

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830043

研究課題名(和文)神経細胞における動的な生化学情報処理機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of biochemical computation and dynamics in neurons.

研究代表者

藤井 哉 (Fujii, Hajime)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：80717546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳機能を理解するためには、複雑な脳の中での神経活動とそれによって活性化される生化学反応を計測し、演算を理解する必要がある。神経細胞での生化学演算を計測するために、本研究では非常にダイナミックレンジを改善した新型のCa²⁺依存性酵素に対するプローブを開発した。そして、これらのプローブを用いて、Ca²⁺依存性リン酸化酵素(CaMKII)と脱リン酸化酵素(カルシニューリン)の活性化の時空間的プロファイルを生きた神経細胞の樹状突起およびシナプスにおいて計測し、全く異なることが明らかになった。この成果は、神経細胞における生化学演算機構の一端を明らかにし、高次脳機能の理解につながるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Understanding how complex neuronal activities and biochemical computation induced by synaptic input in neuronal circuit is fundamental question in neuroscience. To begin to answer that question, direct measurement of biochemical activities in synapses of living neuron is necessary. We developed new probes for measurement of Ca²⁺ dependent kinase (CaMKII) and Ca²⁺ dependent phosphatase (calcineurin) activities, which have improved signal to noise ratio. With these new probes, we investigated Ca²⁺ dependent kinase and phosphatase activities in dendrites and synapses of living neurons during induction phase of synaptic plasticity. Distinct spatial and temporal profiles between the two enzymes was discovered. These results provide new insights into the biochemical computation in neurons and shed new light on how the brain works.

研究分野：神経科学

キーワード：Ca²⁺シグナル シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

脳機能の中心となるシナプスでは、神経の入力に対してどのような情報処理が行われてシナプスや神経細胞の応答を引き起こしているのだろうか？過去20年以上にわたるタンパク質と相互作用の同定によって、シナプス入力から受容体、セカンドメッセンジャー、酵素、足場タンパク質、細胞骨格、転写因子へといった情報伝達を、静的なフローチャートとして表現してきた。しかし、こうした静的なネットワーク図だけでは、複雑な地下鉄の路線図を眺めるようなもので、脳の動作原理を理解するためには『時刻表』が必要である。すなわち、神経細胞内・樹状突起内・シナプス内で、いつ、どこで、どの分子が、どのくらい活性化されるのかを直接計測し、生きて動く生化学反応システムとしてのオーガナイゼーションを理解する必要がある。

特に、記憶・学習においては、こうした生化学反応システムによる神経機能・シナプス機能の変化が重要な役割を果たしていると考えられている。長期増強や長期抑圧といったシナプスの機能的可塑性および、こうした機能的な変化に伴いシナプスの形態が変化するシナプス構造的可塑性は、記憶や学習といった高次脳機能の神経細胞・シナプスの基盤と考えられている。こうしたシナプス可塑性が誘導される際には、Ca²⁺依存性リン酸化酵素である CaMKII および Ca²⁺依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性化が非常に重要な役割を果たしていることが、これまでの遺伝子改変動物や薬理学的実験により明らかになっており、『路線図』すなわちシグナル伝達の静的なネットワーク図はかなりの部分解明されてきている。しかし、『時刻表』の部分、つまり生きて神経細胞や樹状突起、シナプスにおける生化学シグナルの活性化の時間的、空間的なパターンはまだ十分に理解されていない。こうしたことから、申請者は CaMKII およびカルシニューリンの活性化を可視化する FRET プローブ(酵素活性をシアンと黄色の2色の蛍光タンパク質の蛍光強度比として検出するプローブ)を世界に先駆けて開発した。そして、生きて神経細胞やシナプスにおけるこれらの酵素の活性化の時空間的パターンを明らかにするとともに、様々な頻度や回数で入って

くる神経入力パターンに対するこれらの酵素の生化学的な演算過程を明らかにした(Fujii et al., Cell Rep, 2013)。しかし、申請者の先行研究においてはこれらの生化学シグナル可視化プローブの性能(シグナル変化率)は十分ではなく、シナプスや樹状突起での生化学シグナルによる演算過程はまだ十分には理解されていない。また、複数の生化学シグナルの間での活性化の空間的な拡がりの比較検討やさまざまな入力刺激に対する応答性の違いも十分に理解されていない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、申請者の先行研究を進展させ、明るさや変化率を改善した新規の Ca²⁺依存性酵素活性を測定するための FRET プローブを開発する。そして、複数の Ca²⁺依存性酵素について神経細胞、樹状突起、シナプスでの活性化の時空間的パターンや生化学的演算処理の解析を行い、Ca²⁺依存性リン酸化酵素・脱リン酸化酵素の活性化バランスによるシナプス構造的可塑性の意思決定過程について解析する。

3. 研究の方法

申請者が先行研究において開発した CaMKII およびカルシニューリンの FRET プローブを(Fujii et al., Cell Rep, 2013)、構造生物学的データ(三次元立体構造)および比較進化ゲノム学データ(生物種間でのタンパク質アミノ酸配列の違い)を応用した合理的プローブ設計法のアプローチを用いて再設計し、シグナル変化率の改良を行う。そのために、近年開発された種々の新規蛍光タンパク質、FRET プローブの基本骨格に対する蛍光タンパク質の挿入位置やそれらをつなぐリンカー配列を変化させた種々のコンストラクトを作成する。作成したコンストラクトは HEK293T 細胞に発現させ、ライセートを作成し、蛍光プレートリーダーを用いて FRET 計測を行ってそのシグナル変化率の比較検討を行う。また、FRET プローブの蛍光シグナル変化が酵素活性のリードアウトとなっていることを確認するために、プレートリーダーによる FRET 計測を用いて薬理的な検討を行う。次に、樹状突起上のシナプスに対する入力の空間パターンと生化学的反応の検討を行うために、種々の刺激方法

(グルタミン酸光誘拐法による刺激や多点刺激、シナプス構造的可塑性を誘導するための刺激、自発的な活動を誘導するための薬剤処理刺激など)を検討する。海馬分散培養神経細胞に対して、本研究で開発した新規 FRET プローブを遺伝子導入し、蛍光顕微鏡を用いて CaMKII およびカルシニューリンの活性化パターンの計測を行う。

4. 研究成果

合理的なプローブ設計法により作成した種々の FRET プローブコンストラクトを作成し、蛍光プレートリーダーによる FRET 計測を用いてそれらのシグナル変化率の比較検討を行った結果、従来のカルシニューリン FRET プローブよりもシグナル変化率が改善された新型カルシニューリンプローブの開発に成功した。また、CaMKII プローブについても蛍光タンパク質の種類を変更することで、より高輝度の CaMKII プローブの開発に成功した。次に、新型カルシニューリンプローブを HEK293T 細胞に発現させ、薬理的阻害実験を行ったところ、このプローブは Ca^{2+} /カルモジュリン依存的な FRET シグナル変化を示し、このことから、従来の生化学的手法よりも時空間分解能が飛躍的に向上し、生きた神経細胞での計測が可能な光学的な酵素活性の読み出しとして用いることができることが示された。

次に、神経細胞に対して種々の刺激方法の検討を行った結果、薬剤処理による内在的な活動・神経伝達物質放出や多点パターンでの刺激方法を行うことが可能になった。神経細胞に CaMKII プローブもしくは新型カルシニューリンプローブとシナプス構造を可視化する赤色蛍光タンパク質を導入し、グルタミン酸の光融解法による単一シナプスで構造的可塑性を誘導する刺激を行い、その時の活性化シグナルの時空間パターンの違いを検討した。この結果、CaMKII とカルシニューリンでは全く異なる活性化プロファイルを示すことが明らかとなった。これらの成果は生きた神経細胞の樹状突起およびシナプスにおける生化学的演算過程の新たな一面を明らかにしたものであり、高次脳機能の理解につながる非常に重要な成果である。

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)

1, Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Horigane SI, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H. (2017)

Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease.

J Neurochem. 2017 Mar 15. doi:

10.1111/jnc.14020.

2, Horigane S, Ageta-Ishihara N, Kamijo S, Fujii H, Okamura M, Kinoshita M, Takemoto-Kimura S, Bito H

Facilitation of axon outgrowth via a Wnt5a-CaMKK-CaMKII α pathway during neuronal polarization.

Mol Brain. 9:8. (2016) (査読あり)

3, Inoue M, Takeuchi A, Horigane S, Ohkura M, Gengyo-Ando K, Fujii H, Kamijo S, Takemoto-Kimura S, Kano M, Nakai J, Kitamura K and Bito H.

Rational design of a novel high-affinity, ultrafast, red calcium indicator R-CaMP2

Nature Methods, 12, 64-70 (2015) (査読あり)

[学会発表](計 12 件)

招待講演

1, 藤井哉、井上昌俊、尾藤晴彦

Ca²⁺シグナル伝達のプローブ開発と多重イメージング

第 11 回 NIBB バイオイメージングフォーラム、岡崎、2017 年 2 月 14 日

2, Fujii H, Inoue M, Bito H

Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII and Calcineurin.

第 54 回日本生物物理学会年会シンポジウム、つくば、2016 年 11 月 26 日

3, 藤井哉、井上昌俊、尾藤晴彦

Ca²⁺シグナリングの可視化プローブの開発と多重イメージング

生理学研究所 研究会「シナプス伝達の細胞分

子調節機構」、岡崎、2016年11月21日

4, **Fujii H.**, Inoue M, Bito H
Development and imaging of new color indicators for Ca²⁺ signaling in living neurons.

第39回日本神経科学大会シンポジウム、横浜、2016年7月20日

5, **Fujii H.**, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII α and calcineurin. HHMI Janelia Conference “Fluorescent proteins and biological sensors IV”, Ashburn, VA, USA, 2014年9月30日

口頭発表

6, **藤井 哉**, 井上 昌俊, 奥野 浩行, 佐野 慶和, 竹本 - 木村 さやか, 喜多村 和郎, 狩野 方伸, 尾藤 晴彦. CaMKII α とCalcineurinによる神経入力情報の非線形デコーディング

Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII α and Calcineurin. 第37回日本神経科学大会、横浜、2014年9月11日

ポスター発表

7, **藤井 哉**, 井上昌俊, 尾藤晴彦
Rational engineering of sensors for hierarchical and orthogonal Ca²⁺ signaling

第8回「光塾」、東京工業大学すずかけ台キャンパス、横浜、2016年12月17日

8, **Fujii H.**, Inoue M, Bito H.
Rational engineering of sensors for hierarchical and orthogonal Ca²⁺ signaling. The 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2016年11月13日

9, **Fujii H.**, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H
Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input

Information by CaMKII α and Calcineurin., 第7回「光塾」、広島大学 東広島キャンパス、2015年9月5日-6日

10, Kamijo S, Suzuki K, Horigae H, **Fujii H.**, Takemoto-Kimura S, Bito H. Spontaneous L-type calcium channel activity regulates local calcium signaling in the neurites of developing cortical neurons. The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA, 2014/11/19

11, **Fujii H.**, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H. Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII α and calcineurin. HHMI Janelia Conference “Fluorescent proteins and biological sensors IV”, Ashburn, VA, USA, 2014年9月29-30日

12, **藤井 哉**, 井上 昌俊, 奥野 浩行, 佐野 慶和, 竹本 - 木村 さやか, 喜多村 和郎, 狩野 方伸, 尾藤 晴彦. CaMKII α とCalcineurinによる神経入力情報の非線形デコーディング. Nonlinear Decoding and Asymmetric Representation of Neuronal Input Information by CaMKII α and Calcineurin. 第6回イメージング若手の会「光塾」、神戸、2014年9月6-7日

〔図書〕(計 1件)

1, 藤井哉, “カルモジュリン”, **脳科学辞典** (DOI: 10.14931/bsd.4597) (2015) (査読あり)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0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 0件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
蛍光タンパク質・プローブ情報共有サイト
“ I love GFP ”
<https://sites.google.com/site/ilovegfp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 哉 (FUJII, Hajime)
東京大学大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：80717546

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()