

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

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

### 1. 「可塑的回路」の可視化

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) マウスを複数ライン作出し、さらに 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 ウィルスを改良し、各種刺激に対する特異的刺激応答性の可視化を抗体を用いた免疫染色などと対比させながら検証した (投稿中、ならびに文献9, 12)。

② また高頻度刺激下における Arc 遺伝子産物の行方を *in vitro* 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が、CaMKIIbetaKO マウスや CaMKIIbeta 変異体を用い検証した (文献5, 6)。

③ 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、*in vivo* においても刺激をうけていないシナプスへより強固に Arc ターゲティングが認められることを明らかにした。これは、「弱いシナプスへターゲットされる」逆タギング現象が存在することを示す初めての物証である。すなわち Arc の細胞作用が、「弱いシナプスを弱める」ことにより、各種入力を受容するシナプス間の強弱比を長期にわたり維持することであることを実証した (文献5, 6)。

④ さらに、Arc 陽性細胞を、生きた脳でライブイメージングするため、SARE エレメントを人工的に強化したエレメント E-SARE (enhanced SARE) を作出し、AAV レポーターウィルス感染後、視覚刺激やひげ刺激により活性化された皮質 2/3 層の神経細胞の電氣的性質や入力応答について調べた。本研究は、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い、現在投稿中である。

### 2. 個体脳における回路可塑性の外的制御法の確立

分担研究者の喜田らとの協働にて、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ールが樹立され、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 シグナル (文献7, 13, 14) のアクチベーター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、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。本年度は、逆に同アクチベーターのノックダウン実験を領域特異的に実施したところ、同アクチベーターの寄与が脳部位特異的であることを明らかにした。このような、脳部位選択的 CREB シグナリングの存在は、初めての発見であり、現在投稿中である。

### 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、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。さらに単一スパイン、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、これまで提唱されていたモデルと異なり、神経細胞内の CaMKII シグナルとカルシニューリンシグナルの間の相互作用が極めて弱いことを示した(文献16)

また、研究分担者の菊地らは、このような FRET プローブの改良、特に蛍光団の蛍光量子収率を高めるための工夫として、organic dye を分子タグに結合する手法の開発・改良を実施した(文献3, 4, 8, 10, 11)。さらに、膜受容体に導入し、高い S/N 比で蛍光標識可能な wash-free リガンドを開発した(文献1, 2, 15)。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Hori Y, Nakaki K, Sato M, Mizukami S, Kikuchi K. (2012) Development of protein-labeling probes with a redesigned fluorogenic switch based on intramolecular association for no-wash live-cell imaging. *Angew Chem Int Ed Engl.* 51: 5611-5614. (DOI: 10.1002/anie.201200867)
2. Mizukami S, Watanabe S, Akimoto Y, Kikuchi K. (2012) No-Wash Protein Labeling with Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis. *J Am Chem Soc.* 134: 1623-1629. (DOI: 10.1021/ja208290f)
3. Sadhu KK, Mizukami S, Lanam CR, Kikuchi K. (2012) A New Approach for Fluorogenic Protein Labeling Via Photoinduced ElectronTransfer Based BL-tag Protein Labeling Method. *Chem Asia J.* 7: 272-276. (DOI: 10.1002/asia.201290001)
4. Terai T, Ito H, Kikuchi K, Nagano T. (2012) Salicylic-acid derivatives as antennae for ratiometric luminescent probes based on lanthanide complexes. *Chemistry.* 18: 7377-7381. (DOI: 10.1002/chem.201200610)
5. 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. (2012) Inverse synaptic tagging of inactive synapses via dynamic interaction of Arc/Arg3.1 with CaMKII  $\beta$ . *Cell.* 149: 886-898. (DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.062)
6. Kim R, Okuno H, Bito H. (2012) Deciphering the molecular rules governing synaptic targeting of the memory related protein Arc. *Commun. Integr. Biol.* 5: 496-498. (DOI: 10.4161/cib.20853)

7. Wang H, Morishita Y, Miura D, Naranjo JR, Kida S, Zhuo M. (2012) Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex. *Mol Brain*. 5: 27. (DOI: 10.1186/1756-6606-5-27)
8. Baba R, Hori Y, Mizukami S, Kikuchi K. (2012) Development of a fluorogenic probe with a transesterification switch for detection of histone deacetylase activity. *J Am Chem Soc*. 134: 14310-14313. (DOI: 10.1021/ja306045j)
9. Watakabe A, Kato S, Kobayashi K, Takaji M, Nakagami Y, Sadakane O, Ohtsuka M, Hioki H, Kaneko T, Okuno H, Kawashima T, Bito H, Kitamura Y, Yamamori T. (2012) Visualization of cortical projection neurons with retrograde TET-off lentiviral vector. *PLoS One*. 7: e46157. (DOI: 10.1371/journal.pone.0046157)
10. Zeng Z, Mizukami S, Kikuchi K. (2012) Simple and real-time colorimetric assay for glycosidases activity using functionalized gold nanoparticles and its application for inhibitor screening. *Anal Chem*. 84: 9089-9095. (DOI: 10.1021/ac301677v)
11. Dhara K, Hori Y, Baba R, Kikuchi K. (2012) A fluorescent probe for detection of histone deacetylase activity based on aggregation-induced emission. *Chem Commun (Camb)*. 48: 11534-6. (DOI: 10.1039/c2cc36591j)
12. Endo T, Kakeyama M, Uemura Y, Haijima A, Okuno H, Bito H, Tohyama C. (2012) Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS One*. 7: e50741. (DOI: 10.1371/journal.pone.0050741)
13. Descalzi G, Fukushima H, Suzuki A, Kida S, Zhuo M. (2012) Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription. *Mol Pain*. 8: 90. (DOI: 10.1186/1744-8069-8-90)
14. Kida S. (2012) A Functional Role for CREB as a Positive Regulator of Memory Formation and LTP. *Exp Neurobiol*. 21: 136-140. (DOI: 10.5607/en.2012.21.4.136)
15. Sadhu KK, Mizukami S, Yoshimura A, Kikuchi K. (2013) pH induced dual "OFF-ON-OFF" switch: influence of a suitably placed carboxylic acid. *Org Biomol Chem*. 11: 563-568. (DOI: 10.1039/c2ob26630j)
16. Fujii H, Inoue M, Okuno H, Sano Y, Takemoto-Kimura S, Kitamura K, Kano M, Bito H. (2013) Nonlinear decoding and asymmetric representation of neuronal input information by CaMKII $\alpha$  and calcineurin. *Cell Reports* in press. (DOI: 10.1016/j.celrep.2013.03.033)

### (3-4) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)