

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19631

研究課題名(和文)意思決定における海馬の行動予想発火の役割

研究課題名(英文)Role of hippocampal predictive firing in decision making

研究代表者

林 康紀(Hayashi, Yasunori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：光活性化CREBならびにCaMKIV作成を試みた。両者が核タンパク質であることを利用し、光活性化核移行シグナル(paNLS)を作成することを試みた。mCherryと核輸出シグナル-LOV2ドメイン-核移行シグナルを融合すると、光照射により核へ移行が観察された。しかしCREBと融合し、CRE下流でLuciferase発現させたところ、光照射していない場合も発現が見られ、leakが疑われた。そこで、方針を転換し、dnCREBならびにdnCaMKIVを作成している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、記憶形成のメカニズムに踏み込むもので、多彩な記憶障害を伴う疾患(例えば認知症など)や記憶が病的に更新する疾患(例えばPTSDや薬物依存)の理解と治療に役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：We attempted to generate photoactivatable CREB and CaMKIV. Because both are nuclear proteins, we first generated a photoactivatable nuclear localization signal (paNLS). The resultant fusion protein, nuclear export signal-LOV2 domain-nuclear localization signal tagged with mCherry, translocated to the nucleus by photostimulation. However, when we fused it with CREB and monitored activity by expressing luciferase under CRE, there was a significant leak of activity even under the darkness. We therefore decided to generate a dominant negative CREB and CaMKIV.

研究分野：神経科学

キーワード：光活性化蛋白質 記憶・学習 スパイン 興奮性シナプス CREB CaMKIV 光プローブ

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

### 1. 研究開始当初の背景

動物はある行動をしようとする意思を決定する前に、意識下あるいは意識上にシミュレーションを行うことで脳内モデルを形成し、そのうち最適なものを選択していると考えられる。しかし、それに関わる神経回路は明らかではない。本研究では特に海馬に着目して研究を進める。海馬では動物の場所に応答する場所細胞がある事が知られているが、最近、場所細胞が行動前、これからの行動を予想するように順番に発火する事が見出された。特に、動物に走った経験がない新たな経路を予想させても、これまで経験した発火を組み合わせ、新しい発火順列を形成することができることから、単にこれは既に走った経験がある経路の場所細胞が再活性化されているのではなく、行動の意思決定に伴い、新たな脳内モデルが形成されていると想定される。

### 2. 研究の目的

しかしこの「行動予想発火順列」の生理学的意義は明らかではない。特に重要な事に、それが行動を計画し、かつ引き起こすのに必要十分であるかは明らかではない。この解明にあたり難しい点は、行動予想発火順列は時間的に制御されたものであり、単に光遺伝学的に活性化させただけでは誘導できない点である。そのため、いくつかの技術的な工夫が必要である。そこで本研究では、次のような specific aim を設定して研究を進める(下ポンチ絵参照)。

#### SA1. シナプス可塑性閾値の光制御技術の開発

LTP の閾値を調節するシグナル経路である CaMKIV 及び CREB の活性を、光感受性タンパク質である LOV ドメインを用いることで光にて制御できるようにする。これを用いると場所体験時に光を照射する事により、特定の細胞に選択的に場所をコードさせる事ができる。さらに ChR2 と共発現する事により、場所をコードさせた細胞を任意の時に再活性化する事が可能となる。

#### SA2. 特定の CA3 神経細胞をセルアセンブリに誘導し、発火順列を形成させる技術の開発

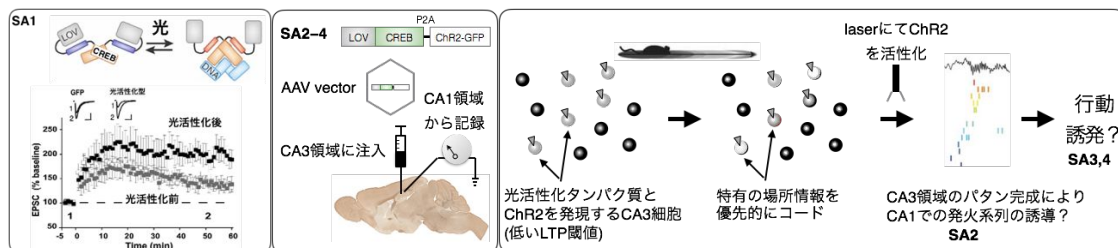
SA1 の技術を用い、特定の CA3 細胞に走行路の場所情報を優先的にコードさせる。その上で同じ細胞を ChR2 にて再活性化すると CA3 領域のパターン完成特性により走行路と同じ CA1 細胞の発火順列を再現できると期待される。これはテトロード記録にて確認する。

#### SA3. 海馬における行動予想発火が行動の選択とその柔軟性に必要十分であるかの検討

SA2 のように CA1 細胞の発火順列を人工的に再現することで、行動が再現するかを検討する。また行動の柔軟性に行動予想発火パターンの変化が付随するかを確認する。また、自閉症モデル動物で、固執傾向が行動予想発火の過剰な安定性として観察されるか検討する。

#### SA4. 人為的に形成された行動予想発火が新たな行動パターンを誘導できるかの検討

次に、行動予想発火そのものが、行動の内容を決定する事ができるかを検討する。このため複数の発火順列を人工的に連続して発火させた場合、行動パターンも結合するかを検討する。



海馬で観察される行動予想発火は、場所、走行時間と距離、行動との定量的相関が取れる実験系としてユニークである。この点、恐怖刺激条件づけで使われる文脈に対する脳内モデルとは異なり、行動の選択やプランニング、意思決定に関わる神経回路が明らかになる期待される。

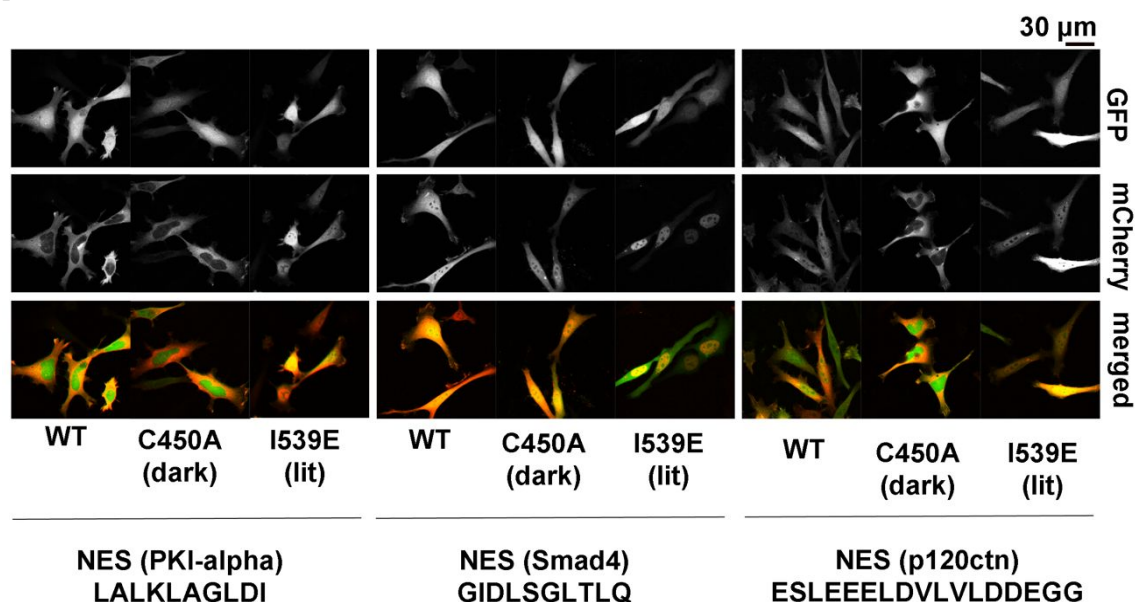
### 3. 研究の方法

本研究では、当初の目的として光活性化 CREB ならびに CaMKIV 作成し、それを用い、特定の神経細胞に記憶をエンコードさせることを目的とした。この目的のため、両者が核タンパク質であることを利用し、光活性化核移行シグナル (paNLS) を作成することを試みた。燕麦由来の向光性に関与する蛋白質ドメインである、LOV2 ドメインを用いた。LOV2 ドメインは光照射により、構造が変化し、他のタンパク質の活性を調節できる。そこで、mCherry と幾つかの核輸出シグナル-LOV2 ドメイン-核移行シグナルとを融合し、細胞に発現し光照射を行った。cAMP-dependent protein kinase inhibitor  $\alpha$  (PKI $\alpha$ )、mothers against decapentaplegic homolog 4 (Smad4)、Catenin delta-1 (ctnnd1, p120ctn) の核輸出シグナルを用いた。効率的にスクリーニングするため LOV2 domain の明型と暗型をそれぞれ模倣する点変異体 (I539E ならびに C450A) をペアで作成し、明型で核に移行する構築を同定することを試みた。可視化には mCherry を融合した。それができたら野生型を用い、473 nm 光で核移行することを確認した。

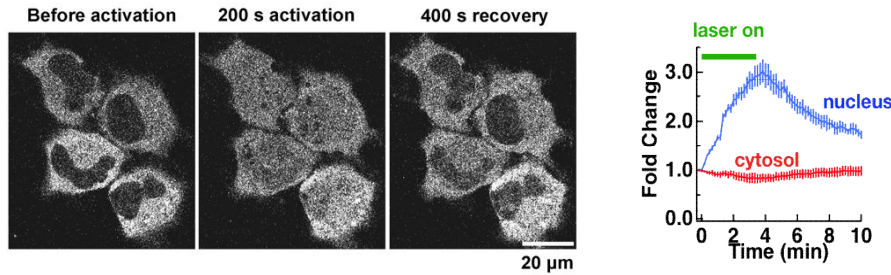
完成した paNLS は CREB に融合した上で cAMP-response element (CRE) 下 luciferase を発現する細胞を用い western blotting で luciferase 蛋白の発現を観察した。

#### 4. 研究成果

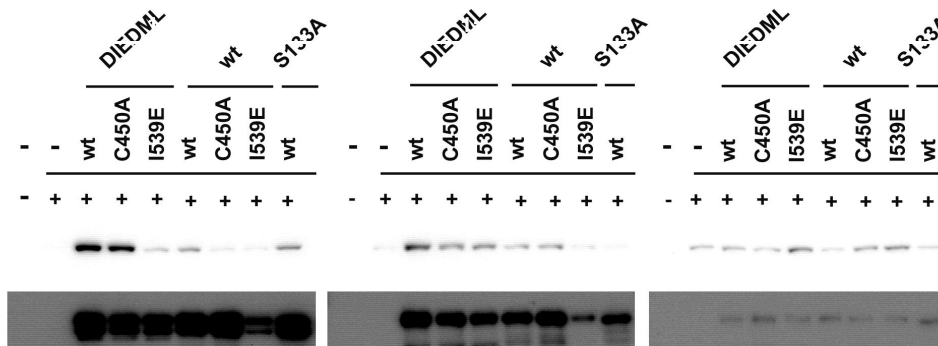
作成した paNLS 候補の明型、暗型の分布を比較したところ、PKI $\alpha$  の NES を用いた時に、暗型で細胞質にとどまり、明型で核に移行することが認められた。Smad4 の NES を用いたときには明型で核に移行するのは認められたものの、暗型でもかなり核での分布が認められたため、不適當と考えられた。p120ctn を用いた時にも核に移行する像が認められたが、野生型 LOV2 ドメインに繋げた時は光を照射しなくても若干の核への移行が認められた。そのため、これも不適當であると考えられた。そのため、PKI $\alpha$  の NES を用いた paNLS を用い、paCREB を用いることを試みた。



次に活性型 CREB と paNLS の融合蛋白質を作成し、mCherry で tag することにより分布を可視化した上で、440 nm 光を照射した。その結果、光照射により核への移行が認められた。光照射を停止すると、数分の単位で可逆的に核外へ戻っていった。



そこで、この構築を CRE 下流で luciferase 発現する構築と共発現し、luciferase を western blotting にて検出した。CREB は、常時活性型 (DIEDML 変異体)、野生型、ならびにリン酸化による活性化を受けない S133A 変異体を用いた。その結果、常時活性型 CREB を用いた場合、明型と暗型では明らかに明型で luciferase の誘導が認められた。しかしながら、暗所においたままの野生型 LOV2 ドメインですでに活性が認められてしまった。一方、野生型 CREB は光照射型を結合したときにも活性は見られなかった。そのため、単に野生型 CREB を発現しただけでは、不十分であった。常時活性型を野生型 LOV2 ドメインに結合した場合、暗所でも活性が認められるのは、過剰発現しているため、少しの leak でも活性があるのではないかと考え、量を減らしたが、DIEDML 変異体-野生型 LOV2 ドメインですでに明型と変わらない程度の活性を持つ状況は変化しなかった。



今後は CaMKIV を試す、paNLS を複数タンデムにつけるなどの工夫を行っていく。また、CREB や CaMKIV の優勢抑制変異体も一定の有用性があることから、これも試していく。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

- (1) Saneyoshi T, Matsuno H, Suzuki A, Murakoshi H, Hedrick NG, Agnello E, O'Connell RO, Stratton M, Yasuda R, Havashi Y (In press) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP. **Neuron**. 102 (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/Shared/images/a/ae/Saneyoshi\\_Neuron.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/Shared/images/a/ae/Saneyoshi_Neuron.pdf)
- (2) Kim K, Suzuki A, Kojima H, Kawamura M, Miya K, Abe M, Yamada I, Furuse T, Wakana S, Sakimura K, Havashi Y (2019) Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKIIbeta is required for fear learning. **Neurobiol Learn Mem** 157:86-95. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/c/c1/Kim\\_Neurobiol\\_Learn\\_Mem.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/c/c1/Kim_Neurobiol_Learn_Mem.pdf)
- (3) Kashino Y, Obara Y, Okamoto Y, Saneyoshi T, Havashi Y, Ishii K (2018) ERK5 Phosphorylates Kv4.2 and Inhibits Inactivation of the A-Type Current in PC12 Cells. **Int J Mol Sci** 19. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/3/3c/Kashino\\_Int\\_J\\_Mol\\_Sci.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/3/3c/Kashino_Int_J_Mol_Sci.pdf)

- (4) Sato M, Kawano M, Mizuta K, Islam T, Lee MG, Havashi Y (2017) Hippocampus-Dependent Goal Localization by Head-Fixed Mice in Virtual Reality. **eNeuro** 4.  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/02/Sato\\_eNeuro.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/02/Sato_eNeuro.pdf)
- (5) Hallin EI, Eriksen MS, Baryshnikov S, Nikolaienko O, Grodem S, Hosokawa T, Havashi Y, Bramham CR, Kursula P (2018) Structure of monomeric full-length ARC sheds light on molecular flexibility, protein interactions, and functional modalities. **J Neurochem** 147:323-343. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/05/Hallin\\_J\\_Neurochem.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/05/Hallin_J_Neurochem.pdf)
- (6) Bosch M, Castro J, Sur M, Havashi Y (2017) Photomarking Relocalization Technique for Correlated Two-Photon and Electron Microcopy Imaging of Single Stimulated Synapses. **Methods Mol Biol** 1538:185-214. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/9/91/Bosch\\_Methods\\_Mol\\_Biol.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/9/91/Bosch_Methods_Mol_Biol.pdf)
- (7) Sato M, Kawano M, Yanagawa Y, Havashi Y (2016) In vivo two-photon imaging of striatal neuronal circuits in mice. **Neurobiol Learn Mem** 135:146-151. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/06/Sato\\_Neurobiol\\_Learn\\_Mem.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/0/06/Sato_Neurobiol_Learn_Mem.pdf)
- (8) Kim K, Saneyoshi T, Hosokawa T, Okamoto K, Havashi Y (2016) Interplay of enzymatic and structural functions of CaMKII in long-term potentiation. **J Neurochem** 139:959-972. (査読あり)  
[http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/a/ae/Kim\\_J\\_Neurochem.pdf](http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/shared/images/a/ae/Kim_J_Neurochem.pdf)

〔学会発表〕(計約 30 件 最新 10 件のみ示す)

1. Havashi Y. (2019) Why is CaMKII so abundant at synapse? OIST (Okinawa, Japan)
2. Havashi Y. (2019) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP (Niigata, Japan)
3. Havashi Y. (2018) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP (University of Washington, Seattle, USA)
4. Havashi Y. (2018) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying LTP (Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Macau)
5. Havashi Y. (2018) A positive feedback mechanism supporting persistent signaling during hippocampal LTP (Max Planck Institute for Biochemistry (München, Germany))
6. Havashi Y. (2018) A positive feedback mechanism supporting persistent signaling during hippocampal LTP (Max Planck Institute for Biochemistry (University of Bordeaux, France))
7. Havashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Hong Kong University of Science and Technology (Hong Kong)
8. Havashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Molecular and Cellular Cognition Society (Singapore)
9. Havashi Y. (2017) A positive feedback mechanism supporting hippocampal LTP. Korea Brain Challenge Meeting (Seoul, South Korea)
10. Havashi Y. (2017) Roles of cytoskeleton in hippocampal synaptic plasticity. 3rd Neuroscience Meeting in Pakistan (Karachi, Pakistan – online presentation)

〔その他〕

<http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。