

尾藤晴彦

東京大学大学院医学系研究科・准教授

可塑的神経回路を支えるシグナル伝達の分子基盤解明と制御

§1. 研究実施の概要

神経回路には、遺伝子プログラムによって決定される回路 (hardwired circuit) に加え、経験に依存して連結性が強化される可塑的回路 (plastic circuit) の存在が想定されている。本研究では、新規のイメージング技術により、この可塑的回路を支えるシグナル伝達の分子基盤をシナプスレベルならびにシステムレベルで明らかにする。さらに、可塑的神経回路の脱構築・再構築を制御するための新技術を開発する。

このような目的を達成するため、平成22年度においては、「可塑的回路」の可視化に関する基礎的な条件検討、個体脳における回路可塑性の分子基盤解明と外的制御法の確立、「可塑的回路」形成のシグナル伝達解明のための条件検討・蛍光イメージング戦略開発を実施した。

その結果、基礎的条件検討は予定通り進み、平成23年度における本格的な可塑的回路の可視化や操作を可能にする実験条件等が整備された。またその過程で、可塑的回路の分子基盤の解明につながる知見や新たなイメージング戦略につながる成果が得られた。

§2. 研究実施体制

(1) 尾藤グループ (東京大学大学院医学系研究科)

① 研究分担グループ長：尾藤晴彦 (東京大学大学院医学系研究科准教授)

② 研究項目

「可塑的神経回路を支えるシグナル伝達の分子基盤解明と制御」

1) 可塑的回路の可視化

2) 個体脳における回路可塑性の外的制御法の確立 (喜田グループとの協同)

3) 可塑的回路形成発現の分子基盤・シグナル伝達解明 (菊地グループとの協同)

(2) 喜田グループ (東京農業大学)

① 研究分担グループ長：喜田聡 (東京農業大学応用生物科学部教授)

② 研究項目

「可塑的回路操作による恐怖条件付けの形成・固定・再固定・消去機構の解析」

1) 回路機能操作による表現型改変の実証に向けた実験プロトコールの検討

2) 各種記憶課題における記憶制御脳領域・分子の同定とその役割・機能解析・改変

(3) (菊地グループ (大阪大学大学院工学研究科)

① 研究分担グループ長：菊地和也 (大阪大学大学院工学研究科 教授)

② 研究項目

「可塑的回路のシグナル伝達解明を目指した蛍光プローブケミストリーの改良」

1) タグ蛋白質と蛍光プローブを利用した蛋白質標識法の開発と応用

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

尾藤グループ

1. 「可塑的回路」の可視化

本研究課題では、現在知られている中で最も感度の高い神経活動の遺伝子マーカーの一つである、神経特異的前初期遺伝子 *Arc* のプロモーター解析の成果（シナプス活動応答エレメント（Synaptic Activity-Responsive Element, SARE）の発見, Kawashima et al. PNAS 2009; Kim et al. Nature 2010; 文献1）を基に、海馬や大脳新皮質において生理的刺激により速やかに誘導される「可塑的回路」をライブイメージングすることを目標の一つとしている。

可塑的回路の可視化の実証実験として、①*Arc* プロモーターを利用した遺伝子発現レポータートランスジェニック（*Arc-p-Tg*）マウス、②*Arc promoter* のシナプス活動応答性エレメント SARE に基づくレポーターレンチウイルス, AAV ウィルスを用い、各種刺激に対する特異的刺激応答性の可視化を試みた。MECS 刺激、単眼刺激や新規環境/enriched environment に対する暴露実験を行い、活性化される部位を確認した。

レポーター蛍光・発光タンパクの発現は、1) 脳切片にて蛍光顕微鏡・共焦点レーザー顕微鏡、2) cranial window を通した多光子励起顕微鏡、3) transcranial な luciferase 発光計測にて検出可能なことを確認し、その最適条件決定を開始した。

2. 個体脳における回路可塑性の外的制御法の確立

喜田グループと協同で、CREB 機能促進による回路機能の変化を明らかにする目的で、強力な CREB coactivator である CRT1 の活性化型変異体発現 AAV ウィルスベクターを用いて海馬後背部 CA1 周辺へ強制発現させた。ウィルス濃度、注入部位、発現に至る時間等の条件検討を実施、行動表現型の有無の探索も開始した。

また CreER^{T2} を *Arc* プロモーター下で発現させるトランスジェニックマウスのシステムをデザインし、作出を開始した。

3. 「可塑的回路」形成発現の分子基盤・シグナル伝達解明

単一スパインのグルタミン酸光融解刺激と、複数の FRET 計測を同時に実現する測定系を世界で初めて実現した。これにより、カルシウムと cAMP, カルシウムと CaMKII 活性の同時測定が可能となった。本研究でのこの技術を一層完成させるため、脱リン酸化とリン酸化の同時定量可能なプローブも作成した。

一方、ポストシナプス AMPA 受容体の動態解析を実施するため、蛍光性の高親和性化合物を酵素基質とし、標的膜蛋白の細胞外領域に酵素タグを付与可能なプローブ²⁾ をデザインした。この手法が膜蛋白質を高い S/N 比で蛍光標識可能なことを確認した。これにより、新規膜挿入された受容体分子のリアルタイムイメージングする条件検討を開始した。

喜田グループ

1) 回路機能操作による表現型改変の実証に向けた実験プロトコルの検討

尾藤グループと協同で、可塑的回路の操作による表現型改変の実証に向けて、各種ウイルスベクターの感染範囲、感染後の標的遺伝子発現のタイムコース、発現領域等の解析を進め、行動解析に適したウイルス感染条件を検討した。

2) 各種記憶課題における記憶制御脳領域・分子の同定とその役割・機能解析・改変

受動的回避記憶固定化時に前頭前野皮質と前側帯状皮質において CREB 標的遺伝子群が発現誘導されることを見出した。この結果を基にして、薬剤微量注入法を用いて、これら領域における遺伝子発現が記憶固定化に必須であることを初めて明らかにした³。以上の結果から、前頭前野皮質と前側帯状皮質が可塑的回路操作の標的領域の候補であることが明らかとなった。

CaMKIV-CREB-TORC 情報伝達経路の文脈依存的恐怖記憶制御に対する役割を解析する目的で、活性化型 CREB 変異体を前脳領域特異的に発現するトランスジェニックマウスの解析を進めた。その結果、これらの変異型マウスで高発現している CREB 標的遺伝子である神経栄養因子 BDNF が、変異型マウスで観察される短期記憶の向上の原因となっていることを初めて見出した⁶。

さらに、空間記憶想起後の記憶不安定化にはカナビノイド受容体 CB1 及び L 型電位依存性カルシウムチャネル(LVGCC)の活性化が必須であること、また、その後の再固定化には NMDA 型グルタミン酸受容体(NMDAR)活性化及び CREB を介する転写の活性化が必須であることを初めて明らかにした⁴。

菊地グループ

1) タグ蛋白質と蛍光プローブを利用した蛋白質標識法の開発と応用

蛋白質の機能や局在を動物が生きたままイメージングすることは、シグナル伝達カスケードを解明する上で重要であり、蛍光イメージングは、このための強力なツールを提供する。蛍光プローブによる蛋白質の標識は、蛍光蛋白質にかわる新しい蛍光イメージング技術として注目を集めている。特に、組織透過性の高い近赤外蛍光(>700 nm)を発するプローブの蛋白質標識技術への応用は、小動物体内における蛋白質の高感度イメージングを可能にすると期待される。本研究では、尾藤グループと協同で、シグナル伝達カスケードに関わる蛋白質の機能を可視化することを目的として、蛍光プローブに特異的に結合する蛋白質（タグ蛋白質）をタグとして、標的蛋白質を蛍光標識する技術の開発を行う。

これまでに、特定のリガンドと結合するタグ蛋白質として、 β -lactamase 変異体(BL-tag)と Photoactive yellow protein (PYP-tag)を見出している。本年度では、これらのタグ蛋白質に特異的に結合する蛍光プローブをそれぞれのリガンド構造をもとにして合成した⁷⁻⁹。まず、BL-tag

の結合基質である β -lactam 環を有する化合物をもとにして、蛍光クエンチャーと蛍光色素をつないだプローブを設計・合成した。また、同様の設計で、蛍光波長の異なる種々の色素を導入した蛍光プローブを作成した。これらのプローブは、BL-tag と結合するまでは、蛍光が消光しており、BL-tag との結合に伴い蛍光クエンチャーが解離し蛍光を発する発蛍光型プローブである。設計したプローブにより、細胞膜上に発現させた BL-tag 融合 EGFR を種々の蛍光波長でライブセルイメージングすることに成功した。次に、PYP-tag に結合する発蛍光型のプローブの設計に取り組んだ。PYP-tag は、GFP の約半分のサイズからなる小さなタグ蛋白質である。プローブは、クマリン誘導体を基本骨格としてフルオレセインを導入することにより設計した。発蛍光メカニズムは、色素間の会合・解離に基づいており、実際に、PYP-tag との結合により、蛍光強度が上昇することが示された。更に、PYP-tag 標識法を利用して細胞膜上に発現させた蛋白質のライブセルイメージングに成功した。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

尾藤グループ:

1. Okuno H. Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience Res.*, 69: 175-186, 2011.
doi:10.1016/j.neures.2010.12.007
2. Komatsu T, Johnsson K, Okuno H, Bito H, Inoue T, Nagano T, Urano Y. Real-time measurements of protein dynamics using Fluorescence Activation-Coupled Protein Labeling method. *J. Am. Chem. Soc.* (in press)

喜田グループ:

3. Zhang Y, Fukushima H, Kida S. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol. Brain.* 4, 4 (2011) doi:10.1186/1756-6606-4-4
4. Kim R, Moki R, Kida S. Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Mol. Brain.* 4, 9 (2011) doi:10.1186/1756-6606-4-9
5. Hosoda H, Miyao T, Uchida S, Sakai S, Kida, S. Development of tightly regulated tetracycline-dependent transcriptional activator and repressor co-expression system for the strong induction of transgene expression. *Cytotechnology.* 63, 211-216 (2011)

doi:10.1007/s10616-011-9335-z

6. Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T, Toyoda H, Wu L-J, Zhao M-G, Hui X, Shang Y, Endoh K, Iwamoto T, Mamiya N, Okano E, Hasegawa S, Mercaldo V, Zhang Y, Maeda R, Ohta M, Josselyn SA, Zhuo M, Kida S. Up-regulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J. Neurosci.* (in press)

菊地グループ:

7. Sadhu KK, Mizukami S, Watanabe S, Kikuchi K: Turn-on fluorescence switch involving aggregation and elimination processes for β -lactamase-tag. *Chemical Communications* 46:7403-7405 (2010) DOI: 10.1039/C0CC02432E

8. Watanabe S, Mizukami S, Hori Y, Kikuchi K: Multicolor Protein Labeling in Living Cells Using Mutant β -Lactamase-Tag Technology. *Bioconjugate Chemistry* 21:2320-2326 (2010) DOI: 10.1021/bc100333k

9. Sadhu KK, Mizukami S, Watanabe S, Kikuchi K: Sequential ordering among multicolor fluorophores for protein labeling facility via aggregation-elimination based β -lactam probes. *Molecular BioSystems* 7:1766-1772 (2011) DOI: 10.1039/C1MB05013C

10. Yoshimura A, Mizukami S, Hori Y, Watanabe S, Kikuchi K: Cell-Surface Protein Labeling with Luminescent Nanoparticles through Biotinylation by Using Mutant β -Lactamase-Tag Technology *Chembiochem* 12:1031-1034(2011) DOI: 10.1002/cbic.201100021

11. Mizukami S, Matsushita H, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K: ^{19}F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression, *Chemical Science* (in press) (2011)