

光計測と光操作による脳内生化学シグナルの解明

東京大学大学院医学系研究科神経生化学分野

藤井 哉

1. 背景

脳は時々刻々と変わりゆく外部環境からの入力、神経回路を構成するニューロンの電氣的活動（活動電位やシナプス電位）と生化学的活動（酵素活性や遺伝子発現など）によって情報処理し、適切な行動として出力する（参考文献 1~6）。この情報処理のプロセスを神経細胞・シナプスという、脳をつくる基本構成単位からボトムアップに理解することは、神経科学のみならず、神経疾患や薬物依存などの病態を理解する上で非常に重要である。21世紀に入り、生きた脳の神経細胞の電氣的活動を電気生理学・ Ca^{2+} イメージングによって「計測」し、光遺伝学で「操作」という新たな順・逆向方向からのアプローチが開拓され、神経回路での電氣的活動の意義が明らかにされつつある。しかし、一方の生化学的活動に関しては、多くの研究が時空間分解能の低い方法（生化学的解析、遺伝子改変動物や薬理的介入）で行われており、シナプス・細胞・細胞集団レベルでの活性の時空間パターンやその生理的意義は未だによくわかっていない。本研究では、この問題に答えるため、神経細胞において高い時空間分解能での生化学的活動の光計測と光操作の方法論を開発する。特に脳機能や神経可塑性に重要な役割を果たす Ca^{2+} 依存的なリン酸化・脱リン酸化シグナル伝達（ Ca^{2+} /カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリン、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性リン酸化酵素II（CaMKII）の可視化プローブを開発するとともに、ケイジドグルタミン酸光誘拐法といった光操作手法と組み合わせることで、様々な脳機能解析への応用を目指す。

2. 方法

2-1、プローブの作製

ドナー・アクセプター蛍光タンパク質をPCR法により増幅し（Thermo Fisher Scientific社SimpliAmp）、カルシニューリンおよびCaMKIIに組み込み、合計31種類のFRETプローブを開発した。これらプローブを組み込んだ哺乳類発現ベクタープラスミドを作成し、以下の実験で使用した。

2-2、初代培養海馬神経細胞でのイメージング

哺乳0日~1日齢のSDラットより初代培養海馬神経細胞を作成し、培養9日目にリポフェクションにより蛍光プローブのプラスミドを導入した（参考文献 2, 5）。FRETプローブのイメージングは倒立型顕微鏡（Olympus, IX-81）に二波長イメージスプリッティング光学系（浜松ホトニクス社 W-view）を組み合わせ、ドナーとアクセプターからの蛍光を分離し、EM-CCD カメラ（浜松ホトニクス社ImagEM）を用いて計測した。グルタミン酸光融解には紫外線レーザー（New-Wave Research社、Polaris II）を用いた。イメージングにより得られた画像は、画像解析ソフトFijiを用いて関心領域を設定し、その中での蛍光輝度変化を解析した。

3. 結果

3-1、生化学シグナル光計測プローブの開発

カルシニューリンおよびCaMKIIは基底状態では自己抑制ドメイン（AID）と触媒ドメインの相互作用によって酵素活性が抑制されているが、 Ca^{2+} /カルモジュリンの結合によってコンフォメーション変化が聞き起こされて、触媒ドメインがAIDから解放されて活性化される。本研究では、この活性化に伴うコンフォメーション変化をFRET（蛍光共鳴エネルギー移動）として蛍光スペクトル変化に変えて可視化するFRETプローブを開発した（図1）。

そのために、申請者が先行研究において開発したカルシニューリン・CaMKIIプローブ（参考文献5）を骨格として、合理的な高性能プローブ設計や長波長化による多色化・高組織透過性（参考文献2）を適応し、PCRおよび制限酵素を用いたDNAコンストラクションにより、リンカー長の調整や新型高輝度蛍光タンパク質の利用した新規FRETプローブを開発、高性能プローブのスクリーニングを行った。その結果、初代培養海馬神経細胞においてダイナミックレンジが向上した新型カルシニューリンプローブの開発に成功するとともに、高輝度化・長波長化した新型CaMKIIプローブの開発に成功した。

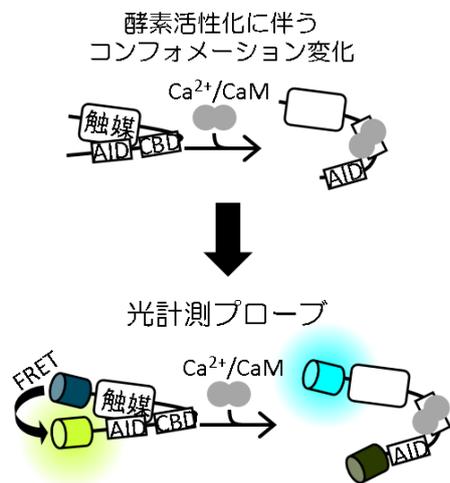


図 1、活性化に伴う酵素のコンフォメーション変化を利用した酵素活性化可視化 FRET プロープのデザイン

3-2、神経細胞における光計測と光操作

初代培養海馬神経細胞において開発した高ダイナミックレンジ・高輝度の新規カルシニューリンプローブおよび新規CaMKIIプローブを発現させ、光融解グルタミン酸刺激による単一シナプス刺激に対する生化学応答のダイナミクスを計測した。その結果、シナプスおよび樹状突起におけるカルシニューリンおよびCaMKIIの時空間的な生化学シグナルの違いが明らかとなった。

4、考察・まとめ

本研究において、従来型よりもダイナミックレンジが向上した新型カルシニューリンプローブおよび、高輝度CaMKIIプローブの開発に成功し、多重FRETイメージング法を用いた高時空間分解能での生化学シグナルのダイナミクス計測の礎を築くことができた。生体内でのシグナル計測は非常にS/Nが低い場合が多く、そうした意味で高ダイナミックレンジ・高輝度のプローブは非常に有用であり、今後脳内での生化学活性測定に応用されると考えられる。

また、本研究はシナプス可塑性が誘導されたシナプスと、樹状突起やその隣のシナプスにおけるリン酸化・脱リン酸化シグナルのバランスの定量と、その生理的機能を解明する今後の試みに大いに役立つと考えられる。特にカルシニューリンの下流で活性化される因子(例えばCRTCI)はシナプスから核へのシグナリング(参考文献3)やヘテロシナプス性のシナプス可塑性に重要な役割を果たしていると考えられており、シナプス・樹状突起・神経細胞レベルでの脳機能解明に重要な役割を果たすと考えられる。本研究ではこうした神経細胞シナプスにおける脳内生化学シグナルの一端を明らかにしており、今後、こうした絶妙に調整された生化学シグナルの脳機能における役割、脳病態における破綻についての研究へとつながることが期待される。

5、発表論文、参考文献

- 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-CaMKI α pathway during neuronal polarization. *Mol Brain*. 9:8. (2016)
- 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)
- Nonaka M, Fujii H, Kim R, Kawashima T, Okuno H, *Bito H. Untangling the two-way signaling route from synapses to the nucleus, and from the nucleus back to the synapses. *Phil Trans Roy Soc B Biol Sci*, 369, 20130150 (2014).
- 藤井哉、尾藤晴彦 カルモジュリンキナーゼIIとカルシニューリンによる神経入力の非線形的なデコーディング. *ライフサイエンス領域融合レビュー*, 2, e014(2013).
- 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 \cdot and Calcineurin. *Cell Reports* 3, 978-987 (2013).
- 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 β . *Cell*. 149, 886-898 (2012).