

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5 月 27 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650197

研究課題名（和文） スパインひとつの可塑性を光で制御する

研究課題名（英文） Optically regulating the synaptic plasticity at the level of single synaptic spine.

## 研究代表者

中村 秀樹 (NAKAMURA HIDEKI)

早稲田大学・理工学術院・助教

研究者番号：50435666

## 研究成果の概要（和文）：

ラパマイシンをリンカーとして用いて任意のペプチドを細胞内局所に移行させる技術を神経細胞、特に後シナプスに応用するため、後シナプス局在足場タンパク質 PSD-95 を様々なデザインで改変したコンストラクトのライブラリを作成した。また、Rho GTPase 機能性ペプチドライブラリも作成し、シナプス特異的に Rho GTPase の活性化を誘導する実験系の構築にむけた準備が整った。さらに、ラパマイシンによるタンパク質ダイナミクスの変化を検出するために、神経細胞に応用可能なタンパク質拡散ダイナミクスの定量化技術（FRAP および FCS）を確立した。

## 研究成果の概要（英文）：

As a preliminary step toward the establishment of technical methods to manipulate the synaptic transmission by rapamycin-induced protein dimerization paradigm, two plasmid libraries were constructed: PSD-95-based construct library and Rho GTPase family-based library. These libraries will contribute to the development of rapamycin-based methods to study synaptic plasticity in neuronal cells. To evaluate the rapamycin-induced protein dimerization within neurons, methods to monitor the diffusion kinetics of soluble proteins in the cell type were also established.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

神経可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

神経ネットワーク研究において、個々の神経細胞の電氣的活動を光刺激で制御す

る 'optogenetics' の応用がひろまりつつあった。この状況をさらに一步すすめて、神経細胞同士のシナプス結合強度を外部から

制御することができれば、現状では解析することの難しい神経ネットワークの活動と個々のシナプス結合との関係を直接明らかにすることができる。そのための手法として、我々はラパマイシンを用いたタンパク質局在の制御技術を改良して、光刺激でタンパク質の局在を制御する実験系を確立することを目標とした。

一般に免疫抑制剤として知られるラパマイシン及びそのアナログをペプチド間のリンカーとして利用し、タンパク質の局在を制御する技術は近年多くの実験で用いられている。とくに小分子Gタンパクやイノシトールリン脂質のリン酸化・脱リン酸化はこの技術によるペプチドの細胞膜移行によってスイッチのように制御できることが報告されており、これらのシグナル系は神経細胞のシナプス結合においても大きな役割を担っていることが示唆されている。我々はラパマイシンに光活性基をつけたケージド化合物を開発し、光刺激による多光子励起を用いてスパインのようにきわめて小さな領域でタンパク質の局在を制御する技術に応用することを考えた。

## 2. 研究の目的

ラパマイシンによるタンパク質局在制御技術を神経細胞に応用し、後シナプスのスパイン特異的に Rho GTPase の活性やイノシトールリン脂質の組成、チャネル分子の局在などを制御する手法を確立する。さらに、光刺激によって活性を制御できるラパマイシンのケージド化合物を開発することで、光によってシナプス可塑性を制御する技術を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 後シナプス特異的な足場タンパク質である PSD-95 を様々なデザインで改変したペプ

チドのライブラリを構築した。具体的には、PSD-95 の N 末端側または C 末端側に FRB もしくは FKBP の 2 種類のペプチドを融合させたコンストラクトを作成した。FRB および FKBP は単独で融合させたものと 2 つ、3 つをタンデムに繋げて融合させたものをそれぞれ作成した。また、PSD-95 改変ペプチドの神経細胞内における局在を観測するために、さらに N 末端側もしくは C 末端側に蛍光タンパク質を融合させたコンストラクトも作成した。

(2) 後シナプスに移行させる側のペプチドとして、Rho GTPase ファミリーのタンパク質である RhoA, Rac1, Cdc42 の活性化型変異体ペプチドを FRB または FKBP、および蛍光タンパク質と融合させたコンストラクトのライブラリを作成した。こちらのコンストラクトでも、FRB と FKBP は単独、2 つ、3 つのタンデムと各種作成した。

(3) ラパマイシンを用いて FRB と FKBP の間の結合を誘導する実験系の評価系として、細胞内タンパク質の拡散および相互作用ダイナミクスを測定する実験系の構築に取り組んだ。そのための技術的基盤として、蛍光退色法 (Fluorescence Recovery after Photobleaching, FRAP) および蛍光相関法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) PSD-95 改変ペプチドライブラリの構築

後シナプスのマーカータンパク質として知られる足場タンパク質 PSD-95 に、ともにラパマイシン結合ペプチドである FRB または FKBP を融合させた。これらの改変ペプチドは後シナプスに任意のペプチドを移行させるための、いわば人工の足場タンパク質として応用できる可能性があり、目的の後シナプス移行ペプチドに応じて異なる構造を持

つ必要が生じることもあり得ることから、本研究ではN末端側、C末端側や融合するFRBやFKBPの数など、幅広いデザインの改変PSD-95ペプチドを作成し、ライブラリを構築した。これらの中から標的のペプチドと最適の組み合わせのものをスクリーニングすることにより、ラパマイシンによるペプチドの細胞内局所への移行制御系を神経細胞後シナプスに応用するための重要なツールとなり得ると考えている。

現在のところライブラリに含まれるPSD-95改変ペプチドのラットおよびマウス海馬培養神経細胞内での局在を確認したが、作成したライブラリのペプチドはどれも後シナプスに集積しており、局在に関しては問題なく使用できると考えている。

## (2) Rho GTPase 関連機能性ペプチドライブラリの構築

Rho GTPase ファミリー(RhaA, Rac1, Cdc42)の活性化型変異ペプチド、および対応するGuanine Exchange Factor (GEF), (Tiam1, Cdc25)を(1)と同様にFRBおよびFKBP、蛍光タンパク質と様々なデザインで融合させた改変ペプチドプラスミドライブラリを作成した。これらと(1)のPSD-95改変ペプチドライブラリとの組み合わせを培養神経系に発現させ、ラパマイシンを添加することでRho GTPase 関連機能性ペプチドの後シナプス移行が起きる組み合わせをスクリーニングし、それらの組み合わせによって後シナプス特異的なRho GTPaseの活性化を行う。

現段階では、株化細胞を用いてRho GTPase 関連ペプチドが細胞質に一様に発現されることを確認している作業の途中である。また、これらのペプチドを細胞膜直下に移行させた場合、Rho GTPaseの活性化

による細胞の形態変化が生じることは実験的に確認済みである。

Rho GTPaseの活性を制御する実験系として、近年では主に植物由来の光感受性タンパク質を用いた光応答性Rho GTPaseの利用が盛んになってきたが、ラパマイシンを用いる方法にも複雑な光刺激光学系が不要であることや、動物個体への長期投与が可能であること、また光刺激に使用される可視光の波長帯を用いた蛍光観察との組み合わせが容易であることなど利点がある。このため、本研究で構築したライブラリからスクリーニングした、神経細胞後シナプスにおけるラパマイシンによるRho GTPase活性制御系は、有用な技術になり得る。

## (3)細胞内タンパク質拡散ダイナミクスの測定技術開発

ラパマイシン添加によるFRBとFKBPの二量体形成は、いままで多くの場合両者の細胞内局在の一致という平衡状態における静的な測定をもとに確認されてきた。しかし、神経細胞のような複雑な形状をもつ細胞において、実際にラパマイシンが2つのペプチドをつなぐリンカーの働きをしているかどうかを検出するためには、両者の拡散ダイナミクスの変化や、両者間の相互作用そのものを測定する実験技術の確立が必要であると考えた。

そこで、細胞内局所において蛍光標識したタンパク質の拡散ダイナミクスを定量的に測定する実験系として蛍光退色法(Fluorescence Recovery after Photobleaching, FRAP)と蛍光相関法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)のふたつを採用し、細胞内のタンパク質の拡散係数定量化を行った。

### ① 蛍光退色法(FRAP)

共焦点蛍光顕微鏡を用いて、FRAP で細胞内タンパク質の拡散係数を定量化する系を確立した。FRAP を用いて細胞質可溶性タンパク質の拡散係数を測定することは、拡散が速いため一般に難しいが、神経細胞のスパインのような細い形状の部分ではFRAPによって拡散ダイナミクスを定量できるのではないかと考えた。そこで、太さが  $1\mu\text{m}$  程度とスパインに近い一次繊毛をモデル系として、繊毛内の可溶性タンパク質の拡散係数を算出することを試みて成功した (*Nature Chemical Biology*, in press)。この研究は Johns Hopkins Univ. のグループとの共同研究として行われ、一次繊毛へのタンパク質のトラフィッキングの詳細を明らかにした。

今回確立した FRAP の手法は、神経細胞内のタンパク質のダイナミクスを制御する本実験系の評価系として重要な意味を持つだけでなく、細胞局所におけるタンパク質拡散ダイナミクスについての知見を得るために重宝な技術である。

## ② 蛍光相関法(FCS)

より一般的に細胞内での拡散ダイナミクスを定量化できる可能性のある実験系として、FCS のシステムを構築した。共焦点蛍光顕微鏡および二光子励起蛍光顕微鏡を用いてシステムを構築し、水溶液中および細胞室内での小分子蛍光プローブ rhodamine6G および蛍光タンパク質 EGFP の拡散ダイナミクス測定に成功した。

## 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 4 件)

(1) Lin Y. C., Niewiadomski P., Lin B., Nakamura H., Phua S. C., Jiao J., Levchenko A., Inoue T., Rohatgi R., Inoue T.

“Chemically inducible diffusion trap at cilia reveals molecular sieve-like barrier”

*Nature Chemical Biology*, 査読有, in press, doi: 10.1038/nchembio.1252

(2) Narita K., Kozuka-Hata H., Nonami Y., Ao-Kondo H., Suzuki T., Nakamura H., Yamakawa K., Oyama M., Inoue T., Takeda S. “Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals”

*Biology Open*, 査読有, Vol. 1 No. 8, 2012, 815-825  
doi: 10.1242/bio.20121081

(3) Nakamura H., Bannai H., Inoue T., Michikawa T., Mikoshiba K. “Cooperative and stochastic calcium releases from multiple calcium puff sites generate calcium microdomains in intact HeLa cells”

*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol. 287 No. 29, 2012, 24563-24572  
doi: 10.1074/jbc.M111.311399

(4) Satoh K., Matsu-Ura T., Enomoto M., Nakamura H., Michikawa T., Mikoshiba K. “Highly cooperative dependence of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase SERCA2a pump activity on cytosolic calcium in living cells”

*Journal of Biological Chemistry*, 査読有, Vol. 286 No. 23, 2011, 20591-20599  
doi: 10.1074/jbc.M110.204685

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 秀樹 (NAKAMURA HIDEKI) 早稲田

大学・理工学術院・助教

研究者番号: 50435666

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号: