数パラメタが 1 個減るだけなので、本質的な単純化にはならない。

単純化は、無視すると決めた部分が実は重要だったという危険性がつきまとう。mGluR 受容体から IP_3 産生までの経路をモデル化せずに、PF 入力があると瞬時に IP_3 濃度がある値まで上昇するとしたモデルもある [42, 59]。また、Hodgkin-Huxley の Na^+ チャネルの方程式とよく似た IP_3 受容体モデル [66] がよく使われている [42, 59]。しかし、 IP_3 受容体を Na^+ チャネルに似せてモデル化する生物学的必然性はなく、それらの研究では定量的にプルキンエ細胞スパインの Ca^{2+} イメージングの結果 [99] を再現することはできなかった。

13.3 決定論的な微分方程式と確率的な遷移方程式

生化学反応式に基づいて、決定論的な微分方程式を使ったが、この方法が正しいのかという疑念もある。スパインの体積が小さいので、分子数が少なく、確率的に反応が振る舞うことが考えられる。例えば、静止状態の遊離 Ca^{2+} の個数は、3-4 個である。 Ca^{2+} ダイナミクスの要である IP_3 受容体の個数は 16 個しかない。

反応速度論の解釈では、分子反応の 1 個 1 個はもともと確率過程であり、分子数が非常に多いときに大数の法則により反応系が決定論的になる。分子数が少な

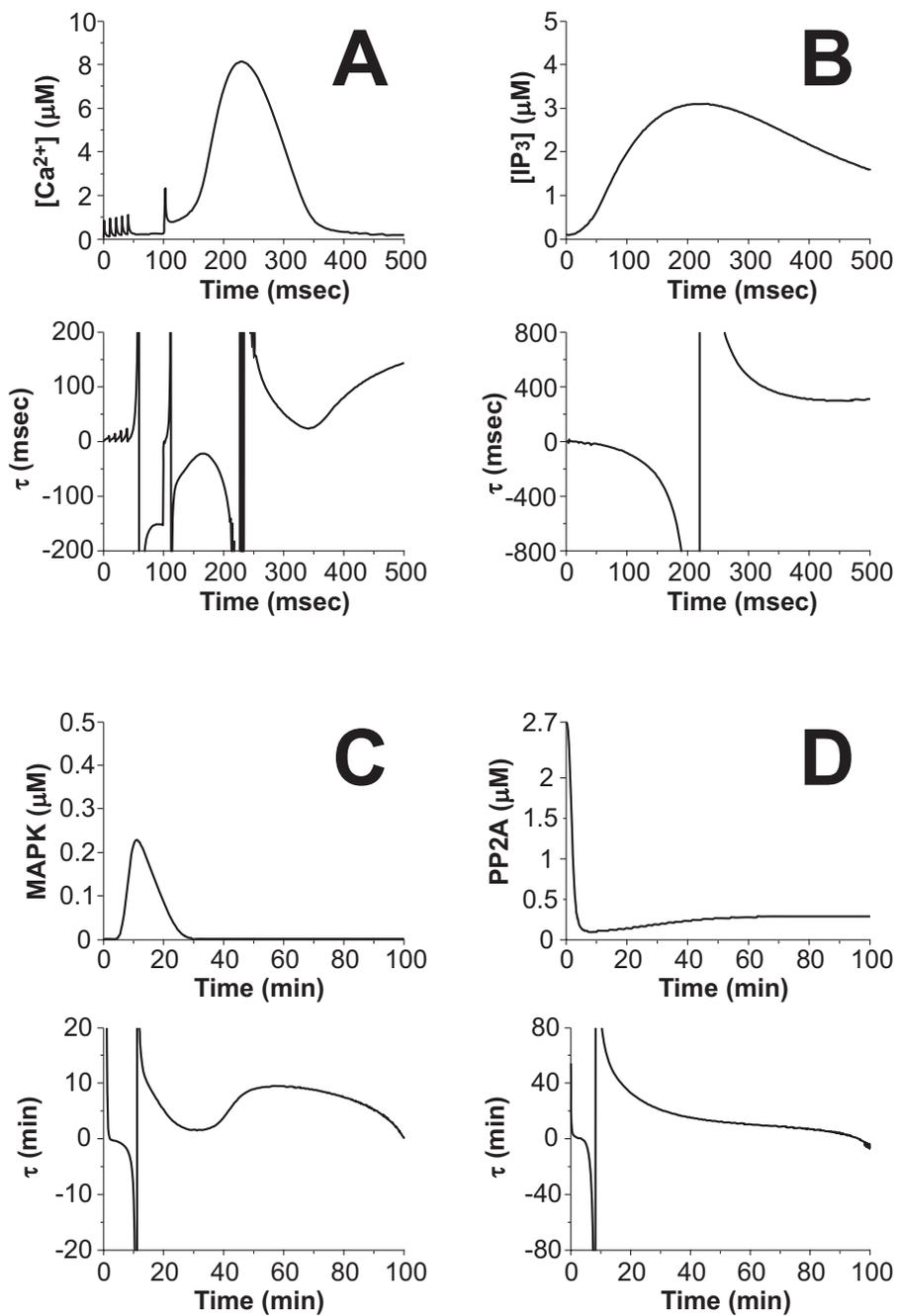


図 41 シグナル伝達経路の経時変化と各瞬間の時定数。Ca²⁺ までの経路。PF と CF の組み合わせ入力を与えたときの (A) Ca²⁺ と (B) IP₃。Ca²⁺ 以降の経路。PF と CF の組み合わせ入力を 1 Hz で 300 回与えた後の、(C) MAPK と (D) PP2A。

い場合は、分子数が反応の1個がたまたま起こったり起こらなかったりしたことが、将来の結果に影響を強く与えてしまう。確率論的にシミュレーション計算を走らせること自体は難しくない。出発点となる微分方程式は、決定論の微分方程式を離散化しただけで、計算方法も、恣意的に決めた刻み時間幅で反応が起こったかどうか吟味するのではなく、次に起こる反応の時間を乱数で決めるという優れた Gillespie アルゴリズムもある [37]。しかし、本論文では、シミュレーションは決定論的に解いた。小脳 LTD 誘導には、300 回の PF と CF のくり返し入力が必要で、 Ca^{2+} 応答の平均を Ca^{2+} シグナル下流は認識していると考えられること、また、シナプス可塑性は、複数のシナプスの足し合わせの電流変化を電気生理学的に観察しているからである。別の理由として、シミュレーション課題が確率論的振る舞いで生まれる現象を必要としなかったから、ということもあった。決定論ではなく、確率論的にシミュレーションを計算することで期待される現象として、確率共振 (stochastic resonance) が知られている。この現象は、システムに適度な強度のノイズを加えることにより、システムの応答性能 (信号の検出率) が向上するという非線形系に特有の現象である。分子反応の場合、内的ノイズとして、確率論的な分子反応の振る舞いがある。しかし、本論文の目的は、確率共振を示すことではない。示す必要性がないものをシミュレーションに含めることは、シミュレーションがより現実的になるという点ではメリットはあるが、デメリットのほうが多い。確率論的に計算してしまうと、1 試行のシミュレーション結果が典型的なものなのか、ごくまれにしか得られないものなのか分からない。したがって、一般的な結論を出すには、数回以上の同じシミュレーションを繰り返す必要がある。また、Fokker-Plank 方程式を用いれば、確率分布ごとモデルを数式化できるが、この方程式は扱いが難しく役立てることができなかった。

13.4 空間的拡散

シミュレーションでは細胞内反応系が均一な溶液であると仮定したが、実際の細胞では分子は局在しているのが一般的である。スパイン内の PSD 構造では、AMPA 受容体は GRIP [78]、mGluR 受容体と IP_3 受容体は homer でつなぎ止められている [12]。PSD 構造中には、シグナルタンパクが密集しており、迅速確実

にシナプスからのシグナルを細胞内に伝える役割を担っていると推測されている。本シミュレーションでは、スパイン内を細胞質を PSD とそれ以外の 2 つに分けた。なぜなら、 Ca^{2+} ダイナミクスモデルでは入力的时间差検出が主題であり、局在化の効果としてのシグナル伝達反応速度上昇と深い関連があったからである。

Homer の一部分を改変して、homer と IP_3 受容体の結合をなくすと、mGluR 受容体アゴニスト投与によるプルキンエ細胞の樹状突起の Ca^{2+} 増加のピーク時刻が遅くなり、ピーク値が低くなるという報告がある [96]。この実験の解釈を、homer 結合がなくなって mGluR 受容体と IP_3 受容体の距離が離れて、 IP_3 拡散により多くの時間を要するようになった、と好意的に考えれば、空間拡散をもっと考慮してコンパートメントを増やすべきだったと言えなくもない。しかし、 IP_3 の拡散定数は $283 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ [6]、スパインの直径は $1 \mu\text{m}$ であるから、 IP_3 はスパイン全体に数ミリ秒で行き渡る計算になる。また、この homer の実験は、その他の不確定要素が強すぎて、十分な反論になっていないと私は考える。Homer 結合によって、 IP_3 受容体の Ca^{2+} や IP_3 結合に対するパラメタ値が変化するという可能性も十分あるし、樹状突起の IP_3 と Ca^{2+} ダイナミクスはスパインとは異なる。

13.5 反応速度論や生化学パラメタの妥当性

シグナル伝達反応が、速度反応論に本当に従うのかという批判がある。私は、これらの批判を技術的批判と原理的批判の 2 種類に区別すべきと考える。

技術的批判は、現在の計測技術の限界から実際に細胞内で起こっている現象を正確に計測できないこと、人工的環境で測定された生化学パラメタを頼りにして数理モデルのパラメタを決めていることへの批判である。私は数理モデルで用いたパラメタ値が実際の細胞とは違うことはあり得ると考える。幸いなことに、1 分子イメージングなどにより、生化学反応の素過程を観測できるようになってきたので、現実的なパラメタ値は入手しやすくなっている。楽観的に考えれば、計測技術の発展によりこの問題は解決されるだろう。

原理的批判は、生体内の反応は特別なものであり、観測できるもの以上の生物らしさのようなものが存在するという立場である。この批判は現代版の生氣論と言えるだろう。生体内で起こっている化学反応を説明する法則が完全に知れてい

ることから考えると、ありそうでない。不思議に見える生命現象が、タンパク質という部品でできた精密機械の挙動の結果であることを具体的に示すのが、システム生物学の役割であると私は考えている。システム生物学の成果が積み重なるにしたいが、このような生気論が存在できる余地はだんだんなくなっていくだろう。

本論文の数値モデルでは、未知のパラメタが数多くあった。未知のパラメタについては、モデル作成者がシミュレーションが実験結果を再現できるように勝手に決めるしか方法がない。異なるパラメタ値が複数報告されていて、どれを選ぶべきかもモデル作成者が決めている。信頼性を客観的に示せるようなパラメタ探索の方法が開発され、標準的に使われるようになると理想的だろう。

また、知られているシグナル伝達経路の他に、別の機構があって、それが細胞機能を担っているのではないかという懸念がある。一般論として、この懸念は正しい。モデルを作るときに注意すべきは、完全ではないにせよ主要な経路はほぼ分かっている対象を選ぶべきである。Ca²⁺ ダイナミクスモデルに関しては、小脳 LTD において非常によく分かっている経路を扱い、未知の経路に原因を求めることが理不尽な状況であった。

結局、余計なものは付けない、無意味にモデルを複雑にしないというのが私の得た結論である。何をモデルに取りこんで何を取り込まないかは、モデルの対象と目的を熟慮して決めるべきである。これが、シグナル伝達の計算機シミュレーションの一番の難点だろう。

13.6 数値モデルの意義

最後に、数値モデルの意義について触れておきたい。数値モデル一般に対する否定的な意見として、モデルは必ずどこか間違っているのも意味がない、というものがある。モデルに間違いがあるのは当然で、それは現象を完全に理解していないからである。間違いを具体的に考えることで、やるべき実験や新しい仮説を見いだすことがモデルの役割である。モデルを作ろうとして、今までの実験結果を整理することだけでも意義がある。そもそも、完全に理解していれば、わざわざモデルを作って検証する必要はない。理解を深めるために、数値モデルを作成するのである。

業績

論文

Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells.

Tomokazu Doi, Shinya Kuroda, Takayuki Michikawa, Mitsuo Kawato
The Journal of Neuroscience 25(4): 950-961, 2005

国際学会

Spike-timing detection by calcium signaling pathways of cerebellar Purkinje cells in different forms of long-term depression.

Tomokazu Doi, Shinya Kuroda, Takayuki Michikawa, Mitsuo Kawato
Society for Neuroscience 33rd Annual Meeting, New Orleans, November 2003

Spontaneous activity of parallel fibers autoregulates the amount of AMPA receptors to elicit cerebellar LTD for supervised learning.

Tomokazu Doi, Shinya Kuroda, Takayuki Michikawa, Kenji Doya, Mitsuo Kawato
Society for Neuroscience 35th Annual Meeting, Washington DC, November 2005

解説記事

小脳長期抑圧に関するシグナル伝達経路のシミュレーション

尾崎裕一・土居智和・川人光男・黒田真也

実験医学、2002年9月、Vol. 20 No. 13、pp. 1879-1884

神経細胞における $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル経路のシミュレーション 小脳プルキンエ細胞が入力タイミングを検出する仕組み

土居智和・黒田真也・道川貴章・川人光男

蛋白質 核酸 酵素、2003年6月、Vol. 48 No. 7、pp. 817-822

国内会議

小脳プルキンエ細胞への入力タイミングを検出する Ca^{2+} 濃度に変換するシグナル伝達のシミュレーション

土居智和・黒田真也・道川貴章・川人光男

電気情報通信学会ニューロコンピューティング研究会、琉球大学、2002年6月

シナプス入力タイミングを検出するシグナル伝達のシステム解析

土居智和・黒田真也・道川貴章・川人光男

日本神経回路学会第12回全国大会、鳥取大学、2002年9月

IP_3 -dependent Ca^{2+} threshold dynamics detect spike-timing for synaptic plasticity in cerebellar Purkinje cells

土居智和・黒田真也・道川貴章・川人光男

第76回日本生化学会大会、パシフィコ横浜、2004年10月

小脳長期抑圧の入力選択性が自発発火頻度依存で調節される

土居智和・黒田真也・道川貴章・銅谷賢治・川人光男

日本神経回路学会第15回全国大会、鹿児島大学、2005年9月

招待発表

小脳シナプス可塑性の $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ シグナル伝達のシミュレーション

土居智和

研究会「生命科学における Informatics と Mathematics」、基礎生物学研究所、2003年3月

謝辞

はじめに、川人光男客員教授と銅谷賢治客員助教授に感謝いたします。私を長い目で見守っていただき、科学者としての訓練を存分に受けることができました。

共同研究者の東大特任助教授の黒田真也先生、東大医科学研究所の道川貴章先生に感謝します。黒田先生は気さくに何でも相談に乗っていただき、道川先生は、生物学実験者からの率直で厳しい意見を何度もいただきました。

石井信教授は、見えない所で私の研究生生活をサポートしてくださったと聞いています。

ATR 脳情報研究所の小笠原英明さんとは、日頃から楽しく研究することができました。

人材抑制ユニットの作村グループに感謝いたします。作村諭一特任助教授とは Hodgkin-Huxley 方程式や leaky-integrator モデルの経験を頼り、私のモデルの理解する手がかりを与えていただきました。五十嵐康伸君、塚田祐基君、本田直樹君、深田智史君とは、システム生物学の動向に情報交換し、彼らの常に積極的な行動には目を見張るものがありました。

ATR 脳情報研究所 CNB で同回生の田中沙織さん、杉本徳和君に感謝します。研究分野や研究ペースは異なるものの、存在そのものが知らず知らずのうちに切磋琢磨できる環境を作り上げていったのではないかと思います。戦友という表現が一番近いでしょうか。

参考文献

- [1] W. C. Abraham and M. F. Bear. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci*, 19(4):126–130, 1996.
- [2] C. E. Adkins and C. W. Taylor. Lateral inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by cytosolic Ca^{2+} . *Curr Biol*, 9(19):1115–1118, 1999.
- [3] A. Aiba, M. Kano, C. Chen, M. E. Stanton, G. D. Fox, K. Herrup, T. A. Zwingman, and S. Tonegawa. Deficient cerebellar long-term depression and impaired motor learning in mGluR1 mutant mice. *Cell*, 79(2):377–388, 1994.
- [4] M. S. Airaksinen, J. Eilers, O. Garaschuk, H. Thoenen, A. Konnerth, and M. Meyer. Ataxia and altered dendritic calcium signaling in mice carrying a targeted null mutation of the calbindin D28k gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4):1488–1493, 1997.
- [5] J. S. Albus. A theory of cerebellar function. *Math Biosci*, 10:25–61, 1971.
- [6] N. L. Allbritton, T. Meyer, and L. Stryer. Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258(5089):1812–1815, 1992.
- [7] D. Angeli, Jr. Ferrell, J. E., and E. D. Sontag. Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(7):1822–1827, 2004.
- [8] M. J. Berridge. Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1):13–26, 1998.
- [9] I. Bezprozvanny, J. Watras, and B. E. Ehrlich. Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*, 351(6329):751–754, 1991.

- [10] U. S. Bhalla and R. Iyengar. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science*, 283(5400):381–387, 1999.
- [11] U. S. Bhalla, P. T. Ram, and R. Iyengar. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science*, 297(5583):1018–1023, 2002.
- [12] P. R. Brakeman, A. A. Lanahan, R. O’Brien, K. Roche, C. A. Barnes, R. L. Huganir, and P. F. Worley. Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386(6622):284–288, 1997.
- [13] D. S. Bredt and S. H. Snyder. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8(1):3–11, 1992.
- [14] I. E. Brown and J. M. Bower. The influence of somatosensory cortex on climbing fiber responses in the lateral hemispheres of the rat cerebellum after peripheral tactile stimulation. *J Neurosci*, 22(15):6819–6829, 2002.
- [15] P. Chadderton, T. W. Margrie, and M. Häusser. Integration of quanta in cerebellar granule cells during sensory processing. *Nature*, 428(6985):856–860, 2004.
- [16] L. Chang and M. Karin. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824):37–40, 2001.
- [17] C. Chen and R. F. Thompson. Temporal specificity of long-term depression in parallel fiber-Purkinje synapses in rat cerebellar slice. *Learn Mem*, 2(3-4):185–198, 1995.
- [18] H. J. Chung, J. P. Steinberg, R. L. Huganir, and D. J. Linden. Requirement of AMPA receptor GluR2 phosphorylation for cerebellar long-term depression. *Science*, 300(5626):1751–1755, 2003.
- [19] H. J. Chung, J. Xia, R. H. Scannevin, X. Zhang, and R. L. Huganir. Phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR2 differentially regulates its

- interaction with PDZ domain-containing proteins. *J Neurosci*, 20(19):7258–7267, 2000.
- [20] M. Coesmans, J. T. Weber, C. I. De Zeeuw, and C. Hansel. Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron*, 44(4):691–700, 2004.
- [21] F. Conquet, Z. I. Bashir, C. H. Davies, H. Daniel, F. Ferraguti, F. Bordi, K. Franz-Bacon, A. Reggiani, V. Matarese, F. Conde, and et al. Motor deficit and impairment of synaptic plasticity in mice lacking mGluR1. *Nature*, 372(6503):237–243, 1994.
- [22] H. Daniel, C. Levenes, and F. Crepel. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. *Trends Neurosci*, 21(9):401–407, 1998.
- [23] E. De Schutter. Cerebellar long-term depression might normalize excitation of Purkinje cells: a hypothesis. *Trends Neurosci*, 18(7):291–295, 1995.
- [24] T. Doi, S. Kuroda, T. Michikawa, and M. Kawato. Inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca^{2+} threshold dynamics detect spike timing in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 25(4):950–961, 2005.
- [25] G. Dupont and C. Erneux. Simulations of the effects of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase and 5-phosphatase activities on Ca^{2+} oscillations. *Cell Calcium*, 22(5):321–331, 1997.
- [26] J. Eilers, G. J. Augustine, and A. Konnerth. Subthreshold synaptic Ca^{2+} signalling in fine dendrites and spines of cerebellar Purkinje neurons. *Nature*, 373(6510):155–158, 1995.
- [27] C. F. Ekerot and M. Kano. Stimulation parameters influencing climbing fibre induced long-term depression of parallel fibre synapses. *Neurosci Res*, 6(3):264–268, 1989.

- [28] S. Endo and T. Launey. ERKs regulate PKC-dependent synaptic depression and declustering of glutamate receptors in cerebellar Purkinje cells. *Neuropharmacology*, 45(6):863–872, 2003.
- [29] S. Endo, M. Suzuki, M. Sumi, A. C. Nairn, R. Morita, K. Yamakawa, P. Greengard, and M. Ito. Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(5):2467–2472, 1999.
- [30] J. C. Fiala, S. Grossberg, and D. Bullock. Metabotropic glutamate receptor activation in cerebellar Purkinje cells as substrate for adaptive timing of the classically conditioned eye-blink response. *J Neurosci*, 16(11):3760–3774, 1996.
- [31] L. Fierro, R. DiPolo, and I. Llano. Intracellular calcium clearance in Purkinje cell somata from rat cerebellar slices. *J Physiol*, 510 (Pt 2):499–512, 1998.
- [32] L. Fierro and I. Llano. High endogenous calcium buffering in Purkinje cells from rat cerebellar slices. *J Physiol*, 496 (Pt 3):617–625, 1996.
- [33] E. A. Finch and G. J. Augustine. Local calcium signalling by inositol-1,4,5-trisphosphate in Purkinje cell dendrites. *Nature*, 396(6713):753–756, 1998.
- [34] S. H. Francis, I. V. Turko, and J. D. Corbin. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 65:1–52, 2001.
- [35] K. M. Franks, C. F. Stevens, and T. J. Sejnowski. Independent sources of quantal variability at single glutamatergic synapses. *J Neurosci*, 23(8):3186–3195, 2003.

- [36] A. Fujiwara, K. Hirose, T. Yamazawa, and M. Iino. Reduced IP₃ sensitivity of IP₃ receptor in Purkinje neurons. *Neuroreport*, 12(12):2647–2651, 2001.
- [37] D. T. Gillespi. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem*, 81(25):2340–2361, 1977.
- [38] K. M. Harris and J. K. Stevens. Dendritic spines of rat cerebellar Purkinje cells: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J Neurosci*, 8(12):4455–4469, 1988.
- [39] N. A. Hartell. Strong activation of parallel fibers produces localized calcium transients and a form of LTD that spreads to distant synapses. *Neuron*, 16(3):601–610, 1996.
- [40] N. A. Hartell, S. Furuya, S. Jacoby, and D. Okada. Intercellular action of nitric oxide increases cGMP in cerebellar Purkinje cells. *Neuroreport*, 12(1):25–28, 2001.
- [41] R. J. Harvey, L. Morando, R. Rasetti, and P. Strata. Spontaneous electrical activity and dendritic spine size in mature cerebellar Purkinje cells. *Eur J Neurosci*, 21(7):1777–1784, 2005.
- [42] N. Hernjak, B. M. Slepchenko, K. Fernald, C. C. Fink, D. Fortin, II Moraru, J. Watras, and L. M. Loew. Modeling and analysis of calcium signaling events leading to long-term depression in cerebellar Purkinje cells. *Biophys J*, 89(6):3790–3806, 2005.
- [43] T. Inoue, K. Kato, K. Kohda, and K. Mikoshiba. Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is required for induction of long-term depression in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci*, 18(14):5366–5373, 1998.
- [44] R. F. Irvine and M. J. Schell. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nature Rev Mol Cell Biol*, 2(5):327–338, 2001.

- [45] M. Ito. Neurophysiological aspects of the cerebellar motor control system. *Int J Neurol*, 7(2):162–176, 1970.
- [46] M. Ito. *The cerebellum and neural control*. Reven Press, New York, 1984.
- [47] M. Ito. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol Rev*, 81(3):1143–1195, 2001.
- [48] M. Ito. The molecular organization of cerebellar long-term depression. *Nature Rev Neurosci*, 3(11):896–902, 2002.
- [49] H. Jiang, D. Wu, and M. I. Simon. Activation of phospholipase C β 4 by heterotrimeric GTP-binding proteins. *J Biol Chem*, 269(10):7593–7596, 1994.
- [50] D. M. Juilfs, S. Soderling, F. Burns, and J. A. Beavo. Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 135:67–104, 1999.
- [51] L. Karachot, R. T. Kado, and M. Ito. Stimulus parameters for induction of long-term depression in *in vitro* rat Purkinje cells. *Neurosci Res*, 21(2):161–168, 1994.
- [52] L. Karachot, Y. Shirai, R. Vigot, T. Yamamori, and M. Ito. Induction of long-term depression in cerebellar Purkinje cells requires a rapidly turned over protein. *J Neurophysiol*, 86(1):280–289, 2001.
- [53] M. Kawato. Internal models for motor control and trajectory planning. *Curr Opin Neurobiol*, 9(6):718–727, 1999.
- [54] K. Khodakhah and D. Ogden. Fast activation and inactivation of inositol trisphosphate-evoked Ca^{2+} release in rat cerebellar Purkinje neurones. *J Physiol*, 487(Pt 2):343–358, 1995.

- [55] J. J. Kim and R. F. Thompson. Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning. *Trends Neurosci*, 20(4):177–181, 1997.
- [56] A. Kirkwood, M. C. Rioult, and M. F. Bear. Experience-dependent modification of synaptic plasticity in visual cortex. *Nature*, 381(6582):526–528, 1996.
- [57] J. Klingauf and E. Neher. Modeling buffered Ca^{2+} diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys J*, 72(2 Pt 1):674–690, 1997.
- [58] W. Kolch, G. Heidecker, G. Kochs, R. Hummel, H. Vahidi, H. Mischak, G. Finkenzeller, D. Marme, and U. R. Rapp. Protein kinase C α activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, 364(6434):249–252, 1993.
- [59] H. J. Kotaleski and T. K. Blackwell. Sensitivity to interstimulus interval due to calcium interactions in the Purkinje cell spines. *Neurocomput*, 44:13–18, 2002.
- [60] S. Kuroda, N. Schweighofer, and M. Kawato. Exploration of signal transduction pathways in cerebellar long-term depression by kinetic simulation. *J Neurosci*, 21(15):5693–5702, 2001.
- [61] J. M. Kyriakis, H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358(6385):417–421, 1992.
- [62] T. Launey, S. Endo, R. Sakai, J. Harano, and M. Ito. Protein phosphatase 2A inhibition induces cerebellar long-term depression and declustering of synaptic AMPA receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(2):676–681, 2004.
- [63] C. C. Leslie. Properties and regulation of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem*, 272(27):16709–16712, 1997.

- [64] V. Lev-Ram, T. Jiang, J. Wood, D. S. Lawrence, and R. Y. Tsien. Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca^{2+} in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron*, 18(6):1025–1038, 1997.
- [65] V. Lev-Ram, S. T. Wong, D. R. Storm, and R. Y. Tsien. A new form of cerebellar long-term potentiation is postsynaptic and depends on nitric oxide but not cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8389–8393, 2002.
- [66] Y. X. Li and J. Rinzel. Equations for InsP_3 receptor-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations derived from a detailed kinetic model: a Hodgkin-Huxley like formalism. *J Theor Biol*, 166(4):461–73, 1994.
- [67] D. J. Linden. The expression of cerebellar LTD in culture is not associated with changes in AMPA-receptor kinetics, agonist affinity, or unitary conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(24):14066–14071, 2001.
- [68] D. J. Linden and J. A. Connor. Long-term synaptic depression. *Annu Rev Neurosci*, 18:319–357, 1995.
- [69] R. Llinas, E. J. Lang, and J. P. Welsh. The cerebellum, LTD, and memory: alternative views. *Learn Mem*, 3(6):445–455, 1997.
- [70] V. Luzzi, C. E. Sims, J. S. Soughayer, and N. L. Allbritton. The physiologic concentration of inositol 1,4,5-trisphosphate in the oocytes of *xenopus laevis*. *J Biol Chem*, 273(44):28657–28662, 1998.
- [71] R.J. MacGregor. Neural and brain modeling. In *Neural and Brain Modeling*. Academic Press, San Diego, 1987.
- [72] H. Maeda, G. C. Ellis-Davies, K. Ito, Y. Miyashita, and H. Kasai. Supralinear Ca^{2+} signaling by cooperative and mobile Ca^{2+} buffering in Purkinje neurons. *Neuron*, 24(4):989–1002, 1999.

- [73] R. Marais, Y. Light, C. Mason, H. Paterson, M. F. Olson, and C. J. Marshall. Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C. *Science*, 280(5360):109–112, 1998.
- [74] J. S. Marchant and C. W. Taylor. Cooperative activation of IP₃ receptors by sequential binding of IP₃ and Ca²⁺ safeguards against spontaneous activity. *Curr Biol*, 7(7):510–518, 1997.
- [75] D. Marr. A theory of cerebellar cortex. *J Physiol*, 202(2):437–470, 1969.
- [76] J. M. Mateos, R. Benitez, I. Elezgarai, J. J. Azkue, E. Lazaro, A. Osorio, A. Bilbao, F. Donate, R. Sarria, F. Conquet, F. Ferraguti, R. Kuhn, T. Knopfel, and P. Grandes. Immunolocalization of the mGluR1b splice variant of the metabotropic glutamate receptor 1 at parallel fiber-Purkinje cell synapses in the rat cerebellar cortex. *J Neurochem*, 74(3):1301–1309, 2000.
- [77] S. Matsuda, T. Launey, S. Mikawa, and H. Hirai. Disruption of AMPA receptor GluR2 clusters following long-term depression induction in cerebellar Purkinje neurons. *EMBO J*, 19(12):2765–2774, 2000.
- [78] S. Matsuda, S. Mikawa, and H. Hirai. Phosphorylation of serine-880 in GluR2 by protein kinase C prevents its C terminus from binding with glutamate receptor-interacting protein. *J Neurochem*, 73(4):1765–8, 1999.
- [79] M. Matsuzaki, G. C. Ellis-Davies, T. Nemoto, Y. Miyashita, M. Iino, and H. Kasai. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neurosci*, 4(11):1086–1092, 2001.
- [80] H. Miyakawa, V. Lev-Ram, N. Lasser-Ross, and W. N. Ross. Calcium transients evoked by climbing fiber and parallel fiber synaptic inputs in guinea pig cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol*, 68(4):1178–1189, 1992.

- [81] M. Miyata, E. A. Finch, L. Khiroug, K. Hashimoto, S. Hayasaka, S. I. Oda, M. Inouye, Y. Takagishi, G. J. Augustine, and M. Kano. Local calcium release in dendritic spines required for long-term synaptic depression. *Neuron*, 28(1):233–244, 2000.
- [82] R. M. Napper and R. J. Harvey. Number of parallel fiber synapses on an individual Purkinje cell in the cerebellum of the rat. *J Comp Neurol*, 274(2):168–77, 1988.
- [83] E. Oancea and T. Meyer. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*, 95(3):307–318, 1998.
- [84] Y. Okubo, S. Kakizawa, K. Hirose, and M. Iino. Cross talk between metabotropic and ionotropic glutamate receptor-mediated signaling in parallel fiber-induced inositol 1,4,5-trisphosphate production in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci*, 24(43):9513–9520, 2004.
- [85] I. Perez-Otano and M. D. Ehlers. Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci*, 28(5):229–238, 2005.
- [86] C. R. Rose and A. Konnerth. Stores not just for storage. Intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron*, 31(4):519–522, 2001.
- [87] B. L. Sabatini, T. G. Oertner, and K. Svoboda. The life cycle of Ca^{2+} ions in dendritic spines. *Neuron*, 33(3):439–452, 2002.
- [88] B. L. Sabatini and K. Svoboda. Analysis of calcium channels in single spines using optical fluctuation analysis. *Nature*, 408(6812):589–593, 2000.
- [89] B. G. Schreurs, M. M. Oh, and D. L. Alkon. Pairing-specific long-term depression of Purkinje cell excitatory postsynaptic potentials results from a classical conditioning procedure in the rabbit cerebellar slice. *J Neurophysiol*, 75(3):1051–1060, 1996.

- [90] K. Shibuki and S. Kimura. Dynamic properties of nitric oxide release from parallel fibres in rat cerebellar slices. *J Physiol*, 498 (Pt 2):443–452, 1997.
- [91] H. Z. Shouval, M. F. Bear, and L. N. Cooper. A unified model of NMDA receptor-dependent bidirectional synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16):10831–10836, 2002.
- [92] G. Stuart and M. Häusser. Initiation and spread of sodium action potentials in cerebellar Purkinje cells. *Neuron*, 13(3):703–712, 1994.
- [93] T. Sugiyama, M. Hirono, K. Suzuki, Y. Nakamura, A. Aiba, K. Nakamura, K. Nakao, M. Katsuki, and T. Yoshioka. Localization of phospholipase C β isozymes in the mouse cerebellum. *Biochem Biophys Res Commun*, 265(2):473–478, 1999.
- [94] H. Sun, C. H. Charles, L. F. Lau, and N. K. Tonks. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. *Cell*, 75(3):487–493, 1993.
- [95] J. Tanaka, S. Nakagawa, E. Kushiya, M. Yamasaki, M. Fukaya, T. Iwanaga, M. I. Simon, K. Sakimura, M. Kano, and M. Watanabe. Gq protein α subunits G α q and G α 11 are localized at postsynaptic extra-junctional membrane of cerebellar Purkinje cells and hippocampal pyramidal cells. *Eur J Neurosci*, 12(3):781–792, 2000.
- [96] J. C. Tu, B. Xiao, J. P. Yuan, A. A. Lanahan, K. Leoffert, M. Li, D. J. Linden, and P. F. Worley. Homer binds a novel proline-rich motif and links group 1 metabotropic glutamate receptors with IP₃ receptors. *Neuron*, 21(4):717–726, 1998.
- [97] M. Vecellio, B. Schwaller, M. Meyer, W. Hunziker, and M. R. Celio. Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28k and parvalbumin knock-out mice. *Eur J Neurosci*, 12(3):945–954, 2000.

- [98] P. Vetter, A. Roth, and M. Häusser. Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. *J Neurophysiol*, 85(2):926–937, 2001.
- [99] S. S. Wang, W. Denk, and M. Häusser. Coincidence detection in single dendritic spines mediated by calcium release. *Nature Neurosci*, 3(12):1266–1273, 2000.
- [100] X. Wang and P. J. Robinson. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neurochem*, 68(2):443–456, 1997.
- [101] Y. T. Wang and D. J. Linden. Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron*, 25(3):635–647, 2000.
- [102] T. Xu, M. Naraghi, H. Kang, and E. Neher. Kinetic studies of Ca^{2+} binding and Ca^{2+} clearance in the cytosol of adrenal chromaffin cells. *Biophys J*, 73(1):532–545, 1997.
- [103] K. Yamamoto, Y. Kobayashi, A. Takemura, K. Kawano, and M. Kawato. Computational studies on acquisition and adaptation of ocular following responses based on cerebellar synaptic plasticity. *J Neurophysiol*, 87(3):1554–1571, 2002.
- [104] L. C. Yeung, H. Z. Shouval, B. S. Blais, and L. N. Cooper. Synaptic homeostasis and input selectivity follow from a calcium-dependent plasticity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14943–14948, 2004.
- [105] H. M. Zhao, R. J. Wenthold, and R. S. Petralia. Glutamate receptor targeting to synaptic populations on Purkinje cells is developmentally regulated. *J Neurosci*, 18(14):5517–5528, 1998.

付録

A. シグナル伝達反応の詳細図

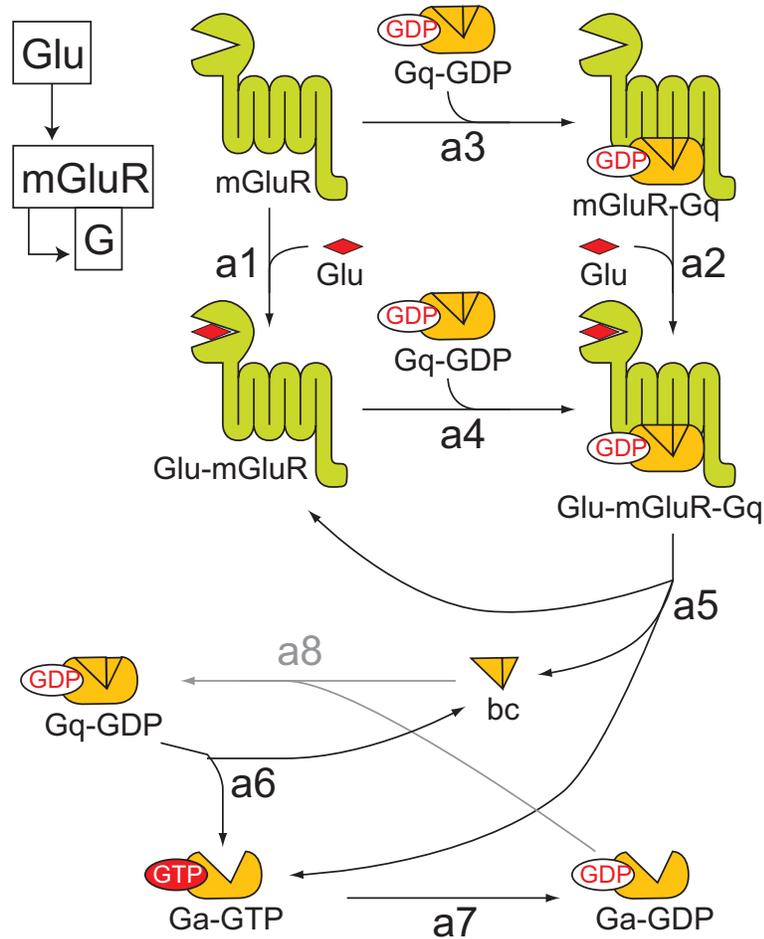


図 42 グルタミン酸は mGluR 受容体と結合して、mGluR 受容体は Gq を活性化する。シナプス間隙にグルタミン酸が放出されると、グルタミン酸は mGluR 受容体に結合する。活性化された mGluR 受容体は Gq と結合し、Gq の GDP が GTP に交換する反応を速める。活性化された Gq は $G\alpha$ サブユニットと $G\beta\gamma$ 複合体に分裂する。調べた限りでは、Fay *et al.*, (1991) *Biochemistry* 30:5066-5075 だけが G タンパク共役受容体の酵素活性を定量的に測定した唯一の論文で、それによると Gq の活性化は非常に遅い。

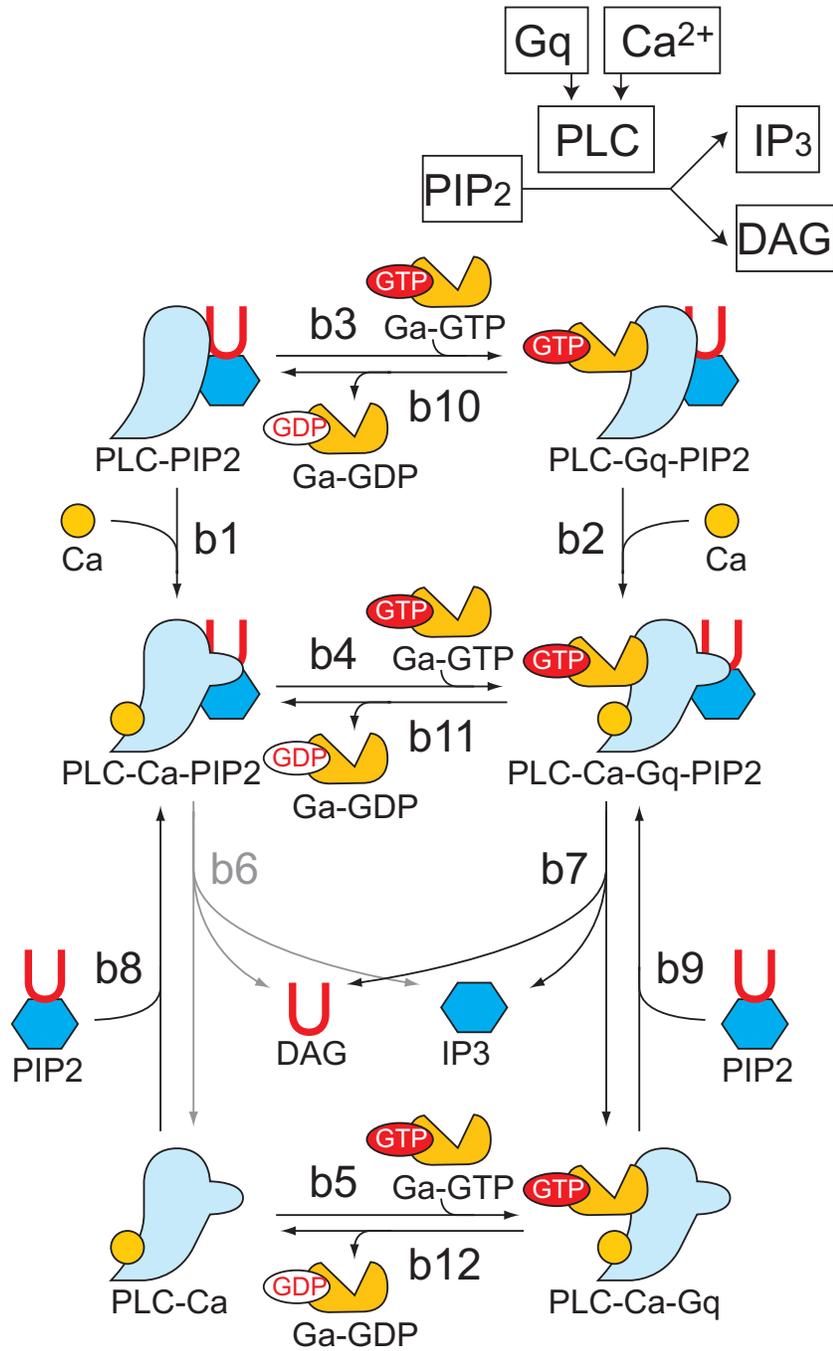


図 43 Gq と結合した PLC β が IP₃ を産生する。Gq α サブユニットが PLC β と結合すると、PLC β が IP₃ を産生する効率が上がる。また、PLC β は GAP (GTPase activating protein) 活性があり、Gq α の ATP 分解作用を数千倍の効率で促進させる。

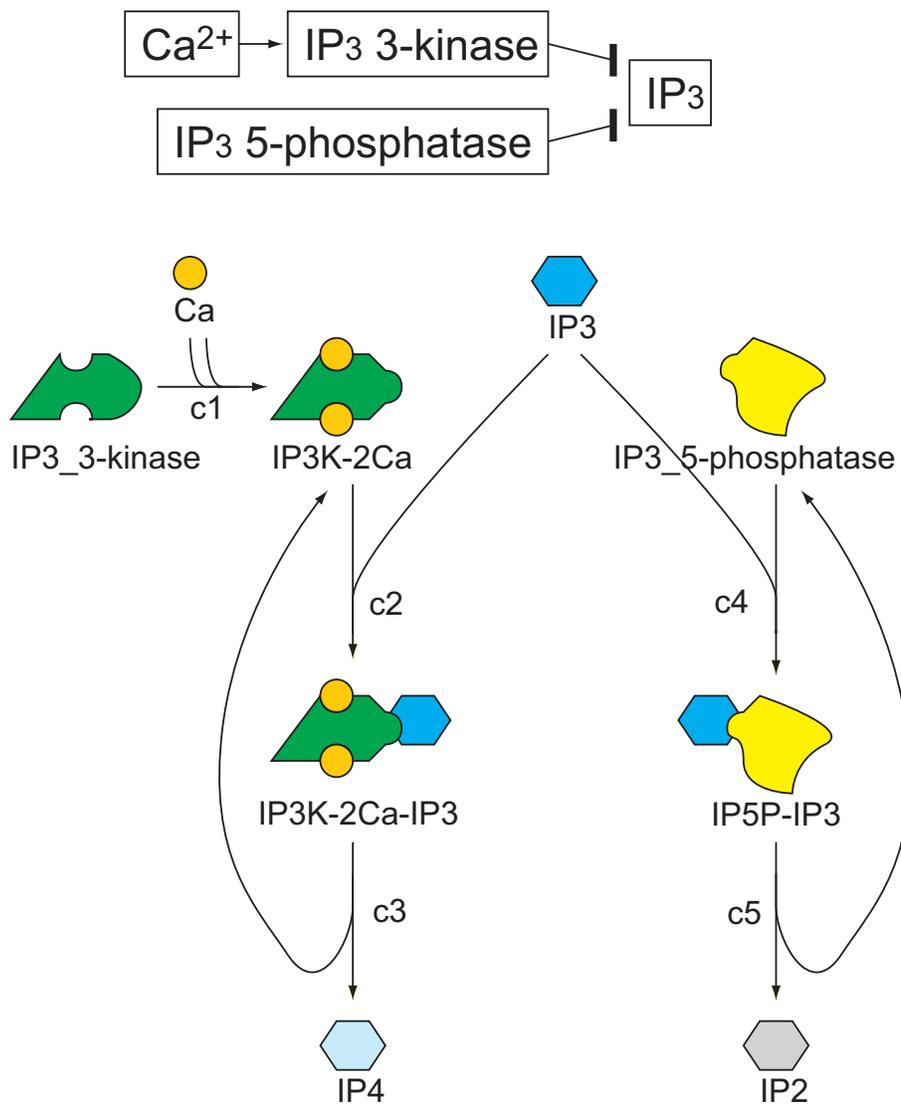


図 44 IP₃ 分解については、シミュレーション論文 (Dunplot and Erneux (1997) *Cell Calcium* 22:321-331) に詳しい解説がある。イノシトールリン酸の代謝については、Irvine and Schell (2001) *Nature Rev Mol Cell Biol* 2:327-338 を参考にすると良い。

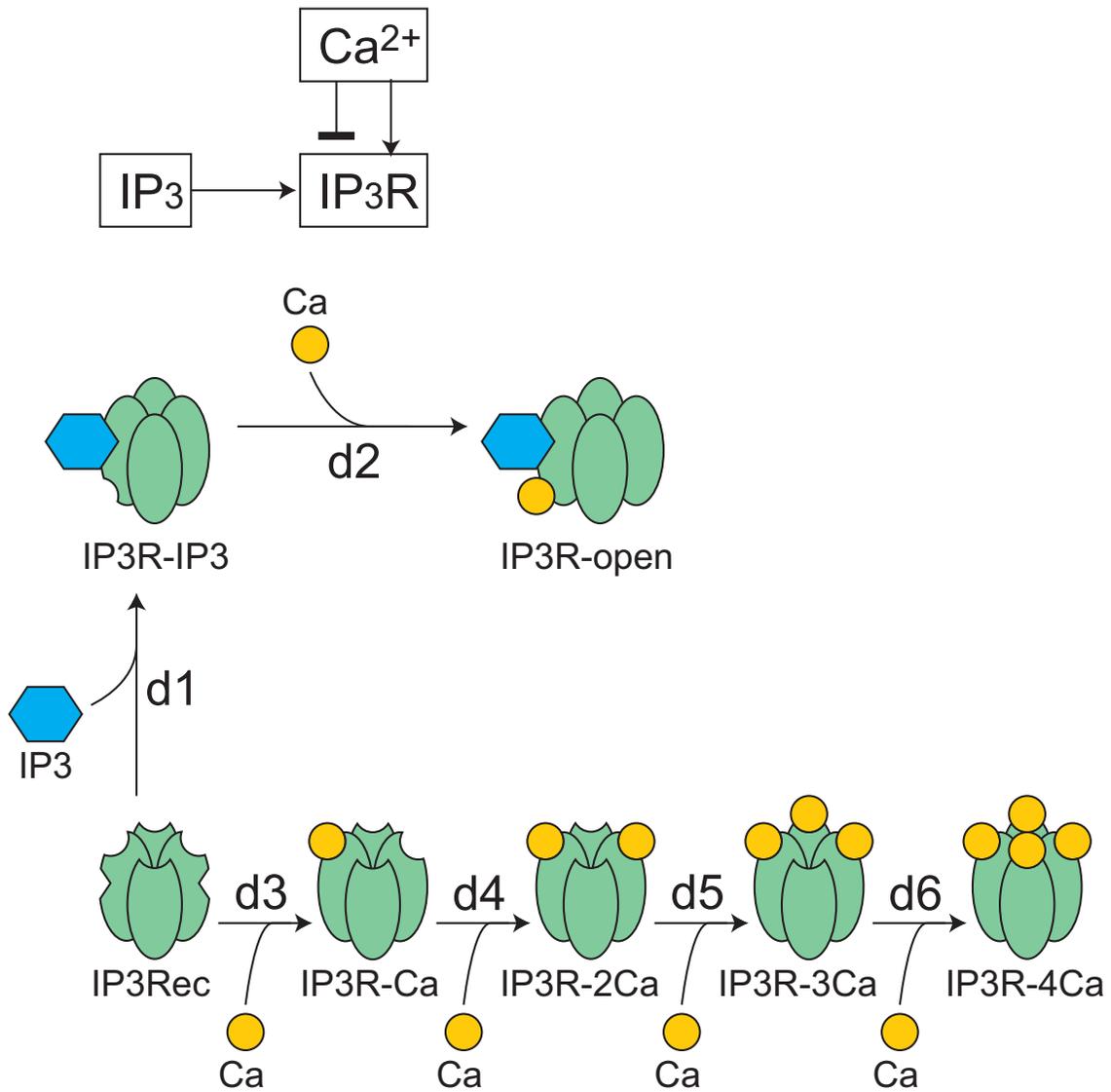


図 45 Adkins and Taylor (1999) *Curr Biol* 9:1115-1118 の概念的なモデルにもとづいて IP₃ 受容体モデルを作成した。IP₃ 受容体が開くには、IP₃ と Ca²⁺ がこの順序で結合する必要がある。IP₃ 結合は露出される Ca²⁺ 依存の部位を Ca²⁺ 不活性化から Ca²⁺ 活性化へ切り替える。

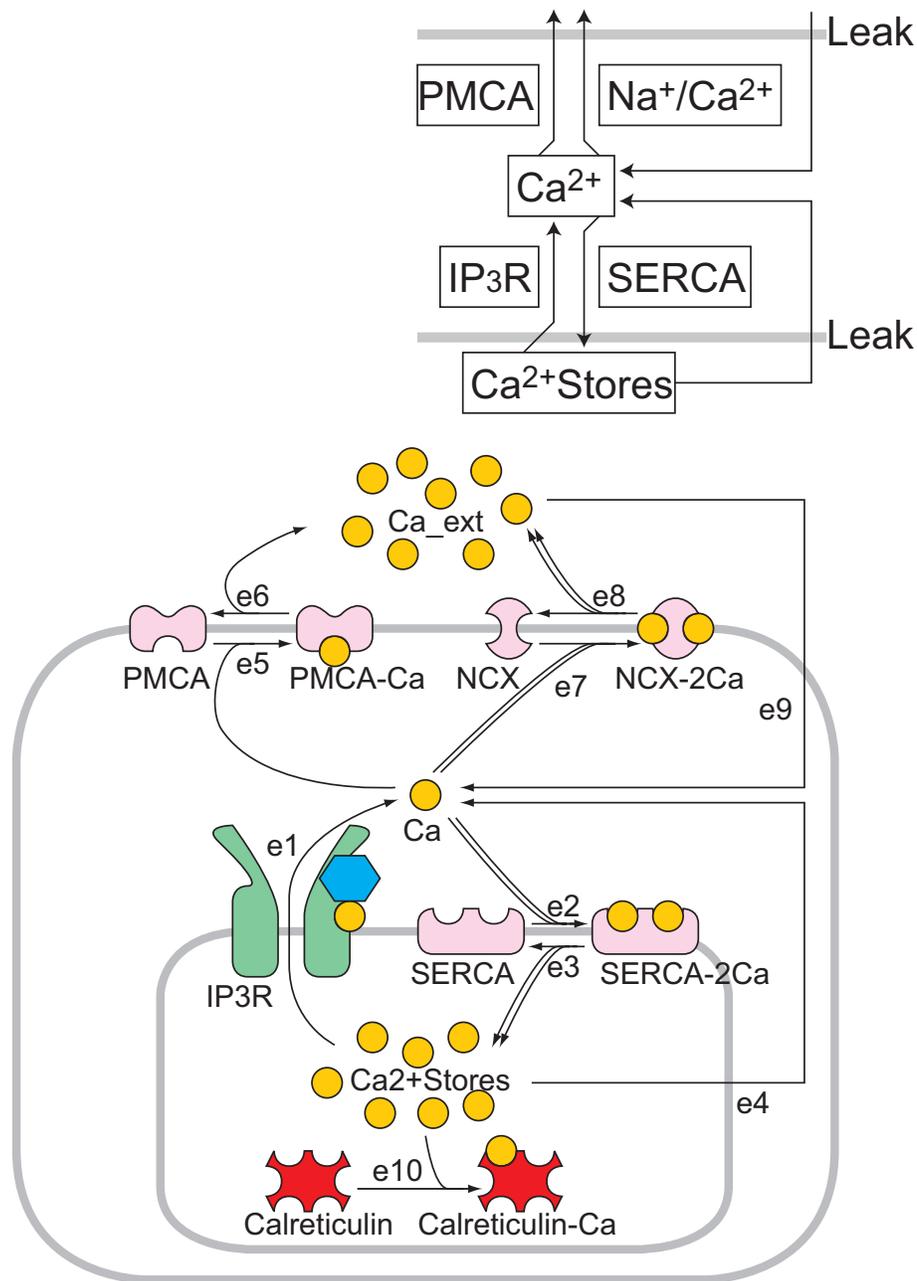


図 46 Ca^{2+} の膜を隔てた移動は、 IP_3 による Ca^{2+} 放出、細胞膜と小胞膜からの Ca^{2+} 漏れ、 Ca^{2+} (SERCA と PMCA) と $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) による Ca^{2+} 汲み出しである。 Ca^{2+} はスパイン首部を通して拡散しないとしている。

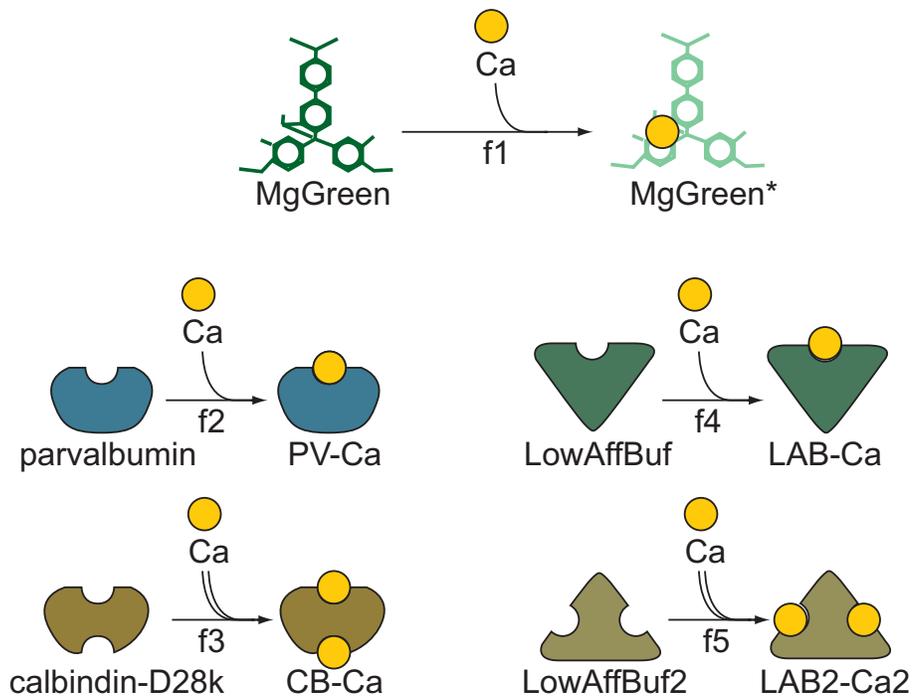
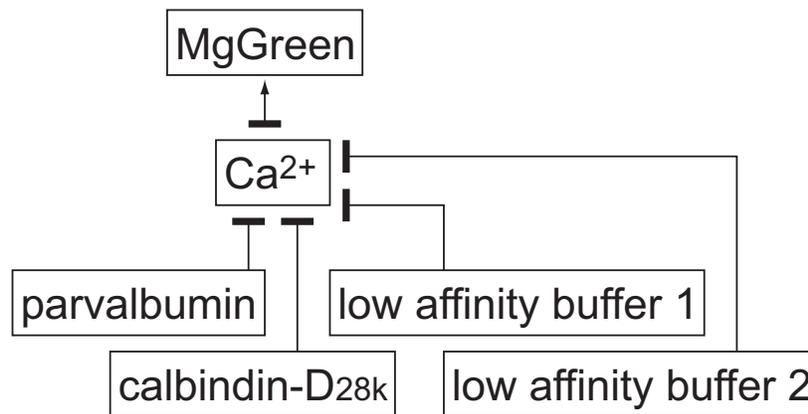


図 47 細胞内では、99%の Ca^{2+} イオンは何らかの内因性 Ca^{2+} バッファーと結合している。特に小脳プルキンエ細胞では、 Ca^{2+} バッファーが高濃度で存在し、結合比 (binding ratio) は 1,000 以上である (Fierro and Llano (1996) *J Physiol* 496:617-625)。その上、 Ca^{2+} 指示薬は外因性バッファーとして働く。細胞内 Ca^{2+} 濃度ごとの結合比は、Maeda *et al.* (1999) *Neuron* 24:989-1002 で詳しく調べられている。

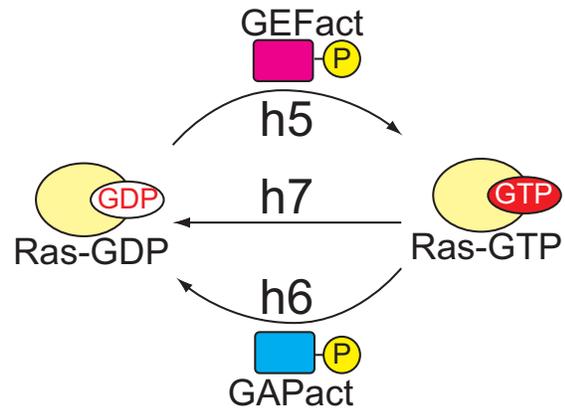
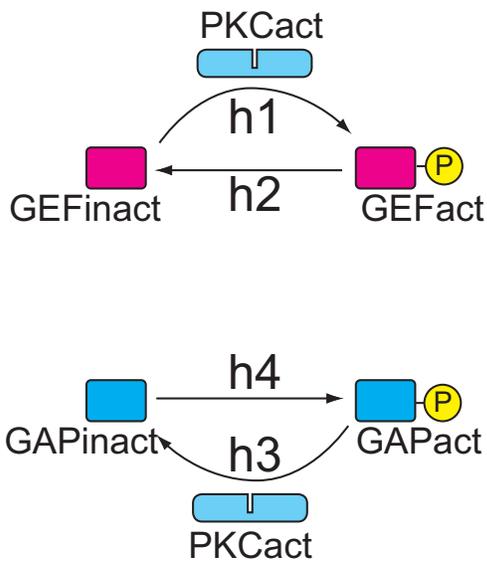
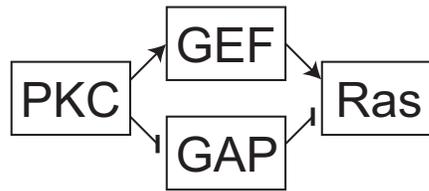


図 49 黒田らのモデル (Kuroda *et al.*, (2000) *J Neurosci* 21:5693-5702) では、PKC が直接 Raf をリン酸化するとしていた。最近、PKC を刺激すると、Raf は Ras-GTP と結合することで活性化することが示されたので (Marais *et al.*, (1998) *Science* 5360:109-112)、完全版モデルでは、PKC は GEF と GAP を介して Ras を活性化させるとした。

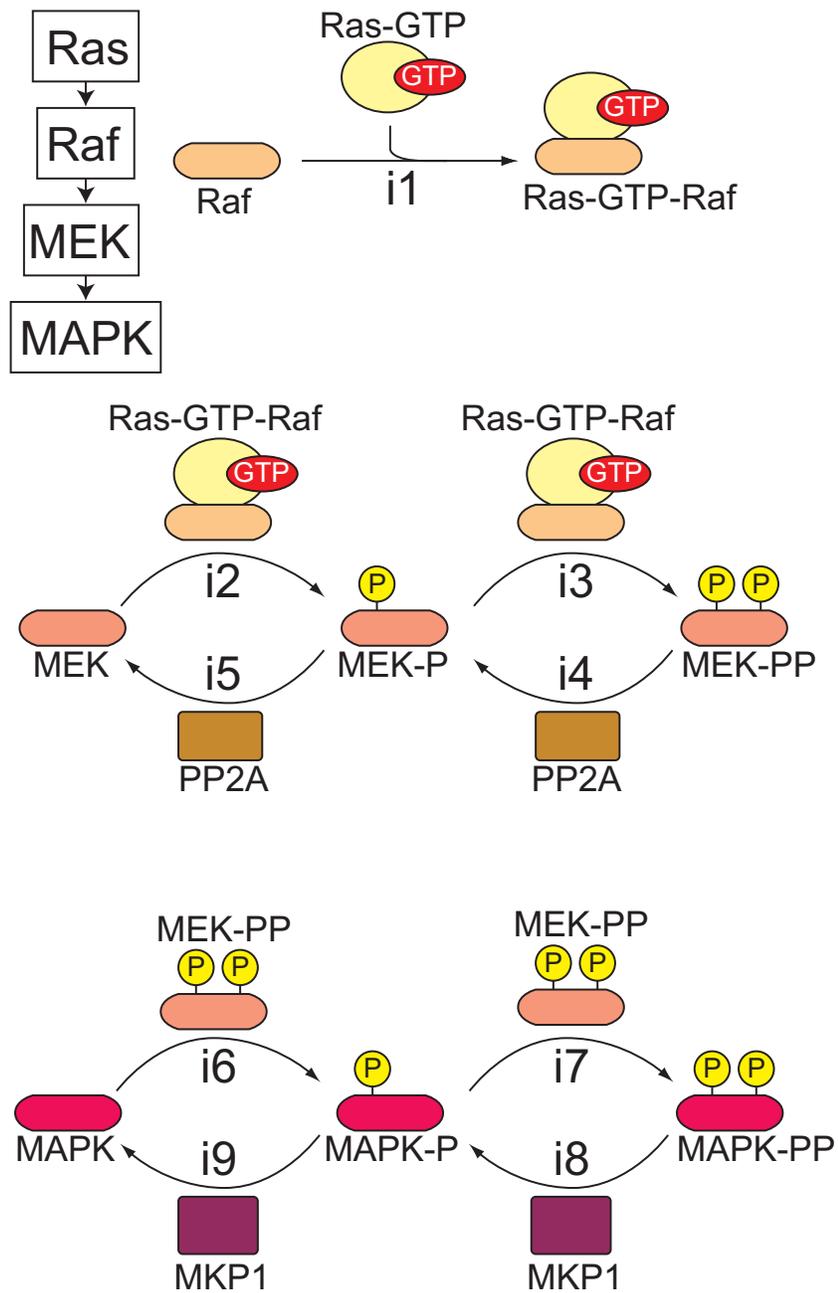


図 50 MAPK カスケードは徹底的に細胞現象が調べられているにもかかわらず、生化学パラメタについてはほとんど報告がない。もしカスケード反応が刺激に対して高い Hill 係数を持つ応答をするならば、酵素濃度は K_m のあたりである必要がある。

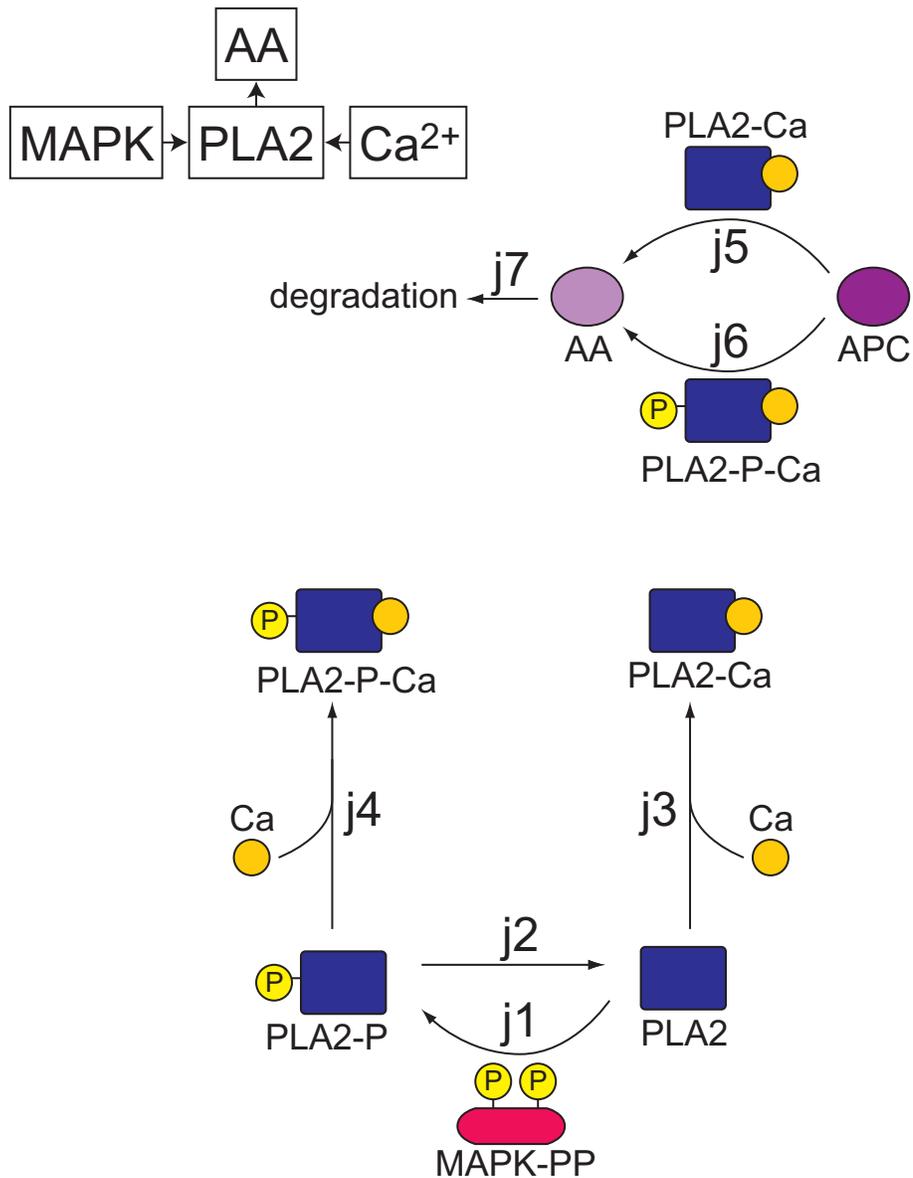


図 51 PLA₂ の活性は、Ca²⁺ 結合と MAPK によるリン酸化により増幅される。黒田らのモデル (Kuroda *et al.*, (2000) *J Neurosci* 21:5693-5702) で入っていた DAG との結合は、PLA₂ は DAG 以外のリン脂質と結合して活性を持つので特に DAG に着目する理由がないので、モデルから外した。

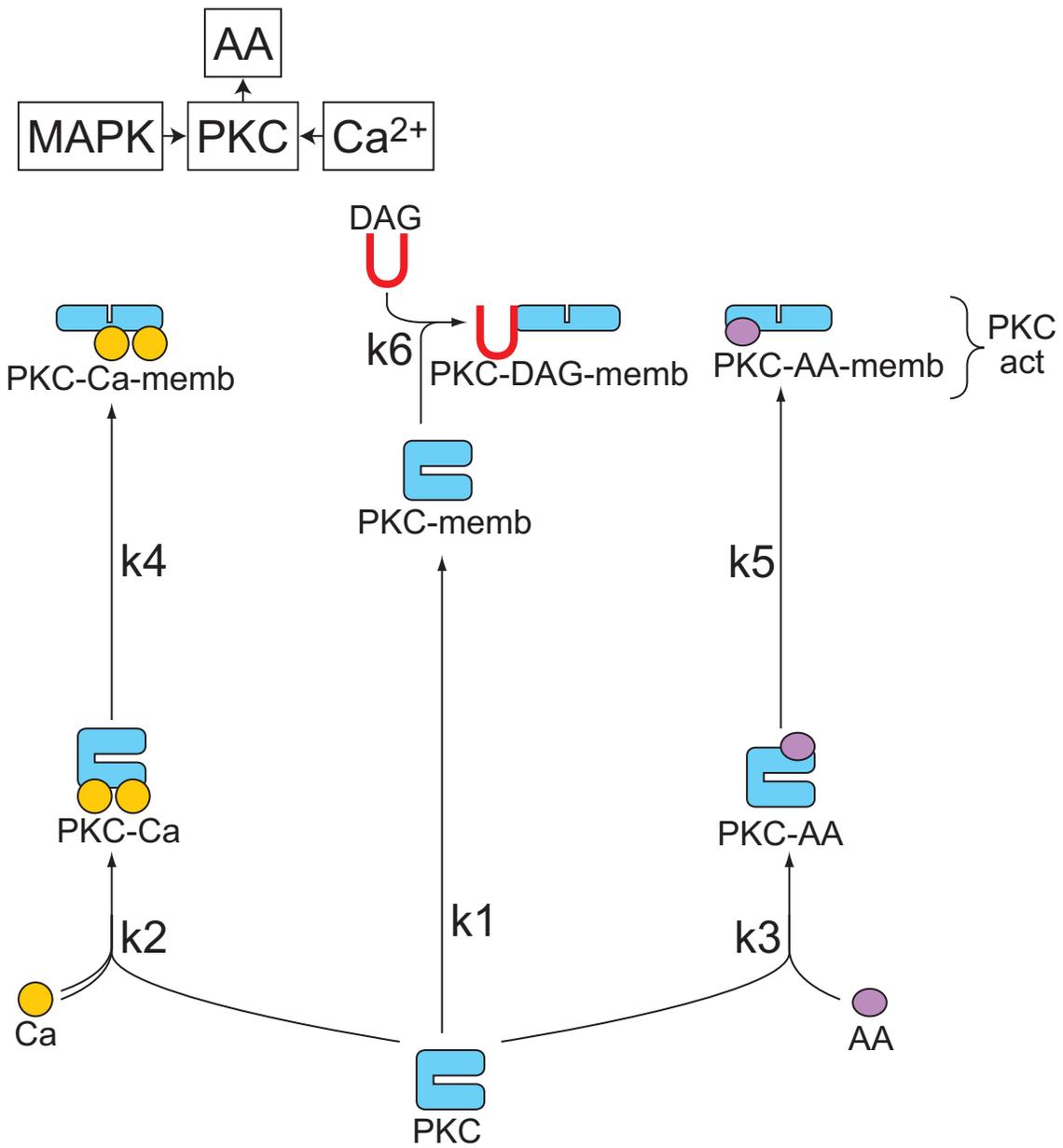


図 52 PKC は、 Ca^{2+} 、DAG、アラキドン酸によって活性化される。モデルでは、 Ca^{2+} 、DAG、アラキドン酸のどれか 1 つ結合すると同一の活性量を持つとした。活性化されると PKC は細胞質から細胞膜へ移行する。

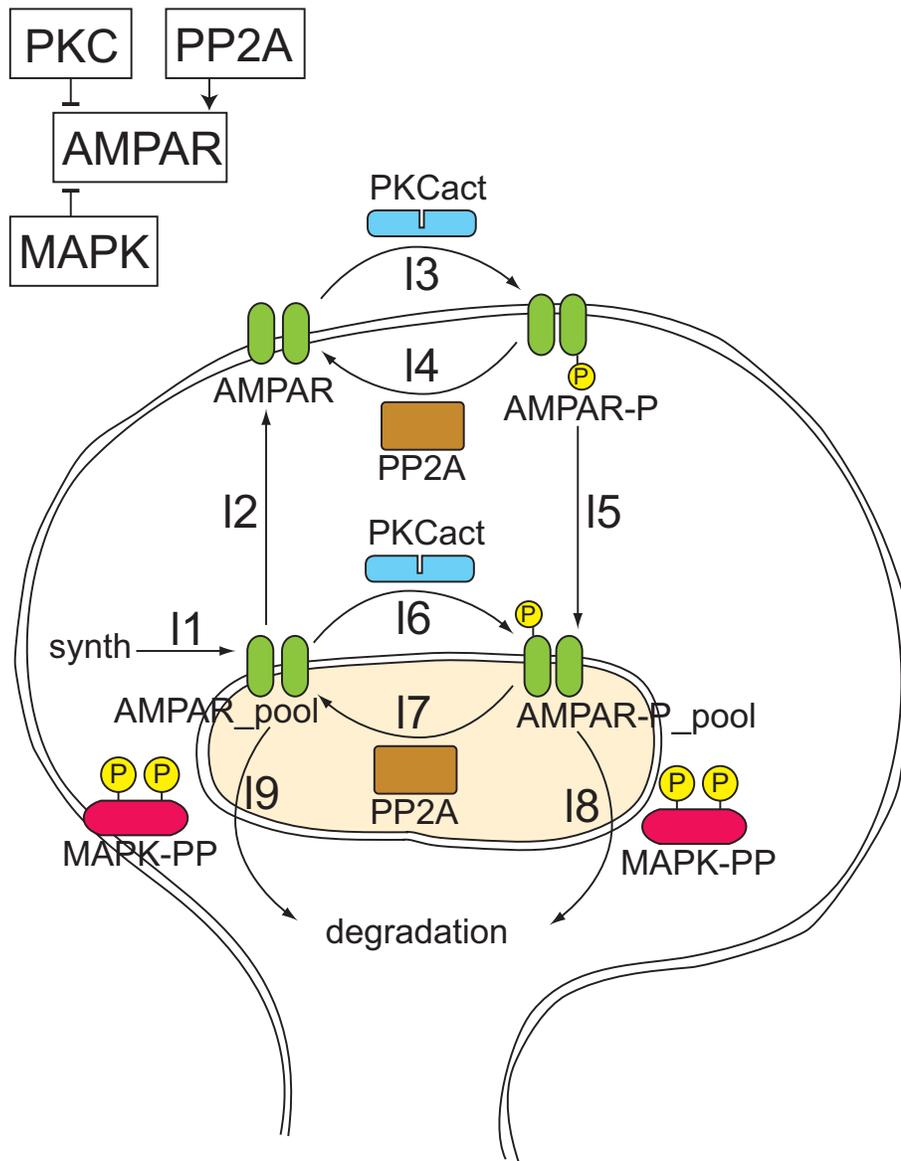


図 53 AMPA 受容体は PKC によってリン酸化され、PP2A によって脱リン酸化される。シナプス膜上のリン酸化された AMPA 受容体は変わらず機能する。リン酸化は AMPA 受容体の細胞内取り込みを誘導する。MAPK 活性化が LTD 保持に不可欠である。モデルでは、MAPK が直接細胞質内の AMPA 受容体数を減少させるとした。MAPK 活性化後の遺伝子発現が LTD 保持に必要なだが、どの遺伝子が LTD に働くのか不明だからである。

B. パラメタ表

B.1 分子濃度パラメタ

ID	グループ	分子名	個数	総個数	濃度 (μM)	総濃度	説明
A1	mGluR	Glu	0	300	0	250	シナプス間隙から放出されたグルタミン酸はミリ秒単位で回収されるはずである。例えば、Takechi <i>et al.</i> , (1998) <i>Nature</i> 396:757-760 によると、高頻度刺激 (100 Hz) でも、EPSC 応答が個別に観察される。したがって、グルタミン酸の減衰時定数は 5 ミリ秒と見積もった。mGluR 受容体と作用するグルタミン酸の初期個数は 300 とした。mGluR 受容体はスパインの端に局在しており、端は中央部よりも神経伝達物質濃度が低い (Franks <i>et al.</i> , (2003) <i>J Neurosci</i> 23:3186-3195)。このグルタミン酸量はほとんどの mGluR 受容体を活性化するのに十分なようである。
A2	mGluR	mGluR	16	26	13.333	21.667	代謝型グルタミン酸受容体 1 型。Mateos <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurochem</i> 74:1301-1309 によると、プルキンエ細胞のスパインの幅は $764.29 \pm 230.81 \text{ nm}$ で、mGluR 受容体 1a 型の密度は $30.20 \pm 2.14/\mu\text{m}^2$ 、mGluR 受容体 1b 型の密度は $15.06 \pm 0.83/\mu\text{m}^2$ である。したがって、mGluR 受容体の個数は 26 個にした。
A3	mGluR	mGluR-Glu	0	26	0	21.667	グルタミン酸結合によって活性化された mGluR 受容体。
A4	mGluR	Gq-GDP	52	60	43.333	50	三量型 G タンパク Gq 型。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、細胞内の Gq は $1.0 \mu\text{M}$ としている。スパインの体積は $0.1 \mu\text{m}^3$ なので、スパイン内の Gq の個数は 60 になる。Gq は PSD に局在しており、スパイン全体の体積は PSD の 50 倍なので、PSD での濃度は $50 \mu\text{M}$ になる。
A5	mGluR	mGluR-Gq	10	26	8.333	15	グルタミン酸なしで mGluR 受容体が Gq に結合した状態。mGluR 受容体と Gq が結合体を作るにはリガンド刺激の前なのか (K_d 値が小さい場合)、それともリガンド刺激で mGluR 受容体が Gq に結合するようになるのか (K_d が大きい場合) よく分かっていない。このモデルでは、中庸をとって、半分の mGluR 受容体がグルタミン酸放出前に Gq と結合しているとしている。
A6	mGluR	Glu-mGluR-Gq	0	26	0	21.667	グルタミン酸-mGluR 受容体-Gq 複合体が Gq を活性化する遷移状態。
A7	mGluR	Ga-GTP	0	60	0	50	活性化された Gq α サブユニット。Gq-GTP は PLC β と結合して、PLC β の IP $_3$ 産生効率を増大させる。
A8	mGluR	Gbc	0	60	0	50	G タンパク $\beta\gamma$ 複合体。このシミュレーションでは、G $\beta\gamma$ によって活性化されるタンパク質はない。
A9	mGluR	Ga-GDP	0	60	0	50	不活性化 Gq α サブユニット。Ga-GDP は迅速に G $\beta\gamma$ と結合して三量体を形成する。
B1	PLC	PIP2	5000	5000	4166.7	4166.7	ホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸。細胞の分子生物学第 4 版によると、5,000,000 個の脂質分子が細胞膜の $1 \mu\text{m}^2$ に存在する。PIP $_2$ は少数派の脂質なので (1%以下)、PSD 上の PIP $_2$ の個数を 5,000 とした。
B2	PLC	PLC-PIP2	42	50	35	41.667	PLC β のサブタイプ 4 型。PLC β は Ca $^{2+}$ によって活性化される前に PIP $_2$ と結合しているとモデル化した。PIP $_2$ 濃度は非常に高いのでほぼ全ての PLC β が PIP $_2$ と結合していると考えられるからである。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、細胞で $0.8 \mu\text{M}$ の PLC β があるとされている。スパインの体積は $0.1 \mu\text{m}^3$ なので、スパイン内の PLC β の個数は 50 になる。PLC β は PSD に局在しており、スパイン全体の体積は PSD の 50 倍なので、PSD での濃度は $42 \mu\text{M}$ になる。
B3	PLC	PLC-PIP2-Ca	7.5	50	6.25	41.667	Gq がないと、PLC β の活性は非常に低い。
B4	PLC	PLC-PIP2-Gq	0	50	0	41.667	この状態では酵素活性はない。PLC β は活性化に Ca $^{2+}$ が必要である。
B5	PLC	PLC-PIP2-Ca-Gq	0	480	0	41.667	完全活性化状態の PLC β 。PLC β は PIP $_2$ を DAG と IP $_3$ に加水分解する。PLC β 4 活性化は Gq 依存であるが、他の PLC β サブタイプはそうでないものもある。
B6	PLC	PLC-Ca	0.5	50	0	41.667	PIP $_2$ と結合していない、PLC β の遷移状態。静止状態では、PLC β は PIP $_2$ と結合するとしている。
B7	PLC	PLC-Ca-Gq	0	50	0	41.667	
B8	PLC	DAG	0	0	0	0	ジアシルグリセロールは PKC を活性化させる。
B9	PLC	IP3_PSD	0.12	12	0.1	10	IP $_3$ は PSD の PLC β によって産生され、細胞質に拡散する。

ID	グループ	分子名	個数	総個数	濃度 (μM)	総濃度	説明
C1	IP3deg	IP3 _{spine}	6	600	0.1	10	シミュレーションでは、静止状態の IP ₃ 濃度を 0.1 μM とした。生きた細胞の IP ₃ 濃度の計測は困難で、唯一の報告は Luzzi <i>et al.</i> , (1998) <i>J Biol Chem</i> 273:28657-28662 である。そこでは、キャピラリー電気泳動を用いて <i>Xenopus</i> 卵の IP ₃ 濃度は 0.04 μM であると算出している。
C2	IP3deg	IP3 _{3-kinase}	52	54	0.86667	0.9	IP ₃ 3-キナーゼ (IP3K) は、IP ₃ を IP ₄ にリン酸化する。Takazawa <i>et al.</i> , (1989) <i>Biochem J</i> 261:483-488 では、700 g の牛脳組織から 0.020 mg のタンパク質が純化された。回収率は 4.4% で分子量は 35,000。組織密度を 1 kg/liter とすると 0.020 mg x (100%/4.4%) / (35000 g/mol) / 0.7 liter = 0.019 μM となる。この酵素はブルキンエ細胞樹状突起に多く局在化している (Yamada <i>et al.</i> , (1993) <i>Brain Res</i> 606:335-340; Go <i>et al.</i> , (1993) <i>Neurosci Lett</i> 158:135-138)。したがって、IP3K 濃度を 0.9 μM まで増加させた。
C3	IP3deg	IP3K-2Ca	2	54	0.033333	0.9	Ca ²⁺ と結合した状態の IP3K。
C4	IP3deg	IP3K-2Ca	0	54	0.033333	0.9	Ca ²⁺ と IP ₃ と結合した状態の IP3K。
C5	IP3deg	IP3 _{5-phos}	58.8	60	0.98	1	IP ₃ 5-ホスファターゼ (IP5P) は IP ₃ を IP ₂ に脱リン酸化する。Verjans <i>et al.</i> , (1992) <i>Eur J Biochem</i> 204:1083-1087 では、2 kg の脳組織から 0.806 mg の IP5P が得られた。回収率は 15% で分子量は 43,000。組織密度を 1 kg/liter とすると、0.806 mg x (100%/15%) / (43000 g/mol) / 2 liter brain = 0.06 μM となる。抗体を用いた研究では、この酵素はブルキンエ細胞に高く発現している (De Smedt <i>et al.</i> , (1996) <i>J Biol Chem</i> 271:10419-10424)。したがって、IP5P 濃度を 1 μM に増加させた。
C6	IP3deg	IP5P-IP3	1.2	60	0.02	1	IP5P と IP ₃ が結合した遷移状態。
D1	IP3R	IP3Rec	14.22	16	0.237	0.26667	IP ₃ 受容体 1 型はブルキンエ細胞に高く発現している。Otsu <i>et al.</i> , (1990) <i>Cell Struct Function</i> 15:163-173 の PF スライド断面図で 16 個の抗体金コロイドの点が数えられた。スライスの厚さはスラインの 1/4 で、IP ₃ 受容体は同性四量体であるから、PF スラインの IP ₃ 受容体個数は 16 個 (=16 / (1/4) / 4) と算出される。
D2	IP3R	IP3R-IP3	0.06	16	0.1	0.26667	IP ₃ と結合した IP ₃ 受容体。本研究の IP ₃ 受容体モデルでは、IP ₃ 結合によって IP ₃ 受容体は Ca ²⁺ に活性化を受けるようになるとしている。
D3	IP3R	IP3R _{open}	0.01	16	0.00016667	0.26667	開状態の IP ₃ 受容体。
D4	IP3R	IP3R-Ca	1.5	16	0.025	0.26667	Ca ²⁺ イオンが 1 個結合した IP ₃ 受容体の不活性化状態。
D5	IP3R	IP3R-2Ca	0.18	16	0.003	0.26667	Ca ²⁺ イオンが 2 個結合した IP ₃ 受容体の不活性化状態。
D6	IP3R	IP3R-3Ca	0.03	16	0.0005	0.26667	Ca ²⁺ イオンが 3 個結合した IP ₃ 受容体の不活性化状態。
D7	IP3R	IP3R-4Ca	0	16	0	0.26667	Ca ²⁺ イオンが 4 個結合した IP ₃ 受容体の不活性化状態。
E1	CaReg	CaSpine	3.6	3.6	0.06	0.06	遊離細胞内 Ca ²⁺ 濃度 ([Ca ²⁺] _i)。静止状態の [Ca ²⁺] _i は 0.06 μM とした。
E2	CaReg	Ca2+PSD	0.072	0.072	0.06	0.08	PSD の Ca ²⁺ 濃度。この濃度は Ca ²⁺ 依存の PLC β 活性化だけに使われる。PSD での PLC β の IP ₃ 産生効率にはほとんど影響がないようだ。
E3	CaReg	SERCA	148	155	2.4667	2.5833	細胞内小胞 Ca ²⁺ ポンプ (SERCA)。SERCA は小胞の支配的なタンパク質で、80% の小胞膜タンパク質を構成している (Stryer の生化学第 5 版より)。SERCA の 2 型がブルキンエ細胞では支配的である (Takei <i>et al.</i> , (1992) <i>J Neurosci</i> 12:489-505)。SERCA 個数は、小胞内の Ca ²⁺ 濃度が 150 μM になるように決めた。
E4	CaReg	SERCA-2Ca	7	155	0.11667	2.5833	Ca ²⁺ と結合した状態の SERCA。
E5	CaReg	PMCA	68	108	1.1333	1.8	細胞膜 Ca ²⁺ ポンプ (PMCA)。PMCA の 2 型がブルキンエ細胞で豊富である (de Talamoni <i>et al.</i> , (1993) <i>PNAS</i> 90:11949-11953)。PMCA は Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体と比べて高い親和性と低い効率性を持つ。静止状態の Ca ²⁺ 濃度では、PMCA の Ca ²⁺ イオンの汲み出しは Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体よりも多い。PMCA 濃度は、静止状態の細胞内 Ca ²⁺ 濃度が 0.06 μM となるように決めた。
E6	CaReg	PMCA-Ca	40	108	0.66667	1.8	Ca ²⁺ と結合した状態の PMCA。
E7	CaReg	NCX	32	32	0.53333	0.53333	Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体 (NCX)。Na ⁺ の細胞膜の電氣的化学的勾配をエネルギー源としている。本論文では膜電位はモデル化していないことに注意。Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体は細胞内 Ca ²⁺ 濃度が数 μM になったことに汲み出しの主力になる。
E8	CaReg	NCX-2Ca	0	32	0	0.53333	Ca ²⁺ と結合した状態の Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体。

ID	グループ	分子名	個数	総個数	濃度 (μM)	総濃度	説明
E9	CaReg	CaStore	1800	30000	150	2500	小胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) は、かつて 1990 年代では 1 mM より高いと推測されていた (例えば、Fiala <i>et al.</i> , (1996) <i>J Neurosci</i> 16:3760-3774; Bezprozvanny and Ehrlich (1994) <i>J Gen Physiol</i> 104:821-856)。低親和性の Ca^{2+} バッファーを用いた最近の研究により $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ が mM 以下であることが分かっている (例えば、Park <i>et al.</i> , (2000) <i>EMBO J</i> 19:5729-5739)。よって、シミュレーションでは、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ を 150 μM とした。
E10	CaReg	calreticulin	960000	1032000	80000	86000	Calreticulin は小胞内 Ca^{2+} バッファーとしてよく知られている。小胞内の結合定数は 5 とした。つまり、静止状態の小胞では、結合状態の Ca^{2+} は遊離状態の 5 倍である。
E11	CaReg	calreticulin-Ca	72000	1032000	6000	86000	Ca^{2+} と結合した状態の calreticulin。
E12	CaReg	Ca_ext	1.20×10^4	1.20×10^4	2000	2000	細胞外 Ca^{2+} 濃度。
F1	CaBuf	MgGreen	14940	15000	249	250	Magnesium Green 1。この低親和性の Ca^{2+} 指示薬は Wang <i>et al.</i> , (2000) <i>Nature Neurosci</i> 3:1266-1273 で 250-500 μM で使用された。この Ca^{2+} イメージングとシミュレーション実験を直接比較するために、モデルに 250 μM の Mg Green を入れた。
F2	CaBuf	MgGreen*	60	15000	1	250	Ca^{2+} と結合した Magnesium Green 1。 Ca^{2+} と結合すると 2 倍の蛍光量になるので、 $F_{\text{max}}/F_{\text{min}} = 2$ である。
F3	CaBuf	parvalbumin	1380	3000	23	50	Parvalbumin は GABA 性神経細胞に高発現しており、ブルキンエ細胞もそうである (de Talamoni <i>et al.</i> , (1993) <i>PNAS</i> 90:11949-11953)。静止状態の Ca^{2+} 濃度で結合定数が非常に高い (Fierro and Llano (1996) <i>J Physiol</i> 496:617-625) ことを考えると、parvalbumin 濃度は数十 μM になる。
F4	CaBuf	PV-Ca	1620	3000	27	50	Ca^{2+} と結合した状態の parvalbumin。
F5	CaBuf	Calbindin	5850	6000	97.5	100	Calbindin-D _{28k} はブルキンエ細胞に高発現している。Calbindin-D _{28k} ノックアウトマウスでの Ca^{2+} 濃度の収束は野生型よりも速い (Airaksinen <i>et al.</i> , (1997) <i>PNAS</i> 94:1488-1493)。Maeda <i>et al.</i> , (1999) <i>Neuron</i> 24:989-1002 は小脳ブルキンエ細胞内の Ca^{2+} バッファー効果を調べ、calbindin-D _{28k} 濃度は 360 μM と結論づけたが、彼らは他の高親和性バッファーや Ca^{2+} ポンプの効率が Ca^{2+} 濃度依存であることを無視した。シミュレーションでは calbindin-D _{28k} 濃度を 100 μM とした。
F6	CaBuf	CB-Ca	150	6000	2.5	100	Ca^{2+} と結合した状態の calbindin-D _{28k} 。
F7	CaBuf	LowAffBuf	5997	6000	99.95	100	ブルキンエ細胞には低親和性バッファーを高濃度で含んでいる (Maeda <i>et al.</i> , (1999) <i>Neuron</i> 24:989-1002)。モデルの Ca^{2+} 結合比を 2 種類の低親和性バッファーを仮定してその論文の Fig. 6 に合わせた。低親和性バッファーその 1 (LAB) は、非共役型で、Hill 係数は 1 である。
F8	CaBuf	LA-Ca	3	6000	0.05	100	Ca^{2+} と結合した状態の low-affinity buffer 1。
F9	CaBuf	LowAffBuf2	6000	6000	100	100	ブルキンエ細胞には低親和性 Ca^{2+} バッファーを高濃度で含んでいる (Maeda <i>et al.</i> , (1999) <i>Neuron</i> 24:989-1002)。モデルの Ca^{2+} 結合比を 2 種類の低親和性バッファーを仮定してその論文の Fig. 6 に合わせた。低親和性バッファーその 2 (LAB2) は、共役型で、Hill 係数は 2 である。
F10	CaBuf	LA-Ca2	0	6000	0	100	Ca^{2+} と結合した状態の low-affinity buffer 2。
G1	NO	NO	0	0.00004	0	0.0024	一酸化窒素は細胞膜も細胞質も通って自由に拡散する。PF 刺激による NO 濃度の最大値は 2.2 ± 0.1 nM である (Kimura <i>et al.</i> , (1998) <i>J Neurosci</i> 18:8551-8558)。
G2	NO	GC	180	180	3	3	グアニル酸シクラーゼの水溶性型。免疫組織化学ではブルキンエ細胞は高濃度で GC を含んでいる (Ariano <i>et al.</i> , (1982) <i>PNAS</i> 79:297-300)。
G3	NO	GC-NO	0	180	0	3	NO と結合した状態の GC。
G4	NO	GTP	600	600	10	10	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 において、GTP 濃度は 10 μM としており、本論文もそれに倣った。
G5	NO	cGMP	0	600	0	10	環状 GMP (cGMP) は GC によって産生され、PDE によって加水分解される。
G6	NO	5'GMP	0	600	0	10	cGMP は PDE によって 5'GMP に加水分解される。
G7	NO	PDE	300	300	5	5	cGMP 依存のホスホジエステラーゼ、PDE5。PDE5 はブルキンエ細胞に高発現している。PDE5 濃度は、Kotera <i>et al.</i> , (1997) <i>Eur J Biochem</i> 249:434-442 と Kotera <i>et al.</i> , (2000) <i>J Histochem Cytochem</i> 48:685-694 から概算した。
G8	NO	PDE-P	0	300	0	5	リン酸化された PDE。リン酸化されると cGMP 分解効率が上昇する。

ID	グループ	分子名	個数	総個数	濃度 (μM)	総濃度	説明
G9	NO	PKG	150	150	2.5	2.5	タンパクキナーゼ G。単離実験では、小脳から 1.63 pmol/mg のタンパク質が得られた。さらに、免疫組織化学よると PKG はブルキンエ細胞に独占的に発現している (Lohmann <i>et al.</i> , (1981) <i>PNAS</i> 78:653-657)。
G10	NO	cGMP-PKG	0	150	0	2.5	cGMP と結合した状態の PKG。
G11	NO	G-sub	642	642	10.7	10.7	Detre <i>et al.</i> , (1984) <i>J Neurosci</i> 4:2843-2849 によると、小脳の細胞質の G 基質濃度は 27.2 pmol/mg である。
G12	NO	G-sub-P	0	642	0	10.7	リン酸化された G 基質。
G13	NO	PP2A	162	162	2.7	2.7	タンパクホスファターゼ 2A 型。濃度は Mumby <i>et al.</i> , (1985) <i>J Biol Chem</i> 260:13763-13770 から見積もった。
G14	NO	PP2A-G-sub-P	0	162	2.7	2.7	PP2A はリン酸化 G 基質と結合すると不活性化される。
H1	Ras	GEFinact	6	6	0.1	0.1	PKC は Ras の GEF を活性化し、GAP を不活性化するとした。GEF と GAP の濃度は推定値だが、実験的に知られている値にはしている。
H2	Ras	GEFact	0	6	0	0.1	PKC によって活性化された GEF。
H3	Ras	GAPinact	0	1.2	0	0.02	PKC によって不活性化された GAP。
H4	Ras	GAPact	1.2	1.2	0.02	0.02	PKC は Ras の GAP を不活性化するとした。GAP 濃度は推定値だが、実験的に知られている値にはしている。
H5	Ras	Ras-GDP	12	12	0.2	0.2	Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 の推定値と同じにした。
H6	Ras	Ras-GTP	0	12	0	0.2	GEF によって Ras が活性化された状態。
I1	MAPK	Raf	12	12	0.2	0.2	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、Storm <i>et al.</i> , (1990) <i>Oncogene</i> 5:345-351 のノザンプロットから Raf 濃度は 0.2 μM と推定した。
I2	MAPK	Ras-GTP-Raf	0	12	0	0.2	Ras-GTP と Raf が結合した状態で、MEK の 2 つの残基をリン酸化する。
I3	MAPK	MEK	10.8	10.8	0.18	0.18	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、Seger <i>et al.</i> , (1992) <i>J Biol Chem</i> 267:14373-14361 から MEK 濃度は 0.18 μM と推定している。
I4	MAPK	MEK-P	0	10.8	0	0.18	MEK が 1 箇所リン酸化された状態。MAPK に対する活性はまだない。
I5	MAPK	MEK-PP	0	10.8	0	0.18	MEK が 2 箇所リン酸化された状態。
I6	MAPK	MAPK	21.6	21.6	0.36	0.36	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、Sanghera <i>et al.</i> , (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:52-57 から MAPK 濃度は 0.36 μM と推定した。
I7	MAPK	MAPK-P	0	21.6	0	0.36	MAPK が 1 箇所リン酸化された状態。活性はまだない。
I8	MAPK	MAPK-PP	0	21.6	0	0.36	MAPK が 2 箇所リン酸化された状態。
I9	MAPK	MKP1	0.192	0.192	0.0032	0.0032	MAP kinase phosphatase。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、PKC-MAPK の正のフィードバックグループが二値性を示すにはパラメタ探索によって MKP1 濃度は 0.0032 μM が適当だとした。
J1	PLA2	PLA2	24	24	0.4	0.4	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、PLA ₂ を純化した Leslie and Channon (1990) <i>Biochim Biophys Acta</i> 1045:261-270 から、PLA ₂ 濃度は 0.4 μM と算出された。
J2	PLA2	PLA2-P	0	24	0	0.4	リン酸化された PLA ₂ 。
J3	PLA2	PLA2-Ca	0	24	0	0.4	Ca ²⁺ と結合した PLA ₂ 。
J4	PLA2	PLA2-P-Ca	0	24	0	0.4	Ca ²⁺ と結合したリン酸化 PLA ₂ 。
J5	PLA2	APC	1800	1800	30	30	Aracholonylphosphatidylcholine。Wijkander and Sundler (1991) <i>Eur J Biochem</i> 202:873-880 で使われたアラキドン酸の前駆体。このアッセイでは 30 μM の APC を基質として使っており、Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 もその値を使っている。
J6	PLA2	AA	120	1800	2	30	アラキドン酸。初期濃度は静止状態の PLA ₂ 活性とアラキドン酸分解のバランスによって得られた。
K1	PKC	PKC	57	60	0.95	1	タンパクキナーゼ C。Marquez <i>et al.</i> , (1992) <i>J Immunol</i> 149:2560-2568 では、クロマフィン細胞で 1,000,000 個の PKC が存在すると算出された。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、そこから PKC 濃度は 1 μM と推測された。
K2	PKC	PKC-memb	1	60	0.016667	1	静止状態で細胞膜に局在している不活性化 PKC。
K3	PKC	PKC-Ca	0	60	0	1	Ca ²⁺ と結合した細胞質内の不活性化 PKC。
K4	PKC	PKC-AA	2	60	0.033333	1	アラキドン酸と結合した細胞質内の不活性化 PKC。
K5	PKC	PKC-Ca-memb	0	60	0	1	Ca ²⁺ と結合した細胞膜直下の活性化 PKC。
K6	PKC	PKC-AA-memb	0	60	0	1	アラキドン酸と結合した細胞膜直下の活性化 PKC。

ID	グループ	分子名	個数	総個数	濃度 (μM)	総濃度	説明
K7	PKC	PKC-DAG-memb	0	60	0	1	DAG と結合した細胞膜直下の活性化 PKC。
L1	AMPA	AMPA	30	33	0.5	0.55	Kuroda <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 21:5693-5702 では、PF-ブルキンエ細胞スパインの AMPA 受容体濃度は $0.5 \mu\text{M}$ (個数でいうと 30 個) としていた。CF-ブルキンエ細胞スパインで、シナプス膜上にある AMPA 受容体数は 50 個と算出された (Matsuzaki <i>et al.</i> , (2005) <i>J Neurosci</i> 25:799-807)。CF スパインは PF スパインより一回り大きいので、この算出値は、黒田らの推定値と整合性がある。
L2	AMPA	AMPA-P	0	33	0	0.55	リン酸化されたシナプス膜上の AMPA 受容体。リン酸化されても Na^+ チャネルとして機能する。
L3	AMPA	AMPA-P_pool	0	33	0	0.55	リン酸化された細胞質内の AMPA 受容体。静止状態におけるリン酸化 AMPA 受容体のシナプス膜上と細胞質内の存在比率は 1:10 にした。
L4	AMPA	AMPA_pool	3	33	0.05	0.55	リン酸化されていない細胞質内の AMPA 受容体。Chung <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 20:7259-7267 から、静止状態における非リン酸化 AMPA 受容体のシナプス膜上と細胞質内の存在比率は 10:1 にした。

B.2 反応速度パラメタ

ID	グループ	反応名	k_f	k_b	K_d	説明
a1	mGluR	Glu_bind_mGluR	11.11	100	9	グルタミン酸濃度に対する遅い EPSC の依存性は、最初に mGluR 受容体が単離された 2 つの論文で測定されている (Masu <i>et al.</i> , (1991) <i>Nature</i> 349:760-765; Houamed <i>et al.</i> , (1991) <i>Science</i> 252:1318-1321)。本論文では Masu <i>et al.</i> , (1991) <i>Nature</i> 349:760-765 の K_d 値を使った。
a2	mGluR	Glu_bind_mGluR-Gq	11.11	100	9	この K_d 値は静止状態で mGluR 受容体が Gq に結合できるか否かを左右する。低い K_d 値だとグルタミン酸放出前から mGluR 受容体と Gq は結合するが、高い K_d 値だとそうではない。中冊を取って、静止状態で半分の mGluR 受容体が Gq と結合しているとした。
a3	mGluR	mGluR_bind_Gq	2	100	50	この K_d 値は静止状態で mGluR 受容体が Gq に結合できるか否かを左右する。低い K_d 値だとグルタミン酸放出前から mGluR 受容体と Gq は結合するが、高い K_d 値だとそうではない。中冊を取って、静止状態で半分の mGluR 受容体が Gq と結合しているとした。
a4	mGluR	mGluR-Glu_bind_Gq	2	100	50	mGluR \rightarrow Glu-mGluR \rightarrow Glu-mGluR-Gq \rightarrow mGluR-Gq \rightarrow mGluR 反応のループ構造から、詳細釣り合い (detailed balance) によりこの K_d 値は一意に決定される。
a5	mGluR	Activate_Gq	116			知りうる限りでは、G タンパク共役受容体による Gq の活性化の k_{cat} 値を測定したのは 1 例しかない (Fay <i>et al.</i> , (1991) <i>Biochemistry</i> 30:5066-5075)。あいにく、その測定では mGluR 受容体ではなくムスカリン作動性アセチルコリン受容体 (muscarinic cholinergic receptors, mAChRs) を使っていた。報告された k_{cat} 値は 0.01 /sec で、2 つのシミュレーション論文で既に使われている (Fiala <i>et al.</i> , (1996) <i>J Neurosci</i> 16:3760-3774; Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387)。この値は数 μ M の IP ₃ 濃度を得るには小さすぎるので、この報告値を無視して、Gq に対する mGluR の k_{cat} 値を 116 /sec とした。
a6	mGluR	Basal-ActGq	0.0001			静止状態での Gq が GTD を GTP に交換する活性。この反応は無視できるほど遅い。
a7	mGluR	Inact_Gq	0.01			Berstein <i>et al.</i> , (1992) <i>J Biol Chem</i> 267:8081-8088 によれば、Gq 自体の GTPase 活性はたったの 0.8 /min しかない。Gq 不活性化は PLC の GAP 活性によって促進される。
a8	mGluR	Trimerize_Gq	6			このパラメタ値は Gq α -GDP と G $\beta\gamma$ の結合速度を決定する。この反応は速いと考えられている。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 と同じ値を使った。6 /sec という k_f 値は小さいと思われるかもしれないが、三量体化はグルタミン酸放出から 1 秒以内にほぼ完了する。
b1	PLC	PLC-PIP2_bind_Ca	500	100	0.2	PLC β 4 活性の Ca ²⁺ 依存性は定量的に測定されていない。そこで、PLC β 1 の K_d 値を転用した (Taylor <i>et al.</i> , (1991) <i>Nature</i> 350:516-518)。
b2	PLC	PLC-PIP2-Gq_bind_Ca	500	30	0.2	PLC β 4 活性の Ca ²⁺ 依存性は定量的に測定されていない。そこで、PLC β 1 の K_d 値を転用した (Taylor <i>et al.</i> , (1991) <i>Nature</i> 350:516-518)。
b3	PLC	PLC-PIP2_bind_Gq	800	40	0.05	PLC-PIP2 \rightarrow PLC-Ca-PIP2 \rightarrow PLC-Ca-Ga-PIP2 \rightarrow PLC-Gq-PIP \rightarrow PLC-PIP 反応のループ構造から、詳細釣り合い (detailed balance) によりこの K_d 値は一意に決定される。
b4	PLC	PLC-PIP2-Ca_bind_Gq	1200	6	0.005	Lee <i>et al.</i> , (1994) <i>J Biol Chem</i> 269:25335-25338 の Figure 4 によると、Gq α の親和性は 5 nM である。この高親和性により、ほとんどの活性化 Gq α は PLC β と結合する。
b5	PLC	PLC-Ca_bind_Gq	1200	6	0.005	Lee <i>et al.</i> , (1994) <i>J Biol Chem</i> 269:25335-25338 の Figure 4 によると、Gq α の親和性は 5 nM である。この高親和性により、ほとんどの活性化 Gq α は PLC β と結合する。
b6	PLC	IP3_prd_without_Gq	2			PLC β 4 は Gq と結合しなくても IP ₃ 産生の活性がある。この活性を測定するのは、PLC β 4 がリボヌクレオチドによって阻害されるため困難である (Lee <i>et al.</i> , (1994) <i>J Biol Chem</i> 269:25335-25338)。そこで、このパラメタは静止状態の IP ₃ 濃度が 0.1 μ M となるように決めた。
b7	PLC	IP3_prd_with_Gq	160			この活性を測定するのは、PLC β 4 がリボヌクレオチドによって阻害されるため困難である (Lee <i>et al.</i> , (1994) <i>J Biol Chem</i> 269:25335-25338)。代わりに PLC β 1 の活性値を使った (Mishra and Bhalla (2002) <i>Biophys J</i> 83:1298-1316)。
b8	PLC	PLC-Ca_bind_PIP2	1	170	170	生化学論文ではいくつかの PLC β のサブタイプにおいて K_m 値は 100-200 μ M とある (James <i>et al.</i> , (1995) <i>J Biol Chem</i> 270:11872-11881)。
b9	PLC	PLC-Ca-Gq_bind_PIP2	1	170	170	PLC β 1 の親和性を使った ($K_m = 170 \mu$ M)。
b10	PLC	inact_Gq_by_PLC-PIP2	8			PLC β 4 は GAP (G タンパク活性タンパク) 活性を持っており、Gq の GTPase 活性効率を数千倍に増大させる。Montel (2000) <i>Nature Cell Biol</i> 2:E82-E83 の論文紹介記事によると、PLC 存在下の Gq 不活性化の半減期は 25-75 ミリ秒とある。PLC β 4 の状態は違っても同じ活性を持つとした。
b11	PLC	inact_Gq_by_PLC-PIP2-Ca	8			PLC β 4 は GAP (G タンパク活性タンパク) 活性を持っており、Gq の GTPase 活性効率を数千倍に増大させる。Montel (2000) <i>Nature Cell Biol</i> 2:E82-E83 の論文紹介記事によると、PLC 存在下の Gq 不活性化の半減期は 25-75 ミリ秒とある。PLC β 4 の状態は違っても同じ活性を持つとした。
b12	PLC	inact_Gq_by_PLC-Ca	8			PLC β 4 は GAP (G タンパク活性タンパク) 活性を持っており、Gq の GTPase 活性効率を数千倍に増大させる。Montel (2000) <i>Nature Cell Biol</i> 2:E82-E83 の論文紹介記事によると、PLC 存在下の Gq 不活性化の半減期は 25-75 ミリ秒とある。PLC β 4 の状態は違っても同じ活性を持つとした。
c1	IP3deg	IP3K_bind_Ca2+	1111.1	100	0.3	Ca ²⁺ シミュレーションの論文から K_d 値を取った (Dunplot and Erneux (1997) <i>Cell Calcium</i> 22:321-331)。Ca ²⁺ に対する K_m 値は 0.3 μ M、Hill 係数は 2。
c2	IP3deg	IP3K-2Ca_bind_IP3	100	80	0.8	Ca ²⁺ シミュレーションの論文から K_m 値を取った (Dunplot and Erneux (1997) <i>Cell Calcium</i> 22:321-331)。Michaelis 定数 K_m は 1 μ M。検算: $K_m = (k_b + k_{cat})/k_f = (80 + 20)/100 = 1 \mu$ M
c3	IP3deg	IP3K_deg_IP3	20			いくつかの研究で全く違う V_{max} 値を報告されている (Irvine <i>et al.</i> , (1986) <i>Nature</i> 320:631-634; Takazawa <i>et al.</i> , (1989) <i>Biochem J</i> 261:483-488; Choi <i>et al.</i> , (1990) <i>Science</i> 248:64-66)。そこで、これらの報告から値を参照するのはやめて、PF と CF 入力タイミング依存性の Ca ²⁺ 応答が出るように V_{max} 値を推定した。

ID	グループ	反応名	k_f	k_b	K_d	説明
c4	IP3deg	IP5P_bind_IP3	9	72	8	K_m 値は Ca^{2+} シミュレーション論文のものを使った (Dunplot and Erneux (1997) <i>Cell Calcium</i> 22:321-331), Michaelis 定数 K_m は $1 \mu M$ 。換算: $K_m = (k_b + k_{cat})/k_f = (72 + 18)/9 = 10 \mu M$
c5	IP3deg	IP5P_deg_IP3	18			IP5P を純化した研究では, V_{max} 値は $20-35 \mu mol/min/mg \text{ protein}$ と報告されている (Verjans <i>et al.</i> , (1992) <i>Eur J Biochem</i> 204:1083-1087)。IP5P は 43 kDa の酵素なので, $k_{cat} = 20-35 \times 43000/60000 = 18 \text{ \# /sec / \# protein}$ と算出される。この類の単位変換は De Schutter (2000) <i>Computational Neuroscience</i> , CRC Press, Boca Raton, pp. 31. を参照されたい。
d1	IP3R	IP3R_bind_IP3	1000	25800	25.8	小胞ストアの Ca^{2+} を枯渇させた測定によると, プルキン工細胞内の IP ₃ 受容体の IP ₃ に対する親和性は人工環境と比べて非常に低い ($K_d = 25.8 \mu M$, Fujiwara <i>et al.</i> , (2001) <i>Neuroreport</i> 12:2647-2651)。この低親和性は, プルキン工細胞内で IP ₃ 光分解の Ca^{2+} 応答で強力な光刺激 (IP ₃ 濃度が $10 \mu M$ となるような) が必要だったこととも辻褃が合う (Khodakhah and Ogden (1993) <i>PNAS</i> 90:4976-4980; Finch and Augustine (1998) <i>Nature</i> 396:753-756)。したがって, K_d は $25.8 \mu M$ とした。
d2	IP3R	IP3R-IP3_bind_Ca	8000	2000	0.25	IP ₃ 受容体を活性化するとき Ca^{2+} は直接結合する。IP ₃ 受容体のベル型 Ca^{2+} 依存性から (Bezprozvanny and Ehrlich (1994) <i>J Gen Physiol</i> 104:821-856; Fujiwara <i>et al.</i> , (2001) <i>Neuroreport</i> 12:2647-2651), $K_d = 0.25 \mu M$ と割り出した。 Ca^{2+} の正のフィードバックループが有効であるためには, この反応は Ca^{2+} 依存性 IP ₃ 受容体不活性化よりも速くなければならない。
d3	IP3R	IP3R_bind_Ca	8.889	5	0.56249	IP ₃ 受容体は $10 \mu M$ 以上の Ca^{2+} 濃度で完全に不活性化される。本論文の IP ₃ 受容体モデルでは, IP ₃ 受容体は 4 つの Ca^{2+} 不活性化部位を持つ。この順次の Ca^{2+} 結合は共役的と仮定した。言い換えると, Ca^{2+} イオンがサブユニットに結合すると, Ca^{2+} イオンは他のサブユニットにより結合しやすくなる。パラメタ決定手順の詳細は本文の IP ₃ 受容体モデルを参照されたい。
d4	IP3R	IP3R-Ca_bind_Ca	20	10	0.5	
d5	IP3R	IP3R-2Ca_bind_Ca	40	15	0.375	
d6	IP3R	IP3R-3Ca_bind_Ca	60	20	0.33333	
e1	CaReg	IP3R_Ca_channel	450	450	(perm)	Bezprozvanny and Ehrlich (1994) <i>J Gen Physiol</i> 104:821-856 では, 小胞 Ca^{2+} 濃度を $2,500 \mu M$ で毎秒 $5,400$ 個の Ca^{2+} イオンが 1 個の IP ₃ 受容体を通過すると算出した。GENESIS/kinetikit の透過性の単位はよく分からないが, 450 とすればこの実験値に合う。
e2	CaReg	SERCA_bind_2Ca	17147	1000	0.24149	SERCA サブタイプ 2b 型の反応パラメタは Lytton <i>et al.</i> , (1992) <i>J Biol Chem</i> 267:14483-14489 から引用した。 $K_m = 0.27 \mu M$, Hill 係数は 2。換算: $K_m^2 = (k_b + k_{cat})/k_f = (1000 + 250)/17147 = (0.27 \mu M)^2$
e3	CaReg	SERCA_uptake	250			Stryer 生化学第 5 版では, SERCA ポンプは毎秒 100 弱の Ca^{2+} イオンを汲み出す。よって, 当初は k_{cat} 値を 50 /sec にしていたが, 低い k_{cat} 値が問題を引き起こした。 k_{cat} 値が低いまま Ca^{2+} ポンプの数を増やしても, 遊離 Ca^{2+} 濃度が低くなってポンプと結合する Ca^{2+} イオン数が減少するので, Ca^{2+} 排出の速度は Ca^{2+} ポンプ数に比例して増加しない。ポンプ数を増やしても, Wang <i>et al.</i> , (2000) <i>Nature Neurosci</i> 3:1266-1273 の Ca^{2+} 経時変化を再現することができなかった。他の Ca^{2+} シミュレーションはポンプと結合する Ca^{2+} の効果を無視していることから, バッファ効果減らすために, V_{max} 値 ($= k_{cat} \times [SERCA]$) は保ったままで, k_{cat} 値と SERCA 濃度を調節することにした。よって, k_{cat} 値を 5 倍にして SERCA 濃度を $1/5$ 倍にした。
e4	CaReg	Ca_Leak_from_ER	15	15	(perm)	この漏れパラメタ値は小胞内 Ca^{2+} 濃度が $150 \mu M$ になるように決めた。
e5	CaReg	PMCA_bind_Ca	25000	2000	0.08	PMCA サブタイプ 2 型の反応パラメタは Stauffer <i>et al.</i> , (1995) <i>J Biol Chem</i> 270:12184-12190 から引用した。 $K_m = 0.1 \mu M$, Hill 係数は 1。換算: $K_m = (k_b + k_{cat})/k_f = (500 + 2000)/25000 = 0.1 \mu M$
e6	CaReg	PMCA_uptake	500			PMCA の処理能力を SERCA の k_{cat} を増大させたのと同じ理由で 10 倍 (50 から 500) にした。
e7	CaReg	NCX_bind_2Ca	93.827	4000	6.5293	このモデルは電位を考慮していないので, Na^+/Ca^{2+} 交換体の汲み上げ効率は膜電位を含まない Ca^{2+} 濃度だけで決まらなければならない。Fujioka <i>et al.</i> , (2000) <i>J Physiol</i> 529:611-623 では, Ca^{2+} 濃度依存の Na^+/Ca^{2+} 交換体電流を測定しており, $K_m = 7.3 \mu M$ で Hill 係数は 2 であった。換算: $K_m^2 = (k_b + k_{cat})/k_f = (4000 + 1000)/93.287 = (7.3 \mu M)^2$
e8	CaReg	NCX_uptake	1000			Stryer 生化学第 5 版では, 1 個の Na^+/Ca^{2+} 交換体は毎秒 $1,000$ 個の Ca^{2+} イオンを排出する。Hill 係数は 2 なので, 1 サイクルあたりの 2 個の Na^+/Ca^{2+} イオンを輸送することになる。したがって, $k_{cat} = 2000/2 = 1000 \text{ /sec}$ 。
e9	CaReg	Ca_leak_from_ext	10	10	(perm)	この漏れパラメタ値は, 細胞内 Na^+/Ca^{2+} 濃度が $0.06 \mu M$ となるように決めた。
e10	CaReg	Ca_bind_calreticulin	0.1	200	2000	Calreticulin は高濃度で非共役的バッファである。Krause and Michalak (1997) <i>Cell</i> 88:439-443 に従って, K_d は $2 \mu M$ とした。
f1	CaBuf	Ca_bind_MgGreen	1000	19000	19	Wang <i>et al.</i> , (2000) <i>Nature Neurosci</i> 3:1266-1273 によると, 内因性 Mg^{2+} 存在下における Magnesium Green 1 見かけ上の K_d 値は $19 \mu M$ である。

ID	グループ	反応名	k_f	k_b	K_d	説明
f2	CaBuf	PV_bind_Ca	18.5	0.95	0.05135	Parvalbumin は結合が遅く低親和性のバッファーである。静止 Ca^{2+} 濃度ではほとんどの parvalbumin は Mg^{2+} と結合している。In Lee <i>et al.</i> , (2000) <i>J Physiol</i> 525:419-431 では、 Mg^{2+} 存在下での見かけ上の解離定数 $K_d = 0.0514 \mu M$ 、分離速度定数 $k_b = 0.95 / sec$ と計測しており、シミュレーションではこのパラメータ値を使った。
f3	CaBuf	CB_bind_Ca	87	11.275	0.36	Calbindin は共役的な高親和性バッファーである。Maeda <i>et al.</i> , (1999) <i>Neuron</i> 24:989-1002 から、 K_d 値は $0.36 \mu M$ で Hill 係数は 2 とした。この値は Nagerl <i>et al.</i> , (2000) <i>Biophys J</i> 79:3009-3018 の Table 1 の (2:2) の欄と整合する。
f4	CaBuf	LA_bind_Ca	10	1000	100	Maeda <i>et al.</i> , (1999) <i>Neuron</i> 24:989-1002 の Fig. 6 に基づいて低親和性バッファーを取り入れた。Hill 定数は low-affinity buffer 1 (LAB) では 1、low-affinity buffer 2 (LAB2) では 2 である。
f5	CaBuf	LA2_bind_Ca	1	4000	20	
g1	NO	GC_bind_NO	0.2	0.05	0.25	Stone and Marletta (1996) <i>Biochemistry</i> 35: 1093-1099 の Fig. 6 によると、NO と GC の結合親和性は $0.25 \pm 0.05 \mu M$ である。
g2	NO	GC_deg	0.673			Wood and Garthwaite (1997) <i>Neuropharmacology</i> 33:1235-1244 では、NO 半減期は 0.5-5 秒である。Kuroda <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 21:5693-5702 で、 $k_f = 0.673 / sec$ とした。
g3	NO	GC_prd_cGMP	0.81667	29.4	45	NO 存在下では、GC の GTP に対する K_m 値は $45-55 \mu M$ である。GC は 200 kDa のタンパクである。Stone and Marletta (1996) <i>Biochemistry</i> 35: 1093-1099 によると、酵素活性は $480 / nmol / min / mg$ protein である。
			7.35		(k_{cat})	
g4	NO	GC_prd_cGMP	20.1546	15.48	0.96	Turko <i>et al.</i> , (1998) <i>Biochem J</i> 329: 505-510 の Table 1 では、活性は $2.5 / \mu mol / min / mg$ であった。PDE は $93 kDa$ のタンパクなので、 $k_{cat} = 2.5 \times 93000 / 60000 = 3.87 / sec$ となる。
			3.87		(k_{cat})	
g5	NO	PKG_act_Gsub	2	0.1	0.05	Ruth <i>et al.</i> , (1993) <i>PNAS</i> 90:2623-2627 の Fig. 1 では、PKG 活性は cGMP 濃度が $50 nM$ のときに最大値の半分になる。
g6	NO	GC_prd_cGMP	18	2.88	0.2	Hall <i>et al.</i> , (1999) <i>J Biol Chem</i> 274:3485-3495 によると、 $K_m = 0.2 \mu M$ 、 $V_{max} = 1.8 \mu mol / min / mg$ protein である。PKG の分子量は $27.5 kDa$ なので、 $1.8 \times 27500 / 60000 = 0.77 / sec$ 。
			0.72		(k_{cat})	
g7	NO	Gsub_deg	0.001			推定値。
g8	NO	Gsub_inact_PP2A	1	0.27	0.27	Endo <i>et al.</i> , (1999) <i>PNAS</i> 96:2467-2472 に示されたように、G 基質は PP2A の弱い阻害物質である。
g9	NO	PKG_phos_PDE	18	2.88	0.2	試験管内では PKG は cGMP 存在下で PDE5 を活性化・リン酸化する (Rybalkin <i>et al.</i> , (2002) <i>J Biol Chem</i> 277:3310-3317)。
			0.72		(k_{cat})	
g10	NO	PDE_deg	0.01	0	0	Mullershausen <i>et al.</i> , (2003) <i>J Cell Biol</i> 160:719-727 の Fig. 6 より、PDE リン酸化は 10 分以内に減少するので、 $k_f = 0.01 / sec$ とした。
g11	NO	PDE-P_deg_cGMP	18	16	1.1111	cGMP に対する PDE5 の K_m 値は、PDE のリン酸化によって 0.96 から $0.58 \mu M$ に減少する (Corbin <i>et al.</i> , (2000) <i>Eur J Biochem</i> 267:2760-2767)。PDE5 活性は PKG によるリン酸化により 2 倍に上昇する (Rybalkin <i>et al.</i> , (2002) <i>J Biol Chem</i> 277:3310-3317)。
			7.74		(k_{cat})	
h1	Ras	PKC_act_GEF	18	16	1.1111	PKC のいろいろな改変標的タンパクでは、 K_m は $0.1-50 \mu M$ という広い幅を取りうる (Chen <i>et al.</i> , (1993) <i>Biochemistry</i> 32:1032-1039)。 k_{cat} は GEF と GAP が Ferrell (1996) <i>Trends Biochem Sci</i> 21:460-466 の Box 1 にあるような双曲線 (Michaelis) 感受性を表すように選んだ。
			4		(k_{cat})	
h2	Ras	basal_GEF_inact	0.1			任意量。
h3	Ras	PKC_inact_GAP	90	80	1.1111	反応速度パラメータは、GEF と GAP が Ferrell (1996) <i>Trends Biochem Sci</i> 21:460-466 の Box 1 にあるような双曲線 (Michaelis) 感受性を表すように決めた。
			20		(k_{cat})	
h4	Ras	basal_GAP_inact	0.1			任意量。
h5	Ras	GEF_act_Ras	0.99	0.4	0.50505	K_m 値は Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 と同じものを使った。 k_{cat} 値は双曲線感受性が出るように 0.02 から $0.1 \mu M$ に上げた。
			0.1		(k_{cat})	
h6	Ras	GAP_inact_Ras	495	40	0.10101	k_{cat} 値は Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 と同じものを使った。 K_m 値は双曲線感受性が出るように 1 から $0.1 \mu M$ に下げた。
			10		(k_{cat})	
h9	Ras	basal_Ras_inact	0.0001			Ras の自然な不活性化は非常に低いとした。
i1	MAPK	Ras-GTP_bind_Raf	45	7.4	0.16444	Ras と Raf の結合反応は Sydor <i>et al.</i> , (1998) <i>Biochemistry</i> 37:14292-14299 で測定されている。Table 1 の RBD+RasmanGppNHp にあるパラメータ値を使った。
i2	MAPK	Raf_act_MEK	1.3191	0.42	0.398	パラメータ値は Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 と同じものを使った。彼らは、Force <i>et al.</i> , (1994) <i>PNAS</i> 91:1270-1274 を元にしてパラメータ値を算出した。
			0.105		(k_{cat})	
i3	MAPK	Raf_act_MEK-P	1.3191	0.42	0.398	
			0.105		(k_{cat})	
i4	MAPK	PP2A_deph_MEK-PP	1.91082	24	15.7	パラメータ値は Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 と同じものを使った。 K_m と k_{cat} は Pato <i>et al.</i> , (1993) <i>Biochem J</i> 293:35-41 の Table 1 からの値である。他に、違う基質で PP2A 活性が異なることを示した研究もある。
			6		(k_{cat})	
i5	MAPK	PP2A_deph_MEK-P	1.91082	24	15.7	
			6		(k_{cat})	
i6	MAPK	MEK_act_MAPK	1.62	0.6	0.0463	パラメータ値は Bhalla <i>et al.</i> , (2002) <i>Science</i> 297:1018-1023 と同じもの

ID	グループ	反応名	k_f	k_b	K_d	説明
			0.15		(k_{cat})	を使った。 k_{cat} は Seger <i>et al.</i> , (1992) <i>J Biol Chem</i>
i7	MAPK	MEK_act_MAPK-P	1.62	0.6	0.0463	267:14373-14361 から 150 nmol/min/ml で、 k_{cat} は Haystead <i>et al.</i> , (1992) <i>FEBS Lett</i> 306:17-22 から 46.6 ± 6.6 nM と概算された。
			0.15		(k_{cat})	
i8	MAPK	MKP_deph_MAPK-PP	30	4	0.16667	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では $K_m = 0.0666$
			1		(k_{cat})	μM と $k_{cat} = 1/sec$ 。Kuroda <i>et al.</i> , (2001) <i>J Neurosci</i>
i9	MAPK	MKP_deph_MAPK-P	30	4	0.16667	21:5693-5702 で、平行線維と登上线維の組み合わせ刺激で MAPK カスケードの二値性が生じるように K_m を 0.16667 μM に変えた。
			1		(k_{cat})	
j1	PLA2	MAPK_PLA2	1.36716	28	25.601	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 で、 K_m を Sanghera <i>et al.</i> , (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:52-57 から算出し、 k_{cat} を Nemenoff <i>et al.</i> , (1993) <i>J Biol Chem</i> 268:1960-1964 から算出した。シミュレーションでは同じパラメタ値を使った。
			7		(k_{cat})	
j2	PLA2	PLA2-P_deg	0.17			Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 において、この速度はリン酸化/非リン酸化 PLA ₂ が適当なバランスをとるように決められた。
j3	PLA2	PLA2_bind_Ca	10	4	0.4	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 で、 K_m を Sanghera <i>et al.</i> , (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:52-57 から算出し、 k_{cat} を Nemenoff <i>et al.</i> , (1993) <i>J Biol Chem</i> 268:1960-1964 から算出した。シミュレーションでは同じパラメタ値を使った。
j4	PLA2	PLA2-P_bind_Ca	10	4	0.4	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 で、 K_m を Sanghera <i>et al.</i> , (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:52-57 から算出し、 k_{cat} を Nemenoff <i>et al.</i> , (1993) <i>J Biol Chem</i> 268:1960-1964 から算出した。シミュレーションでは同じパラメタ値を使った。
j5	PLA2	PLA2-Ca_prd_AA	1.35	21.6	20	PLA ₂ の基質である APC 濃度が推定値なので、 K_m 値も推定値になる。
			5.4		(k_{cat})	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、Channon and Leslie (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:5409-5413 に基づいて相対的な活性値を推定している。
j6	PLA2	PLA2-P-Ca_prd_AA	30	480	20	Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 では、Channon and Leslie (1990) <i>J Biol Chem</i> 265:5409-5413 に基づいて相対的な活性値を推定している。
			120		(k_{cat})	
j7	PLA2	AA_deg	0.4			測定値はない。Bhalla and Iyengar (1999) <i>Science</i> 283:381-387 と同じものを使った。
k1	PKC	PKC_basal_lact	0.001	0.05	0.02	Oancea and Meyer (1998) <i>Cell</i> 95:307-318 の静止状態から、2%の PKC が静止状態で細胞膜に存在すると見積もった。
k2	PKC	PKC_bind_Ca	1	1	1	Oancea and Meyer (1998) <i>Cell</i> 95:307-318 によると、数 μM の Ca^{2+} 濃度の刺激で PKC は細胞質から細胞膜へ移行する。
k3	PKC	PKC_bind_AA	0.2	10	50	Schaechter and Benowitz (1993) <i>J Neurosci</i> 13:4361-4371 で、PKC 活性は 10-500 μM のアラキドン酸濃度で変化する。
k4	PKC	PKC-Ca_to_memb	0.01	0.01	1	Oancea and Meyer (1998) <i>Cell</i> 95:307-318 より、PKC の細胞質から細胞膜への移動は 1 分以内に観察される。
k5	PKC	PKC-AA_to_memb	0.01	0.01	1	Oancea and Meyer (1998) <i>Cell</i> 95:307-318 より、PKC の細胞質から細胞膜への移動は 1 分以内に観察される。
k6	PKC	PKC_bind_DAG	15	30	2	DAG でなく、近年の実験では、DAG による PKC 活性化を調べるのに、DAG でなく DiC8 や PDBu を用いている (例えば、Oancea and Meyer (1998) <i>Cell</i> 95:307-318)。したがって、このパラメタ値は更新していない。
l1	AMPA	AMPAR_synth_move	0.0004			1 つのスパインで、1 個の AMPA 受容体が 2,500 秒の速度で供給されると仮定した。
l2	AMPA	AMPAR_to_memb	0.1	0.01	10	大部分の非リン酸化 AMPA 受容体はシナプス膜にある。Chung <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 20:7258-7267 から、非リン酸化 AMPA 受容体のシナプス膜と細胞質の存在割合を 10:1 とした。
l3	AMPA	PKC_phos_AMPAR	2.08332	6	36	PKC は AMPA 受容体の GluR2 の Ser880 残基をリン酸化する。Kuroda <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 21:5693-5702 で、 $K_m = 3.6 \mu M$ と $k_{cat} = 1.5/sec$ を推定した。
			1.5		(k_{cat})	
l4	AMPA	PP2A_deph_AMPAR-P	1.9161	24	15.657	PP2A 活性はブルキンエ細胞樹状突起の AMPA 受容体集合を解離させる。酵素活性測定では、PP2A は GluR2 を脱リン酸化する (Launey <i>et al.</i> , <i>PNAS</i> (2004) 101:676-681)。パラメタ値は MEK の i4, i5 と同一。
			6		(k_{cat})	
l5	AMPA	AMPAR_to_cyto	0.1	0.01	10	大部分のリン酸化 AMPA 受容体は細胞質に移動する。リン酸化 AMPA 受容体のシナプス膜と細胞質の存在割合を 1:10 とした。
l6	AMPA	PKC_phos_AMPAR_pool	2.08332	6	3.6	PKC は AMPA 受容体の GluR2 の Ser880 残基をリン酸化する。Kuroda <i>et al.</i> , (2000) <i>J Neurosci</i> 21:5693-5702 で、 $K_m = 3.6 \mu M$ と $k_{cat} = 1.5/sec$ を推定した。
			1.5		(k_{cat})	
l7	AMPA	PP2A_deph_AMPAR-P_pool	1.9161	24	15.657	PP2A 活性はブルキンエ細胞樹状突起の AMPA 受容体集合を解離させる。酵素活性測定では、PP2A は GluR2 を脱リン酸化する (Launey <i>et al.</i> , (2004) <i>PNAS</i> 101:676-681)。パラメタ値は MEK の i4, i5 と同一。
			6		(k_{cat})	
l8	AMPA	MAPK_deg_AMPAR-P	0.09765	2	25.602	MAPK は遺伝子発現を介して LTD に関与する。どのタンパク発現が LTD に関しているのか分からないため、簡単に、MAPK が直接細胞質内の AMPA 受容体数を減少するとした。
			0.5		(k_{cat})	
l9	AMPA	MAPK_deg_AMPAR	0.09765	2	25.602	MAPK は遺伝子発現を介して LTD に関与する。どのタンパク発現が LTD に関しているのか分からないため、簡単に、MAPK が直接細胞質内の AMPA 受容体数を減少するとした。
			0.5		(k_{cat})	

B.3 パラメタの分類

	既知				未知
	ブルキンエ 細胞内	他の細胞内	試験管内	他のサブ タイプから	
時定数 τ		f2, f3	a6, a8, e1, e4, e9		a1, a2, a3, a4, b1, b2, b3, b4, b5, b8, b9, c1, c2, c4, d1, d2, d3, d4, d5, d6, e2, e5, e7, e10, f1, f4, f5
解離定数 K_d Michaelis 定数 K_m	d1, d2, d3, d4, d5, d6	a1, a2, a4, f1, f2, f3	b4, b5, c1, c2, c4, e2, e5, e7, e10	b1, b2, b3, b8, b9	a3, f4, f5
酵素最大速度 V_{max}		b10, b11, b12	a7, c5, e3, e6, e8	b7	a5, b6, c3
初期分子濃度 []	$[Ca^{2+}]_i$, IP ₃ R, MgGreen1, parvalbumin, calbindin-D28k, low-affinity buffer 1 low-affinity buffer 2	Glu, mGluR, Gq, IP ₃ $[Ca^{2+}]_{ER}$ $[Ca^{2+}]_{ext}$ calreticulin	PIP ₂ , IP ₃ 3-kinase, IP ₃ 5-phosphatase	PLC β 4 (taken from PLC β 1)	SERCA, PMCA, Na ⁺ /Ca ²⁺

表 4 Ca^{2+} ダイナミクスモデルのパラメタ分類の内訳。パラメタの ID は、付録 A の生化学反応に対応している。