

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02358

研究課題名(和文) 認知行動を制御するCa<sup>2+</sup>/CaMKシグナル伝達機構解明と操作研究課題名(英文) Interrogation and manipulation of Ca<sup>2+</sup>/CaMK signaling mechanisms underlying cognitive behavior

研究代表者

尾藤 晴彦 (BITO, HARUHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：00291964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、生きた脳内におけるニューロンへのCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存的な情報書き込み過程を解明するため、新規改良Ca<sup>2+</sup>シグナリングセンサー群の開発し、1光子イメージングによるCa<sup>2+</sup>シグナル・Ca<sup>2+</sup>エフェクター活性化の伝播・情報処理過程の解明を成体脳・発達期脳で進めた。さらに長期記憶の固定におけるCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存的な情報処理の高次機能発現における役割の解明をめざし、「神経回路への情報書き込み」の分子実体に向ける成果をいくつか得た。今後ともこれらの成果を元に、脳の根本的な作動原理の一端が一層明らかになるとともに、脳機能の計測から操作に至る基盤技術の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to obtain mechanistic insights on the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent information “writing” process that neurons utilize in the living brain. To address this, 1) we developed new improved Ca<sup>2+</sup> signaling sensors, and 2) took advantage of these tools to dissect the spread and information processing encoded by Ca<sup>2+</sup> signals and Ca<sup>2+</sup> effector activation. Furthermore, we investigated the role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent signaling in long-term memory consolidation, and identified several new key molecular players involved in this process. These results shed new light on basic principles on how the brain works, and epitomizes the urgent need to developing foundational technologies to record and manipulate brain functions.

研究分野：神経生化学

キーワード：神経科学 脳・神経 遺伝子 シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

デカルトの「Cogito ergo sum 我思う故に我在り」という言葉に象徴される通り、脳は人が人たる所以の臓器である。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。このような機能的神経回路網には、2つの普遍的な特徴がある。一つは、 $10^{11}$ 個の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合わせ  $10^{14}$ 個のシナプスが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。

このような「剛」と「柔」の特性を規定する分子基盤は何であるか？多種多様な電気的・化学的シグナルの密接な絡み合いから成立つと考えられ、中でも、 $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的リン酸化・脱リン酸化は、30年前の発見当初より、神経回路への情報書込を司る主要な分子基盤の一端を担うのではないかと推察されてきたが、その実態は不明であり、特に *in vivo* 脳における空間的ダイナミクスは未知である。

申請者は20年来、ニューロン内で神経活動依存的に活性化されるメカニズムとして最も重要と考えられる  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン情報伝達系探索を進め、律速段階となる素過程を同定し、その作動原理を明らかにすることを戦略として研究を進めてきた。特に、1) CaMKK-CaMKIV-CREB-Arc 経路の長期記憶形成における意義同定、2) CaMKK-CaMKI-アクチン経路の神経形態形成における役割解明、3) 不活型 CaMKIIbeta のスキャフォールド機能による Arc 逆シナプスタギングの発見、など多くの  $\text{Ca}^{2+}$ 依存的エフェクター分子の機能解明に尽力してきた。これまでの仕事は、loss-of-function (knockout, RNA 干渉法), gain-of-function 変異に基づくシグナル機能解明が主であり、生きた脳における情報処理、すなわち 4D 時空間的シグナルダイナミクスと支配機能の関係性まで踏み込んだものではなかった。この点を克服するため、申請者らは、複数の細胞内シグナルを簡便に測定可能な dual FRET 計測技術や、他の緑色ベースで開発されたインディケータと共測定可能な高性能・高速  $\text{Ca}^{2+}$ センサープローブ R-CaMP2 など新規方法論の開発を進めてきた。

## 2. 研究の目的

$\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的リン酸化・脱リン酸化は、30年前の発見当初より、神経細胞への情報書込を司る主要な分子基盤の一端を担うのではないかと推察されてきたが、その全貌はまだ明らかとなっていない。

そこで本研究課題では、生きた脳内におけるニューロンへの  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的な情報書込み過程を解明するため、

新規改良  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサー群の開発、

1 光子イメージングによる神経回路形成における  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル・ $\text{Ca}^{2+}$ エフェクター活性化の伝播・情報処理過程の解明、

長期記憶の固定における  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的な情報処理の高次機能発現における役割解明、

を試みる。本研究を通じ、「神経回路への情報書込み」の分子の実体に迫り、脳の根本的な作動原理の一端を明かにするとともに、エビデンスに基づき脳機能の解析から操作に至る基礎技術の開発が期待される。

## 3. 研究の方法

新規改良  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサー群の開発：

これまでに開発された、GCaMP6f など緑色  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサーや、R-CaMP2 など赤色  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサーの色異性体などの開発を、蛍光団骨格構造の理解に基づく点変異導入により試みる。また、膜結合型の  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサー開発により、膜直下のシグナル動態解析を実施する。

1 光子イメージングによる神経活動・回路形成における  $\text{Ca}^{2+}$ シグナル・ $\text{Ca}^{2+}$ エフェクター活性化の伝播・情報処理過程の解明：

これまでに開発した緑・赤色センサーを効率良く活用し、成体脳における神経活動多重記録・発達期回路形成時における  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの超長期記録を可能にする手法を開発し、動態解析に応用する。

長期記憶の固定における  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的な情報処理の高次機能発現における役割解明：

シナプスから核へのシグナルにおけるカルシウム動態の下流の分子経路動態と生理的意義探索を行う。

## 4. 研究成果

新規改良  $\text{Ca}^{2+}$ シグナリングセンサー群の開発

既存の蛍光プローブを越える新規センサー分子開発に取り組み、*in vivo* 単一活動電位が測定可能な黄色  $\text{Ca}^{2+}$ センサーの開発を行い、実証実験を実施した。さらに、それまでに開発した高速  $\text{Ca}^{2+}$ インディケータ R-CaMP2 を用い、種々の *in vivo* 実験への応用を試みた。さらに、膜結合型の新規カルシウムセンサー Lck-G-CaMP7 を開発し、脳発達期幼弱神経細胞のカルシウム動態解析に応用した。

1 光子イメージング等による神経活動・回路形成における  $Ca^{2+}$ シグナル・ $Ca^{2+}$ エフェクター活性化の伝播・情報処理過程の解明  
・多重イメージング法の開発

小脳学習課題における GCaMP6f/R-CaMP2 同時イメージング法を開発した (Gaffield et al. *J. Neurophys.*2016)。さらに緑・赤以外のカルシウムセンサープロープにさらに改良を加え、二色以上の同時イメージングが可能な活動計測プロトコルを樹立した。

・自由行動マウスにおける多重多色ファイバーイメージング法の開発

GCaMP6/R-CaMP2 を用い、深部脳機能動態を解明する目的で、線条体 VTA 活動記録を多重ファイバーイメージングによって実施し、同一領域内の他種の神経細胞種の活動同時記録に成功した (Kim et al. *Nature Met* 2016)

・さらに、成体海馬 CA1 神経細胞等にカルシウムセンサーを導入し、1光子蛍光内視鏡イメージングを実施し、 $Ca^{2+}$ シグナル・ $Ca^{2+}$ エフェクター活性化の伝播・情報処理過程の可視化の条件検討を進めた。

・Lck-G-CaMP7 を開発し、脳発達期幼弱神経細胞のカルシウム動態解析に応用したところ、大脳皮質幼弱神経細胞の突起内で自発的に誘発される新たなカルシウムシグナルを発見し、spontaneous regenerative  $Ca^{2+}$  Transient (SRCaT) と命名した。SRCaT は、電位依存的 L 型カルシウムチャンネルによるカルシウム流入を引きがねとしており、脳発生初期の脳層構造・細胞構築にも関与する可能性が示唆された。自閉症様症状をヒトで伴う L 型カルシウムチャンネルを異所性に発現したところ、移動異常が誘発されたが、生後にチャンネル活性を正常化することによりこの異常が回復したことから、脳発達初期における L 型カルシウムチャンネルの脳形成における意義が初めて明らかとなった (Kamijo et al. in press)

長期記憶の固定における  $Ca^{2+}$ /カルモジュリン依存的な情報処理の高次機能発現における役割解明：

シナプスから核へのシグナルにおけるカルシウム動態の下流の分子経路動態と生理的意義探索を行う目的で、場所記憶の生成・想起に必要と考えられている嗅内野-海馬歯状回の回路を刺激する光遺伝学的条件を整え、マウス疾患モデルに対する応用が可能となった (Yamamoto et al. *Cell Rep* 2015)。

さらに、CREB リン酸化を感受する新たなセンサー分子 pCREB-AR を創出し、in vivo 展開への技術開発を実施した。さらに CREB 下流遺伝子産物 Arc の個体動物における可視化解析に関わる数多くの国際共同研究を先導した。

加えて、複数の CaMK 分子種について、個体レベルでのノックアウト・ノックダウン実験等を実施し、その細胞形態・回路形成・

神経可塑性・行動レベルの表現型を解析した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Steward O, Matsudaira Yee K, Farris S, Pirbhoy PS, Worley P, Okamura K, Okuno H, Bito H. Delayed Degradation and Impaired Dendritic Delivery of Intron-Lacking EGFP-Arc/Arg3.1 mRNA in EGFP-Arc Transgenic Mice. *Front Mol Neurosci.* 10:435, 2018. doi: 10.3389/fnmol.2017.00435. 査読あり

2. Honjoh S, de Vivo L, Okuno H, Bito H, Tononi G, Cirelli C. Higher Arc Nucleus-to-Cytoplasm Ratio during Sleep in the Superficial Layers of the Mouse Cortex. *Front Neural Circuits.* 11:60, 2017. doi: 10.3389/fncir.2017.00060. 査読あり

3. Jenks KR, Kim T, Pastuzyn ED, Okuno H, Taibi AV, Bito H, Bear MF, Shepherd JD. Arc restores juvenile plasticity in adult mouse visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:9182-9187, 2017. doi: 10.1073/pnas.1700866114. 査読あり

4. Nikolaienko O, Eriksen MS, Patil S, Bito H, Bramham CR. Stimulus-evoked ERK-dependent phosphorylation of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) regulates its neuronal subcellular localization. *Neuroscience.* 360:68-80, 2017. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.026. 査読あり

5. Inokuchi K, Imamura F, Takeuchi H, Kim R, Okuno H, Nishizumi H, Bito H, Kikusui T, Sakano H. Nrp2 is sufficient to instruct circuit formation of mitral-cells to mediate odour-induced attractive social responses. *Nature Commun.* 8:15977, 2017. doi: 10.1038/ncomms15977. 査読あり

6. Rapanelli M, Frick L, Bito H, Pittenger C. Histamine modulation of the basal ganglia circuitry in the development of pathological grooming. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114: 6599-6604, 2017. doi: 10.1073/pnas.1704547114. 査読あり

7. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, Kamiyo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, **Bito H**. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem.* 141:808-818, 2017. doi: 10.1111/jnc.14020. 査読あり

8. Kim CK, Yang SJ, Pichamoorthy N, Young NP, Kauvar I, Jennings JH, Lerner TN, Berndt A, Lee SY, Ramakrishnan C, Davidson TJ, Inoue M, **Bito H**, Deisseroth K. Simultaneous fast measurement of circuit dynamics at multiple sites across the mammalian brain. *Nature Methods.* 2016 Apr;13(4):325-8. doi: 10.1038/nmeth.3770. 査読あり

9. Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamiyo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, **Bito H**. Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKI pathway during neuronal polarization. *Mol Brain.* 9:8, 2016. doi: 10.1186/s13041-016-0189-3. 査読あり

10. Gaffield MA, Amat SB, **Bito H**, Christie JM. Chronic imaging of movement-related Purkinje cell calcium activity in awake behaving mice. *J Neurophysiol.* 115:413-422, 2016. doi: 10.1152/jn.00834.2015. 査読あり

11. Yamamoto K, Tanei ZI, Hashimoto T, Wakabayashi T, Okuno H, Naka Y, Yizhar O, Fenno LE, Fukayama M, **Bito H**, Cirrito JR, Holtzman DM, Deisseroth K, Iwatsubo T. Chronic optogenetic activation augments a pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Rep.* 11:859-865, 2015. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.017. 査読あり

〔学会発表〕(計 15 件)

1. **Bito H**. Archeology of long-term memory. Brain Research Program International Symposium. Korean Brain Science Institute, 2018.

2. **Bito H**. CREB-Arc signaling in long-term memory formation. Department of Neuroscience Seminar, Karolinska Institute. Stockholm, Sweden, 2017.

3. **Bito H**. New roles for amygdalar calcium signaling during fear memory formation and in social behavior. Nature Conference on Neural Circuitry of Emotion. Shenzhen, China, 2016.

4. **Bito H**. Illuminating activity-dependent signaling and circuits. Gordon Research Conference on Synaptic Transmission. New Hampshire, USA, 2016.

5. Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Fujii H, Kamiyo S, Takemoto-Kimura S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Kano M, Nakai J, Kitamura K, **Bito H**. Rational design of ultrafast, high-affinity red calcium indicator for monitoring neuronal activity. The 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago, USA, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: カルシウム指示遺伝子  
発明者: **尾藤晴彦**、井上昌俊、竹内敦也、中井淳一、大倉正道  
権利者: JST  
種類: PCT  
番号: PCT/JP2015/002869  
出願年月日: 2015 年 6 月 8 日  
国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等  
<http://neurosci.umin.jp/j/neurochemistry.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

尾藤 晴彦 (BITO, Haruhiko)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 00291964