

研究課題別評価

1.研究課題名 :長期記憶の分子機構の探索

2.研究者氏名 :尾藤 晴彦

グループメンバー 野々村 貴美子 (研究期間 H14.4.1. ~ H.15.9.30.)

3.研究の狙い :

長期記憶が成立するために必須な分子機構として、1)転写因子 CREB がシナプス入力特異的に活性化することや 2)シナプス伝達の場合である樹状突起スパインにおけるシグナル伝達効率の上昇が維持されることがこれまで提唱されている。

前者について研究代表者は、以前、CaMKK-CaMKIV カスケードが海馬 CREB リン酸化の必須経路であることを世界に先駆けて示した。しかし、海馬以外の部位における CREB 活性化のメカニズムや意義については、不明であった。そこで本研究では、CaMKIV 類似キナーゼドメインを有するキナーゼを単離し、海馬以外の脳部位における CREB キナーゼの候補を同定し、その生物学的機能を決定することを試みた。

後者については、グルタミン酸受容体のシナプス膜への新規挿入が重要な意義を有することが示唆されているが、その背景にあるトラフィッキング機構や細胞骨格再編成については未解明のままであった。我々はとくにスパイン形態を規定する細胞骨格動員に焦点を絞った。興奮性シナプスが局在する樹状突起スパインにはアクチンのみが細胞骨格成分として存在することが知られていたことから、アクチンに蛍光分子 GFP を融合させて蛍光プローブ GFP-actin を作成し、その動態と神経活動依存的動員を生きた神経細胞で可視化する試みを行った。

これらの実験から、記憶形成・貯蔵に関する転写調節・細胞骨格シグナリングの果たす新たな役割を明らかにすることにより、記憶障害や痴呆の予防・進行阻害のための新たな創薬標的探索の端緒となることが期待される。

4.研究の結果 :

4-1) CaMKIV の小脳顆粒細胞生存における CREB キナーゼとしての必須の役割の解明 (See et al., FASEB J. 2001; Bito and Takemoto-Kimura, Cell Calcium, 2003) :

従来から、我々を含め多くのグループが、CaMKIV は小脳顆粒細胞において非常に強く発現していることを見出していたが、その機能は不明であった。フランス Strasbourg 大 Loeffler 研からの短期派遣留学生 Violaine See との協同研究により、a) 小脳顆粒細胞にて CREB が脱分極依存的にリン酸化され、この過程に CaMKIV が必須であること、b) basal な活動依存的 CREB リン酸化にも CaMKIV が関与していること、c) この後者によって、小脳顆粒細胞の長期的生存が可能となることを見出した。このことにより、CaMKIV-CREB が長期可塑性以外にも、細胞生存のような長期的表現型形成にも関与していることを初めて報告した。

4-2) CaMKIV 類似 CREB キナーゼ (CLICK) の同定と機能解析 (Takemoto-Kimura et al., JBC 2003; Ohmae et al., unpublished data) :

CaMKIV キナーゼ領域のホモロジーを指標に、PCR/ in silico cloning により、CREB 活性を修飾可能なキナーゼを 3 つ同定して、暫定的に CLICK-I、-II、-III と名づけた。これらはいずれも機能未同定のキナーゼで、脳特異的発現分布を有し、in vitro の CREB 転写活性を修飾することから、長期

記憶・長期可塑性に対する貢献があることが期待された。そこで、現在これらについて、遺伝子破壊マウスを作成中である。

CLICK-IIIについては、扁桃体中心核、視床下部内副側核、松果体に極めて強く発現しているCaMKIアイソフォームであることを見出し、かつ膜局在シグナルであるC末端CAAX配列により脂質修飾を受け、膜移行を行う神経特異的キナーゼとしては最初の例であることを報告した。

4-3) 樹状突起スパインへの神経活動依存的アクチン集積機構の解明 (Furuyashiki et al., PNAS, 2002) 突起形成におけるRhoシグナル経路の役割の解明 (Yamasaki et al., Development 2001; Arakawa et al., JCB, 2003; Bito, J. Biochem., 2003)

GFP-actin imagingを生きた初代培養海馬錐体細胞で行った結果、a)アクチン細胞骨格に動的な成分と静的な成分が共存すること、b)一定の条件下でスパインや細胞体辺縁膜へのアクチンの集積が神経活動依存的に引き起こされること、c)スパインへのアクチン移行はNMDA受容体依存的カルシウム流入により、また細胞体辺縁膜へのアクチン集積は、電位依存性カルシウムチャンネルにより特異的に引き起こされることを発見した。

また、突起形成初期におけるアクチン細胞骨格制御の分子機構を解明する目的で、小脳顆粒細胞神経突起モデルを選び、その形成・伸展機構を探索した。その結果、Rho結合キナーゼならびにformin蛋白mDia1の連携による突起制御経路を解明した。

5. 自己評価：

研究代表者がこれまで自分自身の手でオリジナルな発見をしてきた CaMKIV/CREB 経路 (Bito et al., Cell, 1996) ならびに Rho/ROCK/actin 経路 (Bito et al., Neuron, 2000) を出発点に、本さきあげ研究 21 を通じ、3 年間で以下の 3 つの新たなコンセプトを発見・提唱することができた。

(1) 長期可塑性制御を超えた CaMKIV/CREB 経路の普遍的重要性の発見

(2) 神経突起形成・制御に関わる Ca^{2+} /Rho 経路の解明

(3) CLICK-III の脂質修飾による膜局在制御の発見

(2) は京都大学成宮周教授を含む多くの協同研究者に恵まれたこともあり飛躍的な進展をとげ、幸いにも HFSP 若手研究者 Grant や日本薬理学会学術奨励賞をいただく契機となった。しかしむしろ今後の展開が興味深いのは (1) と (3) についてであり、望外の発見であった。これらについては、現在作製中 (あるいは現存) のマウス変異体の解析をしっかりと行い、その意義を詰めていきたい。

このように短期間で多くの発見があった反面、個々の発見の確認・解析に多くの時間を注入せざるを得ず、(委託業者での感染事故など想定外の要因があったにせよ) マウス変異体作製が遅れ、本事業の修了に間に合わなかったことは、おおいに反省すべきである。個体レベルでの解析なくして長期記憶の分子機構とはいえない、という批判は、甘んじて受ける覚悟である。また未発表の CLICK-I、-II 等についても興味深い中間結果が多く得られているが、論文発表まで至らなかった。

幸いにも本研究を引き続き JST の発展継続事業として採択していただけたので、一刻も早くこれらの点を修正し、さらなる発見を目指して今後とも探索を続けていきたい。

6. 研究総括の見解：

シャープな解析力をもつ。医学畑出身のキャリアを活かして大所、高所から課題の重要性を把握し、独自の着想のもとに精密なアプローチを行っていることは評価できる。長期記憶の形成機

構の解明を、記憶成立の中心的な場である海馬における転写調節因子 CREB の動態に狙いを定めて追求し、成果をあげている。将来的には記憶の病態解明とその制御技術の開発を目指している。最近のめざましい成果を評価されて、京大・大学院医学系研究科講師より東大・大学院医学系研究科助教授へと抜擢された。

7. 主な論文等：

原著論文

1. Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICK-III /CaMKI?, a novel membrane-anchored neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). J. Biol. Chem. 278: 18597-18605, 2003.
2. Arakawa Y, Bito H, Furuyashiki T, Tsuji T, Takemoto-Kimura S, Kimura K, Nozaki K, Hashimoto N, Narumiya S. Control of axon elongation via an SDF-1? / Rho / mDia pathway in cultured cerebellar granule neurons. J. Cell Biol., 161: 381-391, 2003.
3. Furuyashiki T, Arakawa Y, Takemoto-Kimura S, Bito H (corresponding author), Narumiya S. Multiple spatiotemporal modes of actin reorganization by NMDA receptors and voltage-gated Ca²⁺-channels. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 99: 14458-14463, 2002.
4. Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, Kengaku M. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. Development 128: 3133-3144, 2001.
5. Yamamoto M, Hilgemann DH, Feng S, Bito H, Ishihara H, Shibasaki Y, Yin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. J. Cell Biol., 152: 867-876, 2001.
6. See V, Boutiller AL, Bito H, Loeffler JP. Calcium-calmodulin dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule cells. FASEB J., 15: 134-144, 2001.

総説・解説

1. Bito H, Takemoto-Kimura S. Ca²⁺/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanism critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival. Cell Calcium, 34: 425-430, 2003.
2. Bito H. Dynamic control of neuronal morphogenesis by Rho signaling. J. Biochem. 134, 315-319, 2003..
3. 古屋敷智之、成宮周、尾藤晴彦. 神経細胞におけるアクチン細胞骨格系の制御 in 動くシナプスと神経ネットワーク (塩坂貞夫編、金芳堂) pp.25-34, 2003.
4. 尾藤晴彦、荒川芳輝. 中枢神経細胞における突起形態制御機構。脳神経外科速報 13: 845-850, 2003.
5. 尾藤晴彦. CREB の脳神経系における役割-長期記憶とアポトーシスの制御。医学のあゆみ, 203: 538-540, 2002.
6. 荒川芳輝、尾藤晴彦. Rho/ROCK と神経細胞形態。BioClinica 17: 1154-1158, 2002.
7. 尾藤晴彦、古屋敷智之、竹本-木村さやか、荒川芳輝、成宮周. マウス海馬錐体細胞初代培養法。実験医学, 20: 2247-2252, 2002.

8. 古屋敷智之、荒川芳輝、竹本-木村さやか、尾藤晴彦、成宮周. 神経活動によるアクチン細胞骨格制御とその多様性. 実験医学別冊「バイオイメージングでここまで理解る」(楠見明弘・小林剛・吉村昭彦・徳永万喜洋編)羊土社刊、pp.32-36, 2002.
9. 古屋敷智之、尾藤晴彦、成宮周. Rho と細胞骨格制御. in シグナル伝達 細胞運命と細胞機能を制御する仕組み. (西田栄介、大野茂男編、共立出版)pp.49-67, 2001.

口頭発表

国際会議

招待講演 8 件 (海外 4 件、国内 4 件)、一般演題発表 7 件

国内学会 研究会等

招待講演 25 件 (受賞講演 1件、シンポジウム 10 件、研究会 14 件)

一般演題発表 13 件 (協同研究者による招待講演 4件を含む)

受賞

2002 年 4 月 HFSP若手研究者 Grant 受賞

2003 年 3 月 日本薬理学会学術奨励賞受賞