

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14826

研究課題名（和文）光活性化型CaMKIIを用いた、シナプス長期増強の誘起による記憶・学習の直接操作

研究課題名（英文）Direct manipulation of memory and learning by inducing long-term potentiation using photoactivatable CaMKII

研究代表者

柴田 明裕 (Shibata, Akihiro)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・特任研究員

研究者番号：10707409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シナプスの長期増強は、学習や記憶の基盤となるシナプス可塑性の一つである。今回私たちは、特定のシナプスに長期増強を誘起させるために、長期増強の誘起に必要なCaMKIIに注目した。そこで、光応答性タンパク質ドメインであるLOVドメインを用いて光活性化型CaMKIIを新規に開発した。そして、光活性化型CaMKIIを用いていることにより、特定のシナプスに長期増強（体制増加、AMPA受容体の集積、EPSCの増加）を誘起することに世界に先駆けて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発に成功した光活性化型CaMKIIは、特定のシナプスに光を用いてLTPを誘起できる初めての光遺伝学ツールである。これにより、これまで不明とされてきた記憶・学習とシナプスの活動レベルの関係が明確になると予想される。また、光活性化型CaMKIIは、特定のシナプスの信号伝達の減少から始まり、シナプスの消失を介して神経ネットワークの崩壊により脳機能障害を誘起するアルツハイマー病や認知症などの神経変性疾患に対する新たな新薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Long-term potentiation of synapses is a form of synaptic plasticity that underlies learning and memory. In order to induce long-term potentiation at specific synapses, we focused on CaMKII, which is required for the induction of long-term potentiation. In this study, we developed a novel photoactivatable CaMKII using the LOV domain, a light-responsive protein domain. We were the first to successfully induce long-term potentiation (Spine volume increase, AMPA receptor accumulation, and EPSC increase) at specific synapses by using photoactivatable CaMKII.

研究分野：神経科学

キーワード：光活性化型CaMKII

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

『シナプス長期増強を強制的に誘起すると、頭は良くなるのか？それとも悪くなるのか？』これが、本研究課題の核心的問いである。そして同時に、この問いは、世界中の研究者が解明したいと努力しているにもかかわらず、ほとんど未解決である。

近年、光によって構造変化するチャンネルロドプシンなどの光応答性分子を遺伝学的手法により特定の神経細胞に発現させ、その機能を光で操作する光遺伝学的手法が登場した (Boyden et al. 2005, Ishizuka et al. 2006)。これにより、マウスの特定の神経細胞集団を刺激すると、記憶状態や学習課程が変化することが明らかになってきた (Rajasethupathy et al. 2016, Christina et al. 2017)。一方、刺激された神経細胞は、自身の信号を、シナプスを介して別の神経細胞へ伝播する。この時、シナプス間の情報伝達効率を可逆的、かつ長期的に向上させる『シナプス長期増強』は、記憶や学習の基礎であると考えられている。しかし、マウスのシナプス集団にシナプス長期増強を誘起させ、記憶状態や学習課程の変化を調べる方法が、無い。そこで、シナプス集団に長期増強を誘起することが可能な光遺伝学プローブである、光活性化型 CaMKII の独自開発を行った (図 1 a)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、シナプス長期増強が、記憶や学習に直接関係しているのかを明らかにすることである。しかしながら、シナプス長期増強と記憶や学習の直接の関係性を調べるための手法が、無かった。そこで、シナプス単位で長期増強を誘起できる光遺伝学的プローブを開発するために、申請者は、シナプス長期増強を誘起する中心的な働きをする、カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ (CaMKII) に着目した (Lisman et al. 2012)。現在申請者は、光を用い、シナプス単位で活性を制御することで、シナプス長期増強を誘起することが可能である光活性化型 CaMKII (シナプス長期増強トリガー) の開発を独自に進めている。

## 3. 研究の方法

### (1) シナプス長期増強を誘起する光活性化型 CaMKII (シナプス長期増強トリガー) の開発

マウスが自由に動き回る条件下で、1シナプス単位でシナプス長期増強を誘起するために、光を用いて CaMKII の活性を制御する光遺伝学的手法が必要である。そこで、本研究では、植物の遺伝子である Phototropin1 が持つ LOV2 遺伝子に着目した。この LOV2 は、青色光照射により閉状態から開状態になる。そのため、LOV2 を CaMKII の制御ドメインとキナーゼドメインの間に遺伝子挿入することで、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。

現在申請者は、この分子のプロトタイプを作製し、海馬スライス切片の神経細胞に発現させ、2光子顕微鏡下で単一スパインを2光子刺激すると、スパインの体積変化を誘起することに成功している。しかし、現状のプロトタイプは、神経細胞内で凝集し、機能しないことがある。そこで、今後は、変異導入、リンカーの最適化、分子自身のフォールディング効率の向上による性能アップを行う。

### (2) 光活性化型 CaMKII を用いたシナプス長期増強の誘起

次に、開発した光活性化型 CaMKII を用いて光刺激によりシナプス長期増強を惹起できるのかを検証する。シナプス長期増強は、前期と後期による2段階の工程により誘起される。そこで、光活性化型 CaMKII が前期・後期の長期増強まで誘起できるのかを2光子顕微鏡を用いて検証する。

### (3) 光活性化型 CaMKII を用いたシナプスの直接操作によるマウスの記憶・学習解析

シナプス長期増強と記憶・学習の関係を直接調べるために、光活性化型 CaMKII をアデノ随伴ウイルスベクター (AAV ベクター) を用いてマウスの海馬の神経細胞に特異的に発現させる。そして、青色 LED をラットの海馬に挿入することで、任意のタイミングでシナプス長期増強を誘起できるようにする。

## 4. 研究成果

### (1) 光活性化型 CaMKII (シナプス長期増強トリガー) の開発と最適化

初年度では、シナプス長期増強を誘起する光活性化型 CaMKII の開発を行った。それには、光応答性ドメインである LOV2 遺伝子に着目し、光活性化型 CaMKII の cDNA を作製した。

次に、作成した光活性化型 CaMKII が、青色光により開閉するかを検証した。実際に、光活性化型 CaMKII の両末端に緑色蛍光タンパク質と、赤色蛍光タンパク質をつけた光活性化型 CaMKII の FRET センサーを作製し、HeLa 細胞に発現させ、開閉による FRET の変化を蛍光寿命イメージング顕微鏡により検出したところ、青色光照射後に FRET が変化することが分かった。つまり、青色光照射により光活性化型 CaMKII の開閉を制御することに成功した (図 1 a)。

次に、光活性化型 CaMKII が、内在性の CaMKII に比べて、どれくらいの自己リン酸化能を保持しているのかを検証した。それには、免疫沈降法と western blotting により検出した。その結果、光活性化型 CaMKII は、内在性の CaMKII とほぼ同じ自己リン酸化能を有していることが分かった。

## (2) 光活性化型 CaMKII を用いたシナプス長期増強の誘起

LTP は、誘起過程の前期と維持過程の後期から構成されている。まず、一般的に前期の LTP に必要な スパイン体積増加、AMPA 受容体の集積、興奮性シナプス後電流 (EPSC) の増加を検証した。

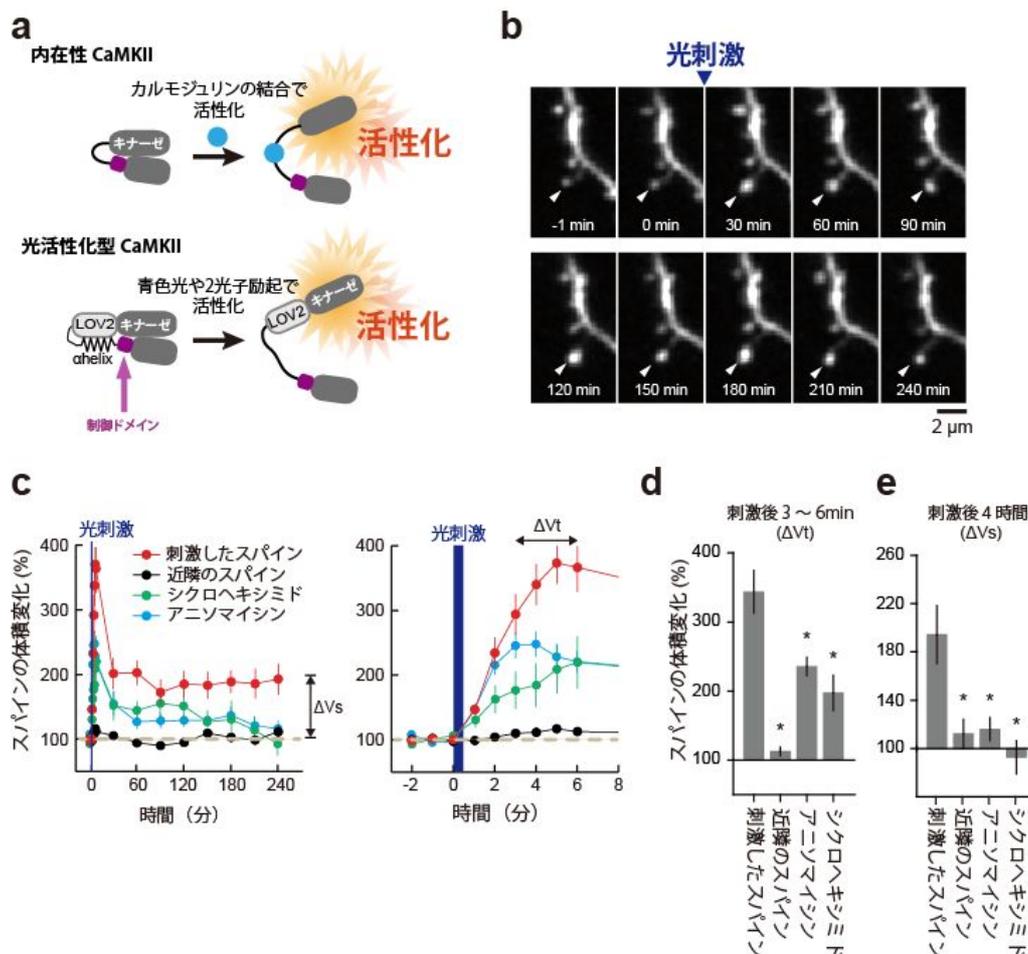
### (2-1) 光活性化型 CaMKII に LTP の誘起

ラットの海馬スライス切片の神経細胞に tdTomato を P2A 配列で繋げた tdTomato-P2A-paCaMKII と、細胞膜上の pH で発光する緑色蛍光タンパク質 SEP を繋げた AMPA 受容体のサブユニット SEP-GluR1 を遺伝子導入した。スパインの形態変化の観察と paCaMKII の光刺激は、2 光子顕微鏡を用いた。その結果、スパインの体積増加に伴い、スパイン上の GluR1 の密度が増加した。そして、EPSC の変化を調べるために、Whole-cell patch-clamp 法を用いたところ、スパインの体積増加に伴い、EPSC の増加が 30 分以上続くことが明らかになった。これらの結果から、特定のシナプス内の paCaMKII を活性化させるだけで、前期の LTP を誘起することが明らかになった。

### (2-2) 光活性化型 CaMKII の光刺激による LTP の維持

次に、光活性化型 CaMKII を用いて、LTP の維持が可能であるかを調べた。それには、(2-1) の実験と同様に、ラットの海馬スライス切片を用いて、神経細胞に光活性化型 CaMKII を遺伝子導入し、単一スパインを 2 光子励起 (青色光の約 2 倍の波長) により刺激した。一般的に、スパイン体積増加が、4 時間以上持続するには、新たなたんぱく質の合成を必要とされている。そのため、スパインの形態変化を 4 時間以上観察した。

その結果、光活性化型 CaMKII を活性化させるだけで、スパインの体積増加が 4 時間以上持続することが明らかになった (図 1)。一方、長時間のスパイン体積変化が、タンパク質合成依存性かを調べるために、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドやアニソマイシンを加えて、同じ実験を行ったが、その場合スパインの体積増加が、4 時間以上維持されないことが明らかになった (図 1c,e)。



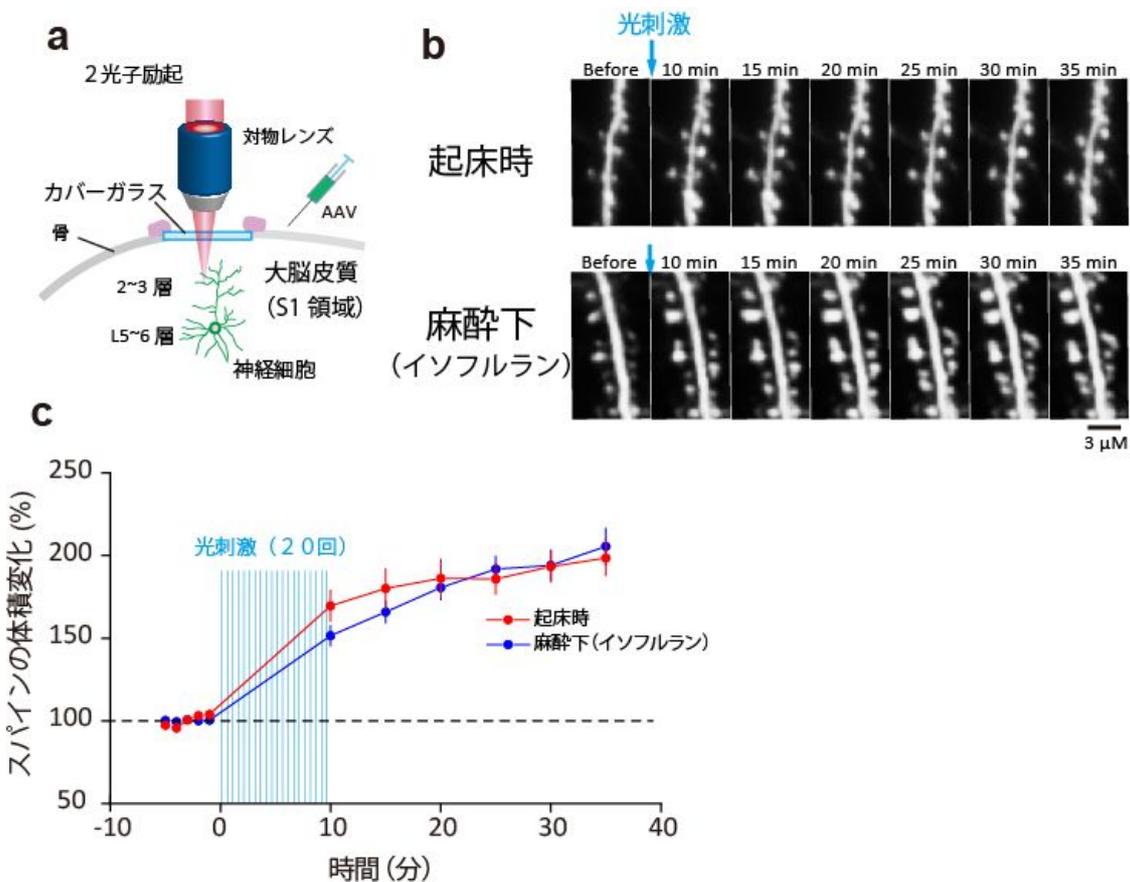
### 図1、光活性化型 CaMKII による長期的なスパイン体積増加

(a) 光活性化型 CaMKII の概要図 (b) 単一スパイン刺激後の体積変化 (矢尻) が4時間以上維持される。(c) タンパク合成阻害剤 (シクロヘキシミドとアニソマイシン) を存在・非存在下におけるスパイン体積変化のタイムコース (d,e) 光刺激後3~6分後と4時間後のスパイン体積変化の比較。\*は統計的に有意差あり ( $p < 0.05$ )。

### (2-3) 生きたマウス脳内における光活性化型 CaMKII によるスパイン体積増加

さらに、光活性化型 CaMKII が、スパインの体積増加を、生きたマウスの脳内でも誘起出来るかどうかを試した。それには、アデノウイルス随伴ベクターを用いてマウスの大脳皮質のS1領域に遺伝子導入し、2光子顕微鏡下でスパインの観察と光刺激を行った。その結果、起床時と麻酔時の両方において、刺激後スパインの体積が2倍近く大きくなり、体積増加が30分以上持続することが分かった。つまり、光活性化型 CaMKII は、生きたマウスにおいても、特定の場所で長期増強を誘起することができる極めて優れた光遺伝学ツールであることが示された (図2)。

これらの結果から、光活性化型 CaMKII は、特定のスパイン内で活性化させるだけで、シナプス長期増強の誘起・維持することが可能なことが明らかになった。つまり、本研究に先駆けて開発に成功した光活性化型 CaMKII は、単一シナプスレベルで長期増強の誘起・維持を可能にする世界で初めてのツールである。



### 図2、in Vivoにおける光活性化型 CaMKII によるスパイン体積増加の誘起

(a) in Vivo 実験の概要図 (b) 覚醒時と麻酔時 (イソフルラン) のスパイン体積変化のイメージ図 (c) 覚醒時と麻酔時のスパイン体積のタイムコース。

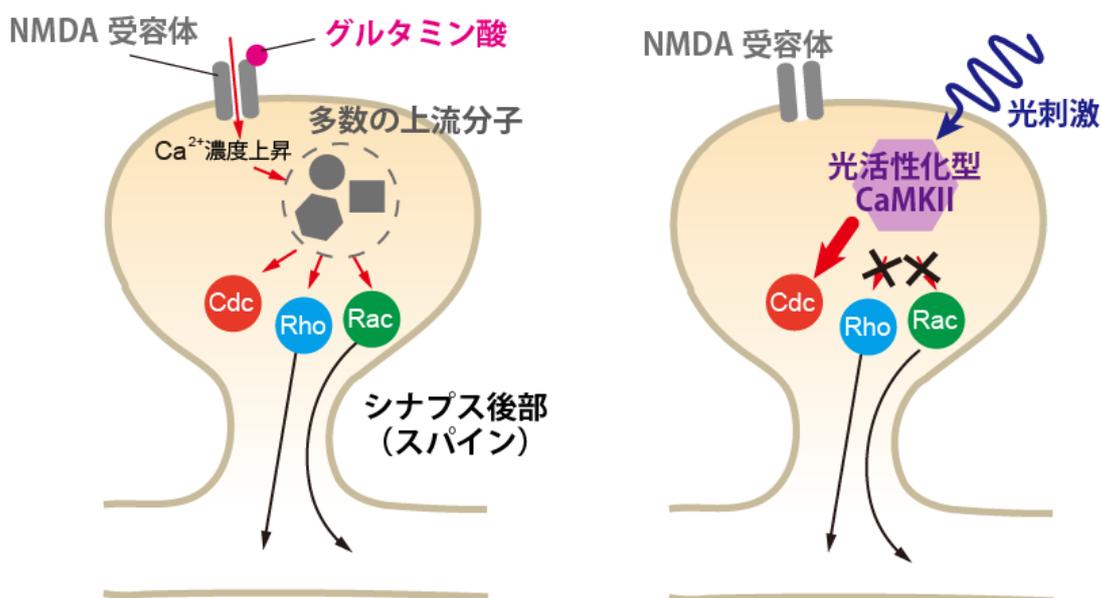
### (3) LTPに必要なCaMKIIシグナル経路の同定

長期増強の誘起に必要なシグナル経路は、刺激したスパイン内の  $Ca^{2+}$ 濃度上昇によるシグナル経路のクロストークにより、非常に複雑となっている。そのため、長期増強に本当に必要なシグナル経路はほとんど分かっていない。そこで、刺激したスパイン内で  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を伴わずに長期増強を誘起可能である光活性化型 CaMKII を用いて、長期増強に必要な CaMKII のシグナル経路の探索を行った。

スパインの可塑的形態変化にはアクチンの重合、脱重合が関与しており、これが受容体のシナプスへのリクルートにも重要であることが分かりつつある。そこで、アクチン制御分子に着目した。

まず、アクチン制御分子の中でも特に中心的な働きをする RhoGTPase (RhoA, Cdc42, Rac1) の FRET センサーを用いて、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を伴わない光活性化型 CaMKII によるスパイン刺激と、Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を誘起するケージドグルタミン酸刺激により、活性が上昇する RhoGTPase を比較し、時空間的な活性化パターンを明らかにした。具体的体には 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法により、海馬組織切片の神経細胞における樹状突起上のスパイン内で起こる FRET シグナルを可視化した。その結果、Cdc42 は、光活性化型 CaMKII とケージドグルタミン酸刺激によりほとんど同じ活性化パターンを示した。一方で、RhoA は、ケージドグルタミン酸刺激では活性化するにも関わらず、光活性化型 CaMKII による刺激には、ほとんど反応しなかった。さらに、Cdc42 の shRNA を用いて、Cdc42 の発現レベルを抑えた状態で同様の実験を行ったところスパインの体積増加が著しく減少した。

Rac1 に関しては、ケージドグルタミン酸刺激により活性化することが報告されているが、本実験では、ケージドグルタミン酸刺激と光活性化型 CaMKII の光刺激において活性化することを捉えることは出来なかった。これらの結果から、グルタミン酸を介した長期増強には、RhoA と Cdc42 が必要だが、CaMKII のシグナル経路の介した長期増強には、Cdc42 が重要な働きをしていることが明らかになった (図 3)。



グルタミン酸による長期増強の誘起 光活性化型 CaMKII による長期増強の誘起  
 図 3、光活性化型 CaMKII による長期増強を誘起時の RhoGTPase の活性化

本研究で明らかになった、長期増強の誘起に必要な CaMKII のシグナル経路は、アクチン制御分子の Cdc42 が重要な働きをしていることが明らかになった。そこで今後は、長期増強の誘起に必要な CaMKII シグナル経路の Cdc42 に関連したシグナル分子群を網羅的に同定していく。それには、光活性化型 CaMKII によりリン酸化を介して活性化するシグナル分子を、リン酸化プロテオミクスを用いて同定してゆく予定である。

さらに、光活性化型 CaMKII は、生きたマウスやラットの脳内に遺伝子導入し、光を用いて特定の領域で長期増強を誘起できるため、海馬や大脳皮質の各シナプスを強化することで、運動学習や記憶学習の強化・弱体化が誘起されるかを調べる予定である。

また、この光活性化型分子の作製方法は、他の分子にも応用可能なため、CaMKII が関係している免疫系や癌の浸潤転移に関わる細胞移動などの分野にも応用してゆく予定である。さらに、特定の細胞現象に必要なシグナル経路を解明し、その細胞現象をコントロールすることで、未だ治療法が確立されていないアルツハイマー病や認知症などの神経変性疾患に対する新たな新薬の開発に繋げていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                      |
|--|----------------------|
| 1. 著者名<br>Xi Chen, Akihiro C. E. Shibata, Ardalan Hendi, Mizuki Kurashina, Ethan Fortes, Nicholas L Weillinger, Brian MacVicar, Hideji Murakoshi and Kota Mizumoto | 4. 巻<br>7            |
| 2. 論文標題<br>Rap2 and TNIK control Plexin-dependent tiled synaptic innervation in <i>C. elegans</i>  | 5. 発行年<br>2018年      |
| 3. 雑誌名<br>eLife  | 6. 最初と最後の頁<br>e38801 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.7554/eLife.38801   | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する         |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Shibata Akihiro C. E., Ueda Hiromi H., Eto Kei, Onda Maki, Sato Aiko, Ohba Tatsuko, Nabekura Junichi, Murakoshi Hideji | 4. 巻<br>12         |
| 2. 論文標題<br>Photoactivatable CaMKII induces synaptic plasticity in single synapses  | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications  | 6. 最初と最後の頁<br>1-15 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41467-021-21025-6  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>柴田明裕                             |
| 2. 発表標題<br>蛍光寿命イメージングと光応答性プローブを用いたシナプス可塑性研究 |
| 3. 学会等名<br>第27回 神経行動薬理若手研究者の集い              |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|