

「脳神経回路の形成・動作原理の解明と制御技術の創出」
平成 22 年度採択研究代表者

H23 年度
実績報告

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. 研究実施体制

(1) 尾藤グループ

① 研究代表者: 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

① 主たる共同研究者: 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変化の実証に向けた実験プロトコルの検討

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

① 主たる共同研究者: 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

§ 2. 研究実施内容

尾藤グループ

1. 「可塑的回路」の可視化

前年度までに、可塑的回路の可視化の実証実験として、①Arc 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、②Arc 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
激応答性の可視化が可能であることを確認した。これらの成果に基づき、本年度はこれらレポ
ーターマウスならびにレポーターウィルスを用い、大脳皮質各層ならびに、より深部の海馬・扁桃
体における遺伝子発現誘導の可視化に関する検討を実施した。

具体的には、深部脳領域における遺伝子発現マッピングについては、Arc-p-Tg の各種ライン
や AAV レポーターウィルス感染後、enriched environment, novelty exposure, contextual fear
conditioning などの条件に暴露させ、その後の海馬、扁桃体、大脳皮質各部位における活性化細
胞の分布を調べた。またエジンバラ大学 Richard Morris 研究室との協同にて、スキーマ学習に伴
い早期に活性化される神経細胞群を Arc 抗体にて標識することを試みたところ、前頭前野の一部
細胞に強い増大が検出され、海馬活性化と並行して前頭前野活性化の貢献が示唆された。

加えて、大脳皮質 Arc 発現の生理的意義を明らかにするためのライブイメージング実験として、
経頭蓋的ルシフェラーゼ発現イメージング法を用いた Arc 遺伝子モニタリング法を樹立した。さら
に、cranial window を通した大脳皮質各層の Arc プロモーター活性陽性細胞の多光子励起顕微
鏡観察を九州大学大木研一教授、東京大学喜多村和郎准教授と協同で行った。

また、Arc プロモーター下で mEGFP-Arc を発現したトランスジェニックマウス Arc-p-mEGFP-Arc
樹立し、高頻度刺激下における Arc 遺伝子産物の行方を可視化したところ、スパイン頭部容量が
増大しているシナプスでなく、むしろ可塑性が生じていないシナプスへ選択的に、かつ
CaMKIIbeta 依存的にターゲットされることを見いだした。

これらの成果の一部は、Tse et al Science 2011(文献 A-2)、Okuno et al. Cell in press (文献
A-3)として発表された。

2. 個体脳における回路可塑性の外的制御法の確立

前年度までの条件検討により、脳定位手術による脳実質への AAV1 ウィルス注入プロトコル
が樹立され、海馬領域に広範に遺伝子導入可能となった。そこで、proof-of-concept 実験として、
強力な CREB coactivator である CRTC1 の活性化型を作出し、野生型遺伝子型の BL6 マウスの
背側海馬 CA1 周辺へ強制発現させ、行動表現型の修飾が得られるかを、喜田グループと協同
で検討した。その結果、海馬に依存する文脈依存的恐怖条件付け課題における長期記憶が増強
することが見いだされた。

3. 「可塑的回路」形成発現の分子基盤・シグナル伝達解明

前年度までに完成させた dual FRET imaging with optical manipulation (dFOMA)法という世界で初めて dual FRET イメージング技術を用い、今年度は、カルシニューリンと CaMKII の2つの酵素活性の同時定量法を確立した。単一スパイン、ならびに細胞体レベルでの高頻度ならびに低頻度刺激により、CaMKII ならびにカルシニューリンの非線形的活性化機構が解明された。

また、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（文献A-1）をポストシナプス AMPA 酸受容体に導入し、高い S/N 比で蛍光標識するケミカルバイオロジー的手法による動的 AMPA 受容体イメージング法を樹立した。

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ールの検討

尾藤グループにて作出した種々のウイルスベクターを用い、脳実質へ感染させたマウス個体を恐怖条件付け文脈課題等の記憶課題に供して、CaMKIV-CREB-TORC 情報伝達経路活性化及不活性化の影響を様々な条件下で解析した。また、転写因子 CREB 活性化型の変異体を前脳領域特異的に発現したマウスの行動学的解析を進め、CREB 活性化により短期記憶を含む記憶形成全般が向上することを明らかにした（文献B-2）。

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

尾藤グループで開発したウイルスベクターの感染効率、発現状態等を海馬中心に検討し、最適な注入量、感染時期、感染範囲等の条件設定を進めた。さらに、テトラサイクリンシステムを利用して、トランスジェニックマウスの作製及び解析を進め(文献B-3)、この系の有効性や改良方法に関して検討して、新規ベクターの開発を行った(文献B-1)。

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

蛋白質の蛍光標識は、蛋白質の細胞内動態や機能を明らかにするための強力な技術である。我々のグループでは、前年度までに、蛍光標識タグ蛋白質として、BL-tag (β -lactamase 変異体) と PYP-tag (Photoactive yellow protein)を見出しており、本年度は、多数のタグ蛋白質標識プローブの開発を行った(文献 C-2,C-4, C-6, C-9, C-10)。特に、細胞内蛋白質を蛍光標識する BL タグプローブ (C-3, C-6)、及び標識速度の向上した BL タグプローブと PYP-tag プローブの設計・合成に成功した(C-10)。BL-プローブならびに PYP-プローブの両者について、それぞれのケミストリーに基づいた標識速度の大幅向上に成功し、細胞膜上の蛋白質の蛍光標識が極めて容易に実現可能となった。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- A-1. 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 (FAPL) method. *J Am Chem Soc.* 133:6745-6751, 2011. (DOI: 10.1021/ja200225m).
- A-2. Tse D, Takeuchi T, Takeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bito H, Morris RGM. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333:891-895, 2011. (DOI: 10.1126/science.1205274).
- A-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. An inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII β . *Cell*, in press.
- B-1. Hosoda H, Miyao T, Uchida S, Sakai S, Kida S. Development of a 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)
- B-2. Suzuki A, Fukushima H, Mukawa, T, Toyoda H, Wu LJ, Zhao MG, Hui X, Shang Y, Endoh K, Iwamoto T, Mamiya N, Okano E, Hasegawa H, Mercaldo V, Zhang Y, Maeda R, Ohta M, Josselyn SA, Zhuo M, Kida S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J. Neurosci.* 31:8786-8802, 2011. (Doi: 10.1523/JNEUROSCI.3257-10.2011)
- B-3. Nomoto M, Takeda Y, Uchida S, Mitsuda K, Enomoto H, Saito K, Choi T, Watabe AM, Kobayashi S, Masushige S, Manabe T, Kida S. Dysfunction of the RAR/RXR signaling pathway in the forebrain impairs hippocampal memory and synaptic plasticity. *Mol Brain.* 5: 8, 2012. (Doi: 10.1186/1756-6606-5-8)
- C-1. Mizukami S, Matsushita H, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K. ¹⁹F MRI detection of β -galactosidase activity for imaging of gene expression. *Chem Sci.* 2:1151-1155, 2011. (DOI: 10.1039/C1SC00071C)
- C-2. Yoshimura A, Mizukami S, Hori Y, Kikuchi K. Cell-surface protein labeling with luminescent nanoparticles through biotinylation by using mutant β -lactamase-tag Technology. *Chem Bio Chem*, 12:1031-1034, 2011. (DOI: 10.1002/cbic.201100021)
- C-3. Watanabe S, Mizukami S, Akimoto Y, Hori Y, Kikuchi K. Intracellular Protein Labeling with Prodrug-Like Probes Using a Mutant β -Lactamase Tag. *Chem Eur*

- J. 17:8342-8349, 2011. (DOI:10.1002/chem.201100973)
- C-4. Mizukami S, Yamamoto T, Yoshimura A, Watanabe S, Kikuchi K. Covalent protein labeling with a lanthanide complex and its application to photoluminescence lifetime-based multicolor bioimaging. *Angew Chem Int Ed.* 50:8750 -8752, 2011. (DOI: 10.1002/ange.201103775)
- C-5. Kowada T, Kikuta J, Kubo A, Ishii M, Maeda H, Mizukami S, Kikuchi K. In Vivo Fluorescence Imaging of Bone-Resorbing Osteoclasts. *J Am Chem Soc.* 133:17772-17776, 2011. (DOI: 10.1021/ja2064582)
- C-6. Mizukami S, Watanabe S, Akimoto Y, Kikuchi K. No-wash protein labeling with designed fluorogenic probes and application to real-time pulse-chase analysis. *J Am Chem Soc.* 134:1623-1629, 2012. (DOI: 10.1021/ja208290f)
- C-7. Okada S, Mizukami S, Kikuchi K. Switchable MRI contrast agents based on morphological changes of pH-responsive polymers. *Bioorg Med Chem.* 20:769-774, 2012. (DOI: 10.1016 /j. bmc. 2011. 12. 005)
- C-8. Terai T, Kikuchi K, Urano Y, Kojima H, Nagano T. A long-lived luminescent probe to sensitively detect arylamine N-acetyltransferase (NAT) activity of cells. *Chem Commun.* 48:2234-2236, 2012. (DOI: 10.1039/C2CC17622J)
- C-9. Sadhu KK, Mizukami S, Lanam CR, Kikuchi K. Fluorogenic protein labeling through photoinduced electron transfer-based BL-tag technology. *Chem Asian J.* 7:272-276, 2012. (DOI: 10.1002/asia.201100647)
- C-10. Hori Y, Nakaki K, Sato M, Kikuchi K. Development of Protein Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association and No-wash Live-cell Imaging. *Angew Chem Int Ed.* 51, in press.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 年度特許出願件数(国内 0 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 0 件)