

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650067

研究課題名(和文)シグナル伝達経路選択的活性化法の開発

研究課題名(英文)Development of a method to activate specific signaling pathway.

## 研究代表者

村越 秀治(MURAKOSHI, Hideji)

生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授

研究者番号：90608142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シナプス内でシグナル伝達経路を選択的に活性化することができる光遺伝学的ツールを開発することを目的とした。これによって、長期増強誘起に必要な分子種、シグナル伝達経路を調べることが可能になる。現在までに、光応答性のCaMKII分子の作製に成功しつつある。この過程で、LOV2をCaMKIIに挿入することで分子全体のフォールディング効率の低下や、凝集が起こりやすくなることが分かってきた。そこで、ランダム変異導入によるフォールディング効率の改善法を開発した。この方法を光応答性のCaMKII分子に適用することで、細胞内局在と活性のダイナミックレンジを大きく改善できた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to develop optogenetic tools to selectively activate a specific pathway of biochemical signaling in synapses. These tools enable us to identify the essential pathways and signaling molecules required for the induction of long-term potentiation. By far, we have developed a prototype photo-activatable CaMKII (paCaMKII), and found that the insertion of LOV2 domain into CaMKII decreases the folding efficiency and induces aggregation of paCaMKII. Therefore, we developed a method to improve the folding efficiency and expression pattern of signaling molecule. An application of this method to paCaMKII also improved the expression pattern and dynamic range of activity in HeLa cells.

研究分野：生物物理

キーワード：シナプス 光操作

### 1. 研究開始当初の背景

海馬神経細胞において、後シナプスを形成するスパインの形態はアクチン繊維によって制御されており、シナプス結合の増強や収縮とも相関関係があることがこの5年程度の間に分かりつつあった。そこで申請者らは、アクチン制御タンパク質である RhoA, Cdc42 に着目し、これらの分子の海馬神経細胞中での時空間活性化パターンを FRET イメージングにより調べることで、RhoA と Cdc42 が CaMKII の一過的な活性化を記憶していることを明らかにしたのである。しかしながら、このようなイメージングによる研究だけでは、分子活性の時空間パターンを知ることができても、各分子がどのように機能しているのかを知ることは容易ではなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、分子機能を直接的に調べるために、シナプス内でシグナル伝達経路を選択的に活性化することができる光遺伝学的ツールを開発し、個々の分子の機能のみならず長期増強誘起に必要な分子数や分子種、シグナル伝達経路を調べるためのツールの開発を目的としている。現在までに、光応答性の CaMKII 分子の作製に成功しつつあるが、この過程で、LOV2 を CaMKII に挿入することで分子全体のフォールディング効率の低下や、凝集が起こりやすくなることが分かってきた。そこで、本研究では CaMKII の FRET プローブをモデルとして、ランダム変異導入によるフォールディング効率の改善法を開発することにした。この方法は、各種光応答性分子のフォールディング効率を改善するための一般的な方法となる。

### 3. 研究の方法

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、カルモジュリンが結合することにより活性化する。この分子の活性化を可視化するために、FRET プローブがよく用いられるが、細胞に発現させると一部の細胞でプローブが凝集してしまうという問題がある。そこで、CaMKII の結合領域にランダム変異導入法によって、変異を導入し、下流の蛍光タンパク質のフォールディング効率を上昇させることによって、CaMKII FRET センサーを高感度化することを目的とした。このために、CaMKII の結合領域をエラー誘発 PCR によって増幅し、大腸菌ベクターに導入し大腸菌をトランスフォーメーションすることでライブラリーを作製し、変異を同定する。

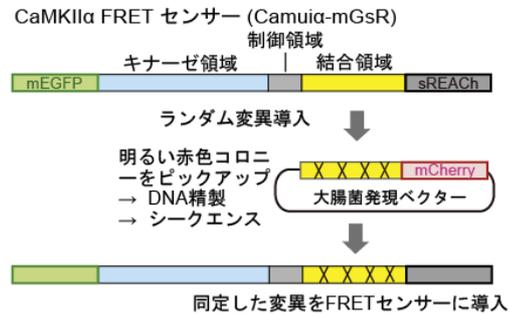


図1. CaMKII FRET センサーの分子進化.

### 4. 研究成果

ライブラリーから明るい赤色コロニーをピックアップしシークエンスすることによって、CaMKII の結合領域に4つの変異を同定した。同定した4つの変異を CaMKII FRET センサーに導入し、感度が上昇しているかどうかをテストした。個々の細胞での CaMKII 活性化を観察し、そのタイムコースを調べたところ、オリジナルの FRET センサーと比べて、変異体は、平均として感度は上昇していなかったが、個々の細胞反応については、反応のバラツキが極めて小さくなっていった。すなわち、細胞の反応を極めて高精度に測定することが可能になったと考えられる。バラツキが小さくなった原因はおそらく、CaMKII の結合ドメインに変異を導入したことによる下流の蛍光タンパク質 (sREAcH) のフォールディング効率の上昇によるものであると考えられるが、詳細は今のところ不明である。

FRET センサーの変異体を神経細胞に導入しケイジドグルタミン酸による単一スパイン刺激を行ったところ、刺激したスパイン内で CaMKII の活性化が観察され、スパイン体積の増大も観察された (図3)。このことは本研究で作製した FRET センサーが神経細胞の微小コンパートメント内にも適用可能であることを示している。さらに、細胞毎の反応を高精度に捉えることができるので In vivo における多細胞の同時観察にも使用し易い。ここで用いた方法は CaMKII の FRET センサーだけでなく、様々な FRET センサーにも適用可能であり、応用範囲は極めて広い。

一方で、我々は光応答性の CaMKII 分子の作製に成功しつつある。この過程で、LOV2 を CaMKII に挿入することで分子全体のフォールディング効率の低下や、凝集が起こりやすくなることが分かってきた。そこで、本研究で得られた変異を光応答性の CaMKII 分子に適用することで、活性のダイナミックレンジや細胞内局在を大きく改善できた。

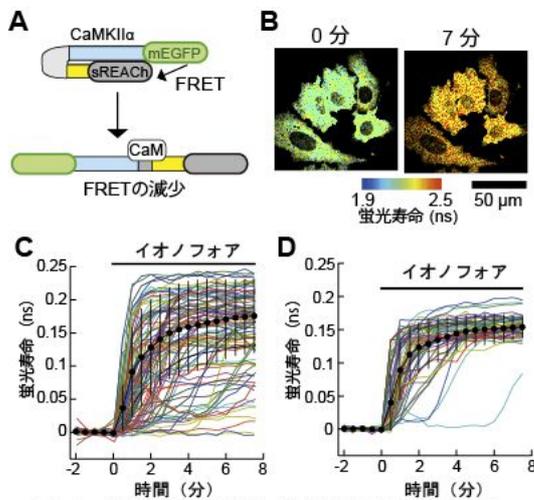


図 2. 新規高精度 CaMKII FRET センサー.

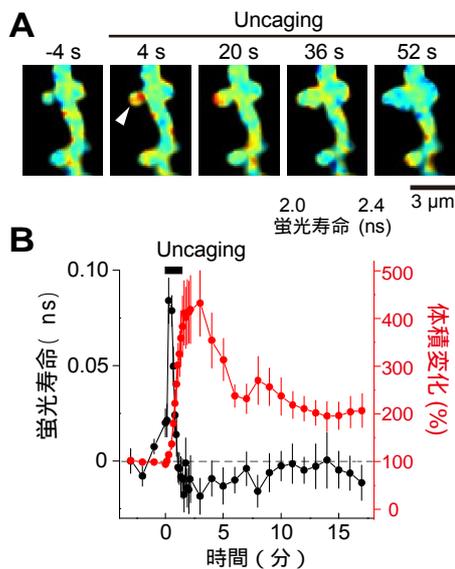


図 3. 単一スパイン内 CaMKII 活性化.

## 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 5 件)

1. Fujiwara TK, Iwasawa K, Kalay Z, Tsunoyama TA, Watanabe Y, Umemura YM, Murakoshi H, Suzuki KG, Nemoto YL, Morone N, and Kusumi A. Confined diffusion of transmembrane proteins and lipids induced by the same actin meshwork lining the plasma membrane. *Mol Biol Cell* 27, 1101-1119 (2016). DOI: 10.1091/mbc.E15-04-0186. (査読有)

2. Shibata AC, Maebashi KH, Nakahata Y, Nabekura J, and Murakoshi H. Development of a molecularly evolved, highly sensitive CaMKII FRET sensor with improved expression pattern. *PLoS ONE* 10, e0121109 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0121109. (査読有)

3. Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Scientific Reports* 5, 15334 (2015). DOI: 10.1038/srep15334. (査読有)

4. Murakoshi H, Shibata AC. Optogenetic imaging of protein activity in the synapse by using 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy. *Optogenetics -Light-Sensing Proteins and Their Applications-*. Springer-Verlag, Germany. 185-197 (2015). [http://link.springer.com/chapter/10.1001%2F978-4-431-55516-2\\_12](http://link.springer.com/chapter/10.1001%2F978-4-431-55516-2_12) (査読有)

## 5. 村越秀治

「二光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるシグナル分子活性計測」  
顕微鏡 50 巻 2 号 2015 年 9 月 106-110  
[http://www.microscopy.or.jp/magazine/50\\_2/50\\_2j07hm.html](http://www.microscopy.or.jp/magazine/50_2/50_2j07hm.html) (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

1. 村越秀治

Optogenetic manipulation and imaging of CaMKII-Rho GTPase signaling pathway during synaptic plasticity  
第58回日本神経化学学会大会  
大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)  
2015年9月13日

2. 村越秀治

細胞内生化学反応イメージングと光操作で探るシナプス可塑性機構  
第88回日本薬理学会  
名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)  
2015年3月20日

3. 村越秀治

LOV2による神経細胞内シグナル分子活性の光操作  
大阪大学タンパク研セミナー(光運動反応・光センサー蛋白質・光遺伝学)  
大阪大学(大阪府吹田市)  
2015年3月10日

4. 村越秀治

シナプス内生化学反応の光操作  
細胞のメゾスケール構造機能シンポジウム  
京都大学(京都府京都市)  
2014年12月13日

5. 村越秀治

2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡によるシグナル分子活性の定量計測  
第3回ニューロフォトンクス研究会  
北海道大学(北海道札幌市)  
2014年11月7日

6. 村越秀治

神経細胞シナプス内生化学反応の可視化と光操作  
第87回日本生化学学会大会  
京都国際会議場(京都府京都市)  
2014年10月16日

7. 村越秀治

CaMKIIによって活性化されたRho GTPaseの協同的作用によるシナプス可塑性誘起  
第52回日本生物物理学会  
札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)  
2014年9月25日

8. 村越秀治

2光子励起技術による単一スパイン内生化学反応の可視化と操作  
Neuro2014(第37回日本神経科学学会)  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)  
2014年9月12日(招待講演)

〔図書〕(計1件)

1. 村越秀治

「シナプス内シグナル分子動態イメージング」ブレインサイエンスレビュー ブレインサイエンス振興財団 クバプロ 2015年2月191-210  
<http://www.kuba.co.jp/syoseki/detail.php?no=3297>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村越 秀治 (MURAKOSHI, Hideji)  
生理学研究所・脳機能計測・支援センター・准教授  
研究者番号: 90608142