

# 新規光応答性タンパク質の開発と個体動物への応用

## Development of new optogenetic tools and its application to *in vivo*

(日本生物物理学会推薦)

代表研究者 生理学研究所 村越 秀治 National Institute for Physiological Sciences Hideji MURAKOSHI

協同研究者 マックスプランク研究所 安田 涼平 Max Planck Florida Institute Ryohei YASUDA

生理学研究所 鍋倉 淳一 National Institute for Physiological Sciences Junichi NABEKURA

Synaptic plasticity is believed to be the basis of learning and memory. Elucidating temporal windows of signaling activity in synapses is crucial for understanding molecular mechanisms underlying synaptic and behavioral plasticity. In this research project, using CaMKII inhibitory peptide named autocamtide inhibitory peptide 2 (AIP2), we developed a genetically-encoded, photoactivatable CaMKII inhibitor, named paAIP2. The photoactivation of paAIP2 in neurons during the induction of LTP and structural LTP (sLTP) of dendritic spines inhibited structural and functional plasticity in hippocampal slices of rodents. However, the photo-inhibition of CaMKII after the induction of plasticity did not block them, suggesting that the initial CaMKII activation is sufficient for inducing functional LTP and structural LTP. Furthermore, we applied paAIP2 to living mice. Using an inhibitory avoidance task, we found that CaMKII inhibition during a task, but not after, is required for the memory formation. Thus, we demonstrated that paAIP2 is an useful tool to study the function of CaMKII at the high temporal resolution in neurons and mice.

### 研究目的

脳は動物の記憶を司る器官であることが分かっているが、その記憶メカニズムは不明な点が多く残っている。例えば、記憶が一体どのような形で脳に長期間保持されているのかといった基本的なことすら分かっていない。記憶は、脳神経細胞が担っていると考えられている。特に神経細胞の接着領域であるシナプスが重要であると考えられている。近年、光学顕微鏡技術やプローブ作製技術の発展により、シナプス内部で、シグナル伝達分子の活性化を観察したり、自在に操作することができるようになりつつある。本研究では、アクチンの重合、脱重合を制御することでシナプスの可塑性にとって重要な役割を果たしていると考えられる CaMKII に着目し、CaMKII の活性化を光照射によって制御（不活化）することができる分子の開発を目的とした。この分子は細胞内で1ミクロンの空間分解能、秒レベルの

時間分解能で CaMKII 活性を阻害できるものである。また、開発する分子を海馬スライスの神経細胞に発現させ、ケイジドグルタミン酸刺激によって引き起こされる長期増強に対する CaMKII 機能や個体動物の記憶における CaMKII の機能を調べることを目的とした。

### 研究経過

大脳皮質や海馬の興奮性神経細胞には CaMKII が豊富に発現している（全タンパク質量の数%）。CaMKII は、主に  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットから成る 12 量体を形成しており、 $\text{Ca}^{2+}$ により活性化したカルモジュリンの結合により活性化する<sup>1)</sup>。特に、隣合うキナーゼドメインが同時に活性化すると、それぞれのキナーゼが隣のサブユニットの Thr286 を自己リン酸化することによって、その活性がカルモジュリンが外れたが外れた後もキナーゼの活性が持続する。

このような自立した活性状態の維持が可能であることから、CaMKII がシナプス可塑性において、メモリー分子のような機能を持っていると考えられてきた。しかしながら、シナプス長期増強時の CaMKII 活性化時間と機能については、現在までにコンセンサスが得られている訳ではない。すなわち、CaMKII の長時間活性がシナプス可塑性に重要であるという報告<sup>2,4)</sup>がある一方で、短時間の活性化で十分であるという報告<sup>5,6)</sup>もされている。そこで本申請研究では、CaMKII 活性を高い時間分解能で可逆的に阻害することが可能な光応答性 CaMKII 阻害ペプチドを開発することにした。また、これを用いて、シナプス可塑性と個体動物の記憶形成における CaMKII 活性の時間窓を調べることにした。

## 1、光応答性 CaMKII 阻害分子の開発

CaMKII の活性を生きた細胞内で高い時空間分解能で活性を阻害できるようにするため、LOV2-Jαドメインを用いて遺伝子コード型の光応答性 CaMKII 阻害分子を開発することにした。LOV2-Jα は植物タンパク質である Phototropin1 の光感受性ドメインであり、青色光照射によって、LOV2 ドメインに結合していた αヘリックスが解離し、分子構造が可逆的に変化する。そこで本研究では、CaMKII の阻害ペプチドである AIP2 (Autocamtide2-Related Inhibitory Peptide、13 アミノ酸から成る) に LOV2 を遺伝子工学的に融合することによって、遺伝子コード型光応答性 CaMKII 阻害ペプチド (paAIP2) を開発した (図 1 a) 開発には、LOV2-Jα と AIP2 の間のリンカー配列を変えたものを多数作製し、CaMKII のキナーゼ活性を光照射依存的に阻害するかどうかを生化学的に調べた。我々が開発した paAIP2 は光照射後に直ちに構造変化し、暗状態に戻すことで 40 秒程度で元に戻る。

## 2、paAIP2 を用いたケイジドグルタミン酸刺激による長期増強誘起の阻害

次に、本研究で開発した paAIP2 を用いて、光照射による CaMKII 阻害がグルタミン酸刺激によるスパイン体積の可塑性な変化を阻害するかどうかを調べた。まず、海馬スライス CA1 領域にある神経細胞に遺伝子銃を用いて mGFP (単量体緑色蛍光タンパ

ク質)、mCherry (単量体赤色蛍光タンパク質)、paAIP2 を同時に発現させた。次に落射蛍光顕微鏡下で mCherry の赤色蛍光を発している細胞を同定し、その細胞を 2 光子顕微鏡下で mGFP の蛍光を観察した。刺激後のスパイン体積の変化は mGFP の蛍光強度によって定量した。ケイジドグルタミン酸による 2 光子単一スパイン刺激 (30 pulses at 0.5 Hz) を行ったところスパイン体積は一過的に 4 倍程度増大した後、収縮し、刺激前よりも 2 倍程度の体積の状態を 20 分以上持続していた (図 1b)。一方、ケイジドグルタミン酸刺激と同時に青色光 (100 mW/cm<sup>2</sup>) により CaMKII の活性を 1 分間阻害したところ、一過的な体積変化が劇的に阻害され、さらに、持続的な体積変化が完全に阻害された (図 1b)。このことは、初期の CaMKII の活性がスパイン体積の変化にとって極めて重要であることを示している。

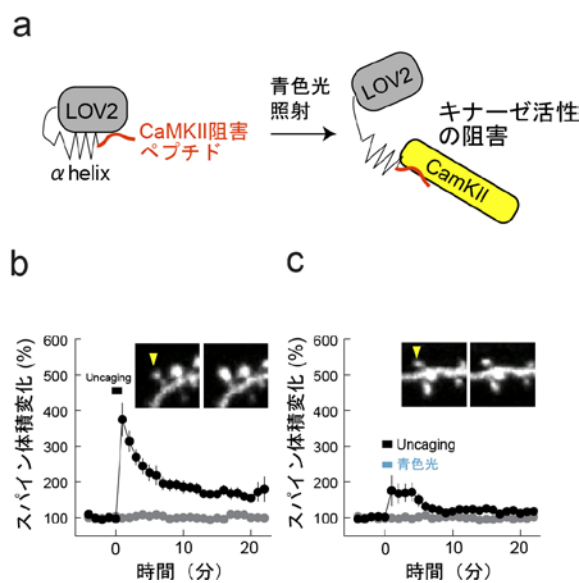


図 1. 光活性型 CaMKII 阻害分子の開発

(a) 光活性型 CaMKII 阻害分子 (paAIP2) の構造。LOV2 ドメインに CaMKII 阻害ペプチドを融合させたものである。光非存在下では折りたたまれた構造をとっており、阻害ペプチドはキナーゼに結合することができない。しかし、青色光により、開状態になると CaMKII のキナーゼドメインに結合し、その活性を阻害する。  
(b) 単一スパイン刺激 (矢尻) 後のスパインの体積変化(左)。ケイジドグルタミン酸刺激と同時に青色光を用いて CaMKII の活性化を阻害すると体積増大

が阻害される(右).

(c) CaMKII に結合しない paAIP2 変異体では光照射を行ってもスパイン体積変化は阻害されない.

### 3、個体マウスにの恐怖記憶に必要な CaMKII 活性の時間窓

paAIP2 の利点の一つは、遺伝子コードされている点である. 細胞特異的なプロモーター遺伝子を利用することで、生きた個体動物の特定の細胞の特定の場所に導入することができる. そこで、paAIP2 を用いて、記憶と CaMKII 活性の関係を個体マウスで調べた. paAIP2 をマウスの扁桃体領域(恐怖記憶を司る脳領域)の神経細胞へ導入するため、GFP を融合した paAIP2 をコードするアデノ随伴ウイルスを作製し、扁桃体へのインジェクションを行った. その後、このマウスを用いて、動的回避テスト(記憶テストの一種)を行った. 明室と暗室の間にマウスが通れるくらいの出入口がついた箱にマウスをおく. マウスは暗い場所を好むため暗い部屋に入るが、この時、マウスが嫌う軽い電気ショックを与える. すなわち、暗い部屋に入ると電気ショックが来ることを記憶させる(恐怖記憶). このトレーニングを行ったマウスを再び明るい部屋に入れると、暗い部屋にはなかなか入らなくなる(受動的回避テスト). すなわち、明るい部屋に滞在する時間を計測することで、電気ショックの記憶を記憶しているかどうかを判別することができる. テストの結果、記憶トレーニングからテストの直前までの間、光照射によって CaMKII を阻害した動物は、比較的短い時間で暗い部屋に入った. すなわち、電気ショックがあることを記憶していなかった. 一方で、トレーニング時に光照射を行わなかった動物では記憶は阻害されなかった. これらの結果から、記憶形成の瞬間に CaMKII 活性が必要であり、保持には必要ないことを示唆するデータを得ることができた.

### 考察

本申請研究では、シナプス可塑性に重要である CaMKII を光照射依存的に阻害することが可能な光応答性 CaMKII 阻害ペプチドの開発に成功した. また、分子を開発するのみならず、ラット海馬スライスに paAIP2 を導入し、シナプスの体積変化を阻害す

ることに成功し、CaMKII の短時間の活性が体積変化に重要であることを明らかにした. すなわち、シナプスの可塑性にとって、CaMKII はメモリー分子ではなくトリガーに重要であることを明らかにした. また、paAIP2 を利用して、個体マウスの記憶形成時の初期段階において CaMKII の活性が重要であることも明らかにした. 現在までに様々な阻害ペプチドが利用できるが、LOV2 ドメインと組み合わせることで、様々な光応答性阻害ペプチドが作製できると考えられる. 今後、このような光操作分子を用いて、個体機能の基礎となる細胞内シグナルの分子メカニズムが詳細に明らかになると考えられる.

### 参考文献

- 1) Lisman J, Yasuda R & Raghavachari S Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat Rev Neurosci* **13** (3): 169-182, 2012.
- 2) Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, et al : Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* **268** (11): 7863-7867, 1993.
- 3) Barria A & Malinow R NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron* **48** (2): 289-301, 2005.
- 4) Ouyang Y, Kantor D, Harris KM, et al : Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J Neurosci* **17** (14): 5416-5427, 1997.
- 5) Lengyel I, Voss K, Cammarota M, et al : Autonomous activity of CaMKII is only transiently increased following the induction of long-term potentiation in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **20** (11): 3063-3072, 2004.
- 6) Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, et al : Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature* **458** (7236): 299-304, 2009.
- 7) Murakoshi H, Shin ME, Parra-Bueno P, et al : Kinetics of Endogenous CaMKII Required for Synaptic Plasticity Revealed by Optogenetic Kinase Inhibitor. *Neuron* **94** (1): 37-47 e35, 2017.

## 研究の発表

### 口頭発表

1. 柴田明裕、村越秀治 Development of a genetically encoded photo-activatable CaMKII (招待講演) 第40回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド、2017年12月6-12月9日 発表日3日
2. 柴田明裕、村越秀治 Development of a genetically encoded photo-activatable CaMKII and its application to the study of synaptic plasticity. (ポスター) 第7回 新潟脳研-霊長研-生理研合同シンポジウム、生理学研究所、2018年3月6,7日
3. 村越秀治 光らない蛍光タンパク質で細胞内分子活性を見る 第2回ルミノジェネティクス研究会 神奈川足柄下郡 静雲荘 2017年6月26日-6月27日 (発表日27日)
4. 村越秀治 2光子蛍光寿命イメージングによる細胞内シグナル伝達解析 第39回神経組織培養研究会 愛知 サンプラザシーズンズ 2017年10月7日-10月8日 (発表日7日)

### 誌上発表

1. Murakoshi H, Shin M, Parra-Bueno P, Szatmari EM, Shibata AC, and Yasuda R. Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron* 94, 37-47 (2017).
2. Murakoshi H, Shibata AC ShadowY: a dark yellow fluorescent protein for FLIM-based FRET measurement. *Scientific Reports* 7, 6791 (2017).
3. 村越秀治 「分子間相互作用を検出する 2光子蛍光寿命イメージング」 生体の科学 医学書院 2017年10月 68(5): p400-401
4. 村越秀治 「クローズアップ実験法 光応答性阻害ペプチドの生化学的機能アッセイ」 実験医学 羊土社 2017年10月 p2765-2770
5. 村越秀治 「光応答性 CaMKII 阻害ペプチドの開発とシナプス可塑性研究への応用」 *CLINICAL CALCIUM* 医薬ジャーナル社 2018年3月 28(3): p414-419