

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：63905

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19382

研究課題名(和文)シグナル経路選択的活性化のための光応答性分子の開発と応用

研究課題名(英文)Development and application of photoactivatable molecules for single-pathway activation

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シナプス可塑性に必須なシグナル経路を選択的に光応答性分子で動作させ、それによって活性化する分子と細胞機能を観察する単一経路時空間活性イメージング法の確立を目指した。特に、光照射が可能な光応答性キナーゼを開発し、2光子励起を用いて、組織内神経細胞上の単一スパイン内で光応答性分子を活性化させることに成功した。これに加えて、光応答性キナーゼと2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡システムを組み合わせることで単一シグナル経路をシナプスレベルで動作させ、下流シグナル分子の時空間的活性化をイメージングすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規の遺伝子コード型光応答性分子の開発に成功し、単一シナプスレベルで可塑的变化を惹起できた点で学術的意義が高い。さらにこの分子を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡システムを用いたFRETイメージングと組み合わせた。これにより、単一経路の分子活性化イメージングが組織深部でしかも単一シナプスレベルで可能になり、新たな分子イメージング法の開拓に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to establish a single-pathway imaging method by combining an optogenetic tool and fluorescence imaging techniques. We have developed a new photoactivatable kinase tool that is capable of selectively activating signaling pathways. Using two-photon excitation, we successfully activated the photoactivatable kinase. Furthermore, we combined the photoactivatable kinase with 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, and successfully observed the photoactivatable kinase-dependent downstream protein activity at the level of single-synapses.

研究分野：生物物理、細胞生物、神経科学

キーワード：シグナル伝達 光応答性分子

1. 研究開始当初の背景

近年、チャンネルロドプシンをはじめとした様々な光応答性分子の開発が大きく進展しており、神経科学を含む様々な分野での応用が進んでいる。しかしながら、細胞内シグナル分子の光操作研究は細胞レベル(空間分解能 $\sim 30\ \mu\text{m}$)のものが殆どであり、細胞内の局所($< 1\ \mu\text{m}$)で分子活性を光操作する方法論は殆ど確立されていないといえる。そこで本研究では、2光子励起をはじめとした多光子励起による局所励起法と光応答性分子開発(どちらも分子研と協力)の両面から、シグナル分子活性をサブマイクロメートルレベルで操作する方法を確立する。これにより、細胞内の局所で直接分子を活性化し、その応答から細胞機能を調べることを目的とした微小領域光遺伝学の創成を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、シナプス長期増強において重要な働きをしていると考えられるセリン・スレオニンキナーゼに着目し、これらの分子の活性を2光子励起で、“ミリ秒レベルの時間分解能”と“マイクロメートルの空間分解能”で直接制御可能な光応答性分子を開発する。また、作製した光応答性分子を1個のシナプス(スパイン)内部で、光活性化(シグナル伝達経路を選択的に活性化)させることで、各分子の機能を直接調べる。さらに、複数種類の光応答性分子を個々に光活性化するのみならず、同時に活性化させ、その応答をスパインの形態や電気シグナルとして計測する。このようにして、シグナル伝達経路を選択的に活性化し、その応答を調べることによって、シナプス長期増強にとって、本質的に重要なシグナル伝達経路とその組み合わせを明らかにする。また、2光子励起による局所励起の利用と光応答性分子開発の両面から、シグナル分子活性をサブマイクロメートルレベルで操作する方法を確立する。これにより、細胞内の局所で直接分子を活性化し、その応答から細胞機能を調べることを目的とした微小領域光遺伝学の創成を目指す。

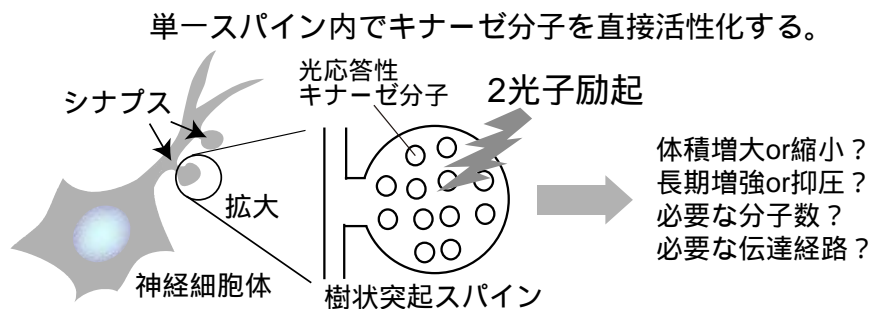


図1 光感受性キナーゼ分子を海馬神経細胞上の1個のスパイン内で直接活性化させたときの応答を形態学的、電気生理学的に調べる(単一シグナル経路活性化解析)。

3. 研究の方法

Phototropin1は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、青色光照射によって、LOV2ドメインに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が変化する。この変化は可逆的である。これを用いて、光依存的に構造変化をおこし、活性化するキナーゼ分子を作製する。具体的には図2に示すような方法でまずは試作する。図2ではCaMKIIを例にとっているが、他のキナーゼ分子であるPAK、ROCKなど活性化様式が似ている分子が多いため、殆どの場合で同じ方法が適用できる。ヒンジ領域を境に分子を2つに分けて、そこにLOV2ドメインを挿入する(図2)。光照射によって、ヒンジ領域に挿入されているLOV2が開状態に

なるため、分子全体の構造が変化し、キナーゼが働くようになる。このような分子を作製するために、様々なリンカーや LOV2 の挿入部位を試す。光照射によって構造変化が起こるかどうかは、HeLa 細胞にコンストラクトを発現させて、蛍光寿命イメージングで FRET を可視化する。分子の両端に GFP と RFP をそれぞれ結合させておけば FRET を見ることで構造変化を可視化できる。この方法なら、1 ヶ月で、フィードバックしながら 100 から 200 種類程度のコンストラクトを試すことができる。

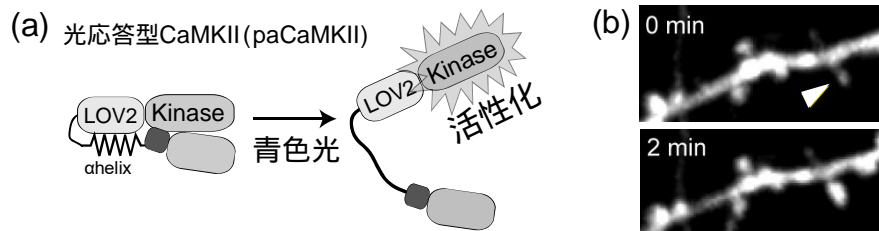


図2、(a)光応答性 CaMKII。制御ドメインとキナーゼの間に青色光により構造変化する植物タンパク質由来の LOV2 ドメインを遺伝子改変により挿入した。この分子は、青色光照射後ミリ秒程度で分子が開状態になりキナーゼ活性が上昇する。光応答性 ROCK、PAK も同様の方法で作製する。(b)光応答性 CaMKII を神経細胞に発現させ樹状突起上のスパイン(矢尻)を 2 光子励起することでスパイン体積の増大を惹起することができた。

4. 研究成果

微小領域光遺伝学の創成を目指して、単一シナプス内で光活性化が可能な paCaMKII の開発を進めた。Phototropin1 は植物の光受容タンパク質キナーゼであり、青色光照射によって、自身の持つ LOV2 ドメインに結合していた α ヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。我々は LOV2 ドメインを用いて、現在までに paCaMKII のプロトタイプの開発に成功した。次に paCaMKII を用いて、微小領域である単一シナプス(スパイン)内でシナプス可塑性が惹起できるかどうかを調べた。海馬スライスに遺伝子銃を用いて paCaMKII を導入し、900 nm の 2 光子励起で paCaMKII を単一スパイン内で活性化させたところ、体積増大(シナプス形態的可塑性)が見られた。また各種変異体を用いることにより、paCaMKII 活性化によるスパイン体積増加は 2 光子励起による paCaMKII のキナーゼ活性の増大によるもの(キナーゼ活性をなくした K42M 変異体では体積変化が起こらない)であることが分かった。さらに、単一スパイン内での paCaMKII によって惹起されたシナプス可塑的形態変化は 4 時間以上持続し、タンパク質合成依存的(アニソマイシンとシクロヘキシミドでタンパク質合成を阻害すると可塑的变化がブロックされる)であることが分かった。また、化学伝達物質であるグルタミン酸の受容体である AMPA 受容体の局在が、paCaMKII を活性化させたスパイン内で増加していることを蛍光イメージングと電気生理実験の両面から確認することができた。さらに、海馬のみならず、大脳皮質スライスや覚醒マウス脳においても単一スパインに可塑的形態変化を惹起することに成功した。すなわち、paCaMKII が個々のシナプスで長期増強を惹起することができるツールであることを示すことができた(現在論文投稿中)。

次に、paCaMKII を直接光活性化させることによって、Cdc42 が活性化するかどうかを調べた。そのために、海馬組織スライスの神経細胞に、paCaMKII と新規開発の蛍光タンパク質を利用した FRET センサーを遺伝子銃で導入し、神経細胞内で CaMKII を光活性化した時の下流分子活性を 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡で観察した。この結果、paCaMKII をス

パイン内で活性化させるとスパイン体積の増大とともに Cdc42 の活性化が起こることが分かった。すなわち、光応答性分子を活性化し、その下流分子活性の時空間分布を可視化する単一経路分子活性化法を開発すること成功した。

今後、単一経路分子活性化法を、Cdc42 だけでなく様々な分子に応用することでシナプス可塑性に必須なシグナルやその時空間分布を明らかにすることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen Xi, Shibata AC, Hendi A, Kurashina M., Fortes E, Weilinger N, MacVicar B, Murakoshi H, Mizumoto K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Rap2 and TNIK control Plexin-dependent tiled synaptic innervation in <i>C. elegans</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.38801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakoshi H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neuronal Synaptic Connections Organized by Small Numbers of Molecules.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Minorities and Small Numbers from Molecules to Organisms in Biology. Springer Singapore.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-981-13-2083-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 村越秀治	4. 巻 -
2. 論文標題 共焦点レーザー走査顕微鏡vi . FLIM- タイムドメイン	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学増刊 羊土社	6. 最初と最後の頁 57-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hideji Murakoshi
2. 発表標題 Optogenetic manipulation of CaMKII activity in synapses.
3. 学会等名 The 16th International Membrane Research Forum（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 Optical manipulation and imaging of signaling molecules in dendritic spines of neurons
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村越秀治
2. 発表標題 Imaging Protein Activity by 2-photon Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
3. 学会等名 The 66th NIBB Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

村越研究室 http://www.nips.ac.jp/multiphoton/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考