

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23680040

研究課題名(和文) 神経回路形成を制御する新規カルシウム依存的リン酸化シグナリング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the novel functions of Ca²⁺-dependent phosphorylation pathway during neuronal circuit formation

研究代表者

竹本 さやか(木村さやか)(Sayaka, Takemoto-Kimura)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：70372365

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 20,900,000円

研究成果の概要(和文): 発生・発達期に生じる神経細胞内Ca²⁺流入が神経回路形成において重要な役割を果たすと考えられるが、Ca²⁺上昇によって活性化される分子イベントが、いかにして神経回路形成を制御するのは未だ不明である。申請者は、培養神経細胞において、軸索・樹状突起発達を、Ca²⁺依存性蛋白質リン酸化酵素、CaMKI ならびにI が担うことを発見した。本研究では、この独自知見を発展させ、in vivoにおけるCa²⁺-CaMKI依存的新規回路形成メカニズムの解明を推進した。独自に作出した遺伝子改変マウスを用い、神経回路形成におけるCaMKIアイソフォームの機能を新たに見出し、その細胞基盤の一端解明に成功した。

研究成果の概要(英文): During neuronal circuit formation, spontaneous calcium transients are believed to modify neuronal circuit formation, even before the synaptic maturation. However, how and which Ca²⁺-dependent downstream molecular events regulate each step of circuit formation are poorly understood. We previously found that distinct limbs of the CaMKK-CaMKI cascade were specifically implicated in determining the extent of either dendritic or axonal growth downstream of different extracellular signals in cultured cortical neurons. In order to extend these results, we have established conditional knockout lines to proceed in vivo study focusing on neuronal circuit formation. We found temporal and cell-type specific knock out of a CaMKI isoform in the developing cerebral cortex indeed impaired circuit formation in vivo and elucidated morphological abnormality of the neurons lacking the CaMKI isoform.

研究分野：神経生化学

キーワード：カルシウム 神経回路形成 CaMK

1. 研究開始当初の背景

様々な状況で生じる神経 Ca^{2+} 上昇は神経回路形成において重要な役割を果たすと考えられている。発生、発達期の神経回路形成異常が、精神神経疾患の素地となることが知られ、神経 Ca^{2+} 上昇によって活性化される分子イベントが、いかにして神経回路形成を制御するのかを明らかにすることは、喫緊の課題である。

研究代表者らの研究グループは、細胞内 Ca^{2+} 上昇によって速やかに活性化される、カルシウム依存的リン酸化酵素(CaMK)のうち、これまで機能が不明であった CaMKI が、神経突起形成を制御することを世界に先駆けて見出した。特に、分子生物学的な手法により、CLICK-III/CaMKIgamma の分子同定を行い、培養神経細胞を用いて、CaMKIgamma の脂質修飾に依存した神経成長因子 BDNF

CaMKIgamma 樹状突起伸展経路 (Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007) を明らかとした。更に、同じファミリーに属する CaMKIalpha が、発生途上における興奮性 GABA の下流で軸索伸展を促進することを見出した (Ageta-Ishihara, Takemoto-Kimura et al. J Neurosci. 2009)。

その一方で、in vivo 回路形成において、実際に本経路が機能するのかについての知見は、研究代表者らが RNAi 法を用いることで見出した CaMKIalpha による大脳皮質脳梁投射交連軸索の伸展作用 (Ageta-Ishihara, Takemoto-Kimura et al. J Neurosci. 2009) に限定されており、ほとんど未解明であった。

2. 研究の目的

このような背景から、本研究では、培養細胞にて明らかとしてきた、 Ca^{2+} -CaMKI 経路を介した神経細胞形態制御の知見を更に発展させ、より普遍的な機能に迫るために、in vivo 回路形成における本酵素群の機能解明を行うことを目的とする。特に、これまでの知見より、発生・発達期の様々な過程で、回路形成を制御する可能性が示唆されているため、時期選択的な機能探索を行うために、コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討を推進する。

本研究により、神経活動依存的(自発的、入力依存的)あるいは、隣接細胞間 communication (神経成長因子や ATP などによって惹起される細胞内 Ca^{2+} 上昇が、どのように細胞の性質を変化させ、応変かつ柔軟な回路装飾を行うのか、in vivo における新たな神経回路形成機構の一端を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでの研究成果から、 Ca^{2+} -CaMKI 経路は、細胞移動、初期の軸索・樹状突起形成や伸展、スパイン発達など様々な局面で多様

な機能を担うことが期待される。そこで、(1)コンディショナルノックアウトマウスを用いた、時期ならびに細胞種選択的な機能解明と、その分子機構の探索を行った。更に、(2) in vivo 機能を理解するために必要な、各 CaMKI アイソフォームの酵素特性の検討を行った。

4. 研究成果

(1)コンディショナルノックアウトマウスを用いた時期ならびに細胞種選択的な機能解明

各酵素ノックアウトマウスならびに、コンディショナルノックアウトマウスの作出：培養細胞において、神経細胞形態制御に関わることが分かっている、CaMKIアイソフォームについて、キナーゼドメインを含むエクソンを欠失する遺伝子欠失マウス(ノックアウトマウス)の作出を推進した。本null変異体は、解剖学的な顕著な異常はなく、通常通り継代可能であることを確認した。また、作出したnull変異体において、標的とする遺伝子断片が確かに欠失していることを、qPCR法により確認した。

更に、cre リコンビナーゼ依存的に組換えをおこし当該エクソンを欠失させるための、遺伝子改変マウス (*Camk1^{flox/flox}* ならびに *Camk1g^{flox/flox}*) の作出を行い、in vivo において、AAV ウイルス並びにプラスミドにより cre リコンビナーゼを発現させることで、cre リコンビナーゼ依存的に組換えが生じ、タンパク質が消失することを確認した。

各遺伝子改変マウスにおける脳組織構築異常の探索：

各遺伝子ノックアウトマウスについて、免疫組織学的に、組織構築の異常を探索したところ、顕著な異常は見出されなかった。培養系では異常を認めるため、この原因としては、in vivo におけるコンペーンションや競合メカニズムが寄与していることが推測された。そこで、上記コンディショナルノックアウトシステムを用いて、開発を進めた AAV ベクターやプラスミドの in utero electroporation 法により (Okuno et al. Cell 2012; Kawashima et al. Nat Methods 2013; Nonaka et al. Neuron 2014; Inoue et al. Nat Methods 2015) cre リコンビナーゼを導入し、時期ならびに細胞種選択的なノックアウトを行う実験系を確立した。特に、胎生期大脳皮質において in utero electroporation により、cre リコンビナーゼを導入することで、時期・細胞種選択的なノックアウト細胞を作成したところ、in vivo 大脳皮質神経回路形成における異常を見出すことに成功した(投稿準備中)。

コンディショナルノックアウトにおけ

る回路形成異常の細胞機構探索：

で見出された回路形成異常の基盤となる細胞機構を、スライス培養下において、ライブイメージングにより、詳細に検討するための実験系を確立した。また、この時期に、CaMKI を活性化するために必要な細胞内Ca²⁺上昇が認められるのかどうか、蛋白性Ca²⁺インディケーターであるGCaMPを用いて検討を行った。

その結果、表現型が認められる回路形成過程において、確かにCa²⁺上昇が認められ、CaMKI が活性化される可能性を見出した。また、イメージング方法の改良を進め、スライス下において細胞形態、細胞骨格動態を可視化することで、コンディショナルノックアウトマウスにおける回路形成異常の基盤となる細胞機構について、新たな知見を得ることに成功した。

次いで、コンディショナルノックアウトマウスと同様な表現型が、酵素のドミナントネガティブ体、ドミナントアクティブ体の誘導により認められることを見出し、Ca²⁺変動に伴う、本酵素の適切な活性が、正常な大脳皮質回路形成において必須であることが示唆された。

in vivo における微細細胞形態の可視化方法の確立：

神経細胞の棘突起といった微細構造は、細胞が密に配置する in vivo において、観察が困難である。そこで、蛍光タンパク質(EGFP)を、組織脳内で一部の細胞のみで発現させる方法を開発し、これにより、個々の神経細胞の形態を、棘突起といった微細構造を含め観察可能となった。本手法を用いて、CaMKI アイソフォームノックアウトマウスの細胞形態の検討を進め、特定のCaMKI アイソフォームによって、扁桃体神経細胞棘突起の形態が変化する可能性を見出した。

(2) in vivo 機能を理解するために必要な各CaMKI アイソフォームの酵素学的特性の検討

これまでの研究成果ならびに、本研究により、CaMKI 経路が神経細胞の神経回路形成・再編成の様々な局面で機能する重要なCa²⁺エフェクターとして主要な役割を担う可能性が浮上した。一方で、CaMKI の各アイソフォーム(alpha, beta, gamma, delta)が、いかにして、異なる機能を有するのかはほとんど分かっていない。これに対し、酵素そのものの特性の違いを解明するため、リコンビナントのCaMKI アイソフォームを精製し、in vitro でのリン酸化反応を検討した。その結果、両酵素が異なるCa²⁺応答性を有しており、また、ペプチド基質に対する特異性は類似するものの、一部の基質について選択性を示すことが分かった(投稿準備中)。これらの、Ca²⁺に対する感受性、下流基質の特異性が、これまで分かっていた両酵素の細胞

内局在の違いに加えて、選択的な機能発揮において重要ではないかと考え、現在検討を進めている。

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8件)

Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K, Bito H. Rational design of a high-affinity, fast, red calcium indicator R-CaMP2. *Nat Methods*. 12(1): 64-70, 2015
DOI: 10.1038/nmeth.3185

Nonaka M, Kim R, Fukushima H, Sasaki K, Suzuki K, Okamura M, Ishii Y, Kawashima T, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Okuno H, Kida S, Bito H.: Region-Specific Activation of CRT1-CREB Signaling Mediates Long-Term Fear Memory. *Neuron*. 84(1): 92-106, 2014
DOI: 10.1016/j.neuron.2014.08.049.

Nonaka M, Kim R, Sharry S, Matsushima A, Takemoto-Kimura S, Bito H. Towards a better understanding of cognitive behaviors regulated by gene expression downstream of activity-dependent transcription factors. *Neurobiol Learn Mem*. 115: 21-29, 2014
DOI: 10.1016/j.nlm.2014.08.010.

竹本-木村さやか カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ. 脳科学辞典
DOI: 10.14931/bsd.4566, 2014

Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Okuno H, Ohki K, Bito H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. *Nat Methods*. 10(9): 889-895, 2013
DOI: 10.1038/nmeth.2559.

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 and calcineurin. *Cell Rep*. 3(4): 978-987, 2013

DOI: 10.1016/j.celrep.2013.03.033.

竹本 - 木村さやか CaMKK-CaMKI 経路による神経突起伸展の制御と大脳皮質構築。神経化学 51(3), 65~70, 2012

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. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII. Cell. 149: 886-898, 2012

DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.062.

[学会発表](計5件)

Takemoto-Kimura S, Horigane S, Suzuki S, Bito H. Control of neuriteogenesis and cortical circuit formation via CaMKK-CaMKI cascades. 第86回日本生化学会大会シンポジウム発表, 2013

Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. 国際生理学会シンポジウム(中国蘇州), 2012

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel functions of Ca²⁺-dependent phosphorylation cascades in neuriteogenesis and emotional behavior. 第35回日本神経科学大会シンポジウム発表, 2012

Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel roles of CaMKK-CaMKI cascades in neuriteogenesis and circuit formation. 第34回日本分子生物学会年会シンポジウム発表, 2011

Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Fujii H, Okuno H, Bito H. Activity-dependent regulation of dendritogenesis via CLICK-III/CaMKI in developing cortical neurons. 41st Annual Meeting of the Society for Neuroscience, poster 発表, 2011

[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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

平成24年度第13回日本神経化学会奨励賞受賞「CaMKK-CaMKI 経路による神経突起伸展の制御と大脳皮質構築」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹本(木村)さやか(TAKEMOTO-KIMURA, Sayaka)

東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 70372365