

審査の結果の要旨

氏名 上田 (石原) 奈津実

記憶・学習など脳高次機能の基盤には、特異的な入出力を処理する神経回路網が存在する。神経回路形成において、神経細胞は異なる性質を持つ2種類の突起（軸索と樹状突起）を適切に発達させる必要がある。カルシウム/カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素(CaMK)群は Ca^{2+} 上昇の下流で働く代表的な分子であるが、個々の CaMK が軸索や樹状突起の発達を制御するのか、また、どのように働くかは不明な点が多い。

本研究は、この課題の解明を目標とし、神経活動やリガンド刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の下流で複数の CaMK が神経回路形成に貢献していると仮説を立て、その検証に取り組んだ結果、以下の結果を得ている。

1. 大脳皮質初代培養神経細胞において、CaMK(CaMKI, CaMKII, CaMKIV)の特異的阻害剤である KN-93 を作用させた結果、軸索と樹状突起伸展が阻害されることを見出した。さらに CaMKI と CaMKIV の上流のキナーゼ CaMKK の特異的阻害剤、STO-609 を作用させたところ、軸索ならびに樹状突起伸展が阻害されることを見出した。STO-609 を作用させた際に見られる表現型は STO-609 低感受性変異体によりレスキューされることも確認した。これらの結果から、CaMKK-CaMKI/IV 経路が幼若期の大脳皮質神経細胞の軸索ならびに樹状突起発達を制御することが示された。
2. CaMKI には異なる遺伝子によりコードされる α 、 β 、 γ /CL3、 δ アイソフォームが存在する。そこで、どの CaMKI/IV アイソフォームが軸索ならびに樹状突起発達を制御しているかを同定するため、それぞれのアイソフォームを特異的にノックダウンするショートヘアピン型 RNAi ベクターを大脳皮質初代培養神経細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、軸索ならびに樹状突起伸展を定量した。結果、CaMKI α のノックダウンが軸索伸展を、CaMKI γ /CL3 のノックダウンが樹状突起伸展を特異的に阻害することを見出した。さらに、CaMKI アイソフォームを過剰発現させたところ、CaMKI α が軸索伸展、CaMKI γ /CL3 が樹状突起伸展を特異的に促進することを見出した。以上の結果から、幼若期の大脳皮質神経細胞の軸索伸展は CaMKI α が、樹状突起伸展は CaMKI γ /CL3 がなう制御することを示した。
3. CaMKI α と CaMKI γ /CL3 はキナーゼドメインの相同性が 71% と高く、基質プロファイルが似ていると考えられてきた。そこで、まずは、CaMKI α のノックダウンによる表現型を CaMKI γ /CL3 の過剰発現でレスキューできないかを評価した。結果、CaMKI α のノックダウンによる表現型を CaMKI γ /CL3 でレスキューできないことが示された。面白いことに、細胞質に diffuse に存在する CaMKI α とは異なり、CaMKI γ /CL3 は長い C 末端を持ち、その C 末部分はプレニル化、パルミトイル化修飾を受けるため、ラフト局在を示すことが示されている。そこで、あえて CaMKI γ /CL3 の C 末を欠失させ、細

4. 申請者らは、すでに CaMKI γ /CL3 による樹状突起伸展制御の上流は BDNF であることを報告している (Takemoto-Kimura S#, Ageta-Ishihara N# et al., Neuron: 54, 755-70, 2007, equal contribution)。そこで、同様に CaMKI α による軸索伸展制御の上流のリガンドの探索を行うため、幼若期において軸索伸展を特異的に促進するリガンドを探索した結果、幼若期に興奮性として働く GABA 刺激が軸索伸展を特異的に促進することを見出した。さらに、GABA の軸索伸展促進効果は、KN-93、STO-609 で阻害され、さらに、CaMKI α のノックダウンによっても阻害されることを見出した。以上の結果から、幼若期の脳皮質において、興奮性の GABA 刺激の下流で CaMKI α を介した軸索発達制御機構が存在することが示された。
5. CaMKI α の in vitro における軸索発達制御機構が in vivo においても見られるか否かを評価した。E15 のマウス胎児に in utero electroporation 法を用いて、layer II/III の神経細胞に CaMKI α ノックダウンベクターを導入した。somatosensory cortex の layer II/III の神経細胞は神経活動依存的に対側の S1/S2 somatosensory cortex の境界部分に軸索を発達させることが知られていたため、この領域における軸索発達を CaMKI α のノックダウンベクター導入神経細胞において評価したところ、コントロールと比べて明らかに軸索の発達阻害が引き起こされることを見出した。以上の結果から、CaMKI α は活動依存的な callosal axon の発達を制御している可能性が示された。

以上、本論文は幼若期の軸索と樹状突起を制御する CaMK の解析から、軸索伸展は CaMKI α が、樹状突起伸展は CaMKI γ /CL3 が制御すること明らかにした。さらに CaMKI α の軸索伸展の上流のリガンドを同定し、in vivo においても、CaMKI α が軸索発達制御を担うことを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、Ca²⁺濃度上昇の下流で複数の CaMK が神経回路形成を制御するとの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものとする。