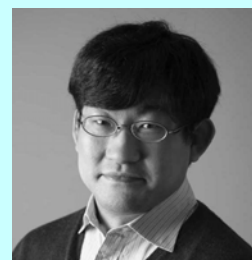


樹状突起形態・機能の神経活動依存的制御の分子機構

Activity-dependent mechanisms regulating dendritic morphology and function

尾藤 晴彦 (BITO HARUHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授



研究の概要

1000 億個のニューロンから成る神経回路網は、遺伝子プログラムに基づく設計図に由来する「剛」の性質と、内部・外部の環境変化に刻一刻と対応しその経験を情報として回路内に書き込める「柔」の特性を併せ持つ。本研究では、回路内で神経情報を受容する樹状突起に特に着目し、様々な神経活動が樹状突起の形態・機能を制御する分子シグナリング機構を解明する。

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：カルシウム、リン酸化、突起伸展、シナプスから核へのシグナリング

1. 研究開始当初の背景

脳は個体の生存と種の繁栄のための最重要器官である。1000億個のニューロンから構成される神経回路網は、普遍的な遺伝子プログラムに基づく設計図に由来する「剛」の性質と、個体毎に内部・外部の環境変化に刻一刻と対応しその経験を情報として回路内に書き込める「柔」の特性を併せ持つ。さらに、脳の活動は、神経回路を構成するニューロン間の情報受け渡しにコードされているが、一つ一つのニューロンの応答性は、細胞内の電気的シグナルと化学的シグナルの複雑な絡み合いから成り立つ。1個のニューロンには数万個のシナプスがあり、各々独立した入力を受ける。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経情報を受容する樹状突起に特に着目する。そして樹状突起における分子シグナリングを、

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の形成・成熟の分子機構、

②シナプス活動により発生した局所シグナルが神経細胞体まで伝わり、転写・翻訳・細胞骨格動員などの機構の活性化により、細胞全体の応答性が変化する分子機構、

③細胞全体の応答性の変化が、最初のシグナルを発生したシナプスの性質を選択的に、かつ長期的に修飾する分子機構、

の3つの側面から徹底的に解明を試みる。

3. 研究の方法

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の活動依存的伸展・成熟の分子機構：BDNF 依存的樹状突起形成伸展の機構を、CLICK-III/CaMKI γ -KO マウス、CaMKK α/β -DKO マウスを用いて検証する。さらに CaMKK α/β -CaMKI γ 経路の上流のローカルシグナルと下流経路の全貌を解明する。

②synapse-to-soma signaling : CREB 依存的転写機構解明、Ca²⁺依存的転写メカニズム解析と種々のイメージングを駆使して、シナプスから神経細胞体・核への生化学的シグナル伝達を解明する。

③soma-to-synapse signaling : 細胞体から樹状突起へと流れる種々の化学的シグナル (mRNA・蛋白などのターゲティング) が、

ローカルなシナプス活動により、どのように選択的に”capture”されるか。その相互作用機構を Arc の場合について明らかにする。

④樹状突起内シグナル操作の方法論開発：in vivo での分子操作・分子修飾を実現する方法論として、in utero electroporation, lentivirus, AAV を用いた遺伝子導入 (野生型、変異型、RNAi, Cre recombinase) 法を確立する。

4. これまでの成果

①シグナル統合のコンパートメントとなる樹状突起の活動依存的伸展・成熟の分子機構：キナーゼ領域が 70% 以上相同である

CLICK-III/CaMKI γ と CaMKI α とを各々幼弱大脳皮質ニューロンに強制発現・ノックダウンしたところ、それぞれ樹状突起伸長と軸索伸長の作用が選択的にあることが示された。加えて、発達期脳の大脳皮質細胞の形態形成においては、1) 膜アンカー型 CLICK-III/CaMKI γ と細胞質びまん性 CaMKI α とが、異なる Ca^{2+} 上昇シグナル (前者はBDNF, 後者はGABA) に対して応答し、しかも 2) 基質特異性も異なることが明らかとなった (Ageta-Ishihara et al. *J. Neurosci.* 2009; Takemoto-Kimura et al. *Eur. J. Neurosci.* 2010)。現在phosphoproteome解析により、CLICK-III/CaMKI γ 基質の網羅的探索を実施中である。また、CaMKK-CaMKI γ 経路の遺伝子破壊マウスにおける行動異常について検索中である。

②synapse-to-soma signalingの解明：神経活動依存的前初期遺伝子であるArc遺伝子のシナプス活動応答性エレメントSAREをゲノム上で単離同定した。SAREはArc遺伝子産物転写開始点のほぼ7kbに位置し、CREB, MEF2, SRF/TCFの結合部位が隣接する特異な構造を取る転写調節領域であった (Kawashima et al. PNAS 2009)。興味深いことに、SAREの付近を起点に両方向性にlong non-coding RNAが活動依存的に生成され、転写調節にも寄与する可能性が示唆された (Kim et al. *Nature* 2010)。またシナプスから核へのシグナルの解明のため、シナプスなど細胞内ミクロドメインの Ca^{2+} シグナル (Bito, *Nature Chem. Biol.* 2010) や細胞体全体へ広がるCaMKシグナル (Redondo et al. *J. Neurosci.* 2010) などの同時計測などを実現する Ca^{2+} シグナル伝達の新たな可視化手法を開発中である。

③soma-to-synapse signalingの解明：

発現誘導されたArc蛋白が細胞体からシナプスへどのようにターゲティングされるかを可視化した。加えて CaMKII β が Arc の capture の調節因子であることを明らかにした。その下流で、シナプス表面のグルタミン酸受容体数が調節されることが強く示唆された。

④樹状突起内シグナル操作の方法論開発：

子宮内遺伝子導入法と lentivirus を組み合わせた新規大脳皮質機能探索法を開発した。これにより、マウス胎生 15 日齢で脳室内に lentivirus 投与すると、移動後の大脳皮質 2/3 層細胞への選択的標識が可能となる。これを利用して、Arc 陽性細胞の選択的標識実験を実施した (Kawashima et al. PNAS 2009)。さらに、AAV ウィルスを用いた脳実質遺伝子導入法の条件検討を行い、高タイター AAV ウィルス調製法を樹立し、海馬等の脳部位への選択的遺伝子導入・発現実験のための予備検討を行った。

5. 今後の計画

「経験」に基づく情報を神経回路内に長期的に「書き込む」ためには、一過性の電氣的シグナルを何らかの化学的シグナル伝達機構によって増幅・固定・貯蔵し、長期間にわたる読み出しを可能とする分子機構が必要となる。本研究を通じ、「神経回路への情報書き込み」の分子の実体に肉薄し、脳の根本的な作動原理の一端を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Yagishita-Kyo N, Inoue M, Nonaka M, Okuno H, Bito H, “CREB” in “**Encyclopedia of Signaling Molecules**” (Springer), in press.
2. Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, Okuno H, Bito H, Ca^{2+} 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.* 32: 224–230, 2010.
3. Bito H, The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Chem. Biol.* 6: 560–563, 2010.
4. Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, 465: 182–187, 2010.
5. Redondo RL, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, Bito H, Morris RGM. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* 30: 4981–4989, 2010.
6. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaesus F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H. Regulation of cortical axon growth by a GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29: 13720–13729, 2009.
7. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. 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.

受賞：平成 22 年度 塚原伸晃記念賞

ホームページ等

<http://www.neurochem.m.u-tokyo.ac.jp/>