

戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「可塑性シグナルの操作による
長期記憶の改変」

研究期間：平成15年10月 1日～
平成19年 3月31日

尾藤 晴彦
(東京大学、准教授)

1. 研究実施の概要

背景

研究代表者は、本SORST研究に先立ち、さきがけ21研究(ポスドク型)事業「長期記憶の分子機構の探索」(2000~2003)を通じて、長期記憶の形成とその維持機構を規定する分子機構の探索を続けてきた。

長期記憶とは、海馬という脳の部位の神経ネットワークの中で、一定の数のニューロン間の連結性が持続的に高まった状態である。この状態を説明する作業仮説として、1) 神経活動が高まったとき、神経活動依存的にCaMKK/CaMKIV経路(Bito et al. Cell 1996; Bito, Cell Calcium 1998)を通じて核でのCREB転写が活性化され、持続的にシナプスへ新規蛋白が供給されること、2) 高い神経活動の持続に伴い、カルシウム依存的なアクチン骨格リモデリング(Bito, J. Biochem, 2003)が生じ、神経やシナプスの形態が変化し、その変化が持続的に維持されること、の2点を重要と考えた。そこで、これらに関与する分子の単離・同定・解析を試みた。

その結果、以下のような成果を得た。

- 1) 長期記憶のマスタースイッチと目される転写因子CREBの制御を媒介する分子候補として、新規CaMKファミリー分子CLICK-I, -II, -IIIを単離した(Takemoto-Kimura et al. J. Biol. Chem. 2003; Bito and Takemoto-Kimura, Cell Calcium 2003);
- 2) 強い神経活動下のアクチン骨格再編成の様子を、世界で初めて可視化することに成功した(Furuyashiki et al., PNAS 2002);
- 3) 神経形態制御・特に神経アクチン制御に関わるRhoシグナリングを初めて明らかにした(Bito et al. Neuron, 2000; Arakawa et al., J. Cell Biol. 2003)。

また同時に、神経組織に任意の遺伝子を導入するためのウィルスベクター構築法やデリバリー手法の検討・開発を進め、いち早く神経細胞におけるRNAiの成功例を発表して注目された(Arakawa et al., 2003; cited in Zeringue and Constantin-Paton, Curr. Opin. Neurobiol. 2004)。

目標

上記のようなこれまでの成果・予備的検討を元に、本SORST研究計画(2003.10-2007.3)では、これまで明らかにしてきた分子機構が、個体・システムレベルでの長期記憶・長期神経可塑性に対してどのように貢献しているかを引き続き解析し、生物学的意義を明らかにすることを目指す。そのために、特にアクチンシグナル伝達系ならびにCaMK伝達系によるシナプス機能の分子制御を個体レベルで行うことを目指す。これらの知見を得

ることにより、最終的に、可塑性シグナルを修飾するベクターの作成および薬剤同定・開発を行い、個体レベルにおける長期記憶の改善（ないし低下の防止）に直結する戦略の開発に貢献する。

成果

1) CREBリン酸化活性を有する新たなCaMキナーゼI, IV類似キナーゼとして先に同定したCLICK-I, CLICK-II, ならびに新たに同定したCLICK-I, II-relatedがそれぞれDCLK1, 2, およびDCLK3のマウス全長cDNA orthologであることを明らかにした。いずれも a) CaMキナーゼ様の配列を有するにもかかわらず、カルシウム・カルモジュリン結合がないこと、b) N-末端のdoublecortin motifが微小管結合すること、c) C-末端のキナーゼ領域がCREBコアクチベーターTORCをリン酸化し、その核内移行阻害によりCREB転写が抑制されること、を証明した (Ohmae et al., J. Biol. Chem. 2006)。このCREBコアクチベーターリン酸化によるCREB転写抑制の生物学的意義 (Okuno and Bito, AFCS/Nature Molecule Pages, 2006) を明らかにするため、成体大脳皮質・海馬で発現しているCLICK-IIのノックアウトマウス作成を完成し、繁殖させるとともに現在表現型解析中である。さらに、CLICK-I, CLICK-IIのダブルノックアウトマウスも作成中である。

2) CaMK経路とアクチン経路の接点を探る過程で、4つ存在するCaMKIアイソフォームの一つ、CLICK-III/CaMKI γ (Takemoto-Kimura et al., J. Biol. Chem. 2003)が、神経回路形成初期において発現し、キナーゼ活性依存的パルミトイル化という新規の制御機構により脂質ラフト膜へ移行すること、その結果、特異的に樹状突起形成と伸展を正に制御するというメカニズムを明らかにした (Takemoto-Kimura et al. Neuron, 2007)。また別個のキナーゼが軸索において同様の機能を担っていること、その機構が分子種特異的な低分子量G蛋白質選別-アクチンリモデリングによることを発見した (Ishihara et al. 投稿準備中)。

3) Sindbis virus、Lentivirusやmass electroporationによる神経細胞特異的遺伝子導入のシステムを確立した。これによる異所性過剰発現ならびにRNA干渉（およびそのレスキュー）を行うことが可能となった (Takemoto-Kimura et al. Neuron, 2007)。Lentivirusを用いた導入技術を、EGFP-actin (Furuyashiki et al., PNAS 2002)を神経細胞特異的に発現する遺伝子改変マウスに応用し、神経回路発達を促進させたり、抑制させたりするための分子操作の基礎実験を準備中である。

展望

本研究を通じて、1) 新たなCREBコアクチベーター制御経路、ならびに2) 樹状突起形成・促進機構を発見した。CREB転写の誘導ならびに樹状突起・スパインの形態リモデリングは、長期記憶の固定の分子機構として注目されており、基礎的な成果は十分得られたと考えられる。今後は本研究の成果を個体動物に応用するための工夫が望まれる。本研究では、個体動物へのウィルスベクターを用いた遺伝子導入による形質改変を試みているが、基礎的実験を超えた個体への応用は今後の課題である。

2. 研究構想

研究の背景と作業仮説

記憶・学習を含め、様々な脳高次機能の基盤には、特異的な入・出力関係を保持する神経回路網が存在する。このニューラル・ネットワークは神経細胞間、あるいは神経細胞内の多種多様なシグナル伝達機構によって支えられている。

中枢神経系を構築しているニューラル・ネットワークには、2つの普遍的な特徴がある。一つは、一定のプログラミングによって、普遍的に神経細胞同士が結合し、機能的なシステムを作り上げる「設計図」とそれを間違えずに読み出す、厳格な「文法」の存在である。もう一つは、個体ごとに内部・外部の環境の変化に刻一刻と対応できる「適応性・順応性」の存在と、過去の経験の記憶に基づき応答を修飾していく内在的な「学習能力」である。

このように「剛」と「柔」の特性を兼ね備える神経回路網を支えているシグナル伝達機構は、電氣的・化学的シグナルの密接な絡み合いから成り立っている。我々は、特に化学シグナルのほとんどが未知であることに着目し、これら一つ一つを同定し、その作動原理を明らかにすることを戦略して研究を進めてきた。

長期記憶とは、海馬という脳の部位の神経ネットワークの中で、一定の数のニューロン間の連結性が持続的に高まった状態であると現在理解されている。我々は生化学者としての立場から、長期記憶成立時における連結性が高まった状態を説明するためには、少なくとも二つの必要要件が存在すると考えた。すなわち、神経活動が高まったとき、その活動が持続するためには、

1) 神経活動依存的に核でのCREB転写が活性化され、持続的に(おそらくシナプスへ)新規蛋白が供給されること、

2) 高い神経活動の持続に伴い、神経やシナプスの形態が変化し、その変化が持続的に維持されること、

の2つが重要であると考えた。この各々の分子基盤を明らかにし、この作業仮説を検証していくのが、本課題の基礎研究として大目標である。

先行研究に基づく本課題の研究計画

本研究に先行研究であるさきがけ21研究においては、活動依存的 CREB 転写制御

と神経形態形成に関与する新たな機能分子の単離・同定・解析を試みた。その成果に基づき、上記作業仮説をさらに検証するため、以下のような計画を立案した。

1) 新規 CREB 制御経路の同定

我々は、これまでに、CREBという転写因子の長期可塑性における重要性とそのときに関与するCaMKIV/CREB経路の役割を発見し、世界に先駆けて発表してきた(Bito et al., Cell, 1996; Deisseroth, Bito et al., Neuron, 1996)。この発見は、その後、ノーベル賞学者である利根川やKandelらによっても追試され、最近の脳科学の教科書にも広く引用されている。申請者は、既事業においてCREB情報伝達を担う新たな分子(群)の同定・クローニングする過程で、CaMKIV以外にも類似のキナーゼが存在し、CREB機能修飾をする可能性を考えた。

さきがけ2 1 研究期間において、CREB転写活性を修飾する脳特異的キナーゼおよび類似キナーゼを新たに4つ同定することに成功した。同定した分子は、その機能性から、各々、CaMK-Like CREB regulatory kinase (CLICK) -I, CLICK-II, -CLICK-I, II-related, CLICK-IIIと名づけ、いずれもその全長cDNAを単離した。いずれも、記憶の場である海馬で発現しており、しかしながら、主たる発現部位がそれぞれ異なっており、別々の生物学的役割を担っていると考えられた(Takemoto-Kimura et al. J. Biol. Chem. 2003; Bito and Takemoto-Kimura et al. Cell Calcium 2003)。

そこで、本 SORST 課題においては、これら4キナーゼの機能解明を実施し、CREB転写を修飾するか否かを検証すること、また適当な遺伝子破壊マウスを作成しこの生物学的意義の検討を行うことを目的とした。

2) シナプス周辺形態制御機構の同定

分裂細胞における non-muscle actin の制御には、低分子量 G タンパク質 Rho およびその類似体 Rac1 および Cdc42 が密接に関与していることから、非分裂細胞である神経細胞においても、神経形態形成における Rho シグナリングの重要性が指摘されていたが、具体的なシグナル伝達機構の同定はなかった。

そこで、さきがけ研究においては、まず神経細胞の形態可塑性が実際に神経活動依存的なアクチン再編成により起こることを示した(Furuyashiki et al., PNAS 2002)。またシナプス形成に先立つ神経回路形成においては軸索伸展が極めて主導的な役割を果たすが、Rho エフェクターである ROCK と mDia が拮抗的にかつ協調的に働くことにより、軸索形成・誘導が成立することを明らかにした(Bito et al., Neuron 2000;

Arakawa et al. J. Cell Biol. 2003)。

このような経緯から、本課題では、残る大きな謎として、樹状突起形成・伸展に対して働くシグナル伝達機構の解明を試みることを計画した。

3) 神経細胞の機能改変のための技術開発

さきがけ 21 研究の過程で、単一シナプスレベルでのアクチンイメージング (Furuyashiki et al., PNAS 2002) や神経細胞の RNA 干渉法 (Arakawa et al. J. Cell Biol. 2003) などを開発することに成功した。

これらの技術開発をさらに推進するため、本研究計画では、神経特異的なウィルスベクター発現系を構築し、個体動物レベルでの神経機能改変につながるような遺伝子導入手法の確立を試みることにした。それを通じ、動物個体の高次機能の一つである長期記憶を、ウィルスベクターにより遺伝子治療的に改変する手法の確立を試み、推進する。

研究の展開に伴う計画の変更

1) 新規 CREB 制御経路の同定

CREB regulatory kinase として同定したキナーゼのうちの 3 つ (CLICK-I, CLICK-II および CLICK-I, II-related) は、CREB リン酸化酵素ではないかという当初の予想を裏切り、基本的に CREB 抑制に働く新たなタイプのキナーゼであることを見出した。そこで、上記 3 キナーゼのうち神経特異的発現を示す CLICK-I と CLICK-II の遺伝子破壊マウス作成を進めるとともに、この CREB 抑制を決定する新たなキナーゼ基質同定を重要な目標とした。

また CLICK-I, CLICK-II の両者がマウス第 5 染色体上で近接している遺伝子であることから、single KO の掛け合わせによる double KO の樹立が困難であると予想された。そこで、CLICK-II-KO-ES に CLICK-I-KO の targeting vector をさらに導入し、相同組換えが同じ染色体対上で起こった個体を直接作成するという戦略に変更した。

2) シナプス周辺形態制御機構の同定

当初、軸索制御のすでに示した ROCK や mDia の樹状突起形成に係る役割を解明することを想定していたが、CLICK-III の RNAi 解析中に、全く予想していなかった樹状突起選択的障害が新たに認められた。この結果を踏まえ、本研究では、CLICK-III/CaMKII γ の樹状突起形態形成作用のメカニズム解明を重点的に進めた。

3) 神経細胞の機能改変のための技術開発

当初は、adenovirusやsindbis virusを用い、成体脳へ直接ウィルスベクターを注入して遺伝子産物の大量発現による機能改変を考えていたが、両ウィルスとも、実は神経細胞特異性が高くないため、ベクターとして限界があることが明らかになった。そのため、実験計画においては、細胞種特異的なプロモータを用いることのできるlentivirusやAAVを用いる戦略に切り替えることに決断した。とくにインサート長がより長いlentivirusを用いたパイロット実験をまず推進することを決めた。

が、その矢先に、法律改正時における条文整備の不備のため、lentivirus作成が大臣申請を伴う実験にグレードアップされてしまい、大きく時間をロスすることとなった。

3. 研究内容

3-1. CREB 転写可塑性を基盤にした長期可塑性シグナルの探索：新規 CREB 制御キナーゼ候補 CLICK-I, CLICK-II, CLICK-I, -II-related の同定と CREB 抑制機構の解明

(Ohmae et al. J. Biol. Chem. 2006)

我々は以前から、海馬長期記憶・長期神経可塑性に CaMKIV/CREB 経路が必須であることを証明してきた (Bito et al. Cell 1996; Bito Cell Calcium; Bito and Takemoto-Kimura,

Cell Calcium 2003)。本酵素と類似機能の分子の存在を探索するため、触媒部位を中心にホモロジーを検索した。PCR 法ならびに、CREB リン酸化を媒介する領域に対するホモロジーにより CaM kinase IV-like CREB regulatory kinase (CLICK) の候補をマウス海馬 cDNA より探索した結果、新たに 3 つのキナーゼを同定し、CLICK-I (CL1)、CLICK-II (CL2)、CLICK-I, -II-related (CLr) と名づけた (図 1)。

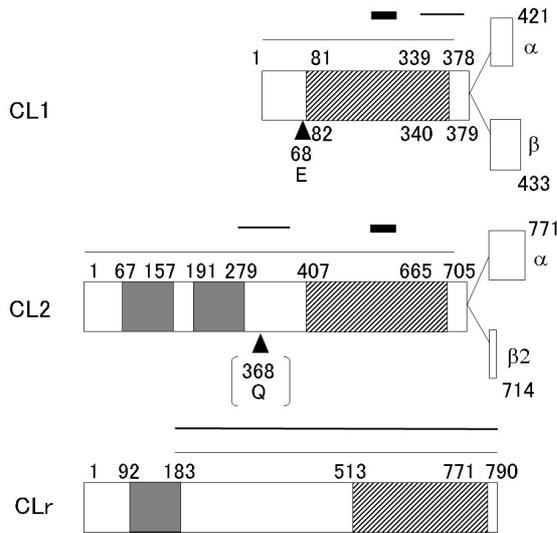


図 1 : CL1, CL2, CLr の構造

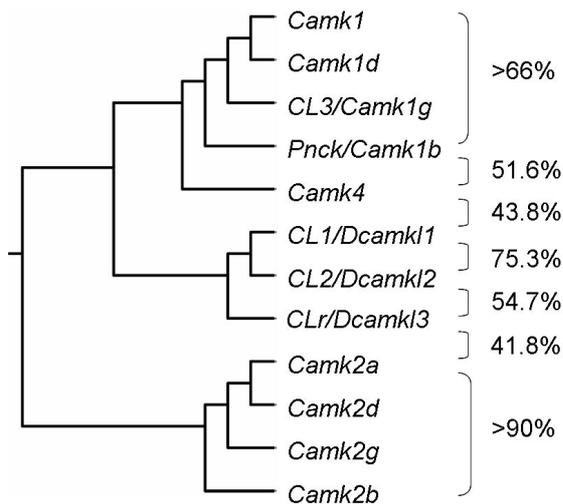


図 2: CL1/CL2/CLr は CaMKI/IV ファミリーと CaMKII ファミリーの間位置する

これらはいずれも機能未同定のキナーゼで、海馬記憶成立に必須である CaM キナーゼである CaMKII ならびに CaMKIV と、進化系統樹上にて丁度中間に位置するキナーゼであることが判明した (図 2)。いずれも脳特異的あるいは、脳に多い発現分布 (図 3) を有し、in vitro の CREB 転写活性を修飾することから、CLICK-I, CLICK-II, CLICK-I, -II-related とともに長期記憶・長期可塑性に対する何らかの貢献があることが期待された。

in vitro にて転写制御活性を確かめたところ、予想に反し、CRE 活性を促進せず、逆

に抑制するキナーゼ群であることが明らかになった。またリコンビナント CREB タンパクをリン酸化する活性は検出できなかった。

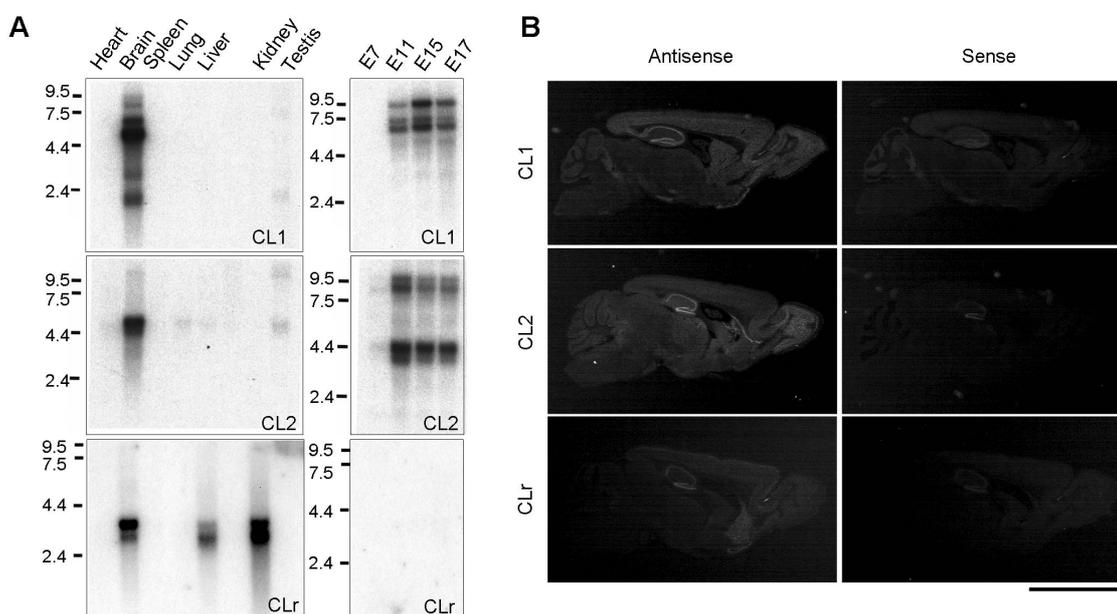


図3: CL1/CL2/CLrの脳神経系における発現分布。A) Northern解析、B)マウス成体脳における in situ hybridization

そこでさらに、検討を加えたところ、a) CaMキナーゼ様の配列を有するにもかかわらず、カルシウム・カルモジュリン結合がないこと、b) N-末端のdoublecortin motifが微小管結合すること、c) C-末端のキナーゼ領域がCREBコアクチベーターTORCをリン酸化し、その核内移行阻害によりCREB転写が抑制されること(図4)を証明した(Ohmae et al., J. Biol. Chem. 2006)。

我々のクローニングに併行して、CLICK-Iと類似のキナーゼDCaMKL1の同定がヒトおよびラットでも報告されていたが、成体における発現を確認してそのmRNAの海馬発現を示した仕事はなく、またDCaMKLファミリーを同一種(特にマウス)でDCaMKL1~3全長cDNAを揃えたのは我々の仕事が初めてである。

このような仕事の成果に基づき、本分子本来の機能がdoublecortin領域でなく、キナーゼ領域にあることを是認し、human およびmouse nomenclatureがDCaMKL (doublecortin and CaM kinase-like) からDCLK (doublecortin-like kinase)へ変更された(Fuse and Bito, AFCS/Nature Molecule Page, 準備中)。

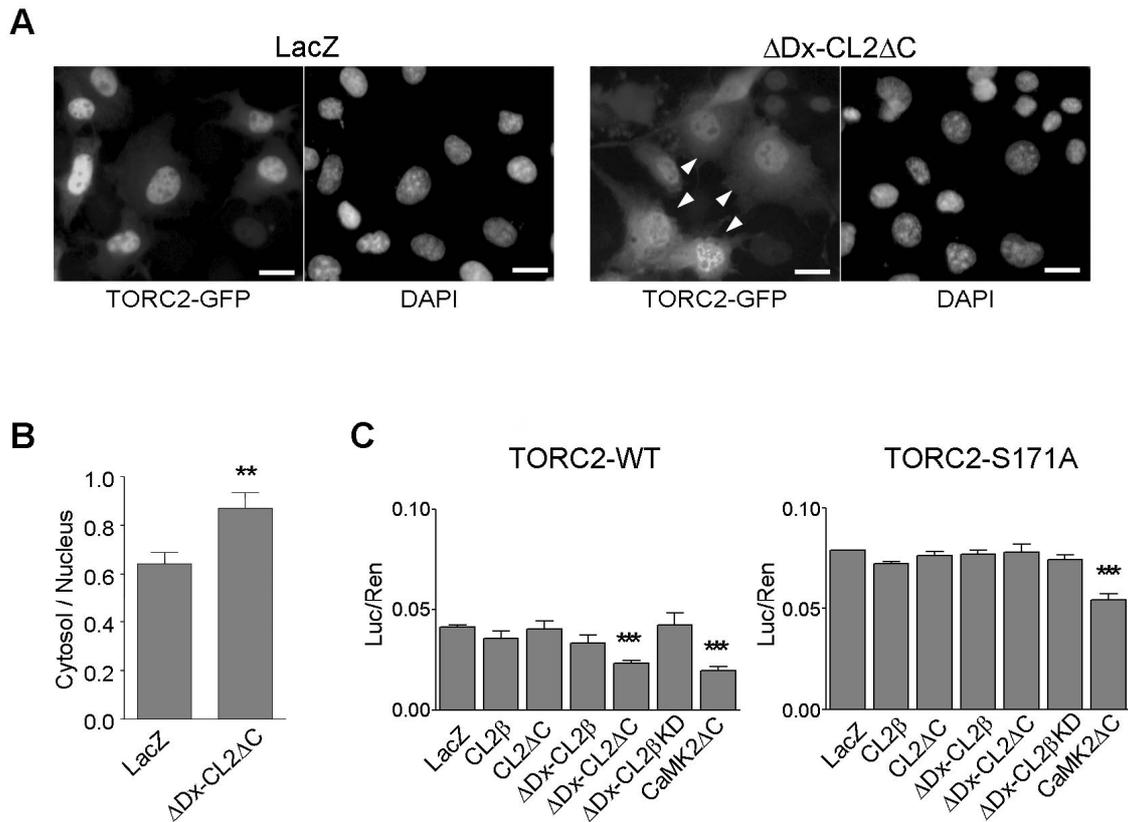


図4: CL2 は TORC-Ser171 リン酸化を介して、核内移行を阻害し CREB 依存的転写を抑制する。A)、B) CL2 活性による TORC の核内移行阻害。C) TORC-Ser171 リン酸化は CL2-依存的 CRE 転写の抑制に必須である。CaMKII 依存的抑制には影響がない。(スケール、10ミクロン)

3-2. CREB 転写可塑性を基盤にした長期可塑性シグナルの探索: CLICK-I, -II 遺伝子欠損マウスの作成 (Okamura et al. 投稿準備中)

我々は、上記の仕事に引き続き、CLICK-I、CLICK-II、CLICK-I,-II-relatedの全遺伝子構造をヒトならびマウスで決定した。

CLICK-I, -IIのキナーゼ領域を含むエクソン構造を明らかになったので、常法により、各々のキナーゼにつき、ATP結合部位のLysineを含むエクソンを欠損するタイプの replacement 型targeting vectorを作成した。ES導入とマウス作成は、BL/6遺伝子背景のマウスES細胞の扱いの実績が世界で一番多いオーストラリアのOzgene社へ委託した。同社にて遺伝子破壊ES細胞は、C57BL/6由来ES細胞であるBruce-4株にて得られた。

CLICK-IIについては、blastocyst injection後、キメラマウスを得、引き続きgermline transmissionが順調に確認された。その後、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスと掛け合わせ、loxP配列にはさまれたNeomycin耐性遺伝子を欠失させた。得られた

ファインダーマウスをBL/6マウスに交配し、繁殖を開始し、現在その表現型解析を始めている。

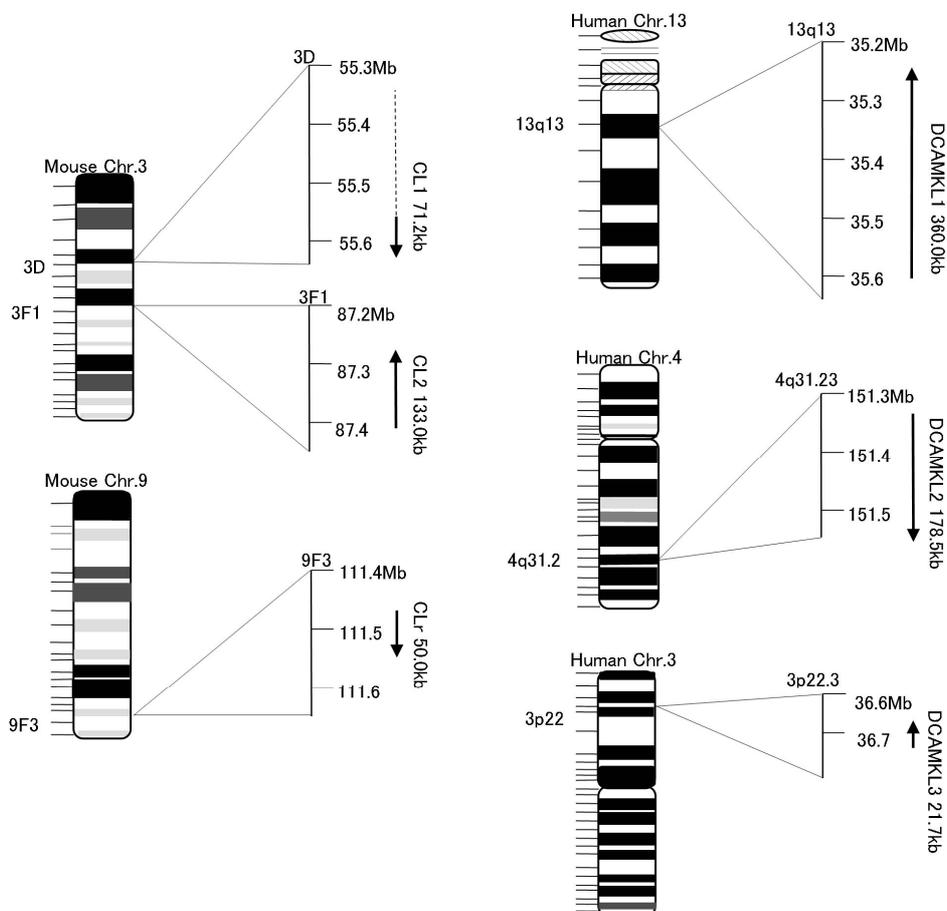


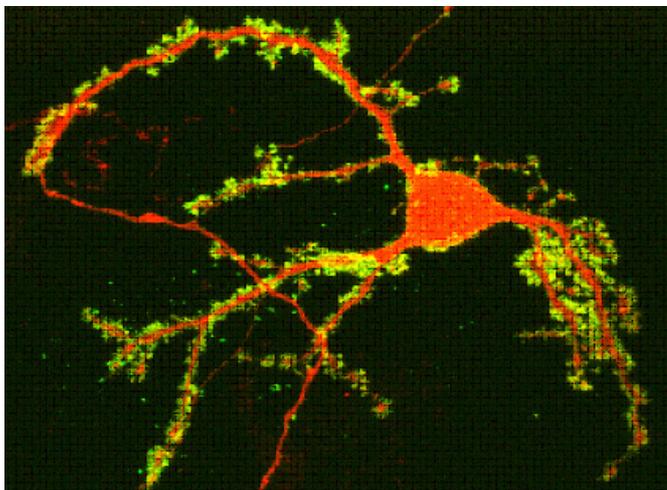
図5: マウスおよびヒト染色体上のCL1/CL2/CLrの遺伝子座。マウスにおいては、CL1とCL2の両遺伝子が染色体3番上に近接している。

CLICK-IとCLICK-IIは、マウスにおいて同一染色体上の近接部位に位置する(図5)ため、2重遺伝子破壊は、単独遺伝子破壊マウスを単純に掛け合わせることで得がたいことが想定された。そこで、C57BL/6由来のES細胞株への2重electroporationを実施した。すなわち、neomycin耐性を指標にスクリーニングしたCLICK-II破壊ES細胞株に、今後はCLICK-I遺伝子破壊ベクターをhygromycin耐性にてスクリーニングし、2重相同組み換えを起こした株を作出した。本細胞(複数)を用いて、これまでblastocyst injectionを数回行っており、キメラマウスが作出されている。現在、germline transmissionの確認と、同一chromosomal allele上に両遺伝子の破壊が確認できるラインをスクリーニング中である。同一染色体上で遺伝子破壊されたES細胞由来のgermline transmissionが成功したマウスでは、安定的にCLICK-I, -IIの同時破壊が実現すると考えられる。

これらのKOマウスでは、CREB抑制の解除による記憶・長期可塑性の促進が表現型として見られるのではないかと期待される。

3-3. 神経形態可塑性を基盤にした長期可塑性シグナルの検索：CLICK-III/CaMKI γ の樹状突起形成・伸展促進活性の発見 (Takemoto-Kimura et al. Neuron, 2007)

神経細胞は極性を持った細胞であり、機能的形態的に異なる2種類の突起、神経軸索と樹状突起を保持する。我々は以前の PRESTO 課題等において、軸索形態制御について多くの知見を得てきた (Bito et al. Neuron, 2000; Yamasaki et al., Development 2001; Arakawa et al., J. Cell. Biol. 2003 ; Yamana et al. Mol. Cell Biol. 2006)。しかし、神経伝達物質を受容する機能を有する樹状突起には、MAP2 に代表される微小管結合タンパクを介した強固な微小管構造が存在し、また多くのアクチン集積構造体も存在する (図6)。



EGFP-actinとCherryを共発現するPurkinje細胞

そこで、本 SORST 課題では、Ca²⁺の下流のシグナル伝達機構が樹状突起アクチン細胞骨格再編成の直接のレギュレーターとして働き、シナプスの位置決めや構造決定の上位に働く可能性を検討した。

このような突起の形態制御に寄与するには、極めて局所的なカルシウム流入に対する応答性が必要であると考えられ、かつ膜近傍のカルシウム応答を担う必要性がある。

我々は、以前 PRESTO 課題にて CREB の上流キナーゼ候補の探索にて単離同定した CLICK-III/CaMKI γ が、神経細胞特異的な発現を示し、かつ著明な膜局在を示す CaMK であることを発見していた (Takemoto-Kimura et al., J. Biol. Chem. 2003)。CaMKI γ の膜面分へのターゲティングとその制御機構についてさらに追求したところ興味深い知見が得られた。CaMKI γ は、膜貫通配列を欠いているが、C末端に特徴的な脂質修飾モチーフを有するために直接膜挿入される新規膜結合 CaMK であることが判明した (図7)。

本キナーゼは Ras 類似の典型的な CAAX モチーフを有し、これがファルネシル化されると Golgi 膜や形質膜の一部に膜局在する。さらに複数のシステイン残基を介したパルミトイル化反応により、detergent-sensitive から detergent-resistant なラフト膜への移行が促進され (図8A)、ゴルジ体や樹上突起の膜脂質マイクロドメインへより強く集積した (図8B)。

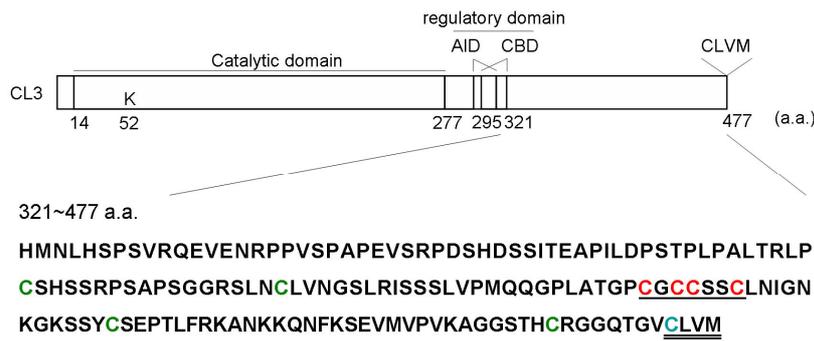


図7: CLICK3 (CL3) の脂質修飾部位。C 末端にある多数のシステイン残基のうち、ファルネシル化される CAAXモチーフ(青)、パルミトイル化される Cys(赤)とその他(緑)を示す。

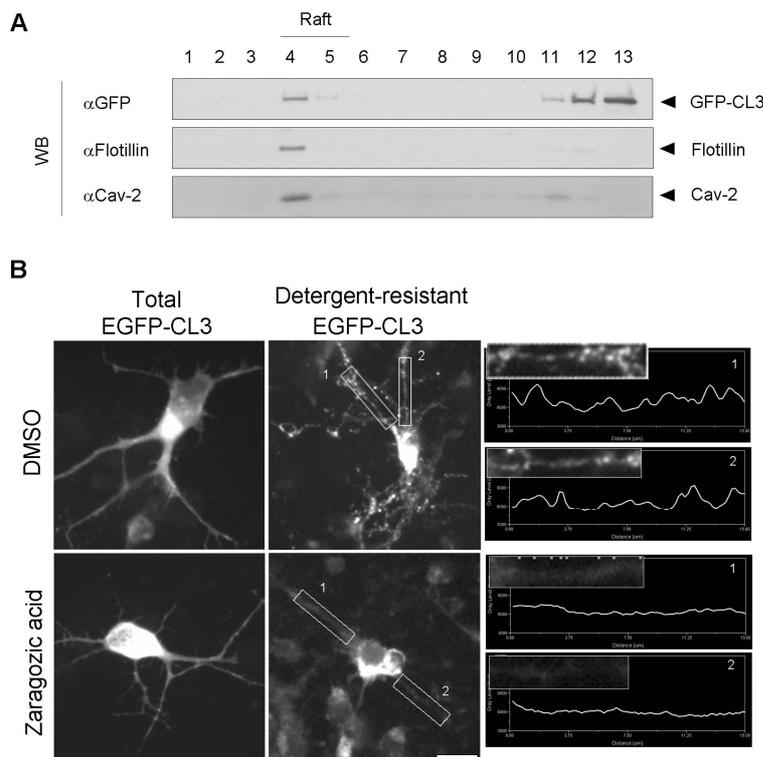


図8. 脂質修飾により、CL3/CaMKI γ は脂質ラフトにアンカーされる。A) CL3はラフト膜神経細胞のラフト膜か区分に回収される。B) Squalene合成酵素阻害薬であるzaragozic acidにて処理し脂質からコレステロールが除去すると、脂質ラフトが喪失し、CL3の樹状突起の点状構造への局在が失われる。(スケール、20ミクロン)

タンパク質の脂質修飾は、ある特定の膜画分へのターゲティングやそこでの機能発現に重要な役割を果たすとされているが、神経細胞におけるその機能的意義については多く知られていない。そこで、まずラフト膜タンパク一般の機能を調べるため、zaragozic acid 処理により初代培養大脳皮質細胞からラフト膜を喪失させたところ、樹状突起の数および長さに大きな現象が生じた(図9)。この発生初期の時期に、CL3/CaMKI γ は確かにマウス大脳皮質神経細胞に強く発現している(図10)。そこで、CL3/CaMKI γ の gain-of-function と loss-of-function の各々の表現型を確かめる目的で、過剰発現(図11)とRNA干渉(図12)の実験を行った。その結果、CL3/CaMKI γ の作用は、樹上突起数と樹状突起長に限定され、軸索には影響がないことが示された。このような樹状突起特異的作用が確認された

リン酸化酵素作用は、これまで皆無である。

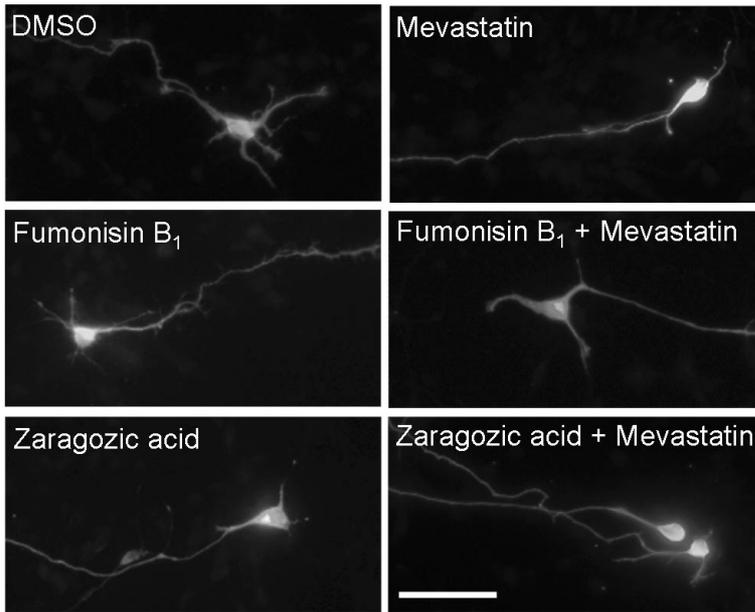


図9. 脂質ラフトによる大脳皮質神経細胞の樹状突起形成・伸展制御。コレステロール合成を阻害する薬剤 (mevastatin, zragozic acid) や sphingolipid 合成の阻害薬 (fumonisin B1) は、樹状突起形成を著明に障害するが、軸索伸展への影響は小さい。(スケール、50 ミクロン)

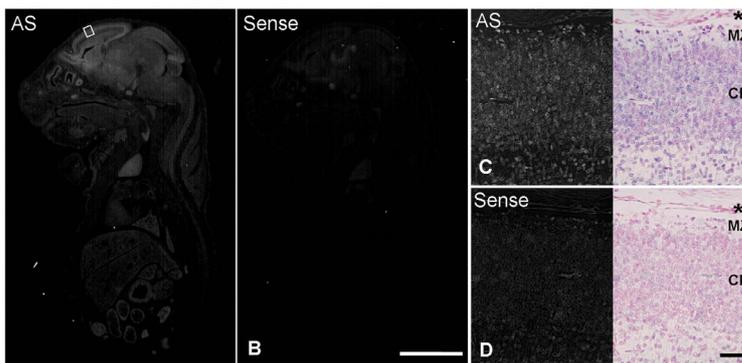


図 10. マウス E17. 5 日期の CLICK-III/CaMKI γ transcript の大脳皮質における局在。胚全体 (左) と大脳皮質層構造 (右) における mRNA 分布。主として、cortical plate における発現が顕著である。

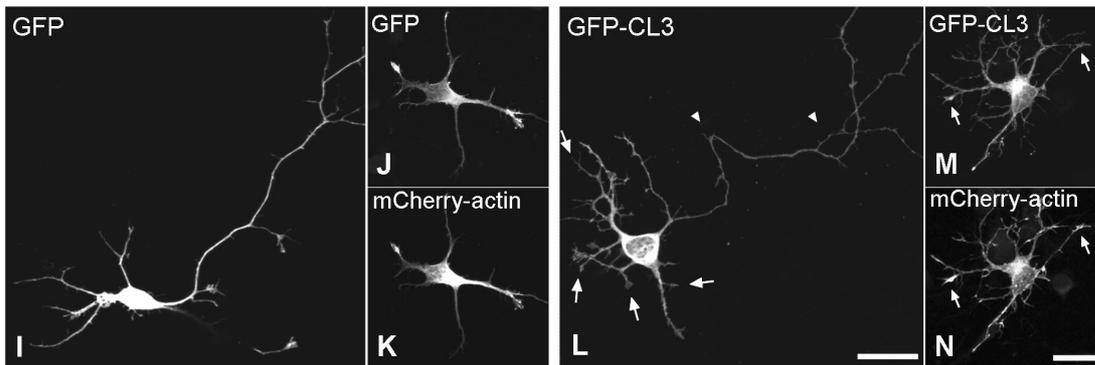


図 11. CL3/CaMKI γ 過剰発現により、細胞体から出現する一次樹状突起 primary dendrite (矢印) の数が上昇する。軸索 (矢頭) への影響は皆無である。増加する突起先端へはアクチンが集積している。(スケール、20 ミクロン)

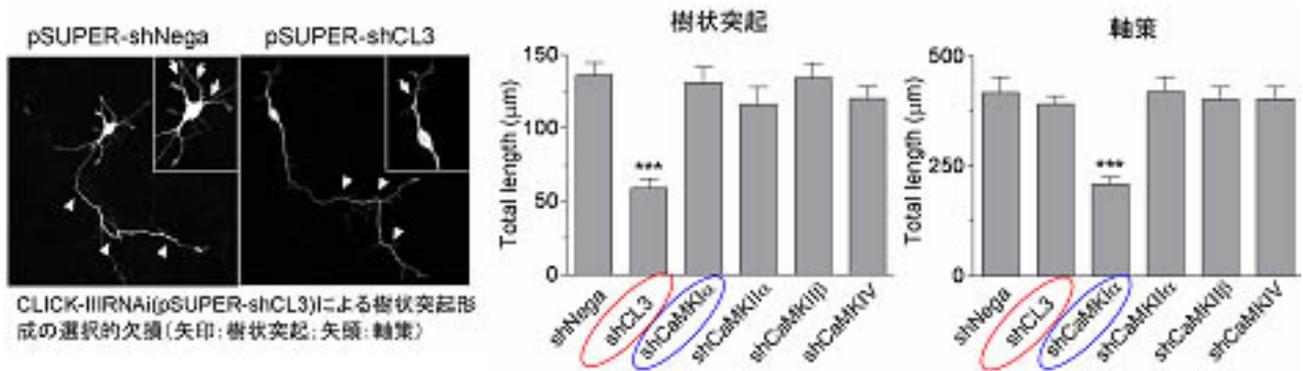


図 1 2. CL3/CaMKI γ の RNA 干渉により樹状突起 (矢印) の形成・伸展が特異的に阻害されるが、軸索 (矢頭) の形成は影響されない (左)。CL3 の樹状突起特異的作用は、他の膜非挿入型の CaMK 種のノックダウンによって再現されない (右)。

このような CL3・CaMKI γ の樹状突起選択的作用は、同酵素のノックアウトマウスから調製した大脳皮質初代培養細胞系においても再確認された。

では CL3・CaMKI γ 作用はどのような生理的シグナルの下流に位置するのか。これを明らかにするため、発生初期ならびに神経可塑性において必須のシグナルを与える BDNF の作用の一端を担うか否かを調べた。BDNF 添加後により生理的レベル以上に BDNF 量を増加させると、樹状突起伸展は促進される。この増分は、CaMK 阻害剤 KN-93 で消失し、CL3・CaMKI γ ノックダウンで完全に再現された。従って、大脳皮質細胞の発生初期の BDNF 依存的樹状突起伸展を CL3・CaMKI γ が担っていることが示唆された。実際、CL3・CaMKI γ のノックダウン効果は、全長キナーゼ (WT) によって rescue されたが、脂質修飾を完全に喪失する点変異 C474S 体で rescue が全くできなかった (図 1 3)。よって、BDNF 作用は、膜にアンカーされた CL3・CaMKI γ に依存することが明らかになった。

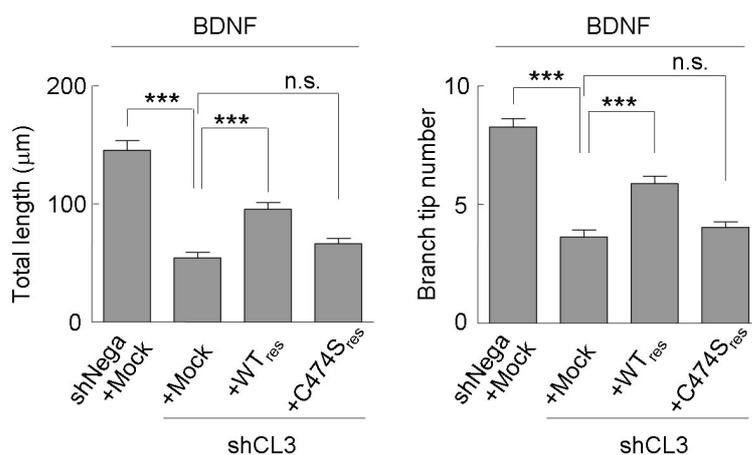


図 1 3. 脂質アンカー型 CL3/CaMKI γ は、BDNF 依存的樹状突起形成・伸展を担っている。

今後はさらに CL3/CaMKI γ 解析を進め、その特異的脂質ラフト挿入の引き金となるシグナルを明らかにすることにより、記憶・長期可塑性の発生時に生じると考えられる神経ネットワークのリモデリングを促進する機構の解明に直結するのではないかと期待される。

また他の CaMKI ファミリーメンバー (CaMKI α,β,δ) は、脳神経系以外でも発現する ubiquitous な遺伝子産物であるのに対し、CLICK-III/CaMKI γ の発現は概ね脳神経系に限局され、成体では不安情動・恐怖記憶の中継核と考えられる扁桃体中心角 CeA、ならびに性行動・摂食行動を制御する視床下部側副核 VMH に強く発現している (Takemoto-Kimura et al. J. Biol. Chem. 2003)。このような範疇の行動異常と合致する所見が得られるか否かを、現在さらに詳細に定量・解析中である。

3-4. 長期可塑性シグナルの操作法開発

本課題で得られた新たな知見を個体での行動・脳機能改変につなげる手法を開発するため、新たに海馬スライスカルチャー実験系を立ち上げ、効率的なウィルスベクター感染条件等を検証した。ウィルスベクターとしては、Sindbis ウィルス、レンチウィルス、AAV ウィルスを用い、神経細胞特異的な遺伝子導入法を確立することを目的に、実験を行った。また行動・脳機能改変のエンドフェノタイプのマーカーとして神経形態変化 (突起・スパイン形成の促進) を用いるため、EGFP-actin (Furuyashiki et al. PNAS 2002) を神経細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスを用い、個体へのウィルス法の検討を実施中である。

1) ウィルスベクターの開発・改良

神経特異的発現を可能にするベクター作成のため、神経特異的プロモータを比較し、synapsin I プロモータが、CaMKII プロモータ等より神経細胞特異性が容易に得られることを確認した。引き続き synapsin I プロモータを用いて、神経発現を効率よく行える各種 lentivirus ベクターを作成しようとしたが、平成17年度より導入されたカルタヘナ条約批准に基づく DNA 実験基準が改正されたため、当初計画されていた WPRE 配列を有するベクターの作出が新たに大臣申請実験指定となり、その手続きの間 (平成17年末まで) 本実験を実行することが不可能となった。平成18年1月より、申請許可が下りた為、現在改良ベクターの作成を再開し、期待通りの結果を得た (図14)。

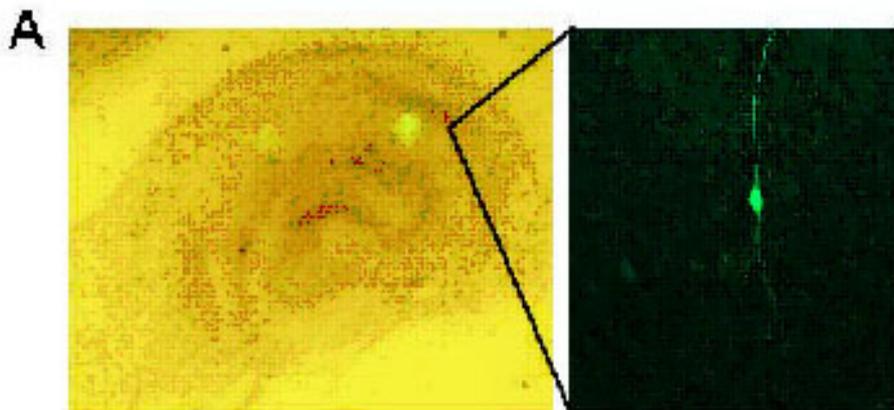


図14. スライス培養標本における神経細胞特異性アッセイ

続いて、形態可塑性測定法開発の一環として、多色蛍光マーカーとして、GFP, mRFP1, GFP-actinなどを bicistronic に発現するウィルスベクターを構築した。さらに、神経細胞における RNA 干渉法が可能となるベクターの確立も試みた。この結果、これまでのところ、PSD-95、CaMKIV や ROCK-I, ROCK-II などの分子に関する siRNA 法の開発を完了した。

2) 長期可塑性測定とスパインイメージング

上記の過程で、海馬スライスカルチャーや分散培養神経細胞系における効率的なアデノウィルス感染条件、遺伝子銃を用いた限定的遺伝子導入法、Sindbis ウィルスを用いたより広範な範囲遺伝子導入法を確立したので、この方法論を活用し、シナプス発現分子とスパインアクチン動態のリアルタイム同時計測を東京医科歯科大学の岡部研究室と共同で実施した (Iki et al., Eur. J. Neurosci., 2005; Kuriu et al. J. Neurosci. 2006)。

また、pilot スケールで、実際にポストシナプスおよびプレシナプスの神経可塑性制御分子の操作を行ってみた。まず、これまでの遺伝子発現技術をポストの PSD-95 に応用してみたところ、PSD-95 の変異体過剰発現によって、スパイン形態やシナプスの樹状突起からの距離を操作できることを確認した (Nonaka et al., J. Neurosci., 2006)。これは、先行研究 (Ehrlich and Malinow, J. Neurosci., 2004) において同様の変異体がシナプス長期可塑性に著しく影響するという結果と合致するものである。

さらに、京都大学の森研究室と共同で、シナプス終末カルシウムチャネルの局在決定因子の分子間相互作用を欠失させるとカルシウムチャネルのプレシナプス局在が喪失し、神経伝達物質放出効率が減少することを示した (Kiyonaka et al. Nature Neurosci., 2007)

合わせて考えると、これまで我々が確立した神経細胞遺伝子導入技術が、可塑性シグナルを操作するためのツールとして有効であることが示唆された。

そこで個体におけるスパイン形成などの促進を指標にする実験系を確立実証するため、EGFP-actin を神経細胞に特異的に発現するトランスジェニックマウスへのウィルス感染等の実験を進めている。

3) 薬理学的操作

CaM キナーゼ活性を有する CaMKI/CaMKIV 群、および CaMKII 群に属するキナーゼは、KN-62 ならびに KN-93 によって活性化が阻害される。また、STO-609 は、CaMKI および CaMKIV のリン酸化酵素である CaMKK1/CaMKK2 の両者のキナーゼ活性そのものを強く阻害する。従って、これらの薬剤を個体に応用する手法があれば可塑性の操作の手段として有効であるが、いずれも血液脳関門を通過できない構造であるため、脳内投与を余儀なくされる。しかし、CaMKK/CaMKIV/CREB 経路が神経生存に必須の経路であるため (Bito and Takemoto-Kimura, Cell Calcium, 2003)、長期投与実験は困難と判明した。

このような過程で、東京医科歯科大学の高柳研究室と共同研究を実施する機会に恵まれ、実は KN-93 や ST0-609 の末梢投与により、骨粗鬆症発症マウスモデルにおける症状増悪が効率よく防止されることが明らかとなった。またこの分子基盤に、CaMKK/CaMKIV/CREB が osteoclast 活性化に不可欠であるという新たなメカニズムの存在があることが証明された (Sato et al., Nature Med., 2006)。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

我々は、PRESTO 課題中に単離同定した複数の可塑性分子について、本 SOSRT 継続課題において重点的に解析を進め、さらにこれらの分子の作用点や作用機序などを個体動物で検証するための新たな実験手法の開発にも取り組んだ。その結果、以下のような成果を得た。

成果 1. CaMKI/CaMKIV ファミリーと類似性が高い神経特異的発現を示すキナーゼを 3 つ (CLICK-I, CLICK-II, CLICK-I,II-related) 同定し、これらが微小管と相互作用し、神経形態を制御する可能性を見出した。さらに、CREB コアクチベーターである TORC をリン酸化し、核内移行を阻害することにより、CREB 依存的転写を阻害する機構を解明した (Ohmae et al. J.B.C. 2006)。

本成果は、従来から我々が提唱してきた「CREB リン酸化以外にも CREB 依存的転写を制御する作用点が多くある」(Bito et al. Cell 1996 ; Okuno and Bito, AfCS Nature Molecule Page, 2006) という主張を改めて裏付けるものである。また従来は doublecortin 様の微小管に対する作用により神経投射などの制御の担い手であると考えられていた DCaMKL 分子に、TORC を基質とするキナーゼという全く予想されなかった可塑的役割があることを示唆するものである。

これらの成果に基づき、DCaMKL が kinase-like でなく、kinase であるという点を再認識し、Human Genome Nomenclature Committee および Mouse Genome Nomenclature Committee により、名称そのものが変えられ、DCLK に統一された (Fuse and Bito, AfCS Nature Molecule Page, under review)。

成果 2. 当グループが以前に単離同定した CLICK-III/CaMKI γ がキナーゼ活性依存的パルミトイル化を介して脂質ラフトに局在し、樹状突起伸展を促進すること、この機構が脳皮質細胞発生初期の BDNF 依存的樹状突起伸展に大きく寄与することを発見した。(Takemoto-Kimura, Ishihara et al. Neuron, 2007)。これは、これまで未知であった CaMKK/CaMKI 経路に、カルシウム依存的アクチン再編成を直接制御し、神経回路形成の初期に重要な貢献をする機能があるということを証明するもので、CaM キナーゼによる神

経機能制御の新たなメカニズムを解明したといえる。

また、キナーゼがパルミトイル化酵素の基質になり得、ダイナミックに細胞内局在を変えらるという全く新たな機構を発見したもので、類似研究はない。

成果3. シナプス可塑性関連分子の操作による神経機能改変を実施するために必要なプロモータ単離、ベクター構築、RNAi 条件検討などを進めた。またシナプス前ならびにシナプス後部の分子構築を規定する典型的な標的分子（カルシウムチャンネルと PSD-95）を選び、その機能改変を可能にするコンストラクトを作成し、*in vitro* レベルで実際に特定神経細胞のシナプスにおける伝達効率やシナプス後肥厚部のタンパク複合体組成の改変（Nonaka et al. J. Neurosci. 2006; Kiyonaka et al., Nature Neurosci., 2007）をデザイン通りに引き起こすことに成功している。

さらに、本研究を発端に、数多くの共同研究を実施することが可能となった。その結果、シナプスのアクチン動態の制御機構、細胞移動、小脳ニューロンや osteoclast の分化、ストレス制御等について、興味深い知見を得ることができた。

本継続課題で得られた基礎技術を今後さらに応用・改良すれば、CREB転写、樹状突起網、神経伝達物質放出効率、シナプス後肥厚部タンパク複合体などを細胞種特異的に改変し、個体レベルの分子操作により神経可塑性を修正し、記憶学習を含む脳高次機能の維持、低下防止、修復再建などにつながるテクノロジーの樹立が期待できる。

4. 研究実施体制

メンバー表

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
尾藤晴彦	東大・院医・ 神経生化	助教授	研究の総括	平成15年10月～ 平成19年 3月
奥野浩行	東大・院医・ 神経生化	助手	ウイルスベクター開 発・イメージング	平成15年10月～ 平成19年 3月
竹本-木村さ やか	東大・院医・ 神経生化	助手	CLICK3/CaMKI γ による 樹状突起形成促進	平成15年10月～ 平成19年 3月
岡村理子	東大・院医・ 神経生化	技術専門 職員	CLICK-I, CLICK-II の 遺伝子破壊	平成15年10月～ 平成19年 3月
布施俊光	東大・院医・ 神経生化	研究員	CLICK-I, CLICK-II の 機能解析	平成16年 9月～ 平成19年 3月
藤井哉	東大・院医・ 神経生化	大学院生	スパインアクチンイ メージングの改良	平成16年 4月～ 平成19年 3月
野中美応	東大・院医・ 神経生化	特別研究 学生	神経RNAi法の改良	平成17年 8月～ 平成19年 3月
石原奈津実	東大・院医・ 神経生化	大学院生	CaMKK/CaMKI経路によ る神経形態形成制御	平成15年10月～ 平成19年 3月
金原富子	東大・院医・ 神経生化	事務補助 員	事務補助	平成15年10月～ 平成19年 3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
なし				

さきがけ研究の延長のため、ワークショップ等を主催することはありませんでした。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
なし			

さきがけ研究の延長のため、研究者等の招聘をすることはありませんでした。

6. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内5件、海外14件)

- Bito H**, Takemoto-Kimura S, Okuno H. Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? in “Molecular Pain“(M. Zhuo ed. Springer) in press.
- Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ . **Neuron**, 54: 755-770, 2007.
- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, **Bito H**, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y. The active zone protein RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca²⁺ channels. **Nature Neurosci.**, 10: 691-701, 2007
- Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, **Bito H**, Takayanagi H. Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway. **Nature Med.** 12: 1410 - 1416, 2006.
- Yamana N, Arakawa Y, Nishino T, Kurokawa K, Tanji M, Itoh RE, Monypenny J, Ishizaki T, **Bito H**, Nozaki K, Hashimoto K, Matsuda M, Narumiya S. Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing APC and c-Src. **Mol. Cell Biol.** 26: 6844-6858, 2006.
- Kuriu T, Inoue A, **Bito H**, Sobue K, Okabe S. Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and independent mechanisms. **J. Neurosci.** 26: 7693-7706, 2006.
- Uemura K, Kihara T, Kuzuya A, Okawa K, Nishimoto T, **Bito H**, Ninomiya H, Sugimoto H, Kinoshita A, Shimohama S. Activity-dependent regulation of β -catenin via ϵ -cleavage of N-cadherin. **Biochem Biophys Res Commun.** 345: 951-958, 2006
- Ohmae S, Takemoto-Kimura S, Okamura M, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Fuse T, Kida S, Tanji M, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Okuno H, **Bito H**. Molecular identification and characterization of a family of kinases with homology to Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases I/IV. **J. Biol. Chem.** 281: 20427-20439, 2006.
- Nonaka M, Doi T, Fujiyoshi Y, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. Essential contribution of the ligand-binding β B- β C loop of PDZ1 and PDZ2 in the regulation of postsynaptic clustering, scaffolding and localization of PSD-95, **J. Neurosci.**, 26: 763-774, 2006.
- Okuno H and **Bito H**. CREB1. **AfCS/Nature Molecule Pages**, doi:10.1038/mp.a000690.01, 2006.
- Iki J., Inoue A., **Bito H.**, Okabe S. Bidirectional regulation of postsynaptic cortactin distribution by

BDNF and NMDA receptor activity. **Eur. J. Neurosci.**, 22: 2985-2994, 2005.

Matsuoka Y, Furuyashiki T, Yamada K, Nagai T, **Bito H**, Tanaka Y, Kitaoka S, Ushikubi F, Nabeshima T., Narumiya S. Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102: 16066-16071, 2005.

Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, **Bito H**, Terashima T, Wright CVE, Kawaguchi Y, Nakao K, and Nabeshima Y. *Ptfla*, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. **Neuron**, 47: 201-213, 2005.

Nemoto T, Kojima T, Oshima A, **Bito H**, Kasai H. Stabilization of exocytosis by dynamic F-actin coating of zymogen granules in pancreatic acini. **J. Biol. Chem.**, 279: 37544-37550, 2004.

尾藤晴彦。神経形態とその可塑性を制御するシグナル伝達機構の探索。生化学。79: 5-15

尾藤晴彦。CaMK カスケードによる神経機能調節。ブレインサイエンス・レビュー 2007 (伊藤正男・川合述史編) クバプロ刊、pp.91-104, 2006.

尾藤晴彦。ROCK インヒビター-神経再生ならびに神経変性防止におけるあらたな創薬標的。医学のあゆみ。208: 469-473, 2004

奥野浩行、竹本-木村さやか、大前彰吾、岡村理子、石原奈津実、**尾藤晴彦**。シナプス活動による遺伝子発現制御。(蛋白質核酸酵素 増刊号) 蛋白質核酸酵素 49: 411-418, 2004.

尾藤晴彦。Open Access Publishing による変革。日本薬理学雑誌 122: 557-558, 2003.

(2) 口頭発表 (内容が重複しているものは除く。国際学会発表を優先。)

① 招待、口頭講演 (国内9件、海外1件)

竹本-木村さやか、石原奈津実、野中美応、安達-森島亜希、間野達雄、藤井哉、星野幹雄、奥野浩行、**尾藤晴彦**。ラフトアンカー型 CaM キナーゼ CLICK-III/CaMKI γ による樹状突起形成制御。日本分子生物学会 2006 フォーラム、2006.12.6-8、名古屋、シンポジウム抄録集「分子生物学の未来」p.177, Sp2C-2.

Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Fujii H, Okuno H, **Bito H**. Regulation of dendritogenesis but not axogenesis via a lipid raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, CLICK-III/CaMKI γ . **Soc. Neurosci. Abstr.** 32, 773.9, 2006. 第36回北米神経科学学会大会、2006.10.14-18、アトランタ、口頭

Bito H, Fujii H, Ishihara N, Fuse T, Nonaka M, Takemoto-Kimura S, and Okuno H. Synaptic activity-driven changes in neuronal signaling cascades. **Neurosci. Res.**, 2005.

第28回日本神経科学学会、2005.7.26-28, 横浜。シンポジウム発表。

Bito H, Takemoto-Kimura S, Okuno H. Analysis of synaptic activity-induced changes in neuronal properties using imaging techniques. **Jpn.J.Physiol.** 54 Suppl. S16, S08-3, 2004 (第81回日本生

理学会大会（札幌）、6.2-4, 2004) シンポジウム
尾藤晴彦。シナプス活動によるアクチンダイナミクスの制御。2004 未来の脳科学展
イベント展シンポジウム要旨集 pp.205-208, 2004 (7.13-14, 2004 東京) シンポジウム発表。

Bito H, Furuyashiki T, Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Fujii H, Okamura M, Okuno H.
Activity-driven changes in neuronal actin cytoskeleton. *Neurosci. Res.* 50 Suppl., S8, SY03, 2004.
シンポジウム

Bito H. Studies on signaling mechanisms regulating plasticity of neuronal morphology. *Seikagaku*
76, S-EP4, 2004. (第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜) 2004年奨励賞受賞講演

Bito H. Molecular mechanisms regulating axon formation and outgrowth. *Seikagaku* 76, S14-2, 734,
2004. (第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜) シンポジウム

Takemoto-Kimura S, Ishihara N, **Bito H**. Multiple lipid modifications in a membrane-anchored
Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), CLICK-III/CaMKI γ . *Seikagaku* 76,
3P136(W35-11), 900, 2004. (第77回日本生化学会 10.13-16, 2004, 横浜) 口頭発表

Bito H, Arakawa Y, Narumiya S. Control of axon formation and outgrowth by Rho signaling. *Jpn. J.*
Pharmacol. 92: in press, 2004 (第77回日本薬理学会年会 3.8-10, 2004, 大阪) symposium

②ポスター発表 (国内6件、海外6件)

Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Fujii H, Okuno H, **Bito**
H. Lipidification regulates neuritogenic activity of CLICK-III/CaMKI γ . *Soc. Neurosci. Abstr.* 32,
225.8, 2006. 第36回北米神経科学学会大会、2006.10.14-18、アトランタ、ポスター

Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Okuno H, **Bito H**. Regulation of
dendritic outgrowth by CLICK-III/CaMKI γ , a lipid rafts-anchored neuronal CaMK.
Neurosci. Res. 55: S62 Suppl. 1, 2006 第29回神経科学学会大会、京都、2006. 7. 19-21、
ポスター

Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Okuno H, **Bito H**. An essential role for CLICK-III/CaMKI γ
in regulation of neurite extension. *Neurosci. Res.* 55: S180 Suppl. 1, 2006 第29回神経科学
学会大会、京都、2006. 7. 19-21、ポスター

Takemoto-Kimura S, Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Okuno H, **Bito H**. Dendritic
outgrowth is regulated by CLICK-III/CaMKI γ , a membrane raft-anchored CaMK that
links Ca²⁺ influx to neuritogenesis. 第79回日本生化学会・第29回日本分子生物学会・
第20回国際生化学・分子生物学会連合同年會、京都、2006. 6. 18-6. 23、ポスター

Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawachi T, Terao, M, Nishimura YV, Fukuda, A, Fuse T,
Matsuo, N, Sone, M, Watanabe, M, **Bito H**, Terashima T, Wright CVE, Kawaguchi Y, Nakao K,

Nabeshima Y. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005.

第35回北米神経科学学会, Washington, Nov.12-16, 2005. ポスター発表.

Takemoto-Kimura S., Ishihara N, Mano T, Okuno H, **Bito H.** A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ /CLICK-III. Soc. Neurosci. Abstr. 31: 498.9, 2005. 第35回北米神経科学学会, Washington, Nov.12-16, 2005. ポスター発表.

Takemoto-Kimura S., Ishihara N, Mano T, Okuno H **Bito H.** A GluR-interacting palmitoyl acyl transferase GODZ palmitoylates and regulates lipid microdomain insertion of a neuron-specific CaM kinase CaMKI γ / CLICK-III. Seikagaku, 2005. 第78回日本生化学会、2005.10.19-22、神戸. ポスター発表.

Fuse T and **Bito H.** Actin dynamics in cultured cerebellar Purkinje cells visualized using EGFP-actin. Neurosci. Res., 2005. 第28回日本神経科学学会、2005. 7. 26-28, 横浜. ポスター発表.

Okuno H, Chowdhury S, Worley P, **Bito H.** Interaction between Arc and CaMKII monitored by fluorescence resonance energy transfer. Neurosci. Res. 50 Suppl. S128, P2-081.ポスター

Okuno H, Chowdhury S, Worley P, **Bito H.** Imaging of Arc-CaMKII interaction by by fluorescence resonance energy transfer in neurons. 14th Neuropharmacology Conference “The cytoskeleton and synaptic function” (San Diego, Oct. 20-22, 2004) abstract book P5, 69, 2004. poster

Okuno H, Chowdhury S, Worley P, **Bito H.** Interaction between Arc and CaMKII in dendrites monitored by fluorescence resonance energy transfer..Soc. Neurosci. Abstr. 30: 164.16, 2004 (第34回北米神経科学学会, San Diego, Oct.23-27, 2004) poster

Takemoto-Kimura S, Ishihara N, **Bito H.** Multiple lipid modifications in a membrane-anchored Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), CLICK-III/ CaMKI γ . Soc. Neurosci. Abstr. 30: 498.9, 2004 (第34回北米神経科学学会, San Diego, Oct.23-27, 2004) poster

(3)特許出願 (国内 件、海外 件)

なし

(4)新聞報道等

①新聞報道：特になし

②受賞：2004年日本生化学会奨励賞

2006年HFSP Grant共同受賞

③その他：特になし

(5)その他特記事項

特になし

7. 結び

本研究に際しては、さきがけ21研究において得られた成果に基づきながらも、単なるフォローアップでなく、あえて過分にもambitiousな目標を掲げ、「可塑性シグナルの操作による長期記憶の改変」という「本来到達すべきlong-term goal」を課題名に掲げ、継続研究を実施した。実は研究課題を構想した時期は、ちょうど、京大講師時代の研究グループによる成果をさらに展開し、東大にて助教授として神経生化学教室を主宰するというチャンスをいただいた時期と重なっており、教室の長期目標を掲げるという必要性があったというのも、その一因である。



その結果、新たなラボを立ち上げて3年で、望外にも、CREB転写を本質的に左右するcoactivatorのリン酸化を制御する新たなキナーゼファミリーを同定し、またCaMKK/CaMKI γ 経路による樹状突起形成・伸展促進の機構を明らかにすることができた。新たに発見した

これらのシグナル伝達経路を、今後、長期記憶の形成や固定を司る重要な経路として確立するために、現在、遺伝子破壊マウスを用いた実験を実施している。例えば、*CaMKI γ -K0*マウス的大脑皮質細胞は、初代培養にて樹状突起のみが短縮するという表現型を示しており、RNA干渉実験のデータを完全に裏付けるものであった。このK0マウスの成体における表現型の解析を通じ、樹状突起形成における欠陥が、どのような影響を脳高次機能に与えるか、明らかになると考えられる。

脳高次機能に直結する遺伝子機能を動物個体レベルで改変する試みのほとんどは、これまでウイルスベクターを利用して行われている。しかし全世界的に見ても、汎用性のある応用例は、未だなく、ベクターや発現プロモータの選択、RNAi効率の最適化、ウイルスタイターの最適化などの技術的進歩の途上である。我々自身も独自の進歩を遂げ、神経細胞へ選択的感染をするウイルスベクターの確立と改良を現在行っている。

本研究遂行に少なからずのインパクトがあった出来事として、日本における様々な法制度改正が挙げられる。これらは本研究計画の進行に大きな影響を及ぼした。

具体的には、日本政府のカルタヘナ条約批准により、DNA実験指針が大きく変更され、ウィルスベクター等の作成に際して、多くの実験（例えば、レンチウィルスベクターによる遺伝子発現に必須なWPRE配列の挿入）が一時的措置として大臣申請の対象となった。申請には半年程度の事務作業が必要となり、ウィルスベクター作成や個体動物での実験条件設定に大きな遅れが生じ、SORST課題の3年終了時に予定していた個体動物への感染実験の多くが全く手付かずとなってしまった。

また、遺伝子マウスの移動が法的規制の対象となり、海外動物施設からの輸入手続きが大幅に改正され、煩雑となった。その結果、やはり世界トップの実績を誇る外国施設にて作成を委託していたKOマウスの国内輸入が、半年以上遅れてしまった。

長期的にこのような改正が国家レベルで必要であったことはいうまでもないが、研究遂行上で大きな障壁となる措置が朝令暮改のようにshort noticeで全国一律に適用される必然的に生じる不具合が本研究においても発生したといえる。研究現場やfunding agencyとの刷り合わせが不十分な制度改正は、時と場合によっては国際競争等の面で大変困難な状況を生み出し、引いてはイノベーションを遅らせる可能性がある、という点を、指摘しておきたい。JSTにおかれても、今後のそのような制度改正に際しては、十分に余裕を持って、各種移行措置等が準備できるよう、ご留意いただき、万全のサポートを賜るよう懇願する次第である。

最後になりましたが、さきがけ21研究（TOREST-PRESTO）ならびに発展研究（SORST）を通じて、6年半におよび、JSTにお世話になりましたこと、篤く御礼申し上げます。この間、研究費の使い方を一から覚えさせていただき、チャレンジングなプロジェクトをどのように運営していくか、すべてJSTのグラントを通じて学んで参りました。日本の多くの若手研究者もそのような思いをしていると思います。

JSTの funding schemeはこれからもいろいろと変遷していくと思いますが、研究統括のsupervisionの下で、若手に自由度の高い研究費を供給していくというさきがけ研究の発想、さらにはそれを競争的に継続させるというSORSTの理念は今後も是非とも維持していただくようお願いいたします。