

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 藤井 哉

本研究は神経細胞の神経入力にともなう細胞内シグナル伝達の変換過程を明らかにすることを目的として、2種類の異なる細胞内シグナルの同時計測が可能である dual FRET 法（以下、dFRET）を開発し、フォトアンケイジング法による局所刺激と組み合わせた新たな蛍光イメージング法を構築し、細胞内の2種類のセカンドメッセンジャーの濃度もしくはセカンドメッセンジャーの濃度とそのエフェクターの活性の同時計測を以下のとおり実現したものである。

- 1、波長特性の異なる3種類の蛍光タンパクを組み合わせて作成された2種類の異なる FRET プローブが同一細胞に存在するときに、励起波長を変化させることによって2つの FRET プローブのシグナルを分離することが可能であるという dFRET の原理を考案し、それが実際に実現可能であることを示した。
- 2、高速波長分離装置、紫外線パルスレーザー、蛍光波長分離装置を組み合わせることで、dFRET に適した光学系セットアップを構築した。
- 3、新規 Ca^{2+} インディケーターを開発するために、既存の FRET プローブである TNXL に融合された蛍光タンパク、リンカーの長さ、融合される方向を検討した。その結果これまでのものよりも蛍光が長波長側にシフトし、かつダイナミックレンジが大きいという特性を持つ新規遺伝子型 Ca^{2+} インディケーターの Red TNXL を開発した。
- 4、3と同様にして cAMP に対するインディケーターである ICUE3 を改良し、これまでのものよりも長波長蛍光をもつ Red ICUE3 を開発した。この Red ICUE と Red TNXL を用いることで、D1 ドーパミン受容体刺激およびグルタミン酸受容体刺激に対して、それぞれ cAMP と Ca^{2+} という異なる細胞内セカンドメッセンジャーの濃度が上昇することおよびそれらの経時的変化を明らかにした。

- 5、 α CaMKII 遺伝子にドナーとアクセプターとなる 2 種類の蛍光タンパクを融合させることで、新規 FRET プローブ α K2 を開発した。生化学的な解析および FRET 測定により α K2 は Ca^{2+} 依存的に CaM と結合すること、他の α CaMKII と多量体化することを示した。また、分光学的な解析から α K2 の FRET シグナルの変化が Ca^{2+} /CaM の結合および 286 番目のスレオニンに対する自己リン酸化によるものであることを示した。これらの結果から、 α K2 は α CaMKII の活性を検出することのできるインディケーターであることを示した。

- 6、神経細胞の細胞体およびシナプスにおいてグルタミン酸のフォトアンケイジングによる神経刺激に伴う Ca^{2+} 濃度変化と α CaMKII の活性変化の同時計測を行い、上昇した Ca^{2+} 濃度が基底状態に戻った後も α CaMKII の活性化は持続することを明らかにした。変異体 α K2 を用いた実験からこの持続的な α CaMKII の活性化には 286 番目のスレオニンのリン酸化が必要であることを示した。また、流入した Ca^{2+} の総量が一定であっても活性化した α CaMKII の総量が神経刺激の頻度に依存して変化しうる可能性を示唆する実験結果を得た。

以上、本研究はこれまで実現が困難であった、神経細胞やシナプスにおいて複数の細胞内シグナル伝達の同時可視化を実現し、神経刺激にともなう 2 種類の異なるセカンドメッセンジャーの濃度もしくはセカンドメッセンジャーの濃度とエフェクターの活性が異なる経時的変化を示すことを明らかにした。この結果は細胞分子生物学の分野におけるシグナル伝達研究において重要な貢献をなすものと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。