

論文の内容の要旨

論文題目 長期記憶をコードするシナプスから核への神経情報伝達動態解析

氏名 井上昌俊

長期記憶は脳が高次機能を遂行する上で、必須な脳機能である。長期記憶固定化の細胞内の機構として、シナプス活動依存的な細胞内へのカルシウム (Ca^{2+}) 流入により、CaMKK-CaMKIV 経路を介して、転写因子 CREB がリン酸化されることにより、活性化され遺伝子発現を誘導することが知られている。また、一過性（数分）のシナプス入力により、CREB 活性化のタイミング及び持続時間（数十分）が決まることが知られている。このことが長期記憶の固定化に重要な役割を担うと考えられている。これは、シナプス入力情報が CREB 活性化時間という情報に変換される際に、CaMKK、CaMKIV がその情報変換を担うことを示唆している。しかし、シナプスから流入した Ca^{2+} 情報がどのように下流のエフェクター (CaMKK、CaMKIV) の時空間プロファイルに変換されて、核における遺伝子発現を誘導するのか不明な点が多い。そこで、私はシナプス入力から CREB 活性化に至るシグナルカスケード全体に着目し、シグナル情報の時空間的な受け渡しとその分子機構の解析を行った。

1. シナプスから核への時空間的な Ca^{2+} の伝播を解析するために、CaMKK が Ca^{2+} /CaM に対して高親和性であるという性質を利用して、GCaMP 及び RGECO1 を改良し、 Ca^{2+} 高親和性の緑色及び赤色 Ca^{2+} インディケーター (GCaMP-H 及び RGECO-H) を開発した。これらのインディケーターは既存の GCaMP3 及び RGECO1 よりも、海馬培養神経細胞において小さい Ca^{2+} 変動を検出した。このインディケーターを用いて、グルタミン酸アンケーシングによる樹状突起への Ca^{2+} 伝播を測定した結果、半径 16 μm 以内に細胞外から Ca^{2+} 流入があり、半径 50 μm の範囲に Ca^{2+} が伝播することが示された。また、この高感度の Ca^{2+} インディケーターを用いることにより、活動電位を抑制した海馬培養神経

細胞において、局所の樹状突起及びスパインに局限した Ca^{2+} 変動 (miniature synaptic calcium transients) を計測することが可能になった。この結果より、これらの Ca^{2+} インディケータは活動電位閾値下の神経細胞における Ca^{2+} 変動を検出することが示された。

2. Ca^{2+} からそのエフェクターである CaMKK α 、CaMKIV、CREB 活性への時間的な情報の変換を解析するために、生きた神経細胞において、CaMKK α 、CaMKIV 及び CREB 活性を測定する FRET インディケータ (それぞれ KK α プローブ、KIV プローブ、pCREB-AR プローブ) を開発した。海馬培養神経細胞の細胞体において、 Ca^{2+} 上昇と下流のエフェクターの活性を同時計測すると、 Ca^{2+} 上昇直後に CaMKK α 、CaMKIV は活性化するのに対し、CREB は活性化までに約 10 秒の潜在時間があることを見出した。このことは、核外で活性化した CaMKIV が核移行し、CREB 活性化の立ち上がり時間を制御することを示唆している。しかし、これは細胞体全体で Ca^{2+} 上昇が起こるために、核と樹状突起における Ca^{2+} 上昇を区別することが困難である。そこで、これを検証するために、グルタミン酸アンケーシングと Ca^{2+} 測定により、樹状突起に局限した Ca^{2+} 流入から核へのシグナル伝達を解析する刺激法を確立した。この刺激法と RGECO-H と pCREB-AR プローブの同時測定を組み合わせて、樹状突起における Ca^{2+} 上昇からその最下流のエフェクターである CREB 活性への変換機構を解析した。その結果、樹状突起における Ca^{2+} 上昇から約 10 分の遅延時間において CREB が活性化されることが明らかになった。また、薬理的解析により、この CREB の活性化は CaMK 依存的であることが示された。さらに、PAGFP-CaMKIV を用いて樹状突起から核への CaMKIV 動態を解析すると、CaMKIV は樹状突起から核へ 10 分以内に到達することが示された。これらの結果は、樹状突起に局限した Ca^{2+} 流入により活性化した CaMKIV の核移行が CREB 活性化のタイミングを制御することを示唆している。
3. Ca^{2+} からそのエフェクターである CaMKK、CaMKIV 活性への変換を解析するために、生きた神経細胞において、CaMKK α 及び CaMKIV の活性を測定する FRET インディケータを開発した。海馬培養神経細胞において、 Ca^{2+} 濃度と CaMKK または CaMKIV 活性の同時計測により、CaMKK α 及び CaMKIV の活性は Ca^{2+} 入力情報を持続させていることを示した。また、生化学的な解析により、CaMKK α は自己リン酸化に伴い、 Ca^{2+} /CaM 非依存的な活性 (autonomy) をもつことを見出した。これらの結果は、CaMKK が Ca^{2+} 入力情報の分子メモリーとして作用していることを示唆している。

以上、シナプス入力により活性化した CaMKIV の核移行が CREB 活性化のタイミングを制御することと Ca^{2+} 入力による CaMKK、CaMKIV 活性時間の持続が CREB リン酸化の持続時間を制御することが示唆された。これらの CaMK カスケードの時空間的な制御が長期記憶の固定化に重要な役割を果たすと考えられる。