

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(A)
研究期間：2008～2012
課題番号：20240032
研究課題名(和文) 樹状突起スパインの構造可塑性の分子機構
研究課題名(英文) Molecular Mechanisms of Structural Plasticity of Dendritic Spine
研究代表者
林 康紀 (HAYASHI YASUNORI)
独立行政法人理化学研究所・シナプス機能研究チーム・チームリーダー
研究者番号：90466037

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：シナプス可塑性、樹状突起スパイン、CaMKII、細胞骨格、海馬

1. 研究計画の概要

近年我々は海馬長期増強(LTP)ならびに長期抑圧(LTD)の誘導に伴い樹上突起 spine の形態が急速に変化する事を見だし、シナプスの構造がこれまで考えられてきたよりダイナミックな事を示した。しかし NMDA 受容体の活性化からこの「構造可塑性」に至る分子機構は明らかではない。本申請は、シナプス後部に多量に存在するシグナル分子である Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII) に注目し、CaMKII が F-actin を束化する事で細胞骨格の一員として機能する事を示し、そのシナプスの機能的、構造的可塑性との関係について理解する事を主目的とする

2. 研究の進捗状況

これまでに質量分析計を用いた CaMKII のリン酸化部位の同定が完了した。どのリン酸化部位がアクチンとの相互作用を制御するかを確認する為に、それぞれをアスパラギン酸に置換して CaMKII 変異体を作製・精製し、遠心法によりアクチンとの相互作用を観察した。その結果、アクチンとの相互作用に影響を及ぼすリン酸化部位を絞る込む事が出来た。それらの部位のアラニン変異体を作成したところ、リン酸化反応を起こしてもアクチンと遊離しない事から、この部位がアクチンとの相互作用を調節するのに必要かつ充分である事が判った。また、アラニン変異体、アスパラギン酸変異体を神経細胞に発現させ、シナプスへの分布を確認した所、アラニン変異体は野生型同様、シナプスへ結合していたが、アクチンに結合出来ないアスパラギン酸変異体はシナプスへ分布しなかった。

さらに、CaMKII によるアクチン束化の生

理的意義を探るため、CaMKII、アクチン、種々のアクチン結合ならびに制御タンパク質との相互作用を検討した。その結果、CaMKII がアクチンに結合した状態下では、コフィリン、Arp2/3、ゲルゾリンがアクチンと相互作用出来ず、重合・脱重合反応に対する影響が抑えられることがわかった。即ち、CaMKII がアクチンを安定化している事が示唆された。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究で立てた仮説がほぼ正しく、予想された結果が出ている為。

4. 今後の研究の推進方策

最終年度である本年度は、シナプスにおいて CaMKII のアクチンとの結合が如何なる作用が有るかを検討していく。

昨年度までに作成した、リン酸化部位をアラニンに置き換えた変異体を用いる。この変異体は、リン酸化されない為、アクチンから遊離する事がない。そのため、ドミナントネガティブ変異体と用いられると考えられる。

実験 1：構造可塑性と CaMKII による F-actin 束化調節の機能解析

仮説：シナプスの CaMKIIb は F-actin を束化しており構造可塑性には CaMKII の遊離が必要である。

上記で得られたアラニン変異体をドミナントネガティブ体として使い、spine の構造可塑性が阻害されるかを検討する。

実験 2：電氣的可塑性と CaMKII による F-actin 束化調節の機能解析

仮説：CaMKII の F-actin からの遊離が、synapse 機能的可塑性を引き起こすのに必要である。

さらに同じ変異体を用い、可塑性（主に LTP）が阻害されるかを電気生理学的に検討する。

実験 3：Chromophore-assisted light inactivation (CALI) を用いた、F-actin 束化調節の機能解析

仮説：CaMKII は構造可塑性に対し抑制的に働いている。

GFP ファミリー蛋白の一つである KillerRed を用い、光照射により CaMKII を活性させる事なく F-actin から遊離させる。その上で spine の形態がどう変化するかを検討する。

実験 1 と 3 に関してはすでに予備実験を行ない、大まかに仮説に沿った結果が得られている。最終的に本研究を出版する。

5. 代表的な研究成果

（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 2 件）

① Hayashi, M. K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M. H., Xu, R.-M., Li, H., Sala, C., Hayashi, Y. (2009) The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. *Cell* 137:159-171 査読有

http://glutamate.brain.riken.jp/dokuwiki/hayashi_cell.pdf

② Kishi, K., van Vugt, M. A., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y., Yaffe, M. B. (2009) Functional dynamics of polo-like kinase-1 at the centrosome. *Mol Cell Biol.* 29:3134-3150 査読有

http://glutamate.brain.riken.jp/dokuwiki/kishi_mol_cell_biol.pdf

〔学会発表〕（計 2 件）

① Hayashi, Y. : Sequential reorganization of synaptic components after LTP induction. Gordon Research Conferences Synaptic Transmission, 2010.07. 25-30, Biddeford, ME, USA.

② Hayashi, Y., Karam K., Hayashi M., Matsuura K., Narayanan R., Lakhapal G., & Okamoto K. : Regulation of structural function of CaMKII by multiple autophosphorylation sites. 7th FENS Forum of European Neuroscience, 2010. 7. 3-7, Amsterdam, Nederland.

〔図書〕（計 2 件）

① Malinow R., Hayashi, Y., Maletic-Savatic M., Zaman S.H., Ponce J.-C., Shi S.-H., Esteban J.A., Osten P., Seidenman K. : Introduction of green fluorescent protein (GFP) into hippocampal neurons through viral infection. In Cold Spring Harbor Protoc. 2010 Apr;2010(4):pdb.prot5406.

② Hayashi, Y., Okamoto, K., Bosch, M. & Futai K. : Neuronal activity-induced genes and synaptic plasticity, tagging and capture. In Synaptic plasticity in health and disease (ed. Kreutzer and Sala, Springer Verlag, in the press)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ウェブページ

<http://glutamate.brain.riken.jp>

Public relation

「世界脳週間 夏休み高校生理科教室」研究室見学 2010.8.20

税務大学校 理化学研究所見学会に伴う講演会 2011.1.17