

研 究 報 告 書

「シグナル分子の活性化観察と操作によるシナプス可塑性機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研 究 者: 村越 秀治

1. 研究のねらい

神経回路の形成・機能の基礎となるシナプス結合の可塑性は、シナプスの後端を形成するスパイン内の情報伝達系によって制御されていると考えられる。しかしながら、スパイン内の生化学反応システムについては、調べる方法論がないためにこれまで殆ど分かっていなかった。本研究では、海馬組織深部神経細胞のスパイン内分子活性化を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いて直接可視化する。このようにして、各種シグナル分子活性の時空間パターンを調べることで、シナプス可塑性を可能にするシグナル伝達システムを明らかにする。また、独自の光応答性シグナル分子を開発し応用することで、分子活性と機能の因果関係にまで迫ることを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究により、光照射によってシグナル分子活性を操作することができる光応答性分子の新規開発に成功した。この分子を用いて、海馬神経細胞のシナプス可塑的变化惹起時のCaMKIIの役割を詳細に調べることで、CaMKIIが可塑的变化を誘起することが分かり、さらに活性化時間を光操作することで、表現型が変わることを見出した。一方で、分子活性化をモニターするための新規蛍光分子やシグナル分子プローブの開発にも成功しており、今後の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた分子活性化イメージングを高精度・低毒性で行うことができるようになっただけでなく、in vivo イメージングへの応用の足掛かりができた。

(2) 詳細

研究テーマ1「光応答性 CaMKII 阻害分子の開発」

シナプス結合の可塑性は、学習や記憶の最小単位と考えられている重要な細胞現象である。中枢神経系の興奮性シナプスにおいて、後シナプスは、マッシュルームのような形をした直径0.5マイクロメートル程度の突起になっており、この構造をスパイン(棘突起)と呼ぶ。記憶学習の基盤となるシナプス可塑性は、スパイン内部の分子によるシグナル伝達によって発生すると考えられている。これまでに、スパイン構造が情報伝達タンパク質の局在や活性化を制御するうえで重要であると考えられており、実際にシナプス結合の増強や減弱に伴って、スパインの大きさも増大、縮小することが知られている。しかしながらどのような分子メカニズムによってこのような形態変化が起こっているのかは殆ど分かっていない。本研究では、Rho GTPase やアクチンを制御することでシナプスの可塑性にとって重要な役割を果たしていると考えられる CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御することができる分子を

開発し、これを用いてシナプス可塑性発現に対する CaMKII の役割を調べた。

1) 遺伝子工学を用いた光活性型 CaMKII 阻害分子の開発

CaMKII の活性を制御できるようにするため、植物の光受容タンパク質キナーゼである Phototropin1 の LOV2ドメインを用いた。LOV2ドメインは青色光照射によって、その分子構造が可逆的に変化する。本研究では、CaMKII の阻害ペプチドである AIP2 に LOV2 を遺伝子工学的に融合させ、光照射依存的に AIP2 の活性が変化するようにし、paAIP2 (photo-activatable AIP2)と名付けた(図 1A)。光照射依存的な paAIP2 の CaMKII への結合のタイムコースを詳細に調べるために、GFP を融合させた CaMKII と RFP を融合させた paAIP2 を HeLa 細胞に発現させ、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡により観察したところ、paAIP2 の CaMKII への結合が青色光照射後 30 秒以内に見られた(図 1B)。CaMKII に結合しない AIP2 の変異体(R5AR6A)では光照射を行っても結合は見られなかった(data not shown)。このことは光照射依存的に AIP2 の CaMKII への結合が起きていることを示している。

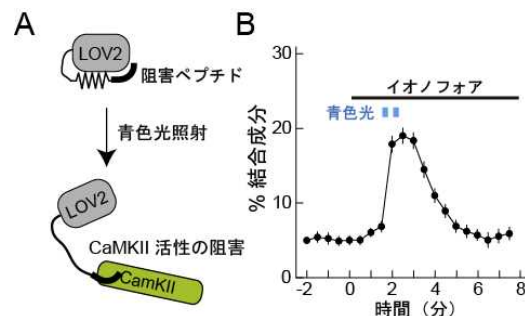


図 1. 遺伝子工学を用いた光活性型 CaMKII 阻害分子の開発
(A) 光活性型 CaMKII 阻害分子の構造。
(B) 青色光照射後の結合のタイムコース。

2) paAIP2 によるスパイン可塑的变化の阻害

次に光照射による CaMKII 阻害がケイジドグルタミン酸刺激により誘起されるスパイン体積の可塑的な変化を阻害するかどうかを調べた。まず、海馬スライスの CA1 領域にある神経細胞に遺伝子銃を用いて GFP と paAIP2 を発現させた。ケイジドグルタミン酸による 2 光子単一スパイン刺激 (0.5 Hz で 30 パルス) を行ったところスパイン体積は一過的に3倍程度増大した後、収縮し、刺激前よりも 2 倍程度の体積の状態を 20 分以上持続していた(図 2)。次に、スパイン体積の可塑的な変化を引き起こすのに必要な CaMKII 活性化の時間領域を調べるためにグルタミン酸によるスパイン刺激と青色光照射のタイミングを少しずつずらしながら実験を行った(図 2)。グルタミン酸刺激と青色光照射のタイミングを完全にオーバーラップさせた場合には、スパイン体積変化がほぼ完全に抑制された。次に、刺激と青色光照射のタイミングを 10 秒、30 秒、60 秒とずらしていったところ、Tshift が 30 秒のときに一過的な体積変化が回復し、Tshift が 60 秒で一過的な変化と持続的な変化が両方とも回復した。この結果は CaMKII は可塑的变化初期の段階で重要であることを示唆している。

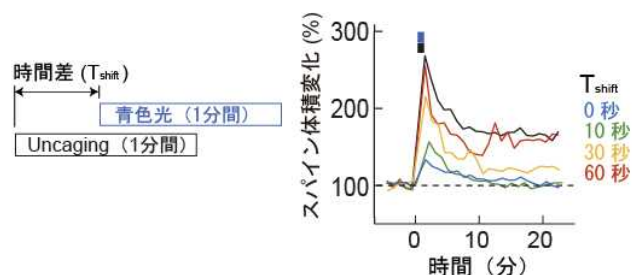


図 2. グルタミン酸によるスパイン刺激と青色光照射のタイミングをずらした時のスパイン体積変化をモニターした。

研究テーマ2「新規 CaMKII FRET センサーの開発」

現在のところ、組織深部のシナプス内でタンパク質分子の活性化や分子間相互作用を直接

観察する最も有力な方法は2光子蛍光寿命イメージング法によって蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を観察することである。すなわち、興味のあるシグナル分子に2種類の蛍光タンパク質分子を融合させることで FRET センサーを作製し、細胞に発現させ、FRET を観察することによって分子の構造変化を可視化する。当然ながら、高感度な FRET センサーを用いれば精度の高い計測ができるため、これまでに様々な蛍光タンパク質の組み合わせやリンカー配列の最適化が試されてきた。しかしながら、シグナル分子自体に変異を導入し FRET センサーのフォールディング効率を高める試みはなされてこなかった。そこで本研究では、CaMKII の結合ドメインに着目し、エラー誘発 PCR によって下流の蛍光分子のフォールディング効率を高める変異体を作製した。これによって従来の FRET センサーと比べて個々の細胞のシグナルのバラツキを大きく減少させるとともに発現パターンも改善することに成功した。

1) ランダム変異導入による高感度 CaMKII FRET センサーの作製

CaMKII 自身に変異を導入し、下流の蛍光タンパク質のフォールディング効率を上昇させることによって、CaMKII FRET センサーを高感度化することを目的とした。このために、CaMKII の結合領域をエラー誘発 PCR によって増幅し、大腸菌ベクターに導入し大腸菌をトランスフォーメーションすることでライブラリーを作製した(図3)。ここから明るい赤色コロニーをピックアップしシークエンスすることによって、結合領域に4つの変異を同定した。

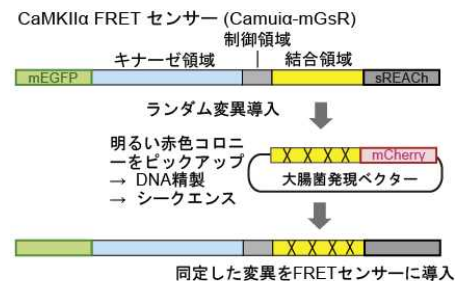


図3. CaMKII FRET センサーの分子進化。

2) 高精度 CaMKII FRET センサーによる活性化イメージング

同定した4つの変異を CaMKII FRET センサーに導入し、感度が上昇しているかどうかをテストした(図4)。FRET センサーを HeLa 細胞に発現させ、イオノフォアにより細胞内への Ca^{2+} 流入を引き起こす。これによって活性化した Calmodulin の結合により、CaMKII は活性化する(図4A)。これを2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡により観察することによって感度が上昇しているかどうかを調べた。この細胞での CaMKII 活性化を観察し、そのタイムコースを調べたところ、オリジナルの FRET センサー(図4C)と比べて、変異体の方(図4D)は、平均としては感度は上昇していなかったが、反応のバラツキが明らかに小さくなっていた。すなわち、細胞の反応を極めて高精度に測定することが可能になったと考えられる。反応のバラツキが小さくなった原因はおそらく、CaMKII の結合ドメインに変異を導入したことによる下流の蛍光タンパク質 (sREACH) のフォールディング効率の上昇によるものであると考えられるが、詳細は今のところ不明である。

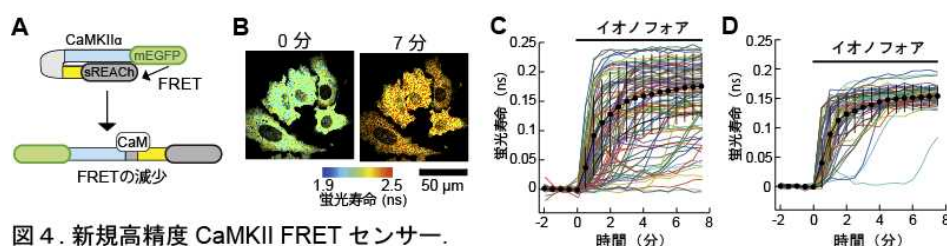


図 4. 新規高精度 CaMKII FRET センサー。

FRET センサーの変異体を神経細胞に導入しケイジドグルタミン酸による単スパイン刺激を行ったところ、刺激したスパイン内で CaMKII の活性化が観察され、スパイン体積の増大も観察された(図5)。このことは本研究で作製した FRET センサーが神経細胞の微小コンパートメント内にも適用可能であることを示している。さらに、細胞毎の反応を高精度に捉えることができるので in vivo における多細胞の同時観察にも使用し易い。

ここで用いた方法は CaMKII の FRET センサーだけでなく、様々な FRET センサーにも適用可能である。

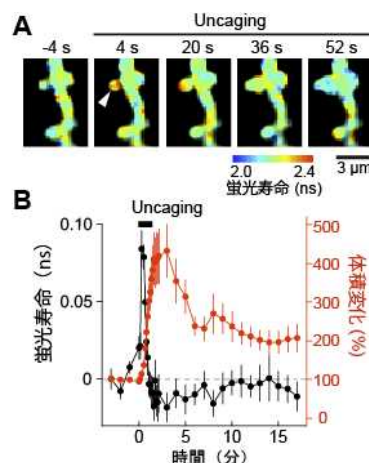


図 5. 単スパイン内 CaMKII 活性化。

3. 今後の展開

本研究で、CaMKII 活性を光操作することが可能な分子を開発することに成功した。また、分子活性を高精度でモニターするための蛍光タンパク質やシグナル分子プローブの開発にも成功した。これらの光ツールは、生きた個体動物への応用も可能なものであり、今後、記憶・学習とシナプス状態の機能連関を明らかにしていきたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

神経細胞シナプス内でシグナル分子活性を高時間分解能で光操作することに成功した。すなわち、植物タンパク質である Phototropin1 の LOV2 ドメインを用いることで CaMKII 活性を光操作することが可能な分子の開発に成功した。さらにこの分子をシナプス可塑性機構の研究に応用することで、CaMKII がスパイン体積増大の初期過程でのみ重要であること、また、CaMKII 活性化が変化の惹起に十分であることを見出した。これらの結果は、細胞内シグナル分子を直接活性化し、その細胞応答を計測するという新しいアプローチの確立に繋がるだけでなく、生きた個体動物への応用にも有用であると考えられる。また、一方で、分子活性化をモニターするための新規蛍光分子やシグナル分子プローブの開発にも成功しており、今後の2光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた分子活性化の高感度イメージングや In vivo イメージング等を高感度・低毒性で行うための足掛かりができた。これらの結果はさきがけ研究の開始時より、実験装置が全くない状態から自作 2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡の構築を含む様々な工夫、試行錯誤の結果である。

(2)研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

脳の大型神経細胞の樹状突起にはシナプスを受ける小突起があり、このスパインは機能的にも形態的にも可塑性を示し、これがシナプス機能の調整に重要であると考えられている。本研究は、特にこのスパイン内で Rho GTPase やアクチンを制御してシグナル伝達の鍵を握るプロテインキナーゼ CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御することができる蛋白性分子を作出して、シナプス可塑性を局所的に操作する分子活性化イメージングを開拓しようとするものである。実際に植物由来の LOV2 ドメインを利用した光活性型 CaMKII 阻害分子 paAIP2 の作出に成功し、スパイン可塑性の特性を解析した。さらに蛍光共鳴エネルギー移動を利用した CaMKII FRET センサーを作成し改良を重ねて高感度高精度低毒性の活性化イメージングにも成功している。これらは本課題の根幹的技術開発を達成したものである。これらのツールを用いて培養細胞におけるスパインの形態的可塑性の特性を解析したが、今後は他にも開発している分子なども合わせて生体内でのイメージングに発展させ、国際的にも注目される成果が十分に期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Uezu A, Okada H, Murakoshi H, Del Vescovo CD, Yasuda R, Diviani D, Soderling S. A Modified SH2 Domain to Phototrap and Identify Phosphotyrosine Proteins from Subcellular Sites within Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, E2929– E2938 (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)

国内学会 招待講演

1. 村越秀治「神経細胞シナプス内生化学反応の可視化と光操作」
第 87 回日本生化学会大会 京都 2014 年 10 月
2. 村越秀治「CaMKII によって活性化された Rho GTPase の協同的作用によるシナプス可塑性誘起」第 52 回日本生物物理学会 北海道 2014 年 9 月
3. 村越秀治 「2 光子励起技術による単一スパイン内生化学反応の可視化と操作」
Neuro2014 (第 37 回日本神経科学学会) 横浜 2014 年 9 月

4. 村越秀治 「シナプス可塑性に関与するシグナル分子活性化の可視化・制御」

第 119 回解剖学会 栃木 自治医科大学 2014 年 3 月

5. 村越秀治 「Imaging and controlling the activity of signaling molecules in dendritic spines of hippocampal neurons」 第 51 回日本生物物理学会 京都 2013 年 10 月

6. 村越秀治 「Optogenetic manipulation of CaMKII activity in neuron」

Neuro2013 (第 36 回日本神経科学学会) 京都 2013 年 6 月

受賞

2011 年 日本生物物理学会若手奨励賞受賞

国際学会 招待講演

Hideji Murakoshi Imaging Rho GTPases activation in single dendritic spines by 2-photon fluorescence lifetime imaging microscopy.

The 8th Asian Biophysics Association Symposium. Jeju, Korea, May 2013.

著作物・総説

1. 村越秀治「シナプス内シグナル分子動態イメージング」

ブレインサイエンスレビュー ブレインサイエンス振興財団 (in press)

2. Murakoshi H. Optogenetic imaging of the activity of signaling molecules in synapse by 2-photon fluorescence lifetime imaging. Optogenetics, Springer. (in press)

3. 村越秀治 「第三篇第1章6節 オプトジェネティクスによる神経細胞シナプス内シグナル伝達分子活性化イメージング」 オプトジェネティクス(光遺伝学) (株)エヌ・ティー・エス 2013 年 4 月 p235-243

4. Murakoshi H, Yasuda R. Postsynaptic signaling during plasticity of dendritic spines. Trends in Neurosci. 35, 135-143 (2012)

5. 村越秀治 「二光子蛍光寿命イメージングによる Rho GTPase 活性化の単一シナプスレベル可視化解析」生物物理 2012 年 6 月 52(3) p158-159