

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680036

研究課題名(和文) Rac 活性ポジティブフィードバックループのシナプス構造可塑性維持への関与

研究課題名(英文) Positive feedback loop of Rac activity on synapse structural plasticity

研究代表者

実吉 岳郎 (Saneyoshi, Takeo)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00556201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では長期増強過程におけるシナプスでのRac活性化の可視化に成功した。NMDA型グルタミン酸受容体およびCaMKII依存的な持続するRac活性はスパインの構造維持に必須であった。Rac活性化因子TIAM1は、Rac活性化、シナプス伝達効率とスパイン形態維持の両面に必要であった。TIAM1とCaMKIIは刺激を受けたスパイン内でシグナル複合体を形成した。この複合体は、カルシウム、カルモデュリン依存的に形成されるが、刺激後長期にわたり維持された。この複体内ではCaMKIIは活性化されており、TIAM1-CaMKIIがスパイン構造を長期間維持するメカニズムであることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this grant period, we have successfully visualized Rac activation induced by LTP stimulation by two-photon fluorescent lifetime imaging microscopy (2pFLIM). The Rac 2pFLIM revealed that Rac activation lasted more than 30 min post LTP stimulation, which depended on NMDA-receptor, CaMKII, and TIAM1. We also demonstrated that CaMKII was locked in active conformation through interaction with TIAM1 in independently from phosphorylation of Thr-286.

研究分野：神経科学一般

キーワード：シナプス

1. 研究開始当初の背景

長期増強刺激を受け肥大化したスパインは刺激が消失した後も元のサイズに戻ることなく形態を維持する。これにはアクチン重合状態の維持が関わるが (Okamoto et al., 2009) いったいどのような分子機序によってアクチン重合状態が維持されるのであろうか? Rho 族 小 GTPase は Rac, Rho, Cdc42 より構成されアクチン細胞骨格系を制御する重要な情報伝達経路として幅広く研究されている (Saneyoshi et al., 2010)。シナプス可塑性の中心分子である CaMKII は、Rho 族の上流分子として機能する (Murakoshi et al., 2011)。しかし、CaMKII は LTP の誘導に必須であるものの、維持には寄与しない (Chen et al., 2001; Buard et al., 2010)。実際、単一スパインレベルでの CaMKII の活性化状態は数十秒間しか持続しない。一方、Rho 経路下流の cofilin のリン酸化状態は、LTP 誘導刺激後少なくとも 30 分間は持続する (Chen et al., 2007)。また、Rac 活性は少なくとも 5 分間は持続する (未発表)。従って、スパイン構造維持に働くシグナル伝達は CaMKII より下流で活性化状態が維持される機構があると考えられる。

これまでの研究により電気生理学的に測定した LTP は Rac 阻害剤により阻害され (Martinez and Tejada-Simon, 2011)、さらに Rac1 変異マウスでは LTP および記憶、学習に障害が観察される (Haditsch et al., 2009)。これらの研究から Rac 分子は LTP の誘導および維持の両方に関わることが示唆されている。sLTP ではどのような役割をしているのだろうか? 本研究計画の作業仮説は、1) Rac によって活性化された Pak が Rac 活性化因子、betaPIX を活性化し更なる Rac 活性化をもたらす。2) 同時に Pak は Rac 阻害因子 (RhoGDI) をリン酸化し、Rac から遊離させることで Rac を活性化しやすくさせる。これら二つの仕組みにより Rac 活性のフィ-

ードバックループが成立する。それ以外に RhoA による制御も考えられている。以上、これまでは Rac を活性化する方法も Rac 活性を測定する方法もなかったため、単一スパインでの Rac 活性のポジティブフィードバックループの検証が不可能であった。申請者の開発した Rac 活性バイオセンサーと光活性化 Rac (PA-Rac) の組み合わせによって初めて検証可能な仮説である。

2. 研究の目的

海馬長期増強現象 (LTP) は、シナプス伝達効率が、一度受けた刺激に対して長期間にわたって上昇する現象であり、記憶・学習の細胞レベルでのモデルであると考えられている。近年 LTP 誘導刺激によりアクチン細胞骨格によるスパインの体積が増大し、それが維持される事 (シナプス構造可塑性、sLTP) が見いだされた。LTP 誘導における NMDA 型グルタミン酸受容体とそれによる Ca^{2+} 上昇は一過性である為、アクチンに至るシグナルカスケードのいずれかの段階で、シグナル活性が長期的に維持される必要がある。申請者はこれまで Rho ファミリーについての研究を行った結果、特に Rac がスパインのアクチン制御の中心分子である事を見いだしてきた。その過程で興味深い事に Rac の下流分子である Pak が Rac の上流分子を活性化させる事に気づいた。この事実から、スパインの構造維持に Rac タンパク質のシグナルのポジティブフィードバック機構が関わるという仮説を立てた。本研究計画ではこの仮説を光活性化型 Rac、ならびに Rac 活性プローブという二つの新技术を用いて検証する。

3. 研究の方法

ラット培養海馬切片に遺伝子銃 (バイオラッド社) を用いて各バイオセンサーを発現させる。遺伝子導入後 1 日から 2 日後に二光子顕微鏡 (オリンパス社) を用いて観察する。観察用レーザーは 910 nm に設定し、刺激用レーザーは 720 nm に設定する。蛍光寿命

測定はSPC-830 (Becker&Hickl社)を用いる。海馬切片は人工脳髄液に還流しておき、刺激前15分間、刺激後30分間2分間隔で撮影する。光活性化Racの活性化はラット培養海馬切片にPA-Racとバイオセンサーを共発現させ、二光子顕微鏡下(観察レーザー1030 nm, 刺激レーザー720 nm)でRacの活性化による効果をFLIM-FRETで解析する。

4. 研究成果

(1) Rac はシナプス構造可塑性に必要な十分な分子である。Rac 阻害剤 EHT1864 で Rac 活性化を阻害すると構造可塑性が有意に減少した。また、阻害剤をLTP刺激後、5分、15分後に添加してもスパインの構造が縮小した。すなわち、Rac 活性化スパイン構造維持に必要な分子であることがわかった。また、光活性化Racを用い単一スパインでRac活性化を起こすとスパイン体積増大、アクチン重合の亢進が観察され、このプロセスはRac阻害剤、Pak阻害剤に感受性があり、CaMKII阻害剤では影響を受けないことからRac活性化がシナプス構造可塑性の十分因子であることがわかった。さらに、Racバイオセンサーを用いたイメージング実験によりRac活性化は刺激後30分以上持続し、それはCaMKII, NMDA受容体依存的な活性化であることがわかった。

(2) Rac 活性化分子、TIAM1 はシナプス可塑性に必要な分子である。Rac 活性化のメカニズムを知る為、NMDA受容体の影響を受ける3つのRac活性化分子、TIAM1, Kalirin7, betaPIXについてノックダウンによる構造可塑性に与える影響を調べた。すべての分子のノックダウンにより構造可塑性が有意に減少した。CaMKIIとの相互作用を調べたところ、TIAM1のみがCaMKIIと強く結合した。TIAM1に焦点を当て、ドミナントネガティブTIAM1発現による構造可塑性およびシナプス可塑性に与える影響を調べた。構造可塑性、Rac活性化、シナプス可塑性すべてドミナントネ

ガティブTIAM1により減少または消失した。すなわち、TIAM1はシナプス可塑性の必須分子であることがわかった。

(3) CaMKIIとTIAM1はスパインで活性化シグナル複合体として機能する。続いてTIAM1とCaMKII相互作用について詳細に検討した。TIAM1はCaMKIIとカルシウム、カルモデュリン依存的に結合するが、一旦結合すると安定な結合になり、カルシウムを除いても複合体は壊れない。ペプチド阻害、CaMKII変異体実験からこの相互作用はTIAM1のアミノ酸1543-1557にCaMKIIのT-siteを介して行われることもわかった。さらに、この複合体でのCaMKIIの酵素活性を調べるとカルモデュリン非依存的活性を示した。従って、TIAM1がCaMKIIによるリン酸化により活性化される事実と合わせるとTIAM1-CaMKII複合体は恒常的活性型シグナル複合体であることがわかる。スパインでのTIAM1-CaMKII複合体形成を2pFLIMイメージングするとグルタミン酸刺激により複合体が形成され、その後30分以上スパイン内で複合体は持続して観察された。以上によりTIAM1-CaMKII複合体はシナプスにおける新しい形態維持装置として機能するモデルを提唱する。

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3件)

Matsuno H, Ohi K, Hashimoto R, Yamamori H, Yasuda Y, Fujimoto M, Yano-Umeda S, Saneyoshi T, Takeda M, Hayashi Y. PLoS One. (2015) A naturally occurring null variant of the NMDA type glutamate receptor NR3B subunit is a risk factor of schizophrenia. 10(3):e0116319. doi: 10.1371/journal.pone.0116319.

eCollection 2015. 査読あり

Saneyoshi T, Hayashi Y. EMBO J.

(2014) Synapse reorganization-a new partnership revealed. 33(12):1292-4. doi: 10.1002/embj.201488619 査読なし

Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Neuron. (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. 82(2):444-59. doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.021. 査読あり

[学会発表](計3件)

Takeo Saneyoshi, Hitomi Matsuno, Nathan Hedric, Hideji Murakoshi, Ryohei Yasuda, and Yasunori Hayashi. Conversion of a transient Ca²⁺ signaling into a persistent structural modification of dendritic spines by CaMKII/TIAM1 complex formation during synaptic plasticity. MDFLI 2015, January 26th to January 28th, 2015, Kyoto, Japan. 国立京都国際会館

Takeo Saneyoshi, Hitomi Matsuno, Nathan Hedric, Hideji Murakoshi, Ryohei Yasuda, and Yasunori Hayashi. Conversion of a transient Ca²⁺ signaling into a persistent structural modification of dendritic spines by CaMKII/TIAM1 complex formation during synaptic plasticity. SfN 2014, November 15th to November 19th, 2014, Washington D.C., USA.

Takeo Saneyoshi and Yasunori Hayashi. Persistent Interaction between CaMKII and TIAM1 during structural plasticity of single dendritic spines. FENS2014, July 5th to July 9th, 2014, Milano, Italy.

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

実吉 岳郎 (Saneyoshi, Takeo)

独立行政法人理化学研究所、脳科学総合研究センター 研究員

研究者番号: 00556201

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: