

in vivo 単一シナプス酵素学樹立に関する基礎研究

Basic Research on the Development of In Vivo Single Synapse Enzymology

(日本生化学会推薦)

代表研究者 東京大学 尾藤晴彦 University of Tokyo Haruhiko BITO

Synaptic plasticity requires active crosstalk between electrical and chemical signals that are co-produced in synaptic microdomains. However, little is known about the exact nature of such interactive signal processing. In this project, we have attempted to develop new experimental tools and protocols that enable to pin down specific enzymatic steps in single synapse, and to measure them as they occur. Furthermore, ground work was achieved to potentially apply this methodology into an in vivo single synapse imaging modality.

研究目的

細胞は試験管とは異なり、化学反応が局所的におこる。自由拡散している酵素と基質が確率的に出会うのではなく、数十 nm 四方の「マイクロドメイン」に濃縮された関連分子の間で効率よくシグナルが共役・伝達されている。ニューロンにおいては、刻一刻と発生する神経情報が、シナプス後膜において受容され、シナプスとそれに隣接するスパイン構造にて電氣的シグナルと化学的な細胞内シグナルに振り分けられる。

神経情報は、膜電位の上昇下降と神経伝達物質放出によって発生する。そして、神経伝達物質受容に引き続くシナプス電位の変化は、神経細胞内で電氣的シグナルと化学的シグナルの両者を生成する。

これらの素過程が並列的に数多くの神経回路内で起こり、その総和として、人間の精神・認知・神経活動が起こると考えられている。すなわち、脳高次機能と呼ばれる意識、情動、記憶、意欲、注意などの機能は、容積 1 femtoliter 以下のシナプス構造、そしてその周辺に位置するマイクロドメインの中で生じる酵素反応および蛋白・蛋白、蛋白・膜、蛋白・細胞骨格相互作用が支配していると言っても過言ではない。然るに、生きた神経細胞内の「マイクロドメイン」内における代謝反応や

酵素反応のダイナミクスはこれまでほとんど明らかにされていない。

特に神経可塑性は、微小空間における電氣的シグナルと化学的シグナルの両者の絡み合いから成り立っていると考えられているが、その全貌はまだ理解されていない。本研究では、化学的シグナルの全貌を単一シナプスレベルで解明するための第1歩として、生化学的酵素反応を取り上げ、酵素活性を動的に生きた神経細胞内で計測する実験システムに関する基礎研究を行う。

研究経過

神経可塑性発現や神経回路形成に際し、神経マイクロドメインやスパイン等微小突起レベルで制御される蛋白リン酸化反応や蛋白・蛋白相互作用が必須な役割を果たすことを、研究代表者らはこれまで明らかにしてきた (Bito et al. *Cell* 1996; Furuyashiki et al. *J. Neurosci.*, Bito et al. *Neuron* 2000; Furuyashiki et al. *PNAS* 2002; Arakawa et al. *J. Cell Biol.* 2003; Nonaka et al. *J. Neurosci.* 2006; Ohmae et al. *J. Biol. Chem.* 2006; Takemoto-Kimura et al. *Neuron*, 2007)。しかしながら、このような神経機能に直結する生化学的反応のダイナミクスを、生きた神経細胞にてリアルタイムで定量測定することはこれまで至難であった。

そこで本研究期間中には、3つの中間目標を設定し、研究計画を遂行した。

1. 神経可塑性に寄与して、神経細胞内マイクロドメインにおいて活性化される重要な細胞内酵素反応カスケードの中の中核となる素過程を生化学的・薬理的に同定する。
2. この素過程を可視化するリポーター蛍光分子を作出するとともに、レンチウイルスベクターにより *in vivo* 神経細胞にリポーターcDNAを導入する分子生物学的基礎技術を開発する。
3. 導入したリポーターの酵素活性を測定する光学的装置を考案する。この空間分解能を単一シナプスまで高めるためのストラテジーを立案し、生きた個体に適応可能な革新的な *in vivo* 生体内マイクロ観察技術を考案・開発する。

1) 神経可塑性に必須な酵素学的素過程を生化学的・薬理的に同定

モリス式水迷路学習課題を考案したエジンバラ大学脳神経科学センター所長のRichard Morris博士との共同研究により、シナプスにおけるCaMKII活性化、ならびにシナプスから核に向けてのCaMKK-CaMKIV-CREBリン酸化経路の賦活化が、速やかに両立して起こることが、神経可塑性や記憶の長期化に必要なことを薬理的、生化学的に解明した (Redondo et al. *J. Neurosci.*

2010)。

2) 単一シナプス内酵素活性化のためのプローブ開発とベクター実用化

この知見に基づき、単一シナプス内で引き起こされるCaMKII活性化を可視化可能な新規蛍光FRETプローブを作成し、可塑性発現のタイミングとCaMKII酵素活性の相関が実は低いこと（可塑性を発現し始める頃にCaMKII活性は減弱する）を証明した（Bito, 2010 symposium lecture）。

一方、シナプスから核へ迫るシグナル伝達経路の分子の実態については、CaMKK-CaMKIV-CREB活性化の下流に、ゲノム上に位置する新規の神経活動応答性配列SAREがあることを見いだした(Okuno et al. 2009 Symposium)。そこで、SARE活性化を可視化するプローブと、これを発現するレンチウイルスベクターを作成し、Arc遺伝子転写がオンになる機構を解明した（Kawashima et al. PNAS 2009）。

さらに、神経回路形成・再編成時に活性化するCaMKIファミリー（Takemoto-Kimura et al. Eur .J. Neurosci. 2010）についても、新規蛍光FRETプローブを作成した（Fujii et al. 未発表）。

3) In vivo 単一シナプス酵素学実現へ向けた実験条件整備

上記にて、作成したFRETプローブ計測をslice のようなsemi-intactの実験システムやin vivo個体で実践するための基礎技術開発を試みた。さらに、この一環で、高精度マニピュレーターを購入して、個別神経細胞の刺激応答性をマップすることに成功した。本手法を用い、神経活動によるキナーゼ活性化応答が、in vitro初代培養系においては、単一シナプスレベルで計測可能となりつつある。そこで、研究代表者の開発した酵素活性可視化プローブに関する基礎的研究をin vitroからin vivo の単一シナプス計測へ展開するため、スタンフォード大学Mark Schnitzer研究室との共同研究により、fluorescent microendoscopeを用いた計測条件の整備を試みているところである。

考察

本研究計画においては、所期に明示した目標を十分達成し、in vivo 単一シナプス酵素学樹立の一手前までこぎ着けているところである。引き続き、生物学的実験コンセプトの推進と計測技術の向上に努めて、数年以内に、in vivo で、真に単一シナプスレベルでの酵素反応をリアルタイムでどんどん可視化していきたいと考えている。その第一歩を踏み出す勇気ときっかけを下さった山田化学振興財団へ厚く御礼申し上げます。

研究発表

口頭発表

1. Haruhiko Bito. CaM kinase signaling in neuronal microdomains. The 13th International Membrane Research Forum/ The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nano-Meso Membrane Mechanisms. 2010. 1.27-1. 29, Kyoto, Japan (発表日2010.1.27)
2. Hiroyuki Okuno, Takashi Kawashima, Mio Nonaka, Nan Kyo, Haruhiko Bito. A critical genomic element for synaptic activity-dependent expression of Arc/Arg3.1. 第36回国際生理学会世界大会(IUPS2009), 2009.7.27-8.1, Kyoto, Japan. (発表日 : 2009. 7.28)

誌上発表

1. Sayaka Takemoto-Kimura, Kanzo Suzuki K, Satoshi Kamijo, Natsumi Ageta-Ishihara, Hajime Fujii, Hiroyuki Okuno, Haruhiko Bito. Ca²⁺ signaling coordinates the formation and the morphological maturation of neuronal circuits and synapses: an essential role for excitation-morphogenesis coupling via CaM kinases. *Eur. J. Neurosci.* in press.
2. Roger Redondo, Hiroyuki Okuno, Patrick A Spooner, Bruno G Frenguelli, Haruhiko Bito, Richard GM Morris. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* in press.
3. Takashi Kawashima, Hiroyuki Okuno, Mio Nonaka, Aki Adachi-Morishima, Nan Kyo, Michiko Okamura, Sayaka Takemoto-Kimura, Paul F Worley, Haruhiko Bito. A synaptic activity-responsive element in the *Arc/Arg3.1* promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 316-321, 2009.