

審査の結果の要旨

氏名 井上 昌俊

長期記憶の固定化には、シナプス入力により流入したカルシウム (Ca^{2+})が、CaMKK-CaMKIV 経路を介して、転写因子 CREB を活性化し、遺伝子発現を誘導することが知られている。しかし、シナプスから流入した Ca^{2+} 情報がどのように時空間的に下流のエフェクターに変換されて、核における遺伝子発現に至るのかわからない点が多い。本研究は、シナプス入力から CREB リン酸化に至るシグナルカスケード全体に着目し、シグナル情報の受け渡しとその分子機構を総合的に解析し、以下の結果を得ている。

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、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、海馬神経細胞において小さい Ca^{2+} 変動を検出することを示した。
2. Ca^{2+} からそのエフェクターである CaMKK α 、CaMKIV、CREB 活性への変換を解析するために、CaMKK α 、CaMKIV 及び CREB 活性を測定する FRET インディケーター (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。
3. 開発した Ca^{2+} インディケーター及び FRET インディケーターを用いて、海馬培養神経細胞の細胞体における Ca^{2+} 上昇と下流のエフェクターの活性への時間的な情報の変換を解析した。その結果、 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。これは、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た。
4. さらに、この可能性を検証するためにグルタミン酸アンケーシングにより、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。この刺激法を用いて、樹状突起における Ca^{2+} 上昇から CREB 活性への変換機構を解析した。その結果、樹状突起に局限した Ca^{2+} 上昇から 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 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 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。以上より、樹状突起で活性化した CaMKIV が核移行し、CREB 活性化の立ち上がり時間を制御している可能性が強く示

唆された。また、GCaMP-H を用いて、グルタミン酸アンケーシングの樹状突起に入力する範囲を解析した結果、1本の樹状突起の半径 16 μm 以内における Ca^{2+} 流入により、CREB 活性化が誘導されることが示唆された。

5. 海馬培養神経細胞の細胞体において Ca^{2+} と CaMKK α 活性を同時測定すると、CaMKK α の活性は Ca^{2+} が減衰した後も 1 分以上にわたり持続する。加えて、CaMKK α の FRET インディケーターが自己リン酸化を検出すること。さらに、生化学的な解析により、CaMKK α は一度活性化すると、 Ca^{2+} /CaM 非依存的な活性 (autonomy) があることを見出した。これらの結果から、CaMKK が Ca^{2+} 入力情報の分子メモリーとして作用することが示唆された。

以上、本論文は CaMKII 以外の CaMK ファミリーメンバーにおいて、初めて CaMKK に自己リン酸化に伴う autonomy があることを見出し、CaMKK の Ca^{2+} /CaM 非依存的な活性の持続が CREB リン酸化の持続時間の制御に寄与していることを示唆した。また、樹状突起で活性化した CaMKIV が核移行し、CREB 活性化の立ち上がり時間を制御していることが示唆された。本研究は、長期記憶の固定化におけるシナプスから核へのシグナル伝達機構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考えられる。