

氏 名 植田 大海

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2430 号

学位授与の日付 2023 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Molecular mechanisms for metaplasticity in dendritic spines
of hippocampal neurons

論文審査委員 主 査 深田 正紀
生理科学専攻 教授
村越 秀治
生理科学専攻 准教授
村田 和義
生理科学専攻 教授
松尾 直毅
九州大学 大学院理学研究院 教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in full Ueda, Hiromi

Title Molecular mechanisms for metaplasticity in dendritic spines of hippocampal neurons

Synaptic plasticity of excitatory synapses is thought to be a cellular basis of memory formation. A well-studied form of synaptic plasticity is long-term potentiation (LTP), a long-lasting enhancement in synaptic currents accompanied by a persistent enlargement of dendritic spines (structural LTP: sLTP). It has been known that the stimulus threshold for LTP induction changes depending on neuronal activity, which is termed metaplasticity. For example, prolonged neuronal activation raises the LTP threshold and prevents excessive LTP expressions, regulating the homeostasis of neuronal excitability. However, molecular mechanisms for metaplasticity remain poorly understood. In this study, I investigated metaplastic regulations of sLTP inductions at dendritic spines of hippocampal neurons after chronic neuronal excitation.

To label chronically-excited neurons, I transfected CA1 pyramidal neurons in cultured mouse hippocampal slices with a destabilized yellow fluorescent protein, d2Achilles, under the control of a synthetic activity-dependent promoter, ESARE, through adeno-associated virus (AAV) vectors. To excite neurons chronically, I applied a GABA_A receptor antagonist, bicuculline, into cultured slices for 24 hours. Then, chronically-excited neurons were labeled by activity-dependent d2Achilles expressions. To induce sLTP, I applied two-photon glutamate uncaging at single spines at 720 nm and monitored the changes of spine volume under a two-photon microscope at 920 nm. As control experiments, non-treated neurons were labeled using AAV-CaMKII0.4-DIO-

Achilles with a low concentration of AAV-hSyn-Cre for sparse expressions of Achilles. In the non-treated neurons, glutamate uncaging induced persistent spine enlargement but not in the bicuculline-treated neurons. I confirmed that an application of another GABA_A receptor antagonist, gabazine, also impaired spine enlargement. These results indicate that glutamate uncaging-induced sLTP is suppressed in chronically-excited neurons.

To investigate molecular mechanisms for sLTP suppression, I focused on protein synthesis because neuronal activation enhances numerous protein syntheses that regulate synaptic functions. I applied a protein synthesis inhibitor, anisomycin, along with bicuculline and examined whether sLTP suppression requires protein synthesis. As a result, the protein synthesis inhibition partially reversed glutamate uncaging-induced sLTP, which suggests that the mechanisms of sLTP suppression partially depend on protein synthesis.

Next, I focused on the signaling cascade for sLTP induction. Glutamate stimulation triggers Ca²⁺ influx into the spines through N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors (NMDARs), leading to activations of signaling molecules for sLTP. To test the impact of chronic neuronal excitation on Ca²⁺ influx into spines, I transfected a genetically-encoded calcium indicator, GCaMP6f, by a gene gun and measured glutamate uncaging-evoked Ca²⁺ influx in single spines. I found that the Ca²⁺ influx was decreased in the bicuculline-treated neurons compared with the control. To examine Ca²⁺ sources that contribute to this Ca²⁺ reduction, I measured Ca²⁺ influx in the presence of various inhibitors for Ca²⁺ sources. A series of experiments revealed that GluN2B subunit-containing NMDAR-mediated Ca²⁺ influx was inhibited after the bicuculline treatment. I also found that the Ca²⁺ reduction was independent of protein synthesis. These results suggest that the protein synthesis-independent inhibition of GluN2B-mediated Ca²⁺ influx would play a role in sLTP suppression.

Ca²⁺ influx activates Ca²⁺/CaM-dependent kinase II (CaMKII) signaling, which

is a necessary process for sLTP. Thus, I examined inhibitions of the CaMKII signaling after the bicuculline treatment. To this end, I applied sLTP induction by directly activating the CaMKII signaling using a genetically-encoded photo-activatable CaMKII (pa)CaMKII. I transfected the paCaMKII gene through AAV and applied two-photon excitation of paCaMKII in single spines at 820 nm. paCaMKII uncaging successfully induced sLTP in the non-treated neurons but not in the bicuculline-treated neurons. To exclude the possibility that paCaMKII expression and function were altered after the bicuculline treatment, I performed a biochemical assay in the dissociated culture of hippocampal neurons expressing paCaMKII. The expression level and light-dependent activity of paCaMKII were unaffected by the bicuculline treatment. These results demonstrate that the CaMKII downstream signaling for sLTP is inhibited in chronically-excited neurons.

Finally, I examined the effect of protein synthesis on the CaMKII downstream inhibition. I found that protein synthesis inhibition by anisomycin during the bicuculline treatment completely recovered paCaMKII-induced sLTP, indicating that the inhibition of the CaMKII downstream signaling requires protein synthesis. The difference in protein synthesis dependency between the CaMKII downstream inhibition and the Ca^{2+} reduction implies that these two inhibitions in the signaling for sLTP are independent mechanisms for sLTP suppression.

In conclusion, this study demonstrates that the two inhibitory mechanisms (i.e., the inhibitions of Ca^{2+} influx and CaMKII downstream) in the signaling for sLTP suppress sLTP induction in chronically-excited neurons. This metaplastic regulation prevents runaway sLTP expressions and maintains neuronal excitability within proper levels.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 植田 大海

Title
論文題目 Molecular mechanisms for metaplasticity in dendritic spines of hippocampal neurons

本論文は、マウス海馬 CA1 領域の神経細胞をモデルとして、慢性的な神経活動下で見られる「シナプスのメタ可塑性の制御機構」を明らかにしたものである。

興奮性シナプスのシナプス可塑性は、記憶や学習の細胞基盤であると考えられている。シナプス可塑性の一つとして、シナプス電流の長期増強 (long-term potentiation: LTP) を伴う樹状突起スパインの持続的な体積増大 (structural LTP: sLTP) がよく研究されている。この LTP が誘導される刺激閾値は、神経細胞の活動履歴によって変化することが知られており、メタ可塑性と呼ばれているが、その分子機構は十分に解明されていない。

出願者は、まず慢性的に興奮した神経細胞を標識するために、海馬スライス CA1 領域に、アデノ随伴ウイルスベクターを用いて、神経活動依存的プロモーター ESARE 下に黄色蛍光タンパク質 d2Achilles を導入した。次に、神経細胞を慢性的に興奮させるために、GABA_A 受容体拮抗薬ピククリンを培養スライス切片に 24 時間投与した。出願者は、メタ可塑性の誘導を調べるため、慢性的に興奮させた d2Achilles 陽性神経細胞において、ケイジドグルタミン酸 (MNI-glutamate) による単一スパイン刺激を行った。慢性的に興奮させていない神経細胞では、刺激によりスパイン体積の持続的な増大 (sLTP) が誘導されたが、ピククリンにより慢性的に興奮させた神経細胞では sLTP は誘導されなかった。したがって、出願者は sLTP において、メタ可塑性が誘導可能であることを見出した。

次に出願者は、メタ可塑性に関わるシグナル伝達経路の解明を試みた。グルタミン酸の刺激は、NMDA 受容体を介してスパインへの Ca²⁺流入を引き起こし、sLTP に必要なシグナル伝達分子群を活性化する。そこで、出願者は GCaMP6f を用いた Ca²⁺イメージングにより、慢性的な神経細胞の興奮がスパインへの Ca²⁺流入に及ぼす影響を検討した。その結果、ピククリン処理した神経細胞では、コントロールと比較して Ca²⁺流入が減少していることが明らかになった。様々な阻害剤を用いた解析により、GluN2B サブユニットを含む NMDA 受容体を介した Ca²⁺流入が、ピククリン処理後に阻害されることが明らかになった。また、この Ca²⁺の減少は、タンパク質合成とは無関係であった。以上の結果から、出願者は、GluN2B を介した Ca²⁺流入の抑制が、sLTP におけるメタ可塑性に関与していることを明らかにした。

一方、Ca²⁺/カルモジュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) はスパインへの Ca²⁺流入により活性化される sLTP に必須のシグナル分子である。そこで、慢性的な神経細胞の興奮が

CaMKII シグナルに及ぼす影響を検討した。CaMKII の下流シグナルを直接調べるため、遺伝子コード型光活性型 CaMKII (paCaMKII) を用いた。アデノ随伴ウイルスにより paCaMKII 遺伝子を導入し、単一スパインの paCaMKII を 820 nm で 2 光子励起したところ、非処理の神経細胞では sLTP の誘導に成功したが、ビククリン処理した神経細胞では sLTP が大きく抑制されていた。つまり、慢性的に興奮した神経細胞では、sLTP のための CaMKII 下流シグナルが阻害されることが明らかになった。この CaMKII 下流シグナルの阻害にはタンパク質合成が必要であった。以上の結果から、出願者は CaMKII の下流シグナルの抑制が、sLTP におけるメタ可塑性に関与していることを見出した。

以上、出願者は、慢性的に興奮した神経細胞において、(1)sLTP におけるメタ可塑性の存在を示し、(2)sLTP におけるメタ可塑性が異なる 2 つの機構 (Ca^{2+} 流入の抑制と CaMKII 下流の抑制) で制御されていることを見出した。このメタ可塑性により、神経細胞の興奮による過剰な sLTP を防ぎ、神経細胞の興奮性を適正なレベル内に維持することができると考えられる。本研究は、メタ可塑性の制御機構を単一スパインレベルで示した先駆的研究として極めて独創性が高く、優れた論文である。シナプス可塑性の分子機構に迫ることは、現在の脳科学の重要課題の一つであり、本研究はこの命題に対し、大きく貢献する論文であると考えられる。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。