

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2012

課題番号：20240032

研究課題名（和文） 樹状突起スパインの構造可塑性の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of structural plasticity of dendritic spine

研究代表者

林 康紀 (HAYASHI YASUNORI)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90466037

研究成果の概要（和文）：

我々はCaMKIIを自己リン酸化させるとアクチンとの相互作用低下することを見だし、それがアクチン結合領域に存在する多くのセリンとスレオニンの自己リン酸化によることを見いだした。CaMKIIは神経活動が基底状態でactinを束化しているが、活性化によりF-actinから遊離し、それによりactinが修飾され、構造可塑性が引き起こされると考えられた。これらの事実はCaMKIIが構造可塑性のゲートとして機能していることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We found autophosphorylation of CaMKII on multiple serine and threonine residues on F-actin binding domain detaches CaMKII from F-actin. We concluded that CaMKII bundles F-actin under basal neuronal activity but when it is activated, it releases F-actin, thereby allowing its modification. This results in structural plasticity. In this way, we speculate that CaMKII act as a gate of structural plasticity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,400,000	6,420,000	27,820,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	39,400,000	11,820,000	51,220,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：細胞・組織、シグナル伝達、神経科学、生理学、脳・神経、記憶学習、シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

我々は海馬長期増強(LTP)ならびに長期抑圧(LTD)の誘導に伴い樹上突起 spine の形態が急速に変化する事を見だし、シナプスの構造がこれまで考えられてきたよりダイナミックな事を示した。

2. 研究の目的

この「構造可塑性」に至る分子機構を明らかにするために、シナプス後部に多量に存在するシグナル分子であるCa²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII)に注目し、CaMKIIがF-actinを束化する事で細胞骨格の一員として機能する事

を示し、そのシナプスの機能的、構造的可塑性との関係について理解する事を主目的とした。

3. 研究の方法

質量分析はハーバード大学の質量分析計室、抗リン酸化タンパク質抗体の作成は Covance 社に依頼した。FRET-FLIM はオリンパス社二光子顕微鏡を用い、Becker & Hickl 社製 SPC-730 または SPC-830 を用い、計測した。構造可塑性は幼弱ラット由来海馬スライス培養を用い、MNI-グルタミン酸を uncaging することにより誘導した。LTP はレンチウイルスを幼弱ラットに注入し、2週間後に急性切片を作成した上で全細胞記録で記録した。KillerRed は二光子顕微鏡を用い 900 nm で活性化させた。

その他の分子生物学的手法、生化学的手法は標準的な方法を用いている。

4. 研究成果

まず、アクチンとの相互作用の調節に必要なリン酸化部位を決定するため、質量分析計を用いてリン酸化を検出した。その結果、アクチン結合領域に存在する多くのセリンとスレオニンがほとんどリン酸化を受けることが明らかになった。そのうち S331 と S371 に対する抗リン酸化タンパク質抗体を作成して、リン酸化の時系列を検討したところ、これのリン酸化はよく知られている T287 のリン酸化と比較してゆっくりと上昇し、また、同じオリゴマーの異なったサブユニット間でおこることが分かった。

この部位がリン酸化されることにより CaMKII がアクチンから遊離するかを検討するため、アスパラギン酸に置換した変異体を作成した。その結果、アクチンとの結合が弱くなり、同時にシナプスへの集積が减弱することが見いだされた。これはアクチンとの結合の减弱を観察しているものと考えられる。また、アクチンとの FRET を用いることでシナプスにおいてアクチンとの結合を観察したところ、グルタミン酸のアンケーシングにより、一過性にアクチンとの結合が减弱すること、またアラニン変異体はその减弱がみられないことが明らかになった。

構造可塑性と CaMKII による F-actin 束化調節の機能解析を行い、シナプスの CaMKIIb は F-actin を束化しており構造可塑性には CaMKII の遊離が必要であるという仮説を検証した。このため、アラニン変異体をドミナントネガティブ体として用い、spine の構造可塑性が阻害されるかを検討した。その結果、グルタミン酸のアンケーシングによる構造

可塑性が阻害され、仮説が正しいことが実証された。また、同じ変異体により電気生理学的に測定される LTP も阻害された。

次になぜ CaMKII がアクチンから離脱しないと構造可塑性がおこらないかを考察した。CaMKII がアクチンを束化することにより、その他のアクチン結合因子との結合を抑えているのではないかと考えた。これを実証するため、ピレンアクチン重合実験などを用い、アクチンと CaMKII の共存下では、コフィリン、ゲルゾリン、Arp2/3 とアクチンとの相互作用が抑えられることが分かった。このことから、CaMKII はアクチンの修飾を阻害していることが分かった。これにより、シナプス形態を維持しているものと考えられる。

この機構がシナプスの構造可塑性に関与しているかを検討するため、chromophore-assisted light inactivation (CALI) を用いた、F-actin 束化調節の機能解析を行った。GFP ファミリー蛋白の一つである KillerRed を用い、照射により CaMKII を活性化させることなく F-actin から遊離させる。その上で spine の形態がどう変化するかを検討した。その結果、CALI を用いて、CaMKII を活性化させることなく F-actin から遊離させるのにグルタミン酸のアンケーシングを加えると、それだけで構造可塑性が誘導できることが分かった。

以上より、CaMKII は神経活動が基底状態で actin を束化しているが、活性化により F-actin から遊離し、それにより actin が修飾され、構造可塑性が引き起こされると考えられた。いわば CaMKII は構造可塑性のゲートとして機能するのではないかと考えられた。

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 3 件)

1. Wang, D.O., Matsuno, H., Ikeda, S., Nakamura, A., Yanagisawa, H., Hayashi, Y., Okamoto, A. (2012) A rapid and effective FISH protocol with hybridization-sensitive fluorescent linear oligo probes. *RNA* 18:166-175
2. Mower, A. F., Kwok, S. M., Yu, H., Majewska, A. K., Okamoto, K.-I., Hayashi, Y.*, Sur, M.* (*: co-corresponding authors) (2011) Experience-dependent regulation of CaMKII activity within single visual cortex synapses in vivo. *Proc. Natl.*

- Hayashi, M.K., Tang, C., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M.H., Xu, R.-M., Li, H., Sala, C., Hayashi, Y. (2009) The postsynaptic density proteins Homer and Shank form a polymeric network structure. **Cell** 137:159-171

[学会発表] (計 19 件)

- Hayashi Y. CaMKII is a gating mechanism of activity-induced structural modification of hippocampal dendritic spines. Winter Conference on Brain Science, Breckenridge, Colorado, USA Jan. 2013/05/02
- Masaaki Sato, Tanvir Islam, Takashi Takekawa, Hiroshi Yamakawa, Masako Kawano, Yoko Yamaguchi, Tomoki Fukai, Masamichi Ohkura, Junichi Nakai, Yasunori Hayashi A virtual navigation system for two-photon calcium imaging in mice. 第35回日本神経科学大会 名古屋 2012 Sep
- Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal learning and memory. 3rd LIN Symposium, Translating synaptic activity into neuronal plasticity, Tagermünde, Germany, 2012 Aug
- Karam Kim, Gurpreet Lakhanpal, Akio Suzuki, Mariko Hayashi, Radhakrishnan Narayanan, Tomoki Matsuda, Takeharu Nagai, Kenichi Okamoto, Yasunori Hayashi, CaMKII serves as a gate of actin-mediated structural plasticity of dendritic spine. Gordon Research Conference Synaptic Transmission, Waterville Valley, USA 2012 July
- Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal learning and memory. The 7th International Conference for Neurons and Brain Disease (Association for the Study of Neurons and Diseases), Montreal, Canada 2012 June
- Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal learning and memory. 2012 International Brain Research Symposium, Daegu, Korea 2012 May
- Hosokawa, T., Hayashi, Y. A quantitative analysis of AMPA receptor GluR1 phospho-isotypes. SfN 2011,

- Lakhanpal, G., Kim, K., Kato-Hayashi, M., Hayashi, Y., Okamoto, K. The role of CaMKII beta in modulating dendritic spine structural plasticity. SfN 2011, Washington DC, USA 2011 Nov
- Kim, K., Hayashi, M., Narayanan, R., Suzuki, A., Matsuura, K., Okamoto, K., Hayashi, Y. CaMKII gates rapid structural plasticity in hippocampal dendritic spines. SfN 2011, Washington DC, USA 2011 Nov
- Hayashi, Y. Principle and application of fluorescence microscopy in neuroscience. IBRO School. Beijing, China 2011 Oct
- Hosokawa, T., Hayashi, Y. A quantitative analysis of AMPA receptor GluR1 phospho-isotypes. 第34回日本神経科学大会 横浜 2011 Sep
- Sato, M., Kawano, M., Islam, T., Yamaguchi, Y., Ohkura, M., Nakai, J., Hayashi, Y. In vivo two-photon imaging of neuronal circuit activity using transgenic mice that express fluorescent calcium sensor proteins in the brain. 第34回日本神経科学大会 横浜 2011 Sep
- Hayashi Y. Phosphoisotype analysis of AMPA receptor GluR1, Gordon Research Conference Excitatory Synapses & Brain Function, Easton, MA, USA, June 2011
- Hayashi Y. The regulation of dendritic spine structural plasticity by CaMKII beta. 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011 July
- Hayashi, Y. Structural roles of CaMKII. 第54回日本神経化学会 金沢 2011 Sep
- Hayashi Y. Temporal progression of the structural and molecular remodeling of dendritic spines after LTP induction. Neuronal Communication Beyond the Synaptic Cleft - International conference and workshop, Niigata, 2011 Feb
- Hayashi Y. Sequential reorganization of synaptic components after LTP induction. Gordon Research Conferences

Synaptic Transmission, Biddeford, ME,
USA, 2010 July

18. Hayashi Y. Regulation of structural function of CaMKII by multiple autophosphorylation sites. 7th FENS Forum of European Neuroscience, Amsterdam, 2010 July
19. Hayashi Y. Molecular mechanism of hippocampal synaptic plasticity. Bristol 2010 From molecules to neuronal, Bristol, UK, 2010 June

[図書] (計 4 件)

1. Sakaguchi M, Hayashi Y. Catching the engram: strategies to examine the memory trace. **Mol Brain**. 2012 Sep 21;5:32.
2. Saneyoshi T, Hayashi Y. The Ca²⁺ and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. **Cytoskeleton** (Hoboken). 2012 Aug;69(8):545-54.
3. Hayashi Y., Okamoto K, Bosch M, Futai K. Roles of neuronal activity-induced gene products in Hebbian and homeostatic synaptic plasticity, tagging, and capture. **Adv Exp Med Biol**. 2012;970:335-54.
4. Bosch M, Hayashi Y. Structural plasticity of dendritic spines. **Curr Opin Neurobiol**. 2012 Jun;22(3):383-8.

[その他]

<http://glutamate.brain.riken.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 康紀 (HAYASHI YASUNORI)
独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム
研究チーム・チームリーダー
研究者番号：90466037

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし