

カルシウム依存的リン酸化経路による新規情動制御機構

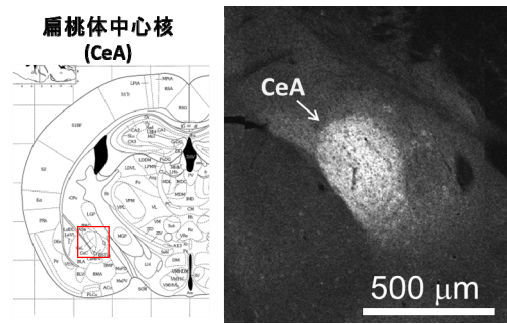
名古屋大学環境医学研究所 神経系分野 I

竹本（木村）さやか

1. 目的

情動(怖い、嬉しい、悲しいなど)は、環境や遺伝的背景に応じて変化し、過度なストレスなどによる情動異常が、現代における社会問題ともなっている。我々は、モデル動物(マウス)を用いて、情動変化を引き起こす分子メカニズムならびにそれに伴う神経活動変化を解明することを目指している。

特に神経Ca²⁺によって活性化されるCa²⁺依存的リン酸化酵素であるCaMKIに着目して研究を推進した結果、同定・クローニングを行った膜アンカー型CaMKI γ /CL3が、不快情動中枢を構成する扁桃体の主たる出力核である、扁桃体中心核 (CeA) に特徴的な発現を示すことを見出し (Takemoto-Kimura et al. 2003, 図1)、その脳機能解明を推進している。本酵素は、培養神経細胞の樹状突起の伸展を制御し、その分子特性からも“扁桃体中心核神経細胞において可塑的变化を担う主要なCa²⁺エフェクター分子である可能性が高い”と考えられる (Takemoto-Kimura et al. 2007)。本研究では、この作業仮説を立証し、扁桃体中心核の特定神経細胞において情動制御に寄与する、新規カルシウム依存的シグナリング経路を明らかにすることを目的とした。



(図1) CaMKI γ 遺伝子は扁桃体中心核 (CeA) で高発現を示す、Ca²⁺依存的リン酸化酵素である。

2. 方法

扁桃体出力核として、その活動が情動反応へ直接影響を与える、扁桃体中心核において、CaMKI γ /CL3が神経活動制御に寄与し情動変化を引き起こすことを立証するために、下記の方法にて検討した。

①CaMKI γ が情動制御において主要な機能を果たす細胞種の解明

扁桃体中心核には複数の神経細胞種が存在する。CaMKI γ の発現する細胞種を明らかにするために、各細胞種においてCaMKI γ をノックアウトあるいは過剰発現した際の、情動行動変化を検討することを目指した。そのため、扁桃体中心核特定神経細胞においてCaMKI γ を欠失させるコンディショナルノックアウトマウスの作出を目指した。また、扁桃体中心核特定神経細胞においてcreリコンビナーゼを発現するcreドライバーラインの樹立を進め、評価した。更に、アデノ随伴ウイルスを用いて、扁桃体中心核特定神経細胞においてCaMKI γ の過剰発現を行った際の行動学的検討を推進した。

②CaMKI γ 陽性細胞の恐怖・不安刺激下での神経活動の可視化

CaMKI γ 陽性細胞が情動表出の際にどのような活動を示すのか、また、CaMKI γ の欠失や過剰発現が、神経活動にどのような変化をもたらすのかを解明するために、扁桃体中心核CaMKI γ 陽性細胞の活動を*in vivo*で可視化する方法の確立を推進した。①において評価を進めたcreドライバーラインを活用し、Ca²⁺インディケーター (GCaMP6) をアデノ随伴ウイルスを用いてCaMKI γ 陽性細胞にて発現させ、自由行動下における神経活動変化を計測した。

③扁桃体中心核情動制御因子BDNF(脳由来神経栄養因子)との関係

申請者は、培養神経細胞を用いて、CaMKI γ が神経由来成長因子BDNFの下流で樹状突起伸長を促進するエフェクター酵素であることを見出している。近年、扁桃体中心核において、BDNFシグナリングの亢進が不快情動の増強に寄与すると報告され、扁桃体中心核においても、BDNF-Ca²⁺-CaMKI γ 経路が存在し、不快情動制御に寄与する可能性が浮上している。ノックアウトマウスにおけるBDNF作用を検討するために、BDNFの扁桃体中心核脳局所投与による恐怖記憶の増強作用について検討した。

3. 結果 研究成果

上述の研究方法により、下記の結果および成果を得た。

①CaMKI γ が情動制御において主要な機能を果たす細胞種の解明

複数の細胞種の中で、CaMKI γ が多く発現する細胞種を同定し、マウス成体脳内において本細胞群においてCaMKI γ を過剰発現すると、特定の情動行動が変化することを見出し、本酵素が回路活動の可塑性を誘導することを支持する結果を得た。また、コンディショナルノックアウトマウス作成に適したcreトライブラインを選択し、新たに樹立したflox系統と交配した。

②CaMKI γ 陽性細胞の恐怖・不安刺激下での神経活動の可視化

扁桃体中心核CaMKI γ 陽性細胞において、自由行動下における神経活動の計測を、小型蛍光顕微鏡と蛋白性Ca²⁺インディケーターを用いて実施する方法を確立した(図2)。これにより情動行動を惹起する刺激を与えた際の神経活動を計測することが可能である。今後、CaMKI γ ノックアウトや過剰発現における神経活動変化を計測し、行動変化との関係を検討する計画である。

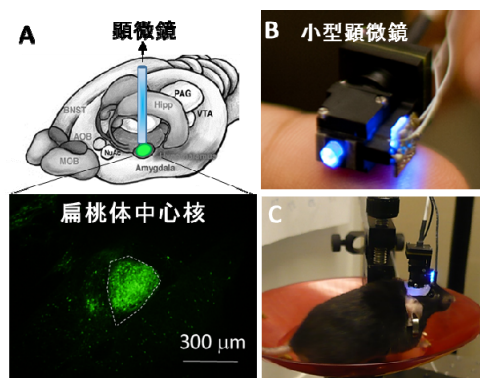
③扁桃体中心核情動制御因子BDNF(脳由来神経栄養因子)との関係

扁桃体中心核にBDNFを局所投与し、恐怖条件付け記憶試験をモデルとして情動行動の変化を検討することを試みた。現在までに複数の投与条件を検討しているが、再現性良く情動行動変化を誘導する投与条件が確定できず、更に投与条件の至適化を推進している。

4. 考察 まとめ

CaMKI γ は、培養神経細胞において神経突起伸長を制御するCaMKファミリー群であることが複数の研究グループより報告されている(Takemoto-Kimura et al. 2010)が、脳内における生理機能は未だ不明である。我々は、CaMKI α およびI γ の脱オープン化を進めており、神経回路形成(Ageta-Ishihara et al. 2009; Horigane et al. 2016)や可塑的变化における機能解明を目指してきた。

本研究では、特に不快な情動制御に寄与する扁桃体中心核における高い発現に着目し、CaMKI γ を介した情動制御機構の解明を推進する研究である。本研究により、「不快情動の出力核である扁桃体中心核神経細胞の活動制御」という、CaMKIの脳内機能が初めて示され、解明の遅れる情動制御に寄与する神経細胞の可塑性発現機構の分子メカニズムの一端が明らかとなる。特に、その発現細胞種を詳細に検討し、見出された発現細胞種において分子操作を実施し行動学的検討を行うこと、またそれに伴う回路活動変化の計測を新規技術を駆使して連動して行うことで、分子—回路—行動制御という多階層に渡る研究が可能となる。特定の神経回路における分子操作とそれに伴う脳機能変化を明らかとすることで、これまでの研究では見落とされてきた、情動制御に直結する機能分子の解明に繋がることが期待される。



(図2) (A) 神経活動可視化の概略図。扁桃体中心核選択的に蛋白性Ca²⁺プロローブ(GCaMP)をウイルスベクターで発現、神経活動に伴うCa²⁺変動を円柱の小型レンズ(GRINレンズ)(A, 挿入図, 水色円柱)を通して記録。(B) 記録に用いる約2gの小型蛍光顕微鏡(inscopix社)。(C) マウス頭部に小型顕微鏡を固定し自由行動下で50個以上の細胞から神経活動計測が可能である。

5. 発表論文、参考文献

Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Arakawa Y, Furuyashiki T, Narumiya S and Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKIgamma, a novel membrane-anchored neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). *J Biol Chem* 278, 18597-18605 (2003)

Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H and Bito H. Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. *Neuron* 54, 755-770 (2007)

Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H and Bito H. Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* 29, 13720-13729 (2009)

Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo 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. *Eur J Neurosci* 32, 224-230 (2010)

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-CaMKIalpha pathway during neuronal polarization. *Molecular Brain* 16;9(1):8. doi:10.1186/s13041-016-0189-3 (2016)