61　海馬行動予想発火の生理的意義の解明	林　康紀

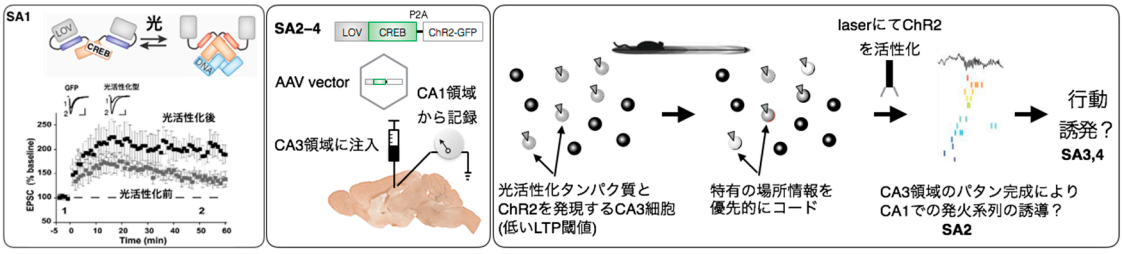
【目的】動物はある行動をしようとする意思を決定する前に、意識下あるいは意識上にシミュレーションを行うことで脳内モデルを形成し、そのうち最適なものを選択していると考えられる。しかし、それに関わる神経回路は明らかではない。本研究では特に海馬に着目して研究を進める。海馬では動物の場所に応答する場所細胞がある事が知られているが、最近、場所細胞が行動前、これからの行動を予想するように順番に発火する事が見出された。特に、動物に走った経験がない新たな経路を予想させても、これまで経験した発火を組み合わせ、新しい発火順列を形成することができることから、単にこれは既に走った経験がある経路の場所細胞が再活性化されているのではなく、行動の意思決定に伴い、新たな脳内モデルが形成されていると想定される。

しかしこの「行動予想発火順列」の生理学的意義は明らかではない。特に重要な事に、それが行動を計画し、かつ引き起こすのに必要十分であるかは明らかではない。この解明にあたり難しい点は、行動予想発火順列は時間的に制御されたものであり、単に光遺伝学的に活性化させただけでは誘導できない点である。そのため、いくつかの技術的な工夫が必要である。そこで本研究では、まず LTP の閾値を調節するシグナル経路である CaMKIV 及び CREB の活性を、光感受性タンパク質である LOV2 ドメインを用いることで光にて制御できるようにする。これを用いると場所体験時に光を照射する事により、特定の細胞に選択的に場所をコードさせる事ができる。さらに ChR2 と共発現する事により、場所をコードさせた細胞を任意の時に再活性化する事が可能となる。

【方法】本研究では、まず、光活性化 CREB ならびに CaMKIV 作製し、それを用い、特定の神経細胞に記憶をエンコードさせることを目的とした。この目的のため、両者が核タンパク質であることを利用し、光活性化核移行シグナル（paNLS）を作製することを試みた。この目的のためには燕麦由来の向光性に関与する蛋白質ドメインである、LOV2 ドメインを用いた。LOV2 ドメインは光照射により、構造が変化し、他のタンパク質の活性を調節できる。そこで、mCherry と核輸出シグナルーLOV2 ドメインー核移行シグナルとを融合し、細胞に発現し光照射する構築をスクリーニングした。出来た paNLS にさらに CREB を融合し、光活性化により核に移行することを確認した。最終的に、CRE 下流で luciferase 発現する構築と共発現し、luciferase を western blotting にて検出した。

【結果】作製した paNLS は核へ移行することが観察された。このことから、光活性化核移行シグナルの作製に成功したと考えられた。しかし CREB と融合し、CRE 下流で luciferase 発現させたところ、光照射していない場合も発現が見られ、mCherry のシグナルでは検出されなかったが、その程度の発現でも CREB の活性が leak していることが疑われた。現在、CaMKIV を同様なアプローチで作製している他、優勢抑制体の CREB ならびに CaMKIV を作製し、記憶固定化の実験に利用できないかを試行していく。

実験計画の概念図



61. 海馬行動予想発火の生理的意義の解明

林　康紀

*京都大学 大学院医学研究科 システム神経薬理部門

Key words：海馬，行動予想発火，光遺伝学，LOV2 ドメインタンパク質

緒　言

動物はある行動をしようとする意思を決定する前に、意識下あるいは意識上にシミュレーションを行うことで脳内モデルを形成し、そのうち最適なものを選択していると考えられる。しかし、それに関わる神経回路は明らかではない。本研究では特に海馬に着目して研究を進める。海馬では動物の場所に応答する場所細胞がある事が知られているが［1］、最近、場所細胞が行動前、これからの行動を予想するように順番に発火する事が見出された［2］。特に、動物に走った経験がない新たな経路を予想させても、これまで経験した発火を組み合わせ、新しい発火順列を形成することができることから［2］、単にこれは既に走った経験がある経路の場所細胞が再活性化されているのではなく、行動の意思決定に伴い、新たな脳内モデルが形成されていると想定される。

しかしこの「行動予想発火順列」の生理学的意義は明らかではない。特に重要な事に、それが行動を計画し、かつ引き起こすのに必要十分であるかは明らかではない。この解明にあたり難しい点は、行動予想発火順列は時間的に制御されたものであり、単に光遺伝学的に活性化させただけでは誘導できない点である。そのため、いくつかの技術的な工夫が必要である。そこで本研究では、まず LTP の閾値を調節するシグナル経路である CaMKIV 及び CREB の活性を［3］、光感受性タンパク質である LOV2 ドメイン用いることで光にて制御できるようにする［4］。これを用いると場所体験時に光を照射する事により、特定の細胞に選択的に場所をコードさせる事ができる。さらに ChR2 と共発現する事により、場所をコードさせた細胞を任意の時に再活性化する事が可能となる。次に、特定の CA3 細胞に走行路の場所情報を優先的にコードさせる。その上で同じ細胞を ChR2 にて再活性化すると CA3 領域のパタン完成特性により走行路と同じ CA1 細胞の発火順列を再現できると期待される。その後、CA1 細胞の発火順列を人工的に再現することで、行動が再現するかを検討する。また行動の柔軟性に行動予想発火パタンの変化が付随するかを確認する。また、自閉症モデル動物で、固執傾向が行動予想発火の過剰な安定性として観察されるか検討する。最終的に行動予想発火そのものが、行動の内容を決定する事ができるかを検討する。このため複数の発火順列を人工的に連続して発火させた場合、行動パタンも結合するかを検討する。

海馬で観察される行動予想発火は、場所、走行時間と距離、行動との定量的相関が取れる実験系としてユニークである。この点、恐怖刺激条件づけで使われる文脈に対する脳内モデルとは異なり、行動の選択やプランニング、意思決定に関わる神経回路が明らかになる期待される。

方　法

1.　光活性化 CREB ならびに CaMKIV の作製

本研究期間では、光活性化 CREB ならびに CaMKIV 作製することを試みた。このため、両者が核タンパク質であることを考え、まず、光活性化核移行シグナル （paNLS）を作製することを試みた。燕麦由来の向光性に関与する蛋白質ドメインである、LOV2 ドメインを用いた。LOV2 ドメインは光照射により、構造が変化し、他のタンパク質の活性を調節できる。そこで、mCherry と幾つかの核輸出シグナル-LOV2 ドメイン-核移行シグナルとを融合し、細胞に発現し光照射を行った。cAMP-dependent protein kinase inhibitor α（PKIα）、mothers against decapentaplegic homolog 4（Smad4）、Catenin delta-1（ctnnd1、p120ctn）の核輸出シグナル（NES）を用いた。効率的にスクリーニングす

*現在の所属：京都大学 大学院医学研究科 システム神経薬理学分野

るため LOV2 domain の明型と暗型をそれぞれ模倣する点変異体（I539E ならびに C450A）をペアで作製し、明型で核に移行する構築を同定した。可視化には mCherry を融合した。それができたら野生型を用い、473 nm 光で核移行することを確認した。

2.　光活性化 CREB の活性の検討

完成した paNLS を CREB に融合した上で cAMP-response element（CRE）下 luciferase を発現する細胞を用い、光照射にて核へ移行することを確認した。これには共焦点顕微鏡（Olympus FV-1200）を用いた。さらに、CREB としての活性は、CRE の下流にて luciferase 蛋白質を発現する構築を用い、western blot でその発現を観察した。

結　果

1. paNLS の作製

作製した paNLS 候補の明型、暗型の分布を比較したところ、PKI α の NES を用いた時に、暗型で細胞質にとどまり、明型で核に移行することが認められた。Smad4 の NES を用いたときには明型で核に移行するのは認められたものの、暗型でもかなり核での分布が認められため、不適当と考えられた。p120ctn を用いた時にも核に移行する像が認められたが、野生型 LOV2 ドメインに繋げた時は光を照射しなくても若干の核への移行が認められた。そのため、これも不適当であると考えられた。そのため、PKI α の NES を用いた paNLS が最適であると考えられた。

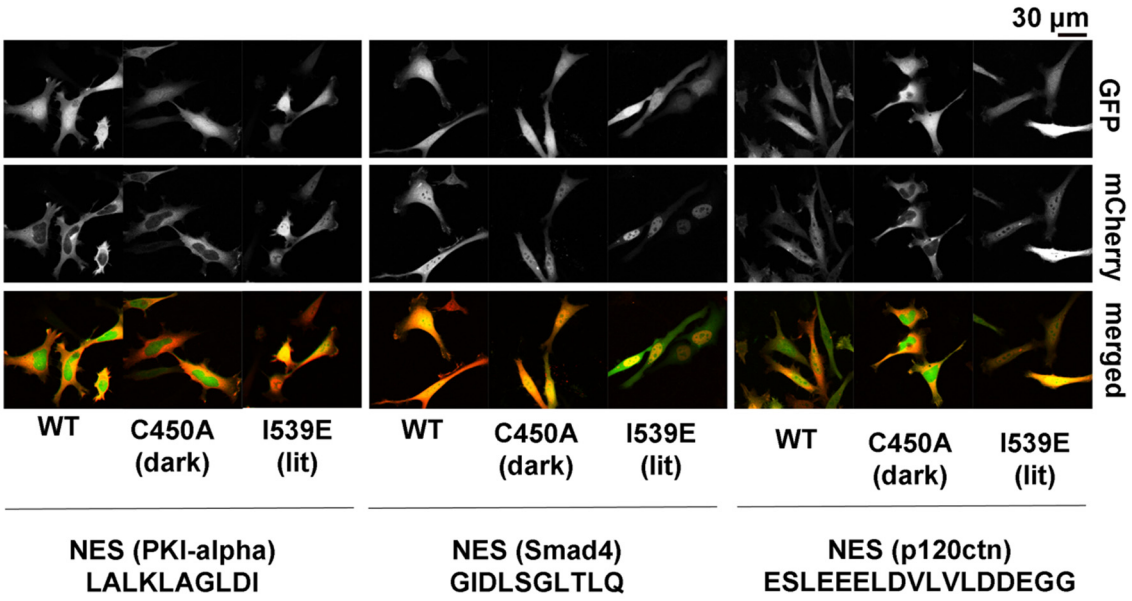


図 2.　様々な核移行シグナルを用いて作製した paNLS 候補

既知の核移行シグナルを野生型 LOV2 ドメイン、あるいは明型と暗型をそれぞれ模倣する点変異体（I539E ならびに C450A）と mCherry との融合蛋白質とし、分布を確認した。GFP を共発現し、細胞の形態を確認した。

2. paCREB の光照射による核移行の検討

次に活性型 CREB と paNLS の融合蛋白質を作製し、mCherry で tag することにより分布を可視化した上で、440 nm 光を照射した。その結果、光照射により核への移行が認められた。光照射を停止すると、数分の単位で可逆的に核外へ戻っていった。

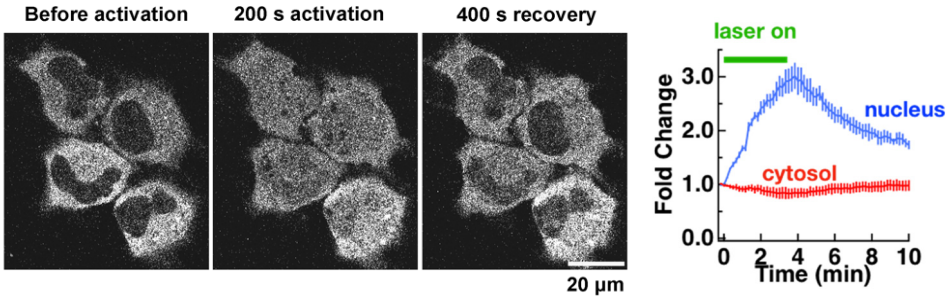


図 3.　paCREB の光照射による核移行の検討

3.　paCREB の光活性化の検討

そこで、この構築を CRE 下流で luciferase 発現する構築と共発現し、luciferase を western blotting にて検出した。CREB は、常時活性型（DIEDML 変異体）、野生型、ならびにリン酸化による活性化を受けない S133A 変異体を用いた。その結果、常時活性型 CREB を用いた場合、明型と暗型では明らかに明型で luciferase の誘導が認められた。しかしながら、暗所においたままの野生型 LOV2 ドメインですでに活性が認められてしまった。一方、野生型 CREB は光照射型を結合したときにも活性は見られなかった。そのため、単に野生型 CREB を発現しただけでは、不十分であった。常時活性型を野生型 LOV2 ドメインに結合した場合、暗所でも活性が認められるのは、過剰発現しているため、少しの leak でも活性があるのではないかと考え、量を減らしたが、DIEDML 変異体–野生型 LOV2 ドメインですでに明型と変わらない程度の活性を持つ状況は変化しなかった。

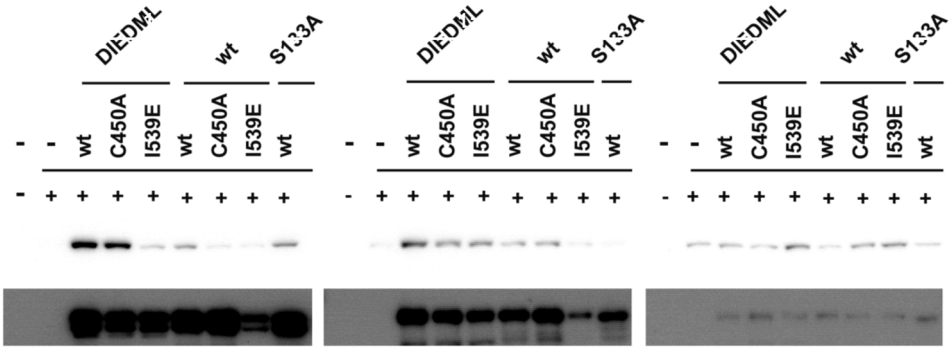


図 4.　paCREB の光照射による活性化の検討

考　察

paNLS は完成したが、CREB と融合タンパク質としたときは、leak のため、使えなかった。今後は CaMKIV を試す、paNLS を複数タンデムにつけるなどの工夫を行っていく。また、CREB や CaMKIV の優勢抑制変異体も一定の有用性があることから、これも試していく。

共同研究者

本研究は、京都大学大学院医学研究科システム神経薬理分野の学生である加古敦也君、實吉岳郎准教授との共同研究による。

文 献

1) McNaughton BL, Barnes CA, O'Keefe J. The contributions of position, direction, and velocity to single unit activity in the hippocampus of freely-moving rats. Exp Brain Res. 1983;52(1):41-9. PMID: 6628596 doi: 10.1007/bf00237147

2) Pfeiffer BE, Foster DJ. Hippocampal place-cell sequences depict future paths to remembered goals. Nature. 2013;497(7447):74-9. Epub 2013/04/19. doi: 10.1038/nature12112. PubMed PMID: 23594744; PubMed Central PMCID: PMCPMC3990408.

3) Marie H, Morishita W, Yu X, Calakos N, Malenka RC. Generation of silent synapses by acute in vivo expression of CaMKIV and CREB. Neuron. 2005;45(5):741-52. Epub 2005/03/08. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.039. PubMed PMID: 15748849.

4) Hahn KM, Kuhlman B. Hold me tightly LOV. Nat Methods. 2010;7(8):595, 7. doi: 10.1038/nmeth0810-595. PubMed PMID: 20676078.