

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月30日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（S）

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20670002

研究課題名（和文） 樹状突起形態・機能の神経活動依存的制御の分子機構

研究課題名（英文） Activity-dependent mechanisms regulating dendritic morphology and function

研究代表者 尾藤 晴彦 (BITO HARUHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00291964

研究成果の概要（和文）：

「経験」に基づく情報を、神経回路内に長期的に「書き込む」シグナル伝達機構については多くの謎が残っている。本研究課題を通じ、①神経突起の形態制御を司る新たなCaMKK-CaMKカスケード、②シナプス活動が新規遺伝子発現を引き起こすメカニズム、③神経活動によって誘導された遺伝子産物がシナプスを修飾する逆シナプスタギング機構、等を解明し、「経験」が神経情報として神経回路に貯蔵される仕組みを世界に先駆けて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Molecular mechanisms underlying experience-dependent information processing and storage have remained elusive. Here, in this research program, we have uncovered novel molecular insights on ①the role of CaMKK-CaMK cascade in neurite morphogenesis, ②the signaling cascade that triggers new gene expression upon receipt of synaptic activity, and ③a new inverse synaptic tagging mechanism that mediates specific forms of synaptic modulation upon activity-dependent gene expression. These findings shed new lights on the machinery that transforms and stores information about previous experience within the neural circuits.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
21年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
22年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
23年度	22,800,000	6,840,000	29,640,000
24年度	16,800,000	5,040,000	21,840,000
総計	80,600,000	24,180,000	104,780,000

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：カルシウム、リン酸化、突起伸展、シナプスから核へのシグナリング

1. 研究開始当初の背景

脳は個体の生存と種の繁栄のための最重要器官である。1000億個のニューロンから構成される神経回路網は、普遍的な遺伝子プログラムに基づく設計図に由来する「剛」の性質と、個体毎に内部・外部の環境変化に刻一刻と対応しその経験を情報として回路内に書き込める「柔」の特性を併せ持つ。さらに、脳の活動は、神経回路を構成するニューロン間の情報受け渡しにコードされているが、一つ一つのニューロンの応答性は、細胞内の電気的シグナルと化学的シグナルの複雑な絡み合いから成り立つ。1個のニューロンには数万個のシナプスがあり、各々独立した入力を受ける。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経情報を受容する樹状突起に特に着目する。そして樹状突起における分子シグナリングを、

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の形成・成熟の分子機構、

②シナプス活動により発生した局所シグナルが神経細胞体まで伝わり、転写・翻訳・細胞骨格動員などの機構の活性化により、細胞全体の応答性が変化する分子機構、

③細胞全体の応答性の変化が、最初のシグナルを発生したシナプスの性質を選択的に、かつ長期的に修飾する分子機構、

の3つの側面から徹底的に解明を試みる。

3. 研究の方法

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の活動依存的伸展・成熟の分子機構：BDNF 依存的樹状突起形成伸展の機構を、CLICK-III/CaMKI γ -KO マウス、CaMKK α/β -DKO マウスを用いて検証する。さらに CaMKK α/β -CaMKI γ 経路の上流のローカルシグナルと下流経路の全貌を解明する。

②synapse-to-soma signaling：CREB 依存的転写機構解明、Ca²⁺依存的転写メカニズム解析と種々のイメージングを駆使して、シナプスから神経細胞体・核への生化学的シグナル伝達を解明する。

③soma-to-synapse signaling：細胞体から樹状突起へと流れる種々の化学的シグナル(mRNA・蛋白などのターゲティング)が、ローカルなシナプス活動により、どのように選択的に”capture”されるか。その相互作用機構を Arc の場合について明らかにする。

④樹状突起内シグナル可視化・操作の方法論開発：In vitro でシグナル伝達可視化や、in vivo での分子操作・分子修飾を実現する新規

方法論を確立する。

4. 研究成果

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の活動依存的伸展・成熟の分子機構：キナーゼ領域が70%以上相同であるCLICK-III/CaMKI γ と CaMKI α とを各々幼弱大脳皮質ニューロンに強制発現・ノックダウンしたところ、それぞれ樹状突起伸展と軸索伸展の作用が選択的にあることが示された。加えて、発達期脳の大脳皮質細胞の形態形成においては、1) 膜アンカー型CLICK-III/CaMKI γ と細胞質びまん性CaMKI α とが、異なるCa²⁺上昇シグナル(前者はBDNF, 後者はGABA)に対して応答し、しかも2)基質特異性も異なることが明らかとなった(Ageta-Ishihara et al. J. Neurosci. 2009; Takemoto-Kimura et al. Eur. J. Neurosci. 2010)。現在 phosphoproteome 解析により、CLICK-III/CaMKI γ 基質の網羅的探索を実施中である。また、CaMKK-CaMKI γ 経路の遺伝子破壊マウスにおける行動異常について検索中である(Suzuki et al. 投稿準備中; Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

②synapse-to-soma signaling の解明：神経活動依存的前初期遺伝子である Arc 遺伝子のシナプス活動応答性エレメント SARE をゲノム上で単離同定した。SARE は Arc 遺伝子産物転写開始点のほぼ7kbに位置し、CREB, MEF2, SRF/TCF の結合部位が隣接する特異な構造を取る転写調節領域であった(Kawashima et al. PNAS 2009)。興味深いことに、SARE の付近を起点に両方向性に long non-coding RNA が活動依存的に生成され、転写調節にも寄与する可能性が示唆された(Kim et al. Nature 2010)。またシナプスから核へのシグナルの解明のため、シナプスなど細胞内マイクロドメインのCa²⁺シグナル(Bito, Nature Chem. Biol. 2010)や細胞体全体へ広がるCaMKシグナル(Redondo et al. J. Neurosci. 2010)などの同時計測などを実現するCa²⁺シグナル伝達の新たな可視化手法を開発中である。

③soma-to-synapse signaling の解明：発現誘導された Arc 蛋白は、神経可塑性の高まった回路の良い指標となる(Tse et al. Science 2011; Endo et al. PLOS One 2012)。そこで、誘導された Arc 分子が細胞体からシナプスへどのようにターゲティングされるかを世界で初めて可視化した。加えてCaMKII β が Arc の capture の調節因子であることを明らかにした(Okuno et al. Cell 2012)。その下流で、シナプス表面のグルタミン酸受容体数が調節されることが強く示唆された(Ishii et al. 投稿準備中)。

④樹状突起内シグナル可視化・操作の方法論開発:

子宮内遺伝子導入法と lentivirus を組み合わせた新規大脳皮質機能探索法を開発した。これにより、マウス胎生 15 日齢で脳室内に lentivirus 投与すると、移動後の大脳皮質 2/3 層細胞への選択的標識が可能となる。これを利用して、Arc 陽性細胞の選択的標識実験を実施した(Kawashima et al. PNAS 2009)。さらに、AAV ウィルスを用いた脳実質遺伝子導入法の条件検討を行い、高タイター AAV ウィルス調製法を樹立し、海馬等の脳部位への選択的遺伝子導入・発現実験のための予備検討を行った (Nonaka et al. 投稿中)。また、樹状突起スパインや細胞体における複数のシグナルを同時可視化可能な蛍光プローブの作成と dual FRET イメージングシステム dFOMA 法を開発した (Fujii et al. Cell Reports 2013)

5. 主な発表論文等

(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 22 件)

以下の論文はすべて査読有り。

1. Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, **Bito H**. Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII α and Calcineurin. *Cell Reports* 3, 978-987, 2013(doi: 10.1016/j.celrep.2013.03.033)
2. Endo T, Takeuchi T, Kakeyama M, Uemura Y, Haijima A, Okuno H, **Bito H**, Tohyama C. Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS ONE*, 7, e50741, 2012(doi: 10.1371/journal.pone.0050741)
3. Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, Takemoto-Kimura S, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, **Bito H**. An inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell* 149:886-898, 2012.
4. Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, **Bito H**, Morris RGM. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333: 891-895, 2011.
5. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, **Bito**

H. Ca²⁺ signaling coordinates the formation and the morphological maturation of neuronal circuits and synapses: an essential role for excitation-morphogenesis coupling via CaM kinases. *Eur. J. Neurosci.* 32: 224-230, 2010.

6. **Bito H**. The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Chem. Biol.* 6: 560-563, 2010.
7. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, **Bito H**, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 465: 182-187, 2010.
8. Redondo RL, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, **Bito H**, Morris RGM. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30: 4981-4989, 2010.
9. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, **Bito H**. Regulation of cortical axon growth by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29: 13720-13729, 2009.
10. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, **Bito H**. A synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 316-321, 2009.

[学会発表] (計 70 件)

1. **Bito H**. The role of Arc in inverse tagging of inactive synapses. 25th Winter Conference on Neural Plasticity. 2013.2.10. Curacao, Netherlands.
2. **Bito H**. New roles of CaMKII in information storage and processing. 46th Winter Conference on Brain Research. 2013.1.29. Breckenridge, Colorado, USA.
3. Nonaka M, Fukushima H, Sasaki K, Kawashima T, Okuno H, Kida S, **Bito H**. CREB, Arc and Long-Term Memory

- Formation. 22nd Neuropharmacology Conference 2012. 2012.10.10. Hilton Riverside, New Orleans, Louisiana, USA
4. **Bito H.** CREB regulation and long-term memory. Joint Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Science -Asian Molecular and Cellular Cognition Society. 2011.9.19. Seoul National University, Seoul, Korea
 5. **Bito H.** New roles for CaMK signaling in development and plasticity. Gordon Research Conferences "Excitatory Synapses & Brain Function". 2011.6.30. Stonehill College, Easton, Massachusetts, USA.
 6. **Bito H.** Dual FRET-based analysis of biochemical computation performed by neuronal Ca²⁺ signaling. The 23rd Winter Conference on Neural Plasticity. 2011.2.15. Moorea, French Polynesia.
 7. Fujii H, **Bito H.** Dual FRET-based analysis of biochemical computation performed by neuronal Ca²⁺ signaling processes. The 2nd International Symposium on Frontiers of Neurophotonics, 2010.9.22, Quebec, Canada
 8. **Bito H.** CaM kinase signaling in neuronal microdomains. The 13th International Membrane Research Forum/The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nano- Meso Membrane Mechanisms. 2010.1.27, Kyoto, Japan.
 9. **Bito H.** Synaptic activity-dependent regulation of plasticity-related gene Arc. 4th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2009.7.23, Toronto, Canada
 10. **Bito H.** Regulation of excitation-morphogenesis coupling by CaMKK/CaMKI cascades. 3rd International Conference on Neurons and Brain Diseases. 2008.8.5, Seoul, Korea.

[図書] (計 6 件)

1. **尾藤晴彦.** 活動依存的な遺伝子発現誘導・突起伸展機構. In ブレインサイレンス・レビュー 2013 (廣川信隆 編、クバプロ) pp.155-168.
2. Yagishita-Kyo N, Inoue M, Nonaka M, Okuno H, **Bito H.** "CREB" in "**Encyclopedia of Signaling Molecules**" (Springer), pp. 454-458, 2012.
3. **尾藤晴彦**, 有賀 純。神経細胞内ではたらくシグナル伝達 in シリーズ脳科学 5 分

子・細胞・シナプスからみる脳 甘利 俊一 監修, 古市 貞一 編. 東京大学出版会, 2008

4. **Bito H.** Takemoto-Kimura S, Okuno H. Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? in "**Molecular Pain**" (M. Zhuo ed. Springer), pp.207-217, 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 神経活動依存的プロモータ活性を有するDNA、及びこれを含むベクター

発明者: **尾藤 晴彦**、**奥野浩行**、**川島 尚之**

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-205892

出願年月日: 2012 年 09 月 19 日

国内外の別: 国内

名称: 画像処理装置及び プログラム

発明者: **尾藤 晴彦**、**川島 尚之**

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-170548

出願年月日: 2012 年 07 月 31 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: C a M K I I 阻害ペプチドおよびこれを含有する C a M K I I 阻害剤

発明者: **西川 喜代孝**、**高橋 美帆**、**西村 浩輝**、**高柳 広**、**尾藤 晴彦**

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特開 2012-158525

取得年月日: 2012 年 8 月 23 日

国内外の別: 国内

[その他]

受賞: 平成 22 年度 第 25 回塚原伸晃記念賞
新聞報道 朝日新聞 2009 年 1 月 15 日 夕刊「記憶のきっかけDNA配列発見」

新聞報道 朝日新聞 2012 年 10 月 22 日 朝刊「記憶選びのカギ判明」

ホームページ等

<http://www.neurochem.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 **尾藤 晴彦** (BITO HARUHIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00291964

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし