

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05373

研究課題名(和文)新規光応答性シグナル分子によるシナプス記憶情報保存様式の解明

研究課題名(英文)Revealing the synaptic memory system by a new light sensitive signaling molecules

研究代表者

村越 秀治(Murakoshi, Hideji)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：90608142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年、青色光受容体であるPhototropin1のLOV2ドメインを利用して、様々な遺伝子コード型の光応答性分子が開発されてきており、細胞生物学の分野を中心として様々な分野での利用が進められている。そこで我々は、LOV2ドメインを用いて、光応答性キナーゼ阻害ペプチドの開発を行った。さらにこの分子を用いて、海馬神経細胞のシナプスにおいて、1分間程度のCaMKII活性化がシナプスの可塑的变化を惹起するのに十分であることを明らかにした。また、受動的回避テストを用いて、恐怖記憶形成には扁桃体での比較的短時間のCaMKII活性化が重要であり、持続的なCaMKIIの活性化は必要ないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, the various types of genetically-encoded optogenetic tools using blue-light sensitive LOV2 domain from Phototropin1 have been developed and utilized in a wide range of areas including cell biology field. Here, we succeeded in developing a genetically-encoded light inducible CaMKII inhibitory peptide. Using this newly developed optogenetic tool, we found that the 1 min of CaMKII activation is sufficient for triggering structural plasticity of synapses in hippocampal neurons. Furthermore, using passive avoidance based memory test, we found that transient CaMKII activity is only required for fear memory formation in amygdala of mice.

研究分野：生物物理、細胞生物、神経科学

キーワード：光応答性分子 FRET 蛍光寿命イメージング 2光子顕微鏡 Phototropin

1. 研究開始当初の背景

近年、青色光受容体である Phototropin1 の LOV2 ドメインを利用して、様々な遺伝子コード型の光応答性分子が開発されてきており、細胞生物学の分野を中心として様々な分野での利用が進められている。そこで我々は、LOV2 ドメインを用いて、光応答性キナーゼ阻害ペプチドの開発を行い、シナプス可塑性や個体動物の記憶システムの研究に応用することを目指した。

2. 研究の目的

脳は動物の記憶を司る器官であることが分かっているが、その記憶メカニズムは不明な点が多く残っている。例えば、記憶が一体どのような形で脳に長期間保持されているのかといった基本的なことすら分かっていない。記憶は、脳神経細胞が担っていると考えられている。特に神経細胞の接着領域であるシナプスが重要であると考えられている。近年、光学顕微鏡技術やプローブ作製技術の発展により、シナプス内部で、シグナル伝達分子の活性化を観察したり、自在に操作することができるようになりつつある。本研究では、アクチンの重合、脱重合を制御することでシナプスの可塑性にとって重要な役割を果たしていると考えられる CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御(不活化)することができる分子の開発を目的とした。この分子は細胞内で1ミクロンの空間分解能、秒レベルの時間分解能で CaMKII 活性を阻害できるものである。また、開発する分子を海馬スライスの神経細胞に発現させ、ケイジドグルタミン酸刺激によって引き起こされる長期増強に対する CaMKII 機能や個体動物の記憶における CaMKII の機能を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

大脳皮質や海馬の興奮性神経細胞には CaMKII が豊富に発現している(全タンパク質量の数%)。CaMKII は、主に α サブユニットから成る 12 量体を形成しており、 Ca^{2+} により活性化したカルモジュリンの結合により活性化する。特に、隣合うキナーゼドメインが同時に活性化すると、それぞれのキナーゼが隣のサブユニットの Thr286 を自己リン酸化することによって、その活性がカルモジュリンが外れた後もキナーゼの活性が持続する。このような自立した活性状態の維持が可能であることから、CaMKII がシナプス可塑性において、メモリー分子のような機能を持っていると考えられてきた。しかしながら、シナプス長期増強時の CaMKII 活性化時間と機能については、現在までにコンセンサスが得られている訳ではない。すなわち、CaMKII

の長時間活性がシナプス可塑性に重要であるという報告がある一方で、短時間の活性化で十分であるという報告もされている。そこで本申請研究では、CaMKII 活性を高い時間分解能で可逆的に阻害することが可能な光応答性 CaMKII 阻害ペプチドを開発することにした。また、これを用いて、シナプス可塑性と個体動物の記憶形成における CaMKII 活性の時間窓を調べることにした。

4. 研究成果

CaMKII の活性を生きた細胞内で高い空間分解能で活性を阻害できるようにするため、LOV2-J ドメインを用いて遺伝子コード型の光応答性 CaMKII 阻害分子を開発することにした。LOV2-J は植物タンパク質である Phototropin1 の光感受性ドメインであり、青色光照射によって、LOV2 ドメインに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。そこで本研究では、CaMKII の阻害ペプチドである AIP2 (Autocamtide2-Related Inhibitory Peptide, 13 アミノ酸から成る)に LOV2 を遺伝子工学的に融合することによって、遺伝子コード型光応答性 CaMKII 阻害ペプチド (paAIP2) を開発した。開発には、LOV2-J と AIP2 の間のリンカー配列を変えたものを多数作製し、CaMKII のキナーゼ活性を光照射依存的に阻害するかどうかを生化学的に調べた。我々が開発した paAIP2 は光照射後に直ちに構造変化し、暗状態に戻すことで 40 秒程度で元に戻る。

次に、本研究で開発した paAIP2 を用いて、光照射による CaMKII 阻害がグルタミン酸刺激によるスパイン体積の可塑性な変化を阻害するかどうかを調べた。まず、海馬スライスの CA1 領域にある神経細胞に遺伝子銃を用いて mGFP (単量体緑色蛍光タンパク質)、mCherry (単量体赤色蛍光タンパク質)、paAIP2 を同時に発現させた。次に落射蛍光顕微鏡下で mCherry の赤色蛍光を発している細胞を同定し、その細胞を 2 光子顕微鏡下で mGFP の蛍光を観察した。刺激後のスパイン体積の変化は mGFP の蛍光強度によって定量した。ケイジドグルタミン酸による 2 光子単一スパイン刺激 (30 pulses at 0.5 Hz) を行ったところスパイン体積は一過的に 4 倍程度増大した後、収縮し、刺激前よりも 2 倍程度の体積の状態を 20 分以上持続していた。一方、ケイジドグルタミン酸刺激と同時に青色光 (100 mW/cm²) により CaMKII の活性を 1 分間阻害したところ、一過的な体積変化が劇的に阻害され、さらに、持続的な体積変化が完全に阻害された。このことは、初期の CaMKII の活性がスパイン体積の変化にとって極め

て重要であることを示している。

paAIP2 の利点の一つは、遺伝子コードされている点である。細胞特異的なプロモーター遺伝子を利用することで、生きた個体動物の特定の細胞の特定の場所に導入することができる。そこで、paAIP2 を用いて、記憶と CaMKII 活性の関係を個体マウスで調べた。paAIP2 をマウスの扁桃体領域（恐怖記憶を司る脳領域）の神経細胞へ導入するため、GFP を融合した paAIP2 をコードするアデノ随伴ウイルスを作製し、扁桃体へのインジェクションを行った。その後、このマウスを用いて、動的回避テスト（記憶テストの一種）を行った。明室と暗室の間にマウスが通れるくらいの出入口がついた箱にマウスをおく。マウスは暗い場所を好むため暗い部屋に入るが、この時、マウスが嫌う軽い電気ショックを与える。すなわち、暗い部屋に入ると電気ショックが来ることを記憶させる（恐怖記憶）。このトレーニングを行ったマウスを再び明るい部屋に入れると、暗い部屋にはなかなか入らなくなる（受動的回避テスト）。すなわち、明るい部屋に滞在する時間を計測することで、電気ショックの記憶を記憶しているかどうかを判別することができる。テストの結果、記憶トレーニングからテストの直前までの間、光照射によって CaMKII を阻害した動物は、比較的短い時間で暗い部屋に入った。すなわち、電気ショックがあることを記憶していなかった。一方で、トレーニング時に光照射を行わなかった動物では記憶は阻害されなかった。これらの結果から、記憶形成の瞬間に CaMKII 活性が必要であり、保持には必要ないことを示唆するデータを得ることができた。

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 18 件)

1. 村越秀治

「光応答性 CaMKII 阻害ペプチドの開発とシナプス可塑性研究への応用」
CLINICAL CALCIUM 医薬ジャーナル社 2018 年 3 月 28(3): p414-419
doi: CliCa1803414419. (査読有)

2. 村越秀治

「クローズアップ実験法 光応答性阻害ペプチドの生化学的機能アッセイ」
実験医学 Vol.35 No.16 羊土社 2017 年 10 月 p2765-2770
(査読有)

3. Murakoshi H*, Shibata AC

ShadowY: a dark yellow fluorescent protein for FLIM-based FRET measurement.
Scientific Reports 7, 6791 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-07002-4. (査読有)

4. 村越秀治

「分子間相互作用を検出する 2 光子蛍光寿命イメージング」
生体の科学 医学書院 2017 年 10 月 68(5): p400-401 DOI: <https://doi.org/10.11477/mf.2425200664> (査読有)

5. Murakoshi H*, Shin M, Parra-Bueno P, Szatmari EM, Shibata AC, and Yasuda R. Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. Neuron 94, 37-47 (2017). Doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.036. (査読有)

6. Nakahata Y, Eto K, Murakoshi H, Watanabe M, Kuriu T, Hirata H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Activation-dependent rapid postsynaptic clustering of glycine receptors in mature spinal cord neurons. eNeuro 4, ENEURO.0194-16 (2017). Doi: 10.1523/ENEURO.0194-16.2017. (査読有)

7. Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H*

Dual observation of the ATP-evoked small GTPase activation and Ca²⁺ transient in astrocytes using a dark red fluorescent protein. Scientific Reports 6, 39564 (2016). DOI: 10.1038/srep39564. (査読有)

8. Phengchat R, Takata H, Morii K, Inada N, Murakoshi H, Uchiyama S, and Fukui K. Calcium ions function as a booster of chromosome condensation. Scientific Reports 6, 38281 (2016). DOI: 10.1038/srep38281. (査読有)

9. Hedrick NG, Harward SC, Hall CE, Murakoshi H, McNamara JO, and Yasuda R. Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. Nature 538, 104-108 (2016). DOI: 10.1038/nature19784. (査読有)

10. Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, and Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex.

Nature Communications 7, 12540 (2016).
DOI: 10.1038/ncomms12540(査読有)

11. 柴田明裕、村越秀治
「細胞内発現パターンを劇的に改善した高精度 FRET センサーの開発」
生物物理 2016年6月 56-3 p181-184
DOI: <https://doi.org/10.2142/biophys.56.181> (査読有)

12. Murakoshi H, Yasuda R.
Imaging signal transduction in dendrites using genetically-encoded fluorescent proteins.
Dendrites: development and disease. Springer-Verlag, Germany. 139-154 (2016)
DOI: [10.1007/978-4-431-56050-0_7](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56050-0_7) (査読有)

13. 村越秀治
「二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるシグナル分子活性計測」
顕微鏡 50巻2号 2015年9月 p106-110
(査読有)

14. Murakoshi H*, Shibata AC.
Optogenetic imaging of protein activity in the synapse by using 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. Optogenetics -Light-Sensing Proteins and Their Applications-. Springer-Verlag, Germany. 185-197 (2015). DOI: [10.1007/978-4-431-55516-2_12](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55516-2_12) (査読有)

15. Fujiwara TK, Iwasawa K, Kalay Z, Tsunoyama TA, Watanabe Y, Umemura YM, Murakoshi H, Suzuki KG, Nemoto YL, Morone N, and Kusumi A.
Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. Mol Biol Cell 27, 1101-1119 (2016). DOI: [10.1091/mbc.E15-04-0186](https://doi.org/10.1091/mbc.E15-04-0186). (査読有)

16. Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J
A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy. Scientific Reports 5, 15334 (2015). DOI: [10.1038/srep15334](https://doi.org/10.1038/srep15334). (査読有)

17. Murakoshi H, Shibata AC.
Optogenetic imaging of protein activity in the synapse by using 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. Optogenetics -Light-Sensing Proteins and Their

Applications-. Springer-Verlag, Germany. 185-197 (2015).

DOI: http://link.springer.com/chapter/10.1001%2F978-4-431-55516-2_12 (査読有)

18. 村越秀治
「二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるシグナル分子活性計測」
顕微鏡 50巻2号 2015年9月 106-110
http://www.microscopy.or.jp/magazine/50_2/50_2j07hm.html (査読有)

〔学会発表〕(計10件)

1. 村越秀治
2光子蛍光寿命イメージングによる細胞内シグナル伝達解析
第39回神経組織培養研究会 サンプラザシリーズ(愛知県名古屋市) 2017年10月7日

2. 村越秀治
光らない蛍光タンパク質で細胞内分子活性を見る
第2回ルミノジェネティクス研究会 静雲荘(神奈川県足柄下郡) 2017年6月26日

3. Hideji Murakoshi
Optogenetic manipulation and imaging of CaMKII-Rho signaling pathway during synaptic plasticity. (Symposium) 2017 Yonsei Univ-Korea Univ-NIPS symposium. Seoul, Korea, Apr 21-22, 2017

4. 村越秀治
2光子蛍光寿命イメージングによる光操作分子の開発と今後の展開
分子研研究会「分子観察による生命の階層横断的な理解」分子科学研究所(愛知県岡崎市) 2017年3月21日

5. 村越秀治
Imaging protein activity by 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy The 1st AiBSシンポジウム 岡崎カンファレンスセンター(愛知県岡崎市) 2017年2月19日

6. Hideji Murakoshi
Spatiotemporal manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines (Symposium) The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses". Aichi, Japan, October 26-28, 2016.

7. 村越秀治、柴田明裕、安田涼平、鍋倉淳一
神経細胞内シグナル伝達の光操作と分子活性イメージング
生理研研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」生理学研究所(愛知県岡崎

市) 2016年9月15日

8. 村越秀治

光操作とイメージングによる細胞内単一経路
シグナル伝達解析に向けて
第1回ルミノジェネティクス研究会 熱海共
済会館(静岡県熱海市) 2016年7月23日

9. 村越秀治

2光子蛍光寿命イメージングによるシナプス
内生化学反応の可視化と操作
第25回日本バイオイメージング学会 名古
屋市立大学(愛知県名古屋市) 2016年9月
5日

10. 村越秀治

Optogenetic manipulation and imaging of
CaMKII-Rho GTPase signaling pathway
during synaptic plasticity
第58回日本神経化学学会大会
大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
2015年9月13日

〔図書〕(計1件)

1. 村越秀治

「第2章 少数で伝える～神経シナプスのシ
グナル伝達～」
少数性生物学 永井健治・富樫祐一[編] 日
本評論社 2017年3月 p9-16

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.nips.ac.jp/multiphoton>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 秀治(Murakoshi, Hideji)
生理学研究所・脳機能計測・支援センター
准教授
研究者番号：90608142

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()