

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13270

研究課題名(和文)カルシニューリンの光操作による神経機能の解明

研究課題名(英文)Analysis of neural functions by optical manipulation of calcineurin

研究代表者

藤井 哉 (Fujii, Hajime)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：80717546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：カルシニューリンは記憶・学習に重要な役割を果たしていますが、どうやってその機能を実現しているかを理解するためには、生きた神経細胞でその動きや酵素活性を「見える化」し、人為的に操作する手法が必要になります。本研究では、カルシニューリンとCaMKIIの動きを「見える化」し、以前申請者が開発した光刺激と酵素活性を計測する方法を改良し、より細かく速い応答を見えるようにしました。そして、人為的な光刺激によってシナプス構造が変化する際のカルシニューリンとCaMKIIの活性の相違を明らかにしました。この結果は、記憶や学習といった高次脳機能の基盤となるシグナリングのルールを理解するうえで重要なものとなります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、生きた神経細胞のシナプスや樹状突起で、カルシニューリンの動きやその活性が時間とともに強くなったり弱くなっていく様子を動画として捉えることに成功し、世界に先駆けた成果が得られました。これは、記憶や学習といった高次脳機能のメカニズムを理解するうえで重要なものとなります。また、カルシニューリンは、高次脳機能をはじめ、免疫系や循環器系など全身における生理や病態に非常に重要な役割を果たしています。今後、本研究の手法を発展させることで、これら病態を細胞レベルで理解する道筋ができてゆくと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Calcineurin plays important roles in memory and learning. In order to understand how it works to realize higher brain function, it is necessary to develop methods to visualize and manipulate its mobility and its enzymatic activity in living neurons. In this study, we visualized the movement of calcineurin and CaMKII molecules and measured their activities while performing optical manipulations by our improved method that has higher spatial and temporal resolutions. Using them, we measured the difference in the activity of calcineurin and CaMKII when synaptic structure is manipulated by artificial light stimulation. These result provides insights to unveil biochemical signaling rules that underlie higher brain functions such as learning and memory.

研究分野：神経科学

キーワード：蛍光イメージング 神経可塑性 Ca<sup>2+</sup>シグナリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

カルシニューリンは酵母からヒトまで保存されている  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的脱リン酸化酵素であり、環境からの情報入力を細胞内シグナル伝達の情報に変えることで、脳神経系における神経可塑性や高次脳機能をはじめ、免疫系や循環器系など全身における生理や病態に非常に重要な役割を担っている。例えば、カルシニューリンの活性がシナプス可塑性の長期抑圧に必要であることが示され、また、転写因子 CREB のコファクター-CRTC1 を制御し、神経活動依存的な遺伝子発現や恐怖条件付け学習において重要な役割を果たすことが示されている。こうしたプロセスにおいては、時々刻々と変わりゆく外界環境からの入力情報を  $\text{Ca}^{2+}$  を介してカルシニューリンがまさに「読み解き」、下流の因子に伝達することによってその機能を実現していると考えられ、その活性の時空間パターンを解明することが非常に重要である。

しかし、これまでカルシニューリンの特性・機能の多くは主にシクロスポリンや FK506 などの特異的阻害剤や遺伝子改変動物を用いて、その表現型を動物行動、細胞生物学、生化学的アッセイによって解析することで明らかにされてきた。こうした研究手法は時間的・空間的な分解能が低いため、外界情報を読み解く過程、すなわちカルシニューリンがいつ、どの細胞で、どの程度活性化するのか、ほとんどわかっていない。ましてや、その活性の時空間パターンにどういった生理的意味を持つのかについては今のところ介入実験をする方法がなく、全く手つかずの状況である。たとえば、カルシニューリンがいつ、どの細胞で、どの程度活性化されるのか、その時空間的パターンにはどのような生理的意義があるのかについてはほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに培ってきた光プローブ開発やタンパク質科学の知見・ノウハウを基に、カルシニューリンの分子局在や活性を光によって追跡・操作する技術を開発する。特に、脳においては、カルシニューリンの活動依存的脱リン酸化シグナリングと相対する活動依存的リン酸化シグナリングを担う  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存的リン酸化酵素・CaMKII との比較を行うことで、カルシニューリン活性の時空間制御の特性の解明と神経細胞・シナプス機能に対する役割を解析する。特に、普段は動的平衡にあるために見えない分子の動きを光活性型蛍光タンパク質を用いて「見える化」し、トラッキングするとともに、局所的な光刺激法を用いて単一シナプスを活性化・可塑性を誘導し、カルシニューリンおよび CaMKII の活性化を測定する。

## 3. 研究の方法

シナプスおよび樹状突起においてカルシニューリンおよび CaMKII の時空間的動態を明らかにするために、光照射によって緑色蛍光を発するようになる単量体光活性型緑色蛍光タンパク質 (mPA-GFP) と融合させた、mPA-GFP-カルシニューリンを作成した。分散培養神経細胞に mPA-GFP-カルシニューリンを発現させ、共焦点顕微鏡を用いてシナプスに光照射を行い、カルシニューリンおよび CaMKII の動態を計測した。また、カルシニューリンと CaMKII の活性の時空間パターンを直接比較するため多重化 FRET イメージングの改良を行った。光を用いたカルシニューリン操作のため、DNA コンストラクションを行い、in vitro において評価を行った。

#### 4 . 研究成果

光によってカルシニューリンをトラッキングするために、分散培養神経細胞に mPA-GFP-カルシニューリンを発現させ、シナプスに光照射を行って可視化することで、カルシニューリンの動態を計測した。また、カルシニューリンと生化学的・神経機能的には逆方向の作用を持つと考えられているリン酸化酵素・CaMKII も同様にして計測を行って比較し、動態の違いを明らかにした。この分子の動態の結果を酵素活性化のパターンと対比させるために、多重化 FRET によるカルシニューリンと CaMKII の活性化の比較を行った。多重化 FRET イメージングを樹状突起やシナプスでの S/N 比を向上させるために、蛍光輝度および漏れ込みが改善した新たな蛍光タンパク質を利用した新たなプローブを開発した。ライブ観察用のビデオ光学顕微鏡の光学系の光学素子の最適化や調整を行い、検出感度を向上させた光刺激可能な多重 FRET 観察系を構築した。この観察系を用いて、単一のシナプスに対して光刺激を行い、シナプス可塑性を誘導させ、神経細胞樹状突起およびシナプス部におけるカルシニューリン活性の時空間的なパターンを明らかにした。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1, Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S-i, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, Takemoto-Kimura S, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, **Fujii H**, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. *Cell* 177:1346-1360. (2019) (査読あり)

2, Kamijo S, Ishii Y, Horigane SI, Suzuki K, Ohkura M, Nakai J, **Fujii H**, Takemoto-Kimura S, Bito H. A Critical Neurodevelopmental Role for L-Type Voltage-Gated Calcium Channels in Neurite Extension and Radial Migration. *J Neurosci.* 38:5551-5566. (2018). (査読あり)

3, Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, **Fujii H**, Bito H. (2017)  
Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. *J Neurochem.* 141:808-818. (2017) (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

1, Horigane S, Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Adachi-Morishima A, **Fujii H**, Bito H. Deciphering a calcium-regulated pathway that controls radial migration via excitation-morphogenesis coupling. Society for Neuroscience 2018, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, 2018/11/ 3-7.

2, **Fujii H**, Inoue M, Bito H. Multiplex imaging of neuronal Ca<sup>2+</sup>-mediated signal transduction. Janelia Conference Fluorescent Proteins and Biological Sensors VI, Janelia Research Campus, Ashburn, VA, USA, 2018/10/7 - 10.

3, Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Kamijo S, **Fujii H**, Bito H. Deciphering a calcium-regulated pathway that controls radial migration of im mature cortical neurons.第 61 回日本神経学会大会シンポジウム、2018 /9/6-8.

4, **Fujii H**, Inoue M, Bito H. Imaging of multiple Ca<sup>2+</sup> signaling components in living neurons and synapses. The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, 2018 /7/25-29.

5, Horigane S, Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A, Kamiyo S, **Fujii H**, Bito H. Deciphering Ca<sup>2+</sup> signaling during radial migration of immature cortical neurons. The 41th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, 2018 /7/25-29.

6, Bito H, Kim R, Inoue M, Inokuchi K, Yokoyama T, Sakai K, Miyazawa Y, Ishii Y, Okamura M, Gammon N, Kobari S, Kondo Y, Sakamoto M, **Fujii H**. Deciphering Ca<sup>2+</sup>-dependent signaling pathways underlying cognitive processes. China-Japan Joint Symposium "From Neuronal Circuits to Behavior", 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sunport Takamatsu, Takamatsu, Kagawa, Japan. 2018/3/29.

7, **Fujii H**.

Development and imaging of new color indicators for Ca<sup>2+</sup> signaling in living neurons  
UK-Japan Neuroscience Symposium, Royal Society, London, 2018/3/5

8, Takemoto-Kimura S, Horigane S, Suzuki K, Kamiyo S, **Fujii H**, Bito H. Novel functions of Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation cascades in the period of neuronal circuit formation. CONBIO2017 Joint Annual Meeting of the Japan Biochemistry Society and the Molecular Biology Society of Japan, Kobe International Convention Center, Kobe, Japan. 2017/12/6-9

9, Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S, Kawakami R, Yamaguchi K, Sakamoto M, Yokoyama H, Kim R, Takemoto-Kimura S, Abe M, Yokoyama T, Quirin S, Ramakrishnan C, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, **Fujii H**, Deisseroth K, Kitamura K, Bito H  
Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for In vivo imaging of brain circuit dynamics. The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington Convention Center, Washington DC, USA. 2017/11/11-15.

10, **Fujii H**, Inoue M, Bito H.

Development and imaging of new color indicators for Ca<sup>2+</sup> signaling in living neurons.  
The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Makuhari, Japan. poster, 2017/7/21

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。