

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26540154

研究課題名(和文) 脳の記憶メカニズムに基づいた生体分子メモリシステムの実用化

研究課題名(英文) Biotechnological application of memory-related molecules in the brain

研究代表者

浦久保 秀俊 (Urakubo, Hideotshi)

京都大学・情報学研究科・特定研究員

研究者番号：40512140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳の記憶メカニズムに基づいたCaMKII分子メモリの工学的な実用化を目指し、生化学実験、細胞生物学実験、コンピュータシミュレーションによる検討を行った。特に、CaMKII分子メモリを光により読み書き可能にすることを旨とし、CaMKII-FRETの昆虫細胞発現系の構築、HeLa細胞における分子活性の光による制御について検討し、CaMKII分子メモリは工学的に応用可能であることを確認した。また、現実の脳のスパインにおけるメモリ関連分子の局在を明らかにするために、形態を詳細に再現したスパインにおける関連分子の反応拡散シミュレーションを行った。

研究成果の概要(英文)：Three approaches were utilized to examine the feasibility of biotechnological application of CaMKII memory function: biochemical experiments, cellular and molecular biological experiments, and computer simulation. I developed the insect cell expression system of CaMKII-FRET, and also developed the optical observation/simulation system of target molecules in HeLa cells. The CaMKII memory system is also applicable. Also, I computationally simulated the reaction-diffusion system of the memory-related molecules in morphologically realistic dendrites and spines, to examine localization of those molecules.

研究分野：計算論的神経科学

キーワード：生体分子メモリ シミュレーション 再構成系 CaMKII

### 1. 研究開始当初の背景

脳において、記憶はシナプスと呼ばれる極小部位に埋め込まれる。シナプスにおいて、記憶は一時的な書き込みシグナル( $Ca^{2+}$ )がシナプス分子 CaMKII の長期にわたる自己リン酸化を導くことにより成立する。申請者は、CaMKII をはじめとする各種シナプス分子を精製して試験管中で反応させることにより、脳の記憶メカニズムと同じ仕組みの分子メモリを再構成することに成功した (Urakubo et al. 2014, Biophys J 106, pp.1414-1420)。この CaMKII 分子メモリにおいて、メモリ書き込みに必要な時間は 10 秒未満と短く、理論的なメモリ密度は CaMKII 1 分子単位と高く、メモリ維持に必要なエネルギーは ATP 数十分子程度と小さい。生体分子の機能としては非常に優れた CaMKII 分子メモリを、細胞と親和性の高いメモリシステムとして実用化することはできないだろうか？

### 2. 研究の目的

CaMKII 分子メモリを、細胞と親和性の高いメモリシステムとして実用化することを目指し、再構成系実験 (生化学反応実験)、細胞生物学実験、シミュレーションの 3 方面からの検討を行った。特に CaMKII 分子メモリの光による入力 (Caged  $Ca^{2+}$ )、光による読み出し (CaMKII-FRET) を可能にすることで、分子メモリの空間局在性の検討を行うことを目指した。さらに、現実のシナプス (スパイン) における記憶の安定性との対照を得るため、電子顕微鏡画像より得たスパインの形態に基づいて、CaMKII 分子メモリ関連分子の反応拡散シミュレーションを行った。

### 3. 研究の方法

まず、実験実施場所として、京都大学大学院・医学研究科・青木一洋特定准教授に、青木研究室にて本研究課題の推進に必要な実験を行わせていただくことをお願いし、ご承諾いただいた。

(1) 試験管中の CaMKII 活性を光により制御する分子メモリシステムの構成のために、昆虫細胞 (Sf 細胞) 発現系を用いて CaMKII-FRET を大量に発現させた。(2) 培養細胞における CaMKII 分子メモリの動作を目指して、HeLa 細胞 (培養細胞) 中に多種類の分子を発現させてシグナル伝達の一部を人工的に構築すると共に、FRET などの蛍光により分子活性の観測を行う実験システムの構築を試みた。(3) CaMKII 分子メモリに関連する分子のコンピュータシミュレーションを行い、活性の空間局在について評価した。とくに、スパイン形態に基づいた反応拡散シミュレーションを行う際には、沖縄科学技術大学院大学の Eric De Schutter らにより開発された STEPS と呼ばれるシミュレータを用いた。

### 4. 研究成果

(1) 第一に Addgene より CaMKII-FRET (Camui-

CR) の cDNA を入手し、(2) 野生型 (WT) に加えて T286A, T305A, T286AT305A, 3 つの点変異を作成し、(3) cDNA を pFastBac1 ベクターへ導入し、(4) Bac-to-Bac システムを用いてバクミドを作成した。バクミドを Sf21 細胞に Transfection してバキュロウイルスを作成し、さらに CaMKII-FRET の大量発現を確認した。

(2) 並行して、細胞と親和性の高いメモリシステムを実現するために、取り扱いが容易な HeLa 細胞をターゲットとして、FRET による分子活性の観測の習熟と、Cage 化合物を用いた複数種の刺激を行うため手法の開発を行った (図 1)。ここでは、他プロジェクト研究との関連より、 $Ca^{2+}$  とドーパミン (DA) の二種類の刺激を、それらの時間順序を変更しながら与えた際のアデニル酸シクラーゼ (AC1) の活性を Epac-camps (FRET) を用いて観測した。不要な AC3, AC5 分子の発現を siRNA で阻害するなどした結果、二種類の刺激の時間順序を変えながら与えつつ、AC1 応答を観測す

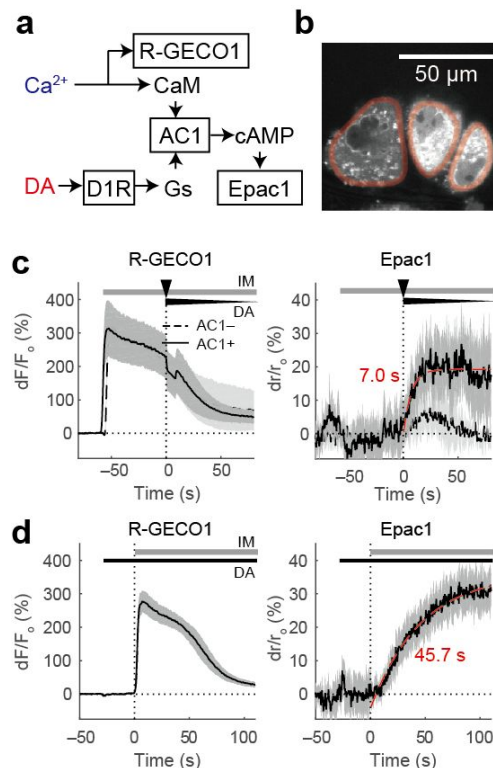


図 1 : HeLa 細胞における、蛍光を用いた分子活性の観測と、Cage 化合物による刺激法の開発。HeLa 細胞に、R-GECO1 ( $Ca^{2+}$  観測分子)、AC1 (ここでの活性観測対象分子)、D1R (AC1 を刺激する分子)、Epac1 (AC1 活性を観測する FRET 分子) を発現させると共に (a)、AC1 を活性化する二種類の Cage 化合物「Caged- $Ca^{2+}$ 」および「Caged-DA」を時間的タイミングを変えながら与え、その際の AC1 応答を Epac1-FRET により観測している (b)。観測対象分子 AC1 は「 $Ca^{2+}$ 」「DA」刺激を与える時間順序に依存して異なる時定数 (赤字) の応答を示した。

ることに成功した(図1)。この方法を応用することにより、CaMKII 分子メモリに対する記憶の入力と消去を光学的に行うことができる。

しかし、残念ながら習熟した HeLa 細胞操作法や Sf21 大量発現系を用いて、CaMKII 分子メモリ特性の蛍光による観測を行うまでには至らなかった。理由は、研究代表者が他プロジェクト雇用であったため、本研究に対するエフォートを十分に割くことができなかったためである。一方、CaMKII-FRET 大量発現系などの準備には成功し、FRET や Cage 化合物の取り扱いにも成功している。従って、必要なエフォートを割くことができれば極めて短期間で生体分子メモリの実用化を達成することができる。今後の研究代表者の雇用環境の変化を期待したい。

(3) 平成 29 年度より、十分な実験を行うことが困難になったため、方針を変更してコンピュータシミュレーションにより、CaMKII 分子メモリの空間方向へのメモリ局在について調べた。これまでの研究代表者の実験により、CaMKII は隣接 CaMKII 分子と相互作用しないことが想定されていた。この場合、CaMKII 分子メモリの空間解像度は理論的に CaMKII 分子一つとなる。しかし、近年の他研究より CaMKII は状況によっては隣接 CaMKII 分子と相互作用することが明らかとなって

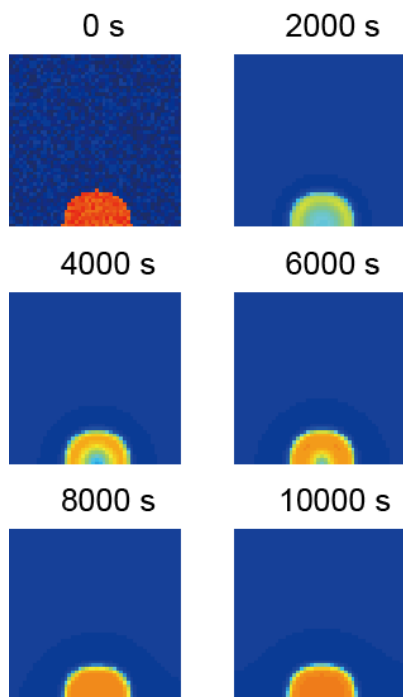


図2 : CaMKII 分子が空間相互作用するとした場合の CaMKII の活性の局在の時間発展(反応拡散シミュレーション)。条件に依存するものの、CaMKII 活性の局在は刺激部位(時刻 0 s における下部半円内)に安定して局在した。シミュレーションでは一片 1 cm の正方形を想定している。

いる(Bhattacharyya et al. 2014, eLife5: e13405)。そこで、CaMKII 分子メモリ同士が相互作用を持ちつつ二次元平面内を拡散する際の分子メモリの空間解像度をシミュレーションにより調べた。その結果、実験条件に依存するものの、反応拡散メカニズムにより CaMKII は十分な空間解像度で局所安定してメモリ機能を示すことが明らかとなった(図2)。

さらに、現実の脳のスパインと同じ形状のなかで CaMKII 分子メモリが十分に局在して機能することで、スパイン単位の情報の入力と消去が可能であることをシミュレーションにより確認した(図3)。現実の脳では、スパインに存在する NMDA 受容体が活性化して Ca<sup>2+</sup>流入が生じ、Calmodulin (CaM) と結合してスパインの CaMKII が活性化することでメモリが入力される。あるいは、CaN が活性化することによりメモリが消去される。この一連のシグナル伝達を微小空間の少数分子効果を取り入れた Gillespie 反応拡散シミュレーションにより再現した。その結果、シミュレーションでは、CaMKII 活性(分子メモリ)は活性化スパインに局在するものの、CaMKII

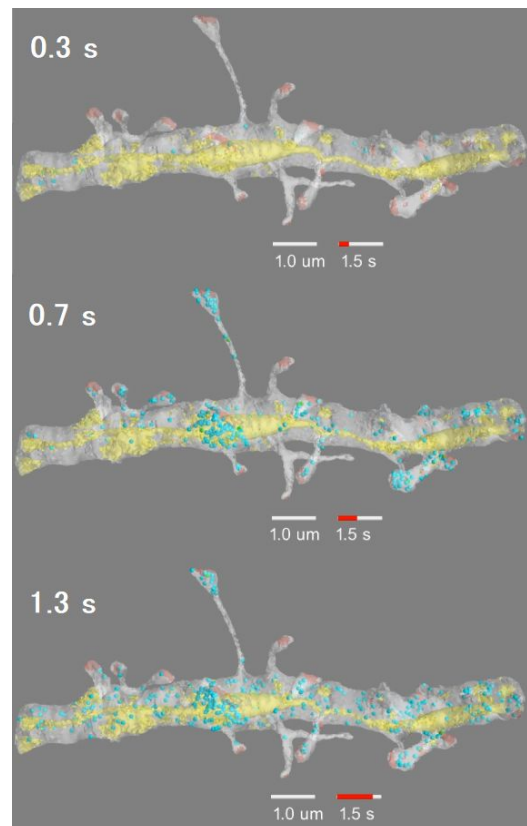


図3 : 電子顕微鏡像に基づいて新皮質スパイン dendrite 形状を再現し、スパイン Ca<sup>2+</sup>流入から CaN 活性までのシグナル伝達を再現した。

時刻 0.5 s に NMDA 受容体が活性化して Ca<sup>2+</sup>流入が与えられると、CaN が活性化する(0.7 s)。CaN 活性より樹状突起へと伝わるが、スパインが長いので、多くは 1.3 s 後もスパインにとどまり続ける。

活性を消去する Calcineurin (CaN) 活性は隣接スパインへ広がることが分かった。特に、新皮質スパインにおいては、スパインの長さのため隣接スパインまで CaN 活性は伝わらない(伝わりにくい)が、海馬 CA1 において CaN 活性は容易に隣接スパインまで伝わるということが明らかとなった。これは、領野に依存して異なる脳のメモリ消去のメカニズムの一つである可能性を示しており、課題終了後も引き続き検証を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

「神経系大規模シミュレーションのためのソフトウェア~NEURONとNEST~」**浦久保秀俊** 日本神経回路学会誌 Vol. 22 No.3 (2015) 133-144

Yuichiro Hayashi, Shin Ishii\*, **Hidetoshi Urakubo\***, "A computational model of afterimage rotation in the peripheral drift illusion based on retinal ON/OFF responses." PLoS ONE, Vol 9, No. 12: e115464, 2014

Ken Nakae, Yuji Ikegaya, Tomoe Ishikawa, Shigeyuki Oba, **Hidetoshi Urakubo**, Masanori Koyama, Shin Ishii\*, "A statistical method of identifying interactions in neuron--glia systems based on functional multicell Ca2+ imaging." PLoS Comput. Biol., Vol. 10, No. 11, e1003949, 2014

Sho Yagishita, Akiko Hayashi-Takagi, Graham C.R. Ellis-Davies, **Hidetoshi Urakubo**, Shin Ishii and Haruo Kasai\*, "A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines." Science, Vol. 345, No.6204, pp. 1616-1620, 2014

Takuya Koumura, **Hidetoshi Urakubo**, Kaoru Ohashi, Masashi Fujii, Shinya Kuroda\*, "Stochasticity in Ca2+ increase in spines enables robust and sensitive information coding." PLoS ONE, Vol. 9, No. 6, e99040., 2014

[学会発表](計3件)

**Urakubo, H.**, Aoki, K, Yagishita, S., Kasai, H., Ishii, S. "Delayed activation of adenylyl cyclase 1 as a causality detector of action-reward conditioning," 日本神経科学大会、2016年11月12~16日、神奈川

**Urakubo, H.**, Aoki, K, Yagishita, S., Kasai, H., Ishii, S. "The role of

adenylyl cyclase 1 in reinforcement synaptic plasticity: a modeling study," SfN annual meeting abstract No. 126.03, 2016年11月12~16日、アメリカ合衆国・サンディエゴ

**浦久保秀俊**「行動報酬タイミング依存シナプス可塑性のシグナル伝達モデル」脳と心のメカニズム第15回冬のワークショップ、2015年1月7~8日、北海道

[その他]

神経回路学会主催 システム神経生物学  
スプリングスクール(SNSS2015)プログラム  
ラムコミッティー(京都) 2015年3月

日本神経回路学会 論文賞 2016年度

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

浦久保 秀俊 (URAKUBO Hidetoshi)

京都大学・大学院情報学研究科・特任助教  
研究者番号: 40512140

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし