

であり、これが研究の進展を妨げている。一方、最近マラリア原虫には葉緑体と先祖を共有するアピコプラストと呼ばれる 35 kb の環状 DNA を持つオルガネラが存在し、マラリア原虫の増殖に必須な機能を有している事が判って来た。また、電子顕微鏡による観察から両者が細胞の中で常に近傍に局在している事が報告されている。そこでこれまでの成果をふまえ、この2つのオルガネラの相互作用を調べ、さらにそれぞれの機能を独立に解析する目的で細胞分画における挙動を調べた。また、目的とするタンパク質をミトコンドリアおよびアピコプラストに局在させるターゲットシグナルを明らかにする目的で、これらの候補を付加した GFP の局在を調べた。

#### (倫理面への配慮)

本研究はすべてが *in vitro* の実験系であり、倫理面の問題は無い。

### C. 研究結果

熱帯熱マラリア原虫の培養系から単離した粗ミトコンドリア画分を用い、ミトコンドリアとアピコプラストの相互作用を調べる目的でパーコールによる分離に対する細胞破碎条件などを含む、種々の処理、薬剤の効果を検討した。ミトコンドリアに関してはジヒドロオロト酸脱水素酵素およびジヒドロオロト酸-シトクロム *c* 還元酵素活性、またアピコプラストに関しては上述のフェレドキシンに対する抗体および 35Kb の環状 DNA 上の塩基配列を増幅する PCR を用いてその挙動を調べた。その結果、 $N_2$  キャピテーションによる細胞破碎

をこれまでの 1200psi から 300psi に低下させても細胞破碎の効率は変化せず、またより障害の少ないミトコンドリアを得る事ができる点が、明らかになった。また、DNase 処理によりヘモゾインを含むフードバキュール（食胞）や他の構造物の塊が消失し、より効率的な分離が可能となった。さらに微小管やアクチンなどの細胞骨格の阻害剤を加える事により、これまで常に挙動が一致していたミトコンドリアとアピコプラストがパーコールによる遠心後に一部異なった位置に分離された。

さらにミトコンドリアおよびアピコプラストに局在すると予想される熱ショックタンパク質およびアシルキャリアータンパク質のターゲットシグナルを付加した GFP がそれぞれに特異的にミトコンドリアとアピコプラストに局在する事を確認した。

また、TCA 回路系酵素でミトコンドリアのマーカー酵素でもあるコハク酸-ユビキノン還元酵素複合体（複合体 II）の遺伝子破壊株を作成し、その増殖速度が大きく低下する事を見出した。

### D. 考察

電子顕微鏡による観察から、マラリア原虫のアピコプラストが常にミトコンドリアの近傍に局在している事は以前から判っていたが、その生理的意義は不明であった。その相互作用はかなり強固であり、生理的にも意義がある事が示唆されていたが、今回の結果はその相互作用に細胞骨格が関与している可能性を強く示唆している。

今回の結果から、これまで顕微鏡レベルで

しか観察できなかったマラリア原虫のミトコンドリア、アピコプラストおよびフードバキュオールをそれぞれ分離する事が可能となり、より詳細な生化学的解析が可能となった。また、ミトコンドリアおよびアピコプラストにタンパク質を特異的に局在させるターゲットシグナルを確認した事によって、次のステップであるカルシウムシグナリングのプロープの特異的導入へ大きく前進した。

また、TCA 回路と呼吸鎖を直接結ぶ複合体 II の遺伝子破壊がマラリア原虫の増殖を阻害する事が判った点は、これまでその機能が疑われてきたマラリア原虫ミトコンドリアの重要性を明確に示すものであり、薬剤標的としての位置付けに大きな進展と考えられる。

#### E. 結論

寄生虫原虫のミトコンドリア呼吸鎖は宿主哺乳類のミトコンドリアと大きく異なった性質を持ち、特異的阻害剤による抗寄生虫薬の重要な標的となる事が明らかになった。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. Kobayashi T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M.,

Mi-ichi, F., Tanaka, T., Hase, T., Miyajima, A., Kawazu, S., Watanabe, Y., Kita, K. (2007) *Mitochondrion* 7, 125-132

- 2) Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia. Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dysoley, L., Ohmae, H., Kita, K., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Kaneko, A., Bjokman, A., and Kobayakawa, T. (2007) *Antimicrob. Agents. Chemother.* 51, 1071-1077
- 3) Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. Kita, K., Shiomi K., and Ōmura, S. (2007) *Trends in Parasitol.* 23, 223-229
- 4) Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of Neuro2a cells. Shinjyo N., and Kita K., (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 130-135
- 5) Decursin and decursinol angelate selectively inhibits NADH-fumarate reductase of *Ascaris suum*. Shiomi K., Hatano H., Morimoto H., Ui H., Sakamoto K., Kita K., Tomoda H., Lee E. W., Heo T. W., Kawagishi H., and Omura S. (2007) *Planta Medica* 73, 1748-1481
- 6) Change of subunit composition of mitochondrial complex II

- (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in *Ascaris suum* during the migration in the experimental host. Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and Kita K. (2008) *Parasitol. Int.* 57, 54-61
- 7) Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of *Echinococcus multilocularis*, Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis. Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., Kita K. and Oku Y. (2008) *Antimicrob. Agents. Chemother.* 52, 164-170
- 8) Mutation underlying resistance of *Plasmodium berghei* to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo<sub>2</sub>) of the cytochrome *b* gene. Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, Kita K., and Marzuki S. (2008) *Parasitol. Int.* 57, 229-232
2. 学会発表
- 1) 城戸康年、坂元君年、藪 義貞、鈴木高史、齋本博之、北 潔 薬剤標的としての Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) の生化学的解析とその特異的阻害剤 Ascofuranone (AF) の実用化に向けて 第 80 回日本生化学会  
大会第・30 回日本分子生物学会年会  
合同大会平成 19 年 12 月
- 2) 河原賢治、小林環、田中健、畑昌幸、北 潔 ネズミマラリア原虫ミトコンドリア調製法の検討 第 75 回日本寄生虫学会総会 第 80 回日本生化学会大会第・30 回日本分子生物学会年会 合同大会平成 19 年 12 月
- 3) 藤岡 直、中村公亮、城戸康年、坂元君年、藪 義貞、鈴木高史、齋本博之、北 潔 アフリカトリパノソーマへのアスコフラノン/グリセロール *in vitro* 殺原虫併用効果におけるグリセロールの標的 第 80 回日本生化学会大会第・30 回日本分子生物学会年会 合同大会平成 19 年 12 月
- 4) 畑 昌幸、小林 環、田中 健、河原賢治、北 潔 熱帯熱マラリア原虫からのミトコンドリア調製法の検討 第 80 回日本生化学会大会第・30 回日本分子生物学会年会 合同大会 平成 19 年 12 月
- 5) 粟野 睦美、網野比左子、石井直明、北 潔 線虫短寿命変異株 *mev-1* コハク酸-ユビキノ還元酵素 複合体 II の生化学的解析 第 80 回日本生化学会大会第・30 回日本分子生物学会年会 合同大会平成 19 年 12 月
- 6) Kita, K. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy VIII Central American and Caribbean Congress of Parasitology and Tropical Medicine 2007 Dec, Habana,

Cuba

2007 June Salvador, Brazil

7) Kita, K. Diversity of parasite  
mitochondria: as a target of  
chemotherapy 10 IUBMB Conference  
and 36a. Annual Meeting of SBBq

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
分担研究報告書

リポーター遺伝子可視化プローブの開発

分担研究者 菊地和也 大阪大学大学院工学研究科 教授

研究要旨

申請者は、細胞内分子を可視化することを目標に、蛍光プローブをデザイン・合成し、生きている細胞での解析を実現してきた。この結果、細胞内分子について「生きた状態」での分子動態が解析可能となり生物学における新たな知見を得ている。本年度は、この応用範囲を生きた個体に広げるため、生体分子との反応によってコントラストが変化する分子プローブの開発原理作製を行った。

A. 研究目的

本研究では生きた個体のイメージングを行うため、生体分子との反応によってコントラストが変化する分子プローブを開発する。生命科学の進歩とゲノム解読の進行により、細胞内での生理活性種やその物質を認識する蛋白質が同定され試験管内での性質が明らかになるにつれ、次の目標である生理的条件での機能解明が重要視されるようになってきた。この機能解明には細胞をすりつぶさないで、生きたまま機能を調べることができれば多くの情報が得られると考えられる。本研究においては個体内の遺伝子発現状況を可視化するために MRI 用プローブ分子をデザイン合成し生物応用を行う。

酵素活性を *in vivo* で可視化する方法として MRI は生体深部の観測においても優れた空間分解能を示すため、酵素活性を MRI で観測できれば極めて有用な情報が得られる。しかし、酵素活性を検出する MRI プローブはほとんど存在しない。そこで、本研究では MRI シグナルの on/off を分子設計により制御した新規酵素活性検出プローブの開発に着手した。

B. 研究方法

$\text{Fe}^{3+}$  や  $\text{Gd}^{3+}$  などの常磁性金属イオンは、NMR測定において横緩和時間  $T_2$  を短縮させ、結果として NMR シグナルを大きく減少させることが知られていた。本研究では、そのシグナル消失現象を利用することで、酵素反応前には MRI シグナルを消失させ、酵素反応後に初めてシグナルが現れるシステムを考案した。このシステムを最大限に生かすために、バックグラウンドシグナルが極めて小さい  $^{19}\text{F}$  MRI を選択した。この応用により、通常の  $^1\text{H}$  MRI で見られるようなバックグラウンドが全く存在しない画像が得られる。このような *in vivo* イメージングの手法は、全く新しい技術であり、波及効果の大きい研究であると考えている。 $\text{Gd}^{3+}$  などの常磁性金属イオンを含む化合物の NMR スペクトルにおいて、常磁性イオンの近傍に存在する観測核種のピークは大きくブロード化することが知られている。これは、常磁性イオンの不対電子が、観測核種の核スピに対して磁気的な影響を与え、横緩和時間  $T_2$  を短縮させることに起因している。ブロード化した NMR シグナル

は、MRIで測定した際に低いシグナル強度を示すことになる。そこで、酵素反応によって常磁性金属イオンと観測核種の距離を離し、常磁性効果を解消することができれば、MRIシグナル強度の増大を観測できるはずである。この原理に基づきプローブデザインを行った。MRIの観測核種としては、生体バックグラウンドシグナルが極めて小さい $^{19}\text{F}$ を選択した。 $^{19}\text{F}$ を含む分子と常磁性の $\text{Gd}^{3+}$ 錯体をペプチドリンカーで繋いだ分子の $^{19}\text{F}$  MRIスペクトルは $\text{Gd}^{3+}$ イオンの常磁性効果を受けて、シグナル強度が極めて低下する。ここに、リンカーペプチド配列を切断するプロテアーゼを加えることで酵素反応によって $T_1$ 及び $T_2$ が大きく減少することが示された。特に、 $T_2$ 変化はイメージングに重要であり、酵素反応によって基質が切断されることで $T_2$ が短縮しコントラストは上昇することが予想された。

#### (倫理面への配慮)

DNA組換え実験ならびに動物実験に関しては、大阪大学吹田キャンパスの該当の委員会に申請を行い、認められたプロトコールに基づいて実験を行った。

#### C. 研究結果

ターゲット酵素として caspase-3 を選択した。caspase-3 はアポトーシスの実行過程において中心的役割を果たす加水分解酵素であり、アポトーシス細胞内でその酵素活性が大きく上昇することが知られている。また、ある種の抗がん剤は癌細胞にアポトーシスを誘導することが知られており、*in vivo* で caspase-3 の酵素活性を検出できれば癌研究などにおける重要な分析手法になる。

本研究ではプローブを合成し、まず *in vitro* で酵素反応の前後で $^{19}\text{F}$ -NMRシグナルが変化することを示し、酵素反応によって $T_1$ 及び $T_2$ が大きく減少することが示された。

#### D. 考察

特に、 $T_2$  変化はその減少によってコントラストが上昇するためイメージングに重要であり、上記変化によってコントラストは約 1,000 倍上昇することが示された。この結果を発展させ、マウスやラットを用いて caspase-3 の *in vivo* イメージングを行う予定である。さらに、癌細胞などで活性が特異的に上昇する加水分解酵素をターゲットにしたプローブを作製し、疾患モデル動物の *in vivo* 酵素活性を追う。このプローブを生物個体に応用することにより、一般的な、酵素活性を生物個体レベルで追跡することが可能となることが予想される。

#### E. 結論

動物個体内の酵素活性可視化を目標として、緩和時間変化型の機能性MRIプローブの設計原理を確立した。この原理を用いて、調べたい生体内分子との反応によってコントラストが変化するプローブ分子を作製できることが期待できる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. S. Mizukami, R. Takikawa, F. Sugihara, Y. Hori, H. Tochio, M. Wälchli, M. Shirakawa, **K. Kikuchi**, Paramagnetic Relaxation-based  $^{19}\text{F}$  MRI Probe to Detect Protease Activity. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 794-795, 2008

2. R.A. Colvin, A.L. Bush, I Volitakis, C.P. Fontaine, D. Thomas, **K. Kikuchi**, W.R.Holmes, Insights into  $\text{Zn}^{2+}$  Homeostasis in Neurons from Experimental and Modeling Studies. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 294: C726-C742, 2008.

3. T. Yogo, Y. Urano, A. Mizushima, H. Sunahara, T. Inoue, K. Hirose, M. Iino, **K. Kikuchi**, T. Nagano, Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 28-32, 2008.

4 K. Hanaoka, **K. Kikuchi**, T. Terai, T. Komatsu, T. Nagano, A  $\text{Gd}^{3+}$ -Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Sensitive to beta-Galactosidase Activity Utilizing a Receptor-Induced Magnetization Enhancement (RIME) Phenomenon. *Chem. Eur. J.*,14: 987-995, 2008.

5. K. Hanaoaka, **K. Kikuchi**, S. Kobayashi, T. Nagano, A Time-resolved Long-lived Luminescence Imaging Method Employing Luminescent Lanthanide Probes with a New Microscopy System, *J. Am. Chem. Soc.* 129: 13502-13509, 2007.

### 2. 学会発表

1. **Kikuchi K**, Fluorescent Sensor Molecules with Tunable Fluorescence Switches for Cellular Imaging. The 6th JSPS Forum in France : "Chemical and physical nanobiology for medicine" JSPS-University of Strasbourg, 2007 November.

### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

#### 1. 特許取得

発明の名称：「MRI用プローブ」，発明者：菊地和也，水上進，滝川利佳，白川昌宏，出願番号：特願2007-68753，出願月日：2007年9月12日。

#### 2. 実用新案登録

特になし

#### 3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）  
 分担研究報告書

認知活動感受性プロモーターの開発

分担研究者 奥野浩行 東京大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

神経細胞においてカルシウムシグナルは認知活動に 관련된 遺伝子発現活性化を引き起こす。この遺伝子活性化をリアルタイムで可視化する技術を確認するため、神経活動に依存した遺伝子発現レポーターを構築し、このレポーター遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成した。

A. 研究目的

生体内カルシウムシグナリング破綻を計測する基盤技術の一つとして、カルシウムシグナル依存的な遺伝子発現をリアルタイムで計測するプロンプ・レポーター分子を構築し、このレポーターを動物個体にする系の確立およびトランスジェニック動物の作成を目的とする。

B. 研究方法

神経特異的前初期遺伝子*Arc*は、記憶課題負荷や感覚刺激等によって海馬や大脳新皮質においてカルシウムシグナルに依存的に発現誘導される。この*Arc*遺伝子の発現制御領域を単離・解析し、この制御下に蛍光蛋白や発光蛋白を配置したレポーターを構築し、①ウイルスベクターへの応用および②トランスジェニック動物を作成を行う。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験および組換えDNA実験は、所属機関該当委員会の承認を得た上、機関ガイドラインを遵守し行った。

C. 研究結果

培養神経細胞を用いた系を用いて詳細な*Arc*遺伝子の発現機構解析を行った結果、神経特異性および活動依存性を規定するプロモーター領域の同定に成功した(Kawashima et al., 投稿中)。このプロモーター制御下に蛍光蛋白およびルシフェラーゼをもつレポーターを構築し、培養神経細胞におけるレポーター性能を検討した。このうちのいくつかのレポーターについて、トランスジェニックマウスの作成を行い、4種の異なるレポーターマウスを樹立した。

D. 考察

現在樹立したトランスジェニックマウスのレポーター性能を解析中である。予備的な結果ではあるが、蛍光蛋白をレポーターに持つある系統では神経活動依存的な蛍光の増加が大脳新皮質および海馬において観察されており、これらマウスの有用性が示唆された。

次年度はインピボにおけるレポーター分子の検出法の確立をめざす。



## E. 結論

本研究による神経活動依存的な遺伝子発現の可視化法は、認知症をはじめとする神経疾患の病態の解明のための有用なツールとなる可能性が高い。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Takemoto-Kimura, S., Ageta-Ishihara, N., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Mano, T., Okamura, M., Fujii, H., Fuse, T., Hoshino, M., Suzuki, S., Kojima, M., Mishina, M., **Okuno, H.** & Bito, H. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. *Neuron* **54**, 755-770 (2007).
2. Bito, H., Takemoto-Kimura, S., & **Okuno, H.** Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs? in *Molecular Pain* (M. Zhuo Ed.), Springer, New York, in press.
3. **奥野浩行**, 藤井哉, 尾藤晴彦: 情報素子としてのシナプス・構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義. p220-233, in ナノメディシン 宇理須恒雄 編, オーム社, 東京 (2008).

## 2. 学会発表

1. **Okuno, H.**: Visualization of activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. ISNM2007/MB-ITR2007, 2007.4.20-22, Okazaki, Japan. シンポジウム、口頭発表
2. **Okuno, H.**, H., Naruse, H., Kawashima, T., Fujii, H., Nonaka, M., Chowdhury, S., Worley, P & Bito, H.: Synaptic targeting of Arc via high affinity interaction with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase IIbeta. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3-7, San Diego, USA. 口頭発表
3. Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Nonaka, M., Fujii, H., **Okuno, H.** & Bito, H.: Differential control of cortical axonogenesis and dendritogenesis by alternate activation of CaMKIalpha and gamma, 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3-7, San Diego, USA. 口頭発表
4. **Okuno, H.**, Fujii, H., Nonaka, M., Ageta-Ishihara, N., Fuse, T., Takemoto-Kimura, S. & Bito, H.: Quantitative imaging for elucidating neuronal signal transduction mechanisms. BMB2007, 2007.12.11-15, 横浜. テクニカルセミナー 口頭発表
5. 竹本-木村さやか, 石原-上田奈津実, 野中美応, **奥野浩行**, 尾藤晴彦: ラフトアンカー型CaMキナーゼ、CLICK-IIIによる樹状突起形成制御. 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10-12, 横浜. シンポジウム 口頭発表
6. **Okuno, H.**, Naruse, H., Kawashima, T., Fujii, H., Chowdhury, S., Worley, P. & Bito, H.: Regulation of Arc localization at synapses via interaction with CaMKIIbeta. 第30回日本神経科学大会, 2007.9.10-12, 横浜. 口頭発表

<p>7. <u>奥野浩行</u>、野中美応、藤井哉、竹本-木村さやか、尾藤晴彦: 神経可塑性関連タンパクArcとPSDタンパク間の相互作用およびシナプス局在機構の解析. 生理学研究所研究会「細胞機能を制御するシグナリング機構の普遍性と特異性」、2007.10.4-5, 岡崎. 口頭発表</p> <p>8. <b>Okuno, H.</b>, Fujii, H., Naruse, H., Kawashima, T., Worley, P &amp; Bito, H.: Regulation of Arc/Arg3.1 localization in dendritic spines via interaction with Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent kinase II. 7th HFSP Awardees Meeting, 2007.7.18-21, Brisbane, Australia. ポスター発表</p> <p>9. <b>Okuno, H.</b>, Naruse, H., Bito, H.: Optical analysis activity-dependent protein synthesis in dendritic regions of neurons. 2<sup>nd</sup> International workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2007.9.6-7, Tokyo, Japan. ポスター発表</p> <p>10. Takemoto-Kimura, S., Ageta-Ishihara, N., Nonaka, M., <b>Okuno, H.</b> &amp; Bito, H.: Requirement for palmitoylation and raft insertion of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma during cortical dendritogenesis. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3-7, San Diego, USA. ポスター発表</p> <p>11. Morinobu, S., Takahashi, T., Iwamoto, Y., Kawano, K.-I., Yamawaki, S., <b>Okuno, H.</b> &amp; Bito, H.: Neonatal isolation induces susceptibility to learned helplessness through the decrease in LIMK1 in the adult rat hippocampus. 37<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Neuroscience, 2007.11.3-7, San Diego, USA. ポスター発表</p>	<p>H. 知的財産権の出願・登録状況 特になし</p>
--	----------------------------------

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<b>奥野浩行</b> 、 <b>藤井哉</b> 、 <b>尾藤晴彦</b>	情報素子としてのシナプス-構造・機能ならびに新たな疾患制御標的としての意義-	宇理須恒雄	ナノメディシン	オーム社	東京	2008	220-233
<b>Bito, H.</b> , Takemoto-Kimura, S., & <b>Okuno, H.</b>	Activity-dependent gene regulation: How do synapses talk to the nucleus and fine-tune neuronal outputs?	M. Zhuo	<i>Molecular Pain</i>	Springer	New York	2008	in press

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takemoto-Kimura, S., Ageta-Ishihara, N., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Mano, T., Okamura, M., Fujii, H., Fuse, T., Hoshino, M., Suzuki, S., Kojima, M., Mishina, M., <b>Okuno, H.</b> & <b>Bito, H.</b>	Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\gamma$ .	<i>Neuron</i>	54	755-770	2007

Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, <b>Bito H</b> , Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori, Y.	RIM1 confers sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca <sup>2+</sup> channels.	<i>Nature Neurosci.</i>	<b>10</b>	691-701	2007
Fuse T, Ohmae S, Takemoto-Kimura S, <b>Bito H</b> .	DCLK1	<i>UCSD-Nature/Molecule Pages</i>		doi:10.1038/mp.a003011.01	2007
尾藤晴彦、野中美応、布施俊光、藤井哉、竹本-木村さやか、奥野浩行	シナプス機能と PSD 構築を制御する分子機構	蛋白質核酸酵素	<b>53</b>	418-423	2008
Kobayashi T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T., Hase, T., Miyajima, A., Kawazu, S., Watanabe, Y., <b>Kita, K.</b>	Mitochondria and apicoplast of <i>Plasmodium falciparum</i> : behaviour on subcellular fractionation and the implication	<i>Mitochondrion</i>	<b>7</b>	125-132	2007
<b>Kita, K.</b> , Shiomi K., and Ōmura, S	Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies	<i>Trends in Parasitol</i>	<b>23</b>	223-229	2007

Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dysoley, L., Ohmae, H., <b><u>Kita, K.</u></b> , Krudsood, S., Looareesuwan, S., Kaneko, A., Bjokman, A., and Kobayakawa, T.	Independent evolution of pyrimethamine resistance in <i>Plasmodium falciparum</i> in Melanesia	<i>Antimicrob. Agents. Chemother</i>	<b>51</b>	1071-1077	2007
Shiomi K., Hatano H., Morimoto H., Ui H., Sakamoto K., <b><u>Kita K.</u></b> , Tomoda H., Lee E. W., Heo T. W., Kawagishi H., and Omura S.	Decursin and decursinol angelate selectively inhibits NADH-fumarate reductase of <i>Ascaris suum</i>	<i>Planta Medica</i>	<b>73</b>	1478-1481	2007
Shinjyo N., and <b><u>Kita K.</u></b>	Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of Neuro2a cells.	<i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>	<b>358</b>	130-135	2007
Iwata F., Shinjyo N., Amino H., Sakamoto K., Islam M. K., Tsuji N. and <b><u>Kita K.</u></b>	Change of subunit composition of mitochondrial complex II (Succinate-ubiquinone reductase/Quinol-fumarate reductase) in <i>Ascaris suum</i> during the migration in the experimental host.	<i>Parasitol. Int.</i>	<b>57</b>	54-61	2008

Matsumoto J., Sakamoto K., Shinjyo N., Kido Y., Yamamoto N., Yagi K., Miyoshi H., Nonaka N., Katakura K., <b>Kita K.</b> and Oku Y.	Anaerobic NADH-Fumarate Reductase System Is Predominant in the Respiratory Chain of <i>Echinococcus multilocularis</i> , Providing a Novel Target for the Chemotherapy of Alveolar Echinococcosis.	<i>Antimicrob. Agents. Chemother</i>	52	164-170	2008
Siregar J. E., Syafruddin D., Matsuoka H, <b>Kita K.</b> , and Marzuki S.	Mutation underlying resistance of <i>Plasmodium berghei</i> to atovaquone in the quinone binding domain 2 (Qo <sub>2</sub> ) of the cytochrome <i>b</i> gene	<i>Parasitol. Int.</i>	57	229-232	2008
Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Hori Y, Tochio H, Wälchli M, Shirakawa M, <b>Kikuchi K</b>	Paramagnetic Relaxation-based <sup>19</sup> F MRI Probe to Detect Protease Activity.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	130	794-795	2008
Colvin RA, Bush AL, Volitakis I, Fontaine CP, Thomas D, <b>Kikuchi K</b> , Holmes WR	Insights into Zn <sup>2+</sup> Homeostasis in Neurons from Experimental and Modeling Studies.	<i>Am. J. Physiol., Cell Physiol.</i>	294	C726-C742	2008
Yogo T, Urano Y, Mizushima A, Sunahara H, Inoue T, Hirose K, Iino M, <b>Kikuchi K</b> , Nagano T	Selective Photoinactivation of Protein Function through Environment-sensitive Switching of Singlet Oxygen Generation by Photosensitizer.	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	105	28-32	2008

Hanaoka K, <b><u>Kikuchi K</u></b> , Terai T, Komatsu T, Nagano T	A Gd <sup>3+</sup> -Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent Sensitive to beta-Galactosidase Activity Utilizing a Receptor-Induced Magnetization Enhancement (RIME) Phenomenon.	<i>Chem. Eur. J.</i>	<b>14</b>	987-995	2008
Hanaoaka K, <b><u>Kikuchi K</u></b> , Kobayashi S, Nagano T	A Time-resolved Long-lived Luminescence Imaging Method Employing Luminescent Lanthanide Probes with a New Microscopy System.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	<b>129</b>	13502-135 09	2007

# 科学

✉ kagaku@asahi.com

朝日新聞 6月15日付朝刊科学面  
にて解説・紹介

## LHC試運転、来春に延期

11月の予定だった欧州合同原子核研究機関(CERN)の大型ハドロン衝突型加速器(LHC)の試運転が来春になりそうだ。CERNの報道官がAFP通信などに、こうした見通しを認めた。LHCは重さの元になるヒッグス粒子の発見などが使命だ。陽子のビームを細く絞る最後の磁石が故障するなど、細かいつまずきが重なったことが延期の理由とされている。

## 神経突起つくる酵素解明

神経細胞は突起を伸ばして互いつながり、情報をやりとりする。その突起の形成に必要な酵素の遺伝子を東京大の尾藤晴彦准教授、竹本さやか助教授らが突き止めた。

このリン酸化酵素がないと、情報の信号を受け取る樹状突起ができなくなり、あると樹状突起が伸びることがわかった。この酵素は脂質とくっつく性質をもち、脂質の膜付近にとどまる。狭い範囲にとどまり、突起の伸長にかかわるほかのたんぱく質をリン酸化させることが、突起づくりに必要だった。(ニューロン)

## 音聞き分ける ゾウの足

アフリカゾウ=写真は赤ちゃん、AFP時事=は遠くのゾウの声を足で「聞き分ける」ことが、米スタン



フォード大の研究でわかった。ゾウが出す人に聞こえない低周波の声は、その振動が地面の揺れとなって伝わり、ゾウの足で捕らえられる。

ライオンが近づいた時にゾウが出す「警報音」を収録して人工的に再生したら、近くの群れから出た警報を捕らえたゾウたちは子どもを群れの中心に移動させるなどの警戒反応を示した。遠くの群れの警報には、あまり反応しなかった。(ニューサイエンティスト)

## 「万能細胞」で論文訂正

米ミネソタ大グループは、ネズミの骨髄の幹細胞から多くの臓器になりうる「万能細胞」を作ったとする02年の論文について、データの一部が誤っていたと認め、14日付英科学誌ネイチャーに訂正を出した。グループは、論文の結論に影響が出るものではないとしている。

任  
関  
発  
見  
は  
説  
明  
す  
る。

「  
」  
と  
話  
し  
て  
い  
る。



Science 誌 2007 年 6 月 22 日号にて  
Editors' Choice 論文として解説



[www.stke.org](http://www.stke.org)

### << Dendrites Are Only a CLICK Away

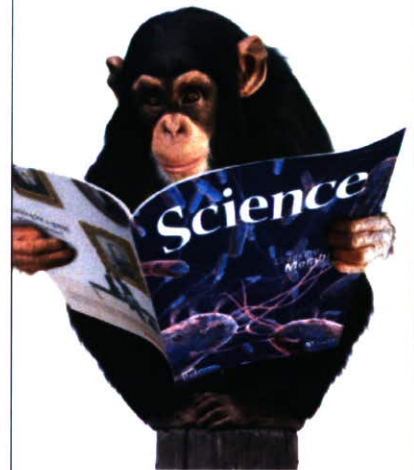
From one side of the neuronal cell body an axon emerges; from the other, a branched dendritic tree. These processes are crucial for the ability of a neuron to receive and transmit electrochemical signals via synapses. Neuronal activity is important in driving dendrite outgrowth, but the intermediary players are not well understood. Because neuronal activity increases intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, roles for members of the family of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) have been investigated. Takemoto-Kimura *et al.* have looked at CLICKIII (also known as CaMKI $\gamma$  or CL3). They found that CL3 undergoes sequential lipid modifications of its C-terminal tail: prenylation, which anchors CL3 to the plasma membrane, followed by palmitoylation. Lipid fractionation experiments then showed that prenylated and palmitoylated CL3 was predominantly associated with lipid raft microdomains in the plasma membrane, and most of the lipid raft-localized CL3 was found in the proximal dendrites. Studies of rat embryonic neurons revealed that total dendrite length was enhanced by overexpression of wild-type but not kinase-deficient CL3, and knockdown of CL3 resulted in fewer and shorter dendrites. Lipid raft-localized CL3 in dendrites activated the Rho GTPase family member Rac, leading to rearrangement of the actin cytoskeleton of the growing dendrite. Together these data suggest that CL3 is a key factor in transducing  $Ca^{2+}$  transients into signals responsible for dendrite outgrowth. — JFF

*Neuron* 54, 755 (2007).

40

## From primates to proteomics research

For careers in science, turn to *Science*



Don't get lost in the career jungle. At ScienceCareers.org we are committed to helping you find the right job, and delivering useful advice. Our knowledge is firmly founded on the expertise of *Science*, and the long experience of AAAS in advancing science around the world. ScienceCareers.org is the natural selection.

[www.sciencecareers.org](http://www.sciencecareers.org)

Features include:

- Thousands of job postings
- Career tools from Next Wave
- Grant information
- Resume/CV Database
- Career Forum



# Regulation of Dendritogenesis via a Lipid-Raft-Associated $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase CLICK-III/ $\text{CaMKI}\gamma$

Sayaka Takemoto-Kimura,<sup>1,7</sup> Natsumi Ageta-Ishihara,<sup>1,2,7</sup> Mio Nonaka,<sup>1</sup> Aki Adachi-Morishima,<sup>1</sup> Tatsuo Mano,<sup>1</sup> Michiko Okamura,<sup>1</sup> Hajime Fujii,<sup>1</sup> Toshimitsu Fuse,<sup>1,2</sup> Mikio Hoshino,<sup>3</sup> Shingo Suzuki,<sup>4,6</sup> Masami Kojima,<sup>4,6</sup> Masayoshi Mishina,<sup>5,6</sup> Hiroyuki Okuno,<sup>1</sup> and Haruhiko Bito<sup>1,2,6,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurochemistry

<sup>2</sup>The Center for Integrated Brain Medical Science

Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>3</sup>Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

<sup>4</sup>Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka, 563-8577, Japan

<sup>5</sup>Department of Molecular Neurobiology and Pharmacology, Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

<sup>6</sup>SORST-JST, Kawaguchi 332-0012, Japan

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence: hbito@m.u-tokyo.ac.jp

DOI 10.1016/j.neuron.2007.05.021

## SUMMARY

$\text{Ca}^{2+}$  signaling plays a central role in activity-dependent regulation of dendritic arborization, but key molecular mechanisms downstream of calcium elevation remain poorly understood. Here we show that the C-terminal region of the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III (CL3)/ $\text{CaMKI}\gamma$ , a membrane-anchored CaMK, was uniquely modified by two sequential lipidification steps: prenylation followed by a kinase-activity-regulated palmitoylation. These modifications were essential for CL3 membrane anchoring and targeting into detergent-resistant lipid microdomains (or rafts) in the dendrites. We found that CL3 critically contributed to BDNF-stimulated dendritic growth. Raft insertion of CL3 specifically promoted dendritogenesis of cortical neurons by acting upstream of RacGEF STEF and Rac, both present in lipid rafts. Thus, CL3 may represent a key element in the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and lipid-raft-delineated switch that turns on extrinsic activity-regulated dendrite formation in developing cortical neurons.

## INTRODUCTION

Neurons grow two characteristic processes: axons and dendrites. The specification of these processes, their outgrowth, and their precise arborization are prerequisites for the formation of appropriate connections between neurons. These steps, which constitute the basis for the

establishment of neuronal circuits, represent central questions in neuroscience for which the molecular mechanisms still remain largely unsolved.

The dendrite formation, which is critical for proper integration of synaptic inputs, is believed to be determined by genetically encoded cell-intrinsic signals as well as environmental-extrinsic signals from neighboring cells. Recent works have shed light on the critical roles of semaphorin 3A, neurotrophins, Notch1, Slit-1, cadherin, BMP, and Wnt/ $\beta$ -catenin in mediating signaling events regulating various stages of dendritogenesis in the developing cerebral cortex (reviewed in Ciani and Salinas, 2005; Higgins et al., 1997; Jan and Jan, 2003; Whitford et al., 2002). In addition, a wealth of work has shown that the formation of dendritic trees is shaped by neuronal activity (Cline, 2001; Konur and Ghosh, 2005). For example, surgical and pharmacological attenuation of sensory inputs impaired dendritic development in the visual cortex as well as in the barrel cortex (Fox and Wong, 2005), while in contrast, enriched environments promoted dendritic growth (Kozorovitskiy et al., 2005). However, how neural activity regulates dendrite arborization at the molecular and cellular level is not well understood.

Activity-dependent regulation of dendritic arbors is believed to be mediated, in large part, via increases in intracellular calcium concentration, which in turn activate several signaling cascades. How can neuronal activity influence dendrite formation downstream of calcium entry and mobilization? Several works have so far indicated a possible involvement of one or multiple members of the multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin (CaM)-dependent protein kinases (CaMKs) family in dendritic development. CaMKs represent major targets for an activated  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex generated by intracellular calcium rise, and two subclasses (the  $\text{CaMKI/IV}$  subfamily [consisting

of five genes] and a CaMKII subfamily [consisting of four genes]) have been shown to be highly expressed in the central nervous system (CNS) (Soderling and Stull, 2001; Hook and Means, 2001; Hudmon and Schulman, 2002). The general CaMK inhibitor KN-62, which inhibited activation of members of both kinase subclasses, was shown to block neurite outgrowth in various cell lines (Zheng et al., 1994; Kuhn et al., 1998; Vaillant et al., 2002). The role of CaMKII in neurite outgrowth has been controversial, however, in part because of the contrasting effect observed between the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of CaMKII (Konur and Ghosh, 2005). CaMKIV, enriched in the nucleus, was shown to mediate dendrite formation via CREB phosphorylation and CREB-mediated transcription (Redmond et al., 2002). Additionally, CaMKI activity may participate in the regulation of growth cone motility and neurite extension (Wayman et al., 2004; Schmitt et al., 2004), but the underlying isoforms and critical mechanisms involved remained obscure.

Recently, a variety of Rho small GTPase family proteins were shown to contribute to dendritic morphogenesis through regulation of actin cytoskeletal remodeling (Luo, 2002; Van Aelst and Cline, 2004). How the small GTPase activity was turned on and off as a function of neuronal activity and multiple coexisting extracellular cues remained largely unknown. In some instances, the GDP-GTP exchange factor (GEF) for a Rho small GTPase family protein was shown to be activated downstream of Ca<sup>2+</sup>. Thus, a synaptically localized Rac-GEF Tiam1 was involved in the regulation of dendritic spines by linking NMDA-receptor activity to Rac1-dependent actin remodeling (Tolias et al., 2005). However, it was not known whether nor which specific CaMK activity may contribute to small GTPase-dependent dendritic actin remodeling during dendritogenesis.

Here, we show a unique function of a lipid-raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase, CLICK-III (CL3)/CaMKI $\gamma$ , in dendritogenesis of developing cortical neurons. The C-terminal end of CL3 was the substrate for sequential lipidifications, i.e., prenylation and palmitoylation. Prenyl-palmitoyl-CL3, generated in a kinase-activity-dependent manner, efficiently accumulated into dendrite-enriched raft-like lipid microdomains. Intriguingly, knockdown or knockout of CL3 reduced the number and the total length of dendrites, but not those of axons. Furthermore, blockade of CL3 occluded BDNF-stimulated dendritic growth, and CL3 membrane anchoring appeared to play an important role in mediating this morphological effect. In keeping with the critical significance of raft insertion of CL3, Rac and its upstream regulator STEF, a Rac-specific GEF, acted downstream of CL3 in the molecular cascade linking Ca<sup>2+</sup> to actin remodeling, and both were present in the lipid rafts. Consistent with these results, Rac activity was sufficient to rescue the dendritic phenotype associated with CL3 knockdown, while raft disruption abolished the dendritogenic effect of CL3 overexpression. Taken together, we thus uncovered a novel CaMK-Rac signaling pathway by

which lipid raft insertion and activation of a specific CaMKI isoform may couple extrinsic neuronal activity with dendrite-restricted cytoskeletal remodeling in developing cortical neurons.

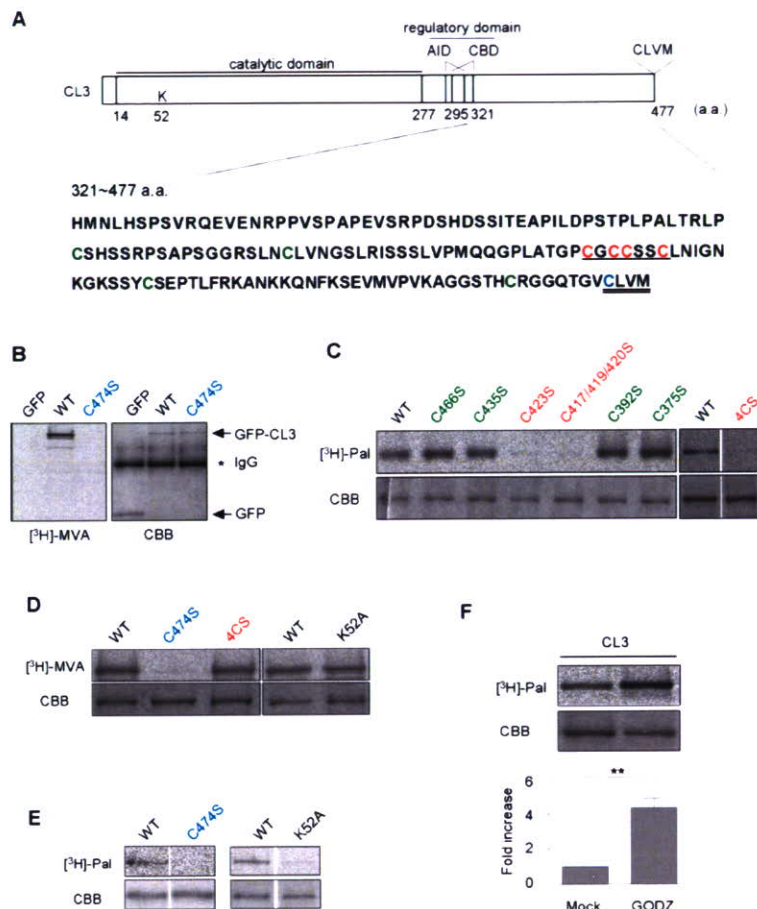
## RESULTS

### **Prenylated CL3 Is Palmitoylated in a Kinase-Activity-Dependent Manner and This Dual Lipidification Determines Golgi Membrane Anchoring and Dendrite-Enriched Lipid Raft Targeting**

Prenylation was often reported to be accompanied by palmitoylation in many neuronal proteins (El-Husseini and Bredt, 2002). We directly tested the presence of multiple palmitoylation sites in the vicinity of the CAAX motif of CL3/CaMKI $\gamma$ , a membrane-anchored CaMK (Takemoto-Kimura et al., 2003) (Figure 1A). Tritiated precursors for either prenyl or palmitoyl moieties, [<sup>3</sup>H]-mevalonate or [<sup>3</sup>H]-palmitate, were added in the culture medium of COS-7 cells expressing either wild-type (WT) CL3 or various C-to-S substitution mutants of CL3, and lipidification of CL3 was tested using SDS-PAGE and digital autoradiography. Either [<sup>3</sup>H]-mevalonate conjugation or [<sup>3</sup>H]-palmitate incorporation was significantly detected in WT-expressing cells (Figures 1B and 1C, WT). The former was absent in a C474S mutant (Figure 1B, C474S), consistent with a CAAX prenylation. In contrast, the latter was reduced to background levels in a quadruple mutation (4CS) of four cysteines (C417S, C419S, C420S, and C423S) (Figure 1C, 4CS), identifying these residues as potential palmitoylation sites.

We next tested whether there was a possible interaction between prenylation, palmitoylation, and kinase activity. Interestingly, the 4CS mutant was prenylated to a similar extent as the WT CL3 (Figure 1D), while palmitoylation was hardly detected in a prenylation-deficient C474S mutant (Figure 1E). Thus, prenylation and palmitoylation might take place in a series, with prenylation perhaps occurring prior to and as a prerequisite for palmitoylation. Furthermore, a K52A kinase-inactive mutant of CL3, in which the consensus ATP-binding lysine residue was replaced with an alanine, was prenylated as much as the WT (Figure 1D), but its palmitoylation was significantly impaired (Figure 1E). These lines of evidence suggested that kinase activation on a prenylated (and thus presumably membrane inserted) CL3 may perhaps trigger a robust conformational change near the membranes that is necessary for full palmitoylation.

Recently, 23 palmitoyl acyl transferases (PATs) have been identified (Fukata et al., 2004; Linder and Deschenes, 2004). The brain-specific localization and the Golgi enrichment of a PAT, originally identified as a Golgi-apparatus-specific protein with the DHHC zinc finger domain (GODZ) (Uemura et al., 2002), were reminiscent of the distribution of CL3. We therefore tested whether GODZ might palmitoylate CL3. GODZ coexpression with CL3 in heterologous cells yielded a 4.3-fold



**Figure 1. The C-Terminal Region of CL3 Is Covalently Modified by a Dual Lipidification Mechanism that Involves Prenylation of the CAAX Motif and a Subsequent Activity-Regulated Palmitoylation**

(A) Domain structure of CL3 (upper panel) and amino acid sequence of its C-terminal end (lower panel). The numbers show the position of amino acid residues. In addition to a classical prenylation site at the Cys-474 residue (in blue) of the C-terminal CAAX motif (double underline), the unique C-terminal region of CL3 contained multiple Cys residues (in red and green), which constituted potential palmitoylation sites. Among them, four neighboring Cys (in red and underlined) were experimentally validated as critical residues for palmitoylation, as shown also in (C). AID, autoinhibitory domain; CBD, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-binding domain.

(B) Prenylation of the CAAX motif of CL3. Immunoprecipitates for each sample were obtained using an anti-GFP antibody and examined by SDS-PAGE followed by autoradiographic exposure. [<sup>3</sup>H]-mevalonate ([<sup>3</sup>H]-MVA) incorporation (left) was detected in a wild-type GFP-CL3 (WT), but not in a CAAX motif mutant (C474S) or GFP alone. The amount of loaded proteins in each lane was comparable, as shown by CBB staining (right). The mobility of GFP-CL3 and GFP are indicated by arrows, and the heavy chain of the IgG used for immunoprecipitation is shown by an asterisk.

(C) Determination of critical palmitoylated Cys residues on CL3. Incorporation of [<sup>3</sup>H]-palmitate ([<sup>3</sup>H]-Pal) was observed in wild-type GFP-CL3 (WT). Incorporation of [<sup>3</sup>H]-palmitate

was significantly diminished in two mutants (in red), C417/419/420S (triple Cys-to-Ser substitution at residues 417, 419, and 420) and C423S, indicating the existence of multiple Cys residues critical for palmitoylation. Unaffected mutants are shown in green. A quadruple mutant (4CS) with a quadruple substitution had the least amount of [<sup>3</sup>H]-palmitate incorporation and was considered to be a palmitoylation-deficient mutant (4CS).

(D) Unchanged level of prenylation on both a palmitoylation-deficient (4CS) and a kinase-dead (K52A, a Lys residue in the ATP-binding pocket replaced with an Ala) mutant of CL3.

(E) A decrease in palmitoylation was observed in a prenylation-deficient mutant (C474S), as well as a kinase-inactive mutant (K52A).

(F) Coexpression of HA-GODZ, a neuronal palmitoyl acyl transferase, led to a significant increase in CL3 palmitoylation by  $4.32 \pm 0.55$  fold ( $n = 5$ ). \*\* $p < 0.01$  by paired t test.

increase ( $4.3 \pm 0.55$ ,  $n = 5$ ) in the amount of palmitate incorporation (Figure 1F).

We previously found that prenylation per se may be necessary for membrane anchoring and for trafficking to diverse membrane compartments, such as the Golgi apparatus or the plasma membranes (Takemoto-Kimura et al., 2003). To test whether an additional palmitoylation may help to redistribute CL3 into specific membrane signalosomes such as those enriched at lipid rafts (Anderson and Jacobson, 2002), we expressed GFP-tagged CL3 (GFP-CL3) in cultured cortical neurons using a lentiviral vector driven by a synapsin I promoter. Consistent with our hypothesis, CL3 cofractionated with the lipid raft markers, caveolin-2 and flotillin-1, in the Triton X-100-insoluble low-density membrane fractions (Figure 2A). We next directly visualized raft-inserted CL3 localization in cultured neurons treated with 0.1% Triton X-100, as

any residual GFP signal should then be indicative of the presence of CL3 in detergent-resistant membrane microdomains. In keeping with this, a sizable detergent nonextractable pool of GFP-CL3 was present in the perinuclear Golgi and proximal dendrites in developing hippocampal neurons (see Figure S1A in the Supplemental Data available with this article online, -GODZ arrow and arrowhead; and Figure S1B), and this pool was further increased by coexpression of GODZ (Figure S1A, +GODZ arrow and arrowheads). In immature cortical neurons, a large majority of the CL3 signal that was resistant to detergent treatment was present both in the intracellular perinuclear Golgi-like membranes and in the minor processes (i.e., dendrites) (Figure 2B, upper panel, see line scan in the inset for CL3 signal in the dendrites). Importantly, this detergent-resistant pool of CL3 was almost completely lost when neurons were treated with zaragozic acid, an