

# 研究報告書

## 「リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 竹本-木村 さやか

### 1. 研究のねらい

神経細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇によって活性化される、 $\text{Ca}^{2+}$  依存性タンパク質リン酸化酵素 CaMK は、標的基質のリン酸化を介して神経機能修飾に寄与すると推測される。我々は、新規に同定した膜挿入型 CaMKI $\gamma$  が、培養神経細胞において樹状突起伸展作用を有することを報告したが、その脳内における生理

機能は長年不明である(Takemoto-Kimura et al. J Biol Chem. 2003, Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007, Takemoto-Kimura et al. European Journal of Neurosci. 2010)。興味深いことに、その手掛かりとして、本酵素が、成体マウス脳内で情動制御に関わる、扁桃体中心核や分界条床核など、大脳辺縁系に属する特定の神経核に非常に多く存在することを見出している。

本酵素は、これらの情動回路を構成する神経細胞内において、神経活動や様々なリガンドによって誘導される  $\text{Ca}^{2+}$  上昇によって活性化され、神経形態制御を介して情動制御に寄与するのか？また、その場合、どのような分子基盤を介するのか？これらの疑問に対し、酵素、細胞、マウス個体といった多階層にわたる研究を推進し、リン酸化による大脳辺縁系情動回路修飾機構の一端解明を目指した。

### 2. 研究成果

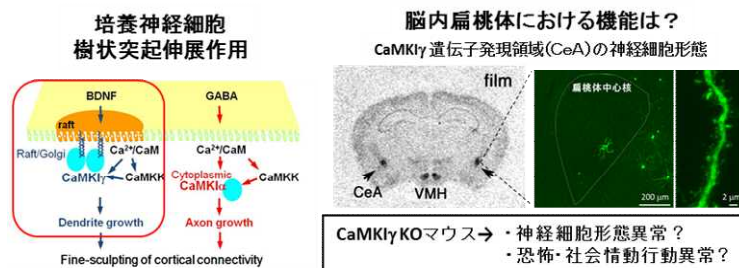
#### (1) 概要

本研究では、上述の、Q1 情動制御に寄与する神経回路修飾における機能解明、Q2 その分子基盤に対し、第1に、①遺伝子欠損マウス (*Camk1g*<sup>-/-</sup>) を用いた、恐怖記憶・社会情動行動の検討、第2に、②分子局在の解明ならびに扁桃体中心核の細胞形態異常について検討を行った。更に③分子基盤を理解するため、CaMKI $\gamma$  の酵素特性とシグナリングネットワークの解明を推進した。④同時に、今後の研究に不可欠である *Camk1g* 発現神経細胞種選択的に遺伝子発現が可能となる遺伝子改変動物の評価を行い方法論の確立を行った。

#### (2) 詳細

##### ①遺伝子欠損マウスを用いた恐怖記憶・社会情動行動異常の探索と神経活動異常

本酵素の遺伝子欠損マウスは、通常に発達し、脳内組織構築においても異常がないことを確認したうえで、行動解析を推進した。まず、扁桃体や分界上床核における発現パターンに



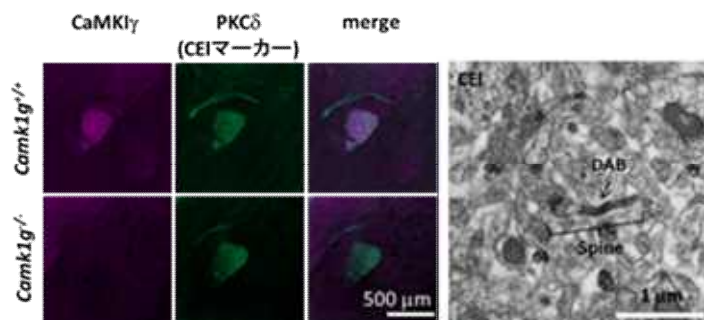
(図1) 本研究のねらい: 培養神経細胞の樹状突起伸展作用を有する  $\text{Ca}^{2+}$  依存性リン酸化酵素 CaMKI $\gamma$  は、CeA や BNST などの特定の神経核に発現する。これらの領域における機能解明とその細胞・分子基盤の解明を目指す。(Takemoto-Kimura et al. J. Biol. Chem. (2003); Takemoto-Kimura et al. Neuron (2007))

合致し、恐怖記憶が減弱することを明らかにした。また、1対1の社会行動(筑波大学・小川研究室、仲田先生)や、集団における社会行動(東京大学・遠山研究室、掛山先生、遠藤先生)において、異常をきたすことを見出した(Takemoto-Kimura, Nakata, Endo et al. 未発表)。

扁桃体中心核の社会情動行動制御における役割についての報告は限られているため、これらの行動時に、活動の認められる領域を IEG 誘導(c-fos の免疫染色)により検討したところ、社会的な刺激存在下で、恐怖行動に寄与する扁桃体 BLA-CeA 回路が活性化することを支持する結果を得た。更に、集団における社会行動時には、遺伝子欠損マウス(*Camk1g<sup>-/-</sup>*)において、扁桃体の IEG 誘導が亢進していることが分かった。

## ②分子局在の解明ならびに扁桃体中心核の細胞形態異常

遺伝子欠損マウス(*Camk1g<sup>-/-</sup>*)における、恐怖記憶・社会情動行動異常の細胞メカニズムを明らかにするため、まず、分子局在の詳細解明を行った。マウス成体脳抽出サンプルを用いて生化学的な脳組織分画法による検討を行ったところ、CaMKI $\gamma$ は粗シ



(図2) 特異的 CaMKI $\gamma$ 抗体を用いた免疫蛍光染色像(左)と免疫電顕像(右)。棘突起のネックや PSD に強い免疫原性(DAB)を認める。

ナプトソーム画分(crude synaptosomal fraction)に濃縮されることを見出し、本酵素のシナプス局在が示唆された。そこで、CaMKI $\gamma$ の神経細胞内局在の詳細解明のために至適な染色条件を見出し、免疫電顕での検討を行ったところ、本酵素が扁桃体中心核において、棘突起に局在することが明らかとなり、棘突起における役割が示唆された。

本酵素は培養系において神経細胞樹状突起形態を変化させる作用を有するため、扁桃体中心核(CeA)における樹状突起・棘突起形態変化を検討する目的で、海馬や大脳皮質などへのマウス個体 *in vivo* への AAV 導入法(文献1)を応用し、扁桃体 CeA 細胞をスパースに蛍光標識する方法を開発した。この方法により初めて、個々の CeA 神経細胞の形態検討が可能となり、*Camk1g<sup>-/-</sup>* の CeA 神経細胞棘突起の形態計測を行ったところ、分子局在と合致し棘突起の形態異常を見出した。

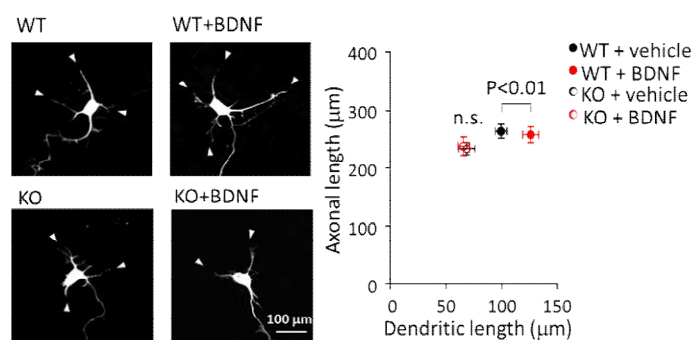
成果①②と、現在実施中の、遺伝子欠損マウスにおける、領域・細胞種選択的な遺伝子欠損を補うレスキュー実験や、領域選択的コンディショナルノックアウトマウスを用いた行動実験結果を合わせ(詳細は④に記述)、論文報告する計画である。

## ③CaMKI $\gamma$ の酵素特性とシグナリングネットワークの解明

上流のリガンド候補として注目される神経栄養因子 BDNF による樹状突起伸展作用における本酵素の寄与を、遺伝子欠損マウス由来初代培養系において検討した。BDNF による樹状突起伸展作用がノックアウト細胞では消失し、同条件下において樹状突起内で BDNF 依存的な  $Ca^{2+}$  変動が計測されることを見出した。

BDNF による  $\text{Ca}^{2+}$  変動は、神経活動の際に流入する  $\text{Ca}^{2+}$  に比べ少ないことが推測される。どのような  $\text{Ca}^{2+}$  変動によって、本酵素が活性化されるのか明らかにするため、精製した酵素を用いて、キナーゼ活性化機構ならびに最適基質配列の検討を行い基質候補の同定を行った。同定ペプチドならびに基質候補を用いて、カルシウム

感受性を計測したところ、予想外にも従来型 CaMKI とは異なり低カルシウムにおいてもリン酸化酵素活性を有し、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇に従い更に活性が亢進するという特性を見出した。また、BDNF 刺激によって、細胞内で本酵素の活性化に必要なリン酸化が増加することを確認し、BDNF  $\rightarrow \text{Ca}^{2+} \rightarrow \text{CaMKI} \gamma \rightarrow$  樹状突起伸展という経路が培養神経細胞において存在することが示された (Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。



(図 3) *Camk1g*<sup>-/-</sup>由来培養神経細胞 (KO) における BDNF 作用の消失 (Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

#### ④脳領域・細胞種選択的な遺伝子操作を目指した遺伝子改変動物の作出と評価

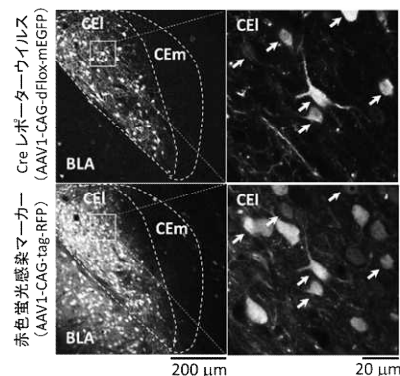
##### ④-1 *Camk1g*<sup>+/-</sup> (*Camk1g*-CrePR 系統) の評価

本研究で用いた *Camk1g* 欠損マウスはプロモーター制御下に誘導型 Cre リコンビナーゼ (CrePR) をノックインしており、Cre ドライバー系統としての活用が同時に期待される。CeA の *Camk1g* 発現細胞特異的な遺伝子操作法開発の第一段階として、*Camk1g*<sup>+/-</sup>を用いた細胞種選択的な遺伝子発現について AAV ウイルスをレポーターとして検討したところ、確かに扁桃体中心核の特定細胞における選択的な遺伝子発現が可能であることが分かった。本系統の活用により、*Camk1g* 発現細胞選択的な様々な検討 (遺伝子欠損を補うレスキュー実験、神経活動の操作や計測、細胞形態の標識、神経回路のトレーシングなど) が可能となり、今後の解析において有効な手段を得たと考える。

本系統 (*Camk1g*<sup>+/-</sup>)を用いて、*Camk1g* 発現細胞選択的に扁桃体において AAV ウイルスにより CaMKI $\gamma$  の発現を補った際に、行動異常のレスキューが可能か、現在検討中である。

##### ④-2 *Camk1g*<sup>flox/flox</sup> 系統の樹立

一方、遺伝子欠損を脳領域選択的に行うため、*Camk1g*<sup>flox/flox</sup> 系統の樹立を、新潟大学・崎村研究室と共同で行い、標的遺伝子の正常な発現確認と AAV-cre 発現による遺伝子欠損などの基礎検討を完了した。現在、扁桃体選択的遺伝子欠損マウスを作出し、情動行動に焦点を当てた行動異常の検討中である。



(図 4) *Camk1g*<sup>+/-</sup> の Cre リポーター活性。Cre レポーター (上段) は、感染マーカー (下段) と対照的に CEI 特定細胞に選択的な発現を示す (矢印)。

### 3. 今後の展開

本研究で明らかとなったリン酸化経路と発現回路に焦点をあて、脳領域・細胞種選択的な遺伝子操作を駆使した研究を更に推進することで、新たな扁桃体情動制御における分子・回路メカニズムが明らかになる。自閉症患者脳やモルヒネ中毒モデルマウス、BDNF 欠損マウスなど病的・病態モデル状況下において脳内の CaMKI $\gamma$  の発現が変化すると報告されており、生理機能のみでなく、病理機能も注目される。カルシウム依存性リン酸化経路は様々な細胞外情報が収束する細胞内シグナリングとして機能する可能性を有しており、本酵素を中心としたシグナリングネットワークの解明を推進することで特定情動回路の調整破綻に起因した疾患に対し分子的側面からの基礎的知見提示へと繋がることが期待される。また、本研究により、見出された、*Camk1g*<sup>+/-</sup> (*Camk1g-CrePR* 系統) の cre ドライバーとしての活用は、神経活動操作を用いた神経ネットワークの研究にも応用可能であり、これらの神経ネットワークが寄与する新規機能の解明につながることを期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本さがけ研究では、自身で同定・クローニングしその細胞機能を明らかとしてきた CaMK について、脳神経機能解明をめざし遺伝子欠損マウスの行動解析ならびに細胞形態変化についての検討を行った。更に、精製酵素、培養細胞を対象として分子特性、シグナリング解明をより一層進めるとともに、神経回路そのものの理解に不可欠である *Camk1g* 発現神経細胞選択的に任意の遺伝子発現が可能になる方法論の確立を行った。

本研究により、新たな実験手法の導入を行うことで、研究を効率的に推進することで成果を得た。具体的には、行動異常のメカニズムを解明するために、所属研究室において行動解析系を導入し、IEG mapping による神経回路同定を実施する体制を整え、さらに、*in vivo* において、これまで技術的に困難であった扁桃体 CeA 神経細胞の形態を詳細に検討する手法をセットアップが可能となった。これらにより、作業仮説を支持する結果を得ることに成功した(上記①②)。同じキナーゼファミリーに属し、神経可塑性との研究が著しく進む CaMKII や CaMKIV とは対照的に、CaMKI の個体における脳神経機能は全く未解明で、CaMKI ノックアウトマウスの行動・細胞形態異常は世界に先駆けた発見であり、取得中の追加データを加えて投稿を進める計画である。

また、CaMKI $\gamma$  リコンビナント酵素を用いた結果(上記③)について、リン酸化酵素がその活性を発揮する条件を知ることは、脳神経機能を解明するうえで大変重要であり、意外にも低  $\text{Ca}^{2+}$  によっても活性化され、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇により徐々に活性が亢進するという、CaMKI の新たな活性化様式の発見につながった(Suzuki, Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。今後は、見出した生化学的な特性、即ち、BDNF による活性化および低  $\text{Ca}^{2+}$  による活性化が、神経細胞内で保たれることを、神経刺激に応答して CaMK の活性を計測する新たな手法(文献2)により計測する計画を推進している。

遺伝子欠損マウスの表現型が明らかになり、病態との関連も示唆されるなか、培養神経細胞モデルに加え、*Camk1g* 発現細胞種における *in vivo* シグナリングネットワークの解明が喫緊の課題と考える。この課題に取り組むために、*Camk1g* 発現細胞種に選択的な遺伝子導入が有効な手段であり、実施可能であることを実証できた点(上記④-1)は、大きな第一歩と考え

る。

## (2) 研究総括評価

竹本研究者は先にプロテインキナーゼ CaMKI $\cdot$ を同定クローニングし、この酵素が情動に関わる扁桃体などに特徴的な分布をなすこと、また培養神経細胞の突起伸展に関わることを明らかにした。本研究では CaMKI $\cdot$ の情動神経回路における役割を、その組織学的局在、酵素学的解析、BDNF から Ca を介するシグナル系の解析、さらに遺伝子改変マウスを用いた行動解析によって明らかにしようとしたものである。この間の研究により CaMKI $\cdot$ が扁桃体中心核神経細胞の棘突起に局在し生化学的分析結果と対応すること、他の CaMK とは異なり低 Ca でベーサルな酵素活性を示すこと、その欠損細胞で BDNF の神経突起伸展作用が消失すること、さらにその欠損マウスでは社会行動の異常を示すことを見出しており、これらは重要な成果である。また扁桃体においてより精密な遺伝子制御実験を可能にするためのツール開発も進めている。近く行動実験の成果を含め大きく纏まった成果が十分に期待できる。今後遺伝子欠損マウスでのレスキュー実験が成功し、in vitro での実験結果と生体での知見との関係をより明確にすることができれば、自閉症やモルヒネ中毒など扁桃体に関わる神経疾患の病理と対処法に手掛かりが得られることも期待できる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Kawashima T, Kitamura K, Suzuki K, Nonaka M, Kamiyo S, **Takemoto-Kimura S**, Kano M, Okuno H, Ohki K, Bito H. Functional labeling of neurons and their projections using the synthetic activity-dependent promoter E-SARE. **Nat Methods**. 10:889-95 (2013)
2. 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 $\alpha$  and calcineurin. **Cell Rep**. 3:978-87 (2013)
3. Okuno H, Akashi K, Ishii Y, Yagishita-Kyo N, Suzuki K, Nonaka M, Kawashima T, Fujii H, **Takemoto-Kimura S**, Abe M, Natsume R, Chowdhury S, Sakimura K, Worley PF, Bito H. Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII $\beta$ . **Cell**. 149:886-98 (2012)

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

## 総説

1. **Takemoto-Kimura S**, Suzuki K, Kamiyo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H and Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation–morphogenesis

coupling during formation and maturation of neuronal circuits.

**European Journal of Neurosci.** 32: 224–230 (2010)

2. 竹本一木村さやか

CaMKK-CaMKI 経路による神経突起伸展の制御と大脳皮質構築。

神経化学 51(3), 65~70 (2012)

**受賞**

第 13 回日本神経化学会奨励賞受賞(2012)

**学会発表**

1. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Suzuki S, Bito H.

Control of neuritogenesis and cortical circuit formation via CaMKK-CaMKI cascades. 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム発表 (2013)

2. Inoue M, Fujii H, Okuno H, Takemoto-Kimura S, Bito H. Resolving CaMKK-CaMKIV signal transfer from synapse to nucleus. 第 36 回日本神経科学学会口頭発表(2013)

3. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Bito H. Differential roles for CaM kinases in mediating excitation morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits. International Conference of Physiological Sciences. シンポジウム発表 (2012)

4. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamiyo S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel functions of Ca<sup>2+</sup>-dependent phosphorylation cascades in neuritogenesis and emotional behavior. 第 35 回日本神経科学大会シンポジウム発表 (2012)

5. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Kamiyo S, Inoue M, Fujii H, Ageta-Ishihara N, Okuno H, Bito H. 発達期大脳皮質神経細胞の樹状突起伸展を制御するカルシウム/カルモジュリン依存性タンパクリン酸化酵素 Igamma の生化学的特徴。第 85 回日本生化学会年会口頭発表 (2012)

6. Takemoto-Kimura S, Horigane S, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamiyo S, Nonaka M, Okuno H, Bito H. Novel roles of CaMKK-CaMKI cascades in neuritogenesis and circuit formation. 第 34 回日本分子生物学会年会シンポジウム発表 (2011)

7. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Horigane S, Kamiyo S, Inoue M, Fujii H, Okuno H, Bito H. Activity-dependent regulation of dendritogenesis via CLICK-III/CaMKI $\gamma$  in developing cortical neurons. Neurosci. Abs. 230.04, 2011. 第 41 回北米神経科学学会年会ポスター発表, Washington DC, USA. (2011)

8. Suzuki K, Takemoto-Kimura S, Kamiyo S, Inoue M, Fujii H, Ageta-Ishihara N, Okuno H, Bito H. Molecular basis of CLICK-III/CaMKI $\gamma$  -mediated dendritogenesis in developing cortical neurons. 第 34 回日本神経科学大会口頭発表 (2011)