

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24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700359

研究課題名（和文） 光活性化蛋白質を用いたRhoファミリーG蛋白質によるシナプス構造可塑性制御の研究

研究課題名（英文） Regulation of synaptic structural plasticity: Involvement of Rho family GTPases by photoactivatable proteins.

研究代表者

実吉 岳郎 (SANEYOSHI TAKEO)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム研究チーム・研究員

研究者番号：00556201

研究成果の概要（和文）：本研究では Rac によるシナプス構造可塑性制御を検討し、1) Rac 阻害剤により構造可塑性が阻害された、2) 光活性化型 Rac による局所 Rac 活性化により構造可塑性が誘導された、ことから Rac シグナルがシナプス構造可塑性に必要十分条件であることを明らかにした。また、記憶学習の中心分子である CaMKII に関して、光活性化型 CaMKII の創製を試み、屈光因子 phototropin 由来の LOV ドメインとの融合により光によって活性制御可能な CaMKII 分子の創製に成功した。

研究成果の概要（英文）：Rac has been implicated in actin remodeling in cells. In this study we tested roles of Rac signaling in structural plasticity of synapse in hippocampal neuron. We found that inhibitors of Rac and its regulators inhibited synapse structural plasticity, and activation of Rac signaling by photoactivatable Rac in a dendritic spine caused spine expansion. These results indicate that Rac is necessary and sufficient for synapse structural plasticity. In addition, we succeeded to generate photoactivatable CaMKII.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：光活性化タンパク質、スパイン、シナプス、構造可塑性、アクチン細胞骨格、2光子顕微鏡、カルシウム、Rho GTPase

1. 研究開始当初の背景

Rho-family Small GTPaseはRac, Rho, Cdc42より構成されアクチン細胞骨格系を制御する重要なシグナル伝達経路として幅広く研究されている。Rho-familyの活性はGTPの加水分解サイクルで調節される：Guanine-exchange factors (GEF)は活性化を、GTPase-activating Proteins (GAP)は不活性化をそれぞれ担う上流の分子であり、蛋白質リン酸化などの翻訳後修飾、蛋白質間相互作用、細胞内局在変化などによって調節を受ける。RacやRhoAはそれぞれPAK, ROCKを活性化させ、LIMKを介してアクチン重合阻害分子、cofilinをリン酸化、不活性化するシグナル経路が存在する。CaMKファミリーの一つ、CaMKIIはRacGEFであるKarilin-7やTiam1をリン酸化し酵素活性を亢進させることでスパイン形成に関与する。また、別のCaMKであるCaMKK/CaMKI経路はRacGEF, betaPIXとシグナル複合体を形成し、その活性を制御する。ヒト精神疾患ではSmall GTPaseシグナル分子の変異が数多く報告されている。これらは正常なシナプス形成にはRho経路が必要であることを示している。一方、長期増強やグルタミン酸刺激によるスパイン肥大化、新規スパイン形成にもCaMKIIは必須である。しかし、CaMKIIとアクチン細胞骨格をつなぐ制御機構は不明な点が多く、CaMKIIが制御する細胞骨格シグナル経路の同定は、発生時における新規スパイン形成のみならずシナプス可塑性発現、すなわち記憶・学習の分子基盤の理解に必須である。

本研究計画では神経可塑性の分子メカニズムの解析に焦点を絞り、細胞骨格を制御するCaMKIIとRho-familyのクロストークの機能解析を行う。細胞骨格に関するシグナル伝達経路は神経分化に重要であることから、長期間の

活性型蛋白質やドミナントネガティブ型蛋白質の過剰発現は発生異常を引き起こすため、シナプス構造可塑性を調べるには短時間で局所的に分子の活性をコントロールできる実験系を用いた時間、空間解像度の高い解析を行う必要がある。2光子顕微鏡技術は脳組織のような透明度の低い厚みのある組織の内部の観察を可能にし、caged-glutamateの近赤外光によるuncaging（活性化）との組み合わせにより神経可塑性の最小単位である単一スパインでのシグナル伝達経路の解析ができるようになった。この技術は電気生理的手法、生化学的手法ではわからない時間、空間分解能の高い解析が可能な点が特徴である。本研究計画は、上記の課題を解決するために2光子顕微鏡イメージング技術と申請者のこれまで行ってきた生化学、分子細胞生物学的手法を組み合わせ以下に示す解析を試みる。

2. 研究の目的

カルモデュリンキナーゼ (CaMK) は多機能蛋白質リン酸化酵素で、シナプス可塑性に重要な役割を果たしていることが知られている。申請者は、シナプス形成におけるCaMKが制御するRho-GTPaseシグナル経路を同定してきた。本研究の目的は、シナプス可塑性の分子メカニズムを理解するため、長期増強発現時のスパイン構造可塑性に関わるCaMKIIが制御する細胞骨格分子や情報伝達経路を光活性化蛋白質を用いてRho-GTPase経路に焦点を絞り同定することである。

3. 研究の方法

本研究計画の目的はCaMKIIのスパイン構造可塑性をもたらす標的分子、シグナル経路は何かを単一スパインレベルで明らかにすることである。研究計画1：薬理阻害剤

を用いたシグナル経路の検証 長期増強時におけるCaMKIIによるアクチン制御の理解には、Rho-familyシグナル伝達経路との関係を明らかにする必要がある。そこでCaMK阻害剤KN93 (5 μ M)、Rac阻害剤EHT1864 (50 μ M)、ROCK 阻害剤Y27632 (10 μ M)、PAK阻害剤IPA-3 (30 μ M) によるスパイン構造可塑性に与える影響を検討する。

研究計画2 : Photoactivatable蛋白質を利用したシグナル伝達調節 NMDARを介したカルシウム流入により活性化するシグナル伝達経路がスパイン構造可塑性発現に十分条件であるか証明には、局所的なシグナル分子、シグナル経路の一過的な活性化によってスパイン構造可塑性が起きるかを検証する必要がある。最近、光によって活性化を誘導出来るPhoto-activatable (PA) な蛋白質の報告が相次いであった (Wu et al., 2009; Levskaya et al., 2009)。この技術は局所限定的に特定の蛋白質を活性化することができる可能性を持つ。そこで研究計画2ではCaMKII、Rhoシグナル分子について4つの異なる原理に基づくPhoto-activatable分子創製を試みる。さらにはそのPhoto-activatable分子によってスパイン肥大化を制御できるかを検討する。原理1) Phototropin光反応性LOV(light oxygen voltage)ドメインを利用した活性調節 (Wu et al., 2009)。LOV光反応性ドメインは光によって構造変化する。この性質を利用し、活性化Racと融合させることで活性化状態が抑制され、光刺激による構造変化でその抑制が解除されRacの活性化を調節出来るという報告があった (Wu et al., 2009)。このドメインを活性化型CaMKII (CaMKII 1-290)と融合させることで不活性化蛋白質にし、光刺激によって活性化状態になるかを検討する。原理2) GFP-CALI法を原理にした抑制蛋白質との融合蛋白質による活性の抑制解除

(Tanabe et al., 2005; Bulina et al., 2006)。GFP-CALI (Chromophore-assisted laser inactivation)法は、GFPを励起させる際に生じる活性酸素により、GFP融合蛋白質そのもの機能を細胞へのダメージを与えることなく失わせる方法である。この原理を応用して、同一蛋白質内の自己疎外領域を失活させ、活性化状態にする試みを行う。具体的には、CaMKIIの自己阻害領域281-310ほどをCaMKIIの触媒領域とリンカーを介して融合する。さらにGFPと融合させる。この融合CaMKII分子が自己阻害状態であり、かつGFP励起によって自己阻害状態が解除されるようなリンカーや条件を検討し、Photoactivatable-CaMKIIを作成する。原理3) シロイヌナズナPhytochromeシグナル系を利用した蛋白質相互作用調節 (Levskaya et al., 2009)。シロイヌナズナのPhytochrome B (PhyB)が下流の転写因子Phytochrome interaction factor (PIF)とPhycocyanoblin (PCB)存在化で赤外線依存的に結合することを利用して、この原理とPAK1が細胞膜に局在するだけで活性化すること (Daniels et al., 1998)を利用し、PhyB-tagged-CAAXとPIF-tagged PAK1によるPAKの活性化を試みる。研究計画3 : スパイン肥大化時におけるRho-familyやその下流シグナル活性の可視化 申請者は神経細胞では脱分極刺激によるRacの活性化がCaMK依存的であることをFRETを原理にしたプローブ (Raichu-Rac) を用いてライブイメージングで解析している (Saneyoshi et al., 2008)。本計画では単一スパインレベルでのグルタミン酸刺激によるRho-family (Rac1, RhoA, Cdc42)やその下流シグナルの活性化状態および分子動態をモニターし、CaMK依存性であるか、また、スパイン構造可塑性に対して分子の活性化はどのような時間、空間制御を受けているかを解析する。

3. 研究成果

計画1について

- 1) Rac シグナルの活性化がシナプス構造可塑性に必要であることが分かった。
- 2) Rac の下流分子である Pak 活性の阻害により Rac 阻害剤と同様の効果が認められたため、Rac-Pak 経路がシナプス構造可塑性に必要であることが分かった。
- 3) また、Rho-ROCK 経路を ROCK 阻害剤で処理してもシナプス構造可塑性は抑制された。したがって、以上の結果より、シナプス構造可塑性には CaMKII, Rac-Pak1, RhoA-Rock 経路が少なくとも必要であることが分かった。

計画2について

- 1) CaMKII 分子を光活性化型に変換する試みとして計画2の原理1から試みた。LOV2 ドメインを CaMKII 分子に融合させるだけでは光による活性変換は認められなかった。そこで CaMKII および LOV2 ドメインの双方についてアミノ酸置換およびアミノ酸欠損変異体を作成し、光活性化型になるかを検討しなおした。すると特定の変異で照射により酵素活性が上がるものが認められた。原理1で光活性化型 CaMKII の作成に成功したため、ほかの原理については検討していない。
- 2) 光活性化型 Rac によりシナプス構造可塑性が誘導できることを見出した。すなわち Rac の活性化がシナプス構造可塑性の十分条件であることが分かった。またこの効果は Rac 阻害剤および Pak 阻害剤により消失することから光刺激の特異性および Rac の活性化は下流の Pak の活性化をもたらすことで、スパインの構造可塑性を引き起こすことが分かった。

計画3について

- 1) CaMKII 分子の活性化の可視化を試み黄色蛍光タンパク質 Venus と赤色蛍光タンパク質 mCherry を利用した CaMKII バイオセンサー Camui を作成し、単一スパインでのケージドグルタミン酸ケージ解除による CaMKII の活性化を蛍光寿命測定顕微鏡法により検討した。以前の報告と同様な CaMKII の活性化を可視化することに成功した。
- 2) Rho GTPase についての可視化を試みている最中にほかの研究グループから単一スパインでの Rho GTPases の活性化可視化の報告があったため、さらに下流分子のアクチン重合の可視化を試みることにした。従来の Ratiometric FRET で使用した蛍光タンパク質の組み合わせでは可視化できなかった。別のアプローチとして F アクチン結合タンパク質と

アクチン間相互作用を見る方式に変更したところ、単一スパインでのケージドグルタミン酸ケージ解除および Rac の活性化によるアクチン重合の変化を蛍光寿命測定顕微鏡法により可視化することができた。

以上、本研究によりシナプス構造可塑性に Rac が必要十分であることを示すことできた(投稿準備中)。また、光活性化技術をシグナル分子へ応用することに成功し、かつ樹状突起スパインでのシグナル伝達経路を光により操作する方法論を確立できたため、今後、同様の手法により研究が発展することが期待できる。

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1件)

① Takeo Saneyoshi and Yasunori Hayashi. (2012) The Ca²⁺ and Rho GTPases pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. Cytoskeleton, in press. 査読あり

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

実吉 岳郎 (SANEYOSHI TAKEO)
独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム
研究チーム・研究員
研究者番号：00556201