

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02708

研究課題名（和文）シナプス状態の光操作による記憶保存様式の理解

研究課題名（英文）Understanding Memory Storage Mechanism through Optical Manipulation of Synaptic States

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） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：光遺伝学的手法を用いることで高い時空間分解能で細胞活動を操作することができ、例えば広く用いられている光遺伝学的ツールであるチャネルロドプシン-2を利用することで神経細胞の活動を細胞レベルで制御することができる。しかしながら、単一シナプスのレベルでシナプス可塑性を誘導できる光遺伝学的ツールはこれまで存在しなかった。そこで私達は単一シナプスの光操作が可能な新規光遺伝学的ツールを開発した。CaMKII に光感受性ドメインLOV2を融合させることで、光活性化可能なCaMKIIを開発した。これにより、海馬ニューロンの単一スパインで長期増強（LTP）を誘導することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、光応答性に改変したCaMKII酵素を用いることで、生きた動物内で個々のシナプスの機能を強化することに成功した。また、本研究で開発した分子デザインは細胞内に存在する様々なタンパク質に応用が可能であるため、将来の光医療開発に繋がる画期的な成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Optogenetic techniques can be used to manipulate cellular activity with high spatiotemporal resolution. A widely used optogenetic tool is channelrhodopsin-2, which can be used to control neuronal activity at the cellular level. However, no optogenetic tool has been able to induce synaptic plasticity at the level of a single synapse. We have therefore developed a novel tool that enables optical manipulation of synapses. Specifically, we developed a light-activatable CaMKII by fusing CaMKII with the light-sensitive domain LOV2. This enabled us to activate light-activatable CaMKII in a single spine and induce long-term potentiation (LTP) in hippocampal neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 光応答性分子

1. 研究開始当初の背景

近年チャネルロドプシンをはじめとした様々な光応答性分子の開発が大きく進展しており、神経科学を含む様々な分野での応用が進んでいる。しかしながら、細胞内シグナル分子の光操作研究は細胞レベル(数十マイクロメートル)のものが殆どであり、細胞内の局所(マイクロメートルレベル)で分子活性を光操作する方法論は殆ど確立されていないといっている。例えば、2光子励起をはじめとした多光子励起による局所励起法と光応答性分子開発の両面から、シグナル分子の活性を光を用いることでサブマイクロメートルの空間分解能で操作する方法を確立することができれば個々のシナプスを光操作することができるようになり極めて有用である。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の局所で直接分子を活性化し、その応答から細胞機能を調べることを目的とした微小領域光遺伝学の創成を目指すことにした。特に、シナプス長期増強において重要な働きをしているセリン・スレオニンキナーゼである Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) に着目し、この分子の活性を2光子励起で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で直接制御可能な光応答性分子の開発を目指した。

3. 研究の方法

Phototropin1 は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、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、分子構造が変化する。この変化は可逆的である。これを用いて、光依存的に構造変化をおこし、活性化するキナーゼ分子を作製することにした。具体的には CaMKII のヒンジ領域を境に分子を2つに分けて、そこに LOV2 ドメインを挿入した(図1)。光照射によって、ヒンジ領域に挿入されている LOV2 が開状態になるため、分子全体の構造が変化し、キナーゼが働くようになる。このような分子を作製するために、様々なリンカーや LOV2 の挿入部位を試した。光照射によって構造変化が起こるかどうかは、HeLa 細胞にコンストラクトを発現させて、蛍光寿命イメージングで FRET を可視化した。また、分子の両端に GFP と ShadowG (色素タンパク質で FRET のアクセプター) をそれぞれ結合させ、FRET を見ることで構造変化を可視化した。この方法により 500 種類程度のコンストラクトをスクリーニングしたところ、青色光照射によって、自身の持つ 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光応答性 CaMKII (photoactivatable CaMKII, paCaMKII)。

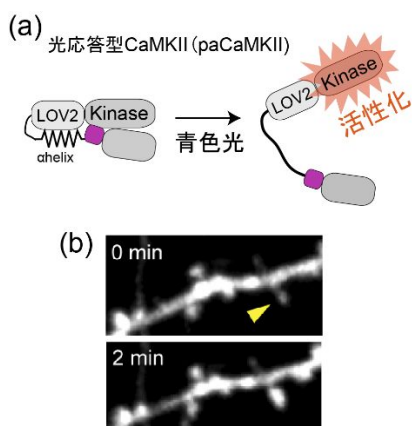


図1、(a) 光応答性 CaMKII。制御ドメインとキナーゼの間に青色光により構造変化する植物タンパク質由来の LOV2 ドメインを遺伝子改変により挿入した。この分子は、青色光照射後ミリ秒程度で分子が開状態になりキナーゼ活性が上昇する。光応答性 ROCK、PAK も同様の方法で作製する。(b) 光応答性 CaMKII を神経細胞に発現させ樹状突起上のスパイン(矢尻)を2光子励起することでスパイン体積の増大を惹起することができた。

4. 研究成果

次に開発した paCaMKII を用いて、微小領域である単一シナプス(スパイン)内でシナプス可塑性が惹起できるかどうかを調べた。海馬スライスに遺伝子銃を用いて paCaMKII を導入し、900 nm の 2 光子励起で paCaMKII を単一スパイン内で活性化させたところ、体積増大(シナプス形態的可塑性)が見られた(図2)。また各種変異体を用いることにより、paCaMKII 活性化によるスパイン体積増加は 2 光子励起による paCaMKII のキナーゼ活性の増大によるもの(キナーゼ活性をなくした K42M 変異体では体積変化が起こらない)であることが分かった。さらに、単一スパイン内での paCaMKII によって惹起されたシナプス可塑的形態変化は 4 時間以上持続し、タンパク質合成依存的(アニソマイシンとシクロヘキシミドでタンパク合成を阻害すると可塑的变化がブロックされる)であることが分かった。また、化学伝達物質であるグルタミン酸の受容体である AMPA 受容体の局在が、paCaMKII を活性化させたスパイン内で増加していることを蛍光イメージングと電気生理実験の両面から確認することができた。さらに、海馬のみならず、大脳皮質スライスや覚醒マウス脳においても単一スパインに可塑的形態変化を惹起することに成功した。すなわち、paCaMKII が個々のシナプスで長期増強を惹起することができるツールであることを示すことができた(Shibata et al. Nature Communications 2021)。

次に、paCaMKII を直接光活性化させることによって、低分子量 G タンパク質である Cdc42 が活性化するかどうかを調べた(Cdc42 はアクチン重合や安定化に関与し、シナプス可塑性を維持するのに重要な役割を果たしている)。そのために、海馬組織スライスの神経細胞に、paCaMKII と新規開発の蛍光タンパク(ShadowY)を利用した FRET センサーを遺伝子銃で導入し、神経細胞内で CaMKII を光活性化した時の下流分子活性を 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡で観察した。この結果、paCaMKII をスパイン内で活性化させるとスパイン体積の増大とともに Cdc42 の活性化が起こることが分かった。すなわち、光応答性分子を活性化し、その下流分子活性の時空間分布を可視化する単一経路分子活性化法を開発すること成功した。今後、単一経路分子活性化法を、Cdc42 だけでなく様々な分子に応用することでシナプス可塑性に必須なシグナルやその時空間分布を明らかにすることができると考えられる。

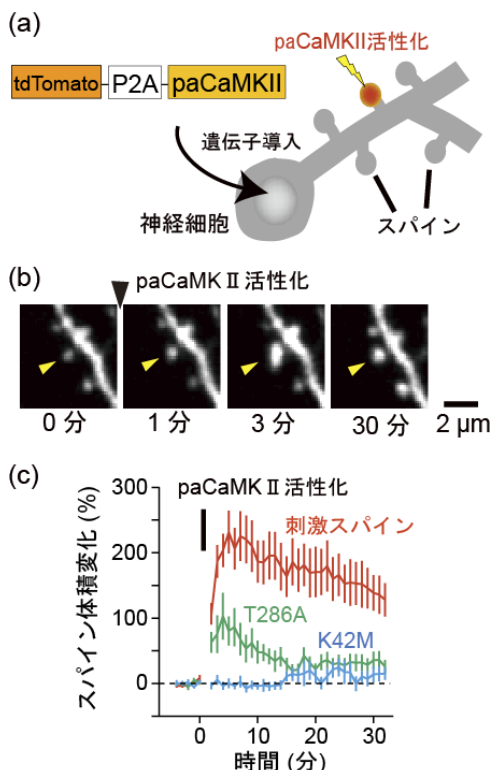


図2、(a) paCaMKIIと赤色タンパク質をコードする DNA を遺伝子銃により神経細胞に導入。

(b) paCaMKIIを活性化させたスパインの画像。矢印で示したスパインにおいて、2 光子励起により paCaMKIIを活性化させたところスパイン体積が増大した(シナプス長期増強)。

(c) paCaMKIIを活性化させたスパインの体積変化の時間経過(赤)。光刺激後、スパイン体積が増大し維持されている。キナーゼ活性のない変異体(K42M)ではスパイン体積は増大しない(青)。自己リン酸化が起こらない変異体(T286A)ではスパイン体積が一過的にしか増大しない(緑)。Shibata et al., Nat. Commun (2021)、および植田ら 生物物理(2022)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saneyoshi T, Matsuno H, Suzuki A, Murakoshi H, Hedrick NG, Agnello E, O'Connell R, Stratton MM, Yasuda R, and Hayashi Y	4. 巻 102
2. 論文標題 Reciprocal Activation within a Kinase-Effector Complex Underlying Persistence of Structural LTP.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuron	6. 最初と最後の頁 1199 1210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuron.2019.04.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Murakoshi H, Horiuchi H, Kosugi T, Onda M, Sato A, Koga N, and Nabekura J.	4. 巻 9
2. 論文標題 ShadowR: a novel chromoprotein with reduced non-specific binding and improved expression in living cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48604-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 村越秀治、植田大海	4. 巻 49
2. 論文標題 二光子蛍光寿命イメージングと色素タンパク質によるタンパク質間相互作用の可視化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 20 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Xi, Shibata AC, Hendi A, Kurashina M., Fortes E, Weilinger N, MacVicar B, Murakoshi H, Mizumoto K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Rap2 and TNIK control Plexin-dependent tiled synaptic innervation in <i>C. elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e38801
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.38801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakoshi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuronal Synaptic Connections Organized by Small Numbers of Molecules.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Springer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-2083-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村越秀治	4. 巻 -
2. 論文標題 共焦点レーザー走査顕微鏡vi.FLIM- タイムドメイン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 羊土社	6. 最初と最後の頁 57-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 Optical manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines of neurons
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 シナプス内シグナル分子の光操作と分子活性イメージング
3. 学会等名 "Chemistry for Neuroscience 2019" 研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Optical manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines of neurons.
3. 学会等名 Current Trends and Future Directions of Synapse-Circuit Plasticity Research. (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Optogenetic induction of synaptic plasticity at single synapses by photoactivatable CaMKII.
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Spatiotemporal manipulation and imaging of signaling molecules in neurons
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Optogenetic manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines of neurons.
3. 学会等名 UK-Japan Neuroscience Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of CaMKII activity in synapses.
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 Optical manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines of neurons
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 Imaging Protein Activity by 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
3. 学会等名 The 66th NIBB Conference, ABiS International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生理学研究所 村越研究室 http://www.nips.ac.jp/multiphoton/ 村越研究室 http://www.nips.ac.jp/multiphoton/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------