

氏 名	ふじ 藤 井 ひろ あき 彰
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2683 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Calcineurin および Superoxide による小脳長期抑圧後期相誘導調節機構の解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 平 野 丈 夫 教 授 藤 吉 好 則 教 授 西 田 栄 介

論 文 内 容 の 要 旨

小脳長期抑圧 (LTD) は、運動学習の細胞レベルの機構と考えられているシナプス可塑性で、小脳プルキンエ細胞において伝達物質であるグルタミン酸に対する応答性が持続的に減弱する現象である。LTD が長期間持続するには、新規の転写に依存する後期相が誘導されることが不可欠である。しかしながら、この長期抑圧後期相誘導の分子機構は明らかになっていない。本論文では、脱リン酸化酵素 Calcineurin および Superoxide が LTD 後期相誘導に関与することを明らかにした。

小脳培養系においては、細胞を高カリウム・グルタミン酸溶液 (K/glu) で処理すると、LTD 後期相が引き起こされることが、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の計測により示されていた。申請者は、Calcineurin 阻害剤を培養液に投与すると、mEPSC の大きさが24時間以上にわたって減弱する現象を見出した。この Calcineurin 阻害による mEPSC の減弱現象の発現は、K/glu 処理による LTD 後期相と同様に、新規の転写、Ca/Calmodulin dependent kinase (CaMK) 活性および代謝型グルタミン酸受容体 1 (mGluR1) 活性に依存していた。また、Calcineurin 阻害による mEPSC の減弱現象と K/glu 処理による LTD 後期相は加算的には起こらなかった。これらの結果は、Calcineurin 阻害による mEPSC の減弱現象と K/glu 処理による LTD 後期相が発現機構を共有していることを示し、Calcineurin 阻害によって LTD 後期相が引き起こされたと考えられる。次に、Calcineurin の活性を上昇させると LTD 後期相誘導が抑制されるか否かを検討した。構成的活性型 Calcineurin をプルキンエ細胞の核内で発現させたところ、K/glu 処理による LTD 後期相の誘導が阻害された。以上の結果から、Calcineurin は LTD 後期相の誘導を負に制御していることが明らかとなった。

実験結果から、LTD 後期相発現に際して Calcineurin の活性が抑えられていると推測されるが、K/glu 処理は細胞内の Ca イオン濃度の上昇を介して Calcineurin を活性化することが予想される。申請者はこの矛盾を解くには、K/glu 処理時に Calcineurin を不活性化する機構の存在が必要と考え、Calcineurin を不活性化する分子である Superoxide に着目した。まず、K/glu 処理時におけるプルキンエ細胞内の Superoxide 量を測定し、LTD 後期相を誘導する K/glu 処理時に細胞内 Superoxide の持続的増加を観測した。また、Superoxide の捕捉剤が、K/glu 処理による LTD 後期相誘導を抑制することも示した。この抑制作用は Calcineurin 阻害によって消失することから、Superoxide は Calcineurin の不活性化を介して LTD 後期相誘導を促進すると考えられる。

以上の結果から、LTD 後期相の発現は Calcineurin により抑制されており、Superoxide によって Calcineurin が不活性化されることにより、LTD 後期相が引き起こされると推定される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

高次脳機能において重要な学習や記憶の細胞レベルの基盤と考えられている現象にシナプス可塑性がある。シナプス可塑性の長期間保持は、新規の転写に依存したプロセスに依存しており、後期相と呼ばれている。運動学習に関わるシナプス可塑性である小脳長期抑圧 (LTD) にも後期相が存在するが、その発現誘導の分子機構はほとんど分かっていない。本研究

において、申請者は脱リン酸化酵素 Calcineurin が LTD 後期相誘導を抑制しており、Superoxide による Calcineurin の不活性化が LTD 後期相誘導を引き起こすことを明らかにした。

申請者は LTD 後期相の測定に、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の計測を用いた。Calcineurin を阻害すると、mEPSC の大きさが24時間以上にわたって減弱する現象を見出した。そして、この減弱現象が LTD 後期相と共通の分子機構で誘導されることを示した。また、Calcineurin の活性を上昇させると、LTD 後期相の誘導が抑制されることも示した。これらの結果は、通常は Calcineurin が LTD 後期相の発現を抑制しており、Calcineurin の活性が低下することにより LTD 後期相が引き起こされることを示唆している。申請者はさらに、LTD 後期相発現時に、Calcineurin を不活性化する機構の解析も行った。神経活動によって増加し Calcineurin を抑えることが知られている Superoxide に注目した。申請者はまず、LTD 後期相を誘導する刺激によって Superoxide が細胞内に蓄積することを示した。次に、Superoxide を除去することで、LTD 後期相誘導が阻害されることを明らかにした。これらの結果は LTD 後期相を誘導する刺激により、細胞内に蓄積される Superoxide が、Calcineurin を不活性化することで LTD 後期相を引き起こしていることを示している。

シナプス可塑性後期相は記憶保持の基盤となる機構と考えられ、その誘導条件の制御機構解明の意義は大きい。本研究において、LTD 後期相発現に Calcineurin と Superoxide が関与することが示された。この知見は、記憶・学習の分子機構の解明に寄与する重要な成果であると評価できる。したがって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、主論文に報告されている研究業績を中心に関連研究分野について試問を行い、合格と認めた。