

remodeling of postsynaptic density (PSD) proteins in Purkinje cell spines. Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S143, P2-b13. 2009. 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18. 名古屋国際会議場, Poster (発表日:2009.9.17)	HH. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)	議場, Symposium (講演日:2009.9.16).
Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, <b>Bito H</b> . Activity-dependent regulation of dendritic growth. Neurosci. Res. 65 Suppl.1: S5, SY1-B2-2, 2009. 第 32 回日本神経科学大会, 2009.9.16-18. 名古屋国際会		

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

ミトコンドリア機能低下の病態生化学的解析

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨 マラリア原虫やトリパノソーマ、またクリプトスポリジウムなど寄生原虫のミトコンドリアやアピコプラスト、最近その存在が明らかになって来たマイトソームなどのオルガネラは宿主哺乳類のそれと大きく異なった性質を持ち、その機能低下を通して化学療法の重要な標的となる。これらのオルガネラにおけるカルシウム動態がその生理機能に大きく関わっているが、本研究では尾藤らが開発した赤色シフト型 FRET 型カルシウムセンサーをオルガネラで発現させ、生活環や環境の変化、また薬剤に対する応答の詳細を解析する系の確立を最終目的としている。その第1段階として、細胞質で合成されたタンパク質をそれぞれのオルガネラに局在させるための特異的ペプチドの配列の同定をめざし、高純度のオルガネラの分離法を確立した。

A. 研究目的

われわれは寄生適応に必須な基本的要素である各種代謝系のなかでも特にエネルギー代謝系に焦点を絞り、ミトコンドリアをはじめとする寄生虫のオルガネラが宿主と極めて異なったエネルギー代謝系を作動させることによって宿主内の環境に適応していることを明らかにしてきた。この成果をふまえマラリア原虫やトリパノソーマのミトコンドリア電子伝達系の特異性を解析することにより、最終的に化学療法の標的として捉えたいと考えている (Kita et al., *Trend. Parasitol.*, 2007)。そこで、熱帯熱マラリア原虫におけるエネルギー代謝系を先端的なエネルギー転換系研究の視点から追求し、さらにクリプトスポリジウムなど他の寄生原虫も含め寄生現象全般に共通する適応戦略の分子基盤とその多様性を明らかにする事を目的として研究を進めている。

B. 研究方法

マラリア原虫を代表とするアピコンプレックス門の原虫は増殖や宿主細胞への侵入に不可欠な種々のオルガネラを備えている。これ

らの機能に関する情報は主に細胞生物学的な方向から進められて来た。最近の研究から、マラリア原虫においてミトコンドリアが細胞質のカルシウムイオンのセンサーとして機能し、その増殖に重要な役割を果たしている事が判って来た (Gazarini et al., *BBRC*, 2004)。そこで、本研究ではそれぞれのオルガネラにおけるカルシウムや ATP 合成に必要な水素イオンの役割を明らかにし、これら寄生虫のオルガネラ機能を標的とする抗マラリア薬を開発する事を最終目的としている。

赤血球内型マラリア原虫ミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系は化学療法剤の標的として期待されている。実際に最も新しい抗マラリア剤であるアトバコンの標的はミトコンドリア電子伝達系の複合体 III のシトクロム *b* である。しかしマラリア原虫ミトコンドリアに関する情報は非常に限られたものであり、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。本研究ではこれらのオルガネラにおけるカルシウム動態を調べるために、尾藤らが開発した赤色シフト型 FRET 型カルシウムセンサーをオルガネラで発現させ、生活環や環境の変化、また薬剤に対する応答の詳細を解析する系の確立を目的としている。そのためには、細胞質で合成されたタンパク質をそれぞれのオルガネラに局在させる系が必要であり、タンパク質の局在を決定する特異的ペプチドの配列を同定する必要がある。これまでも局在に関わる配列に関する予測プログラムが提案されているが、他の生物種と異なり、マalaria原虫ではいまだにタンパク質の局在を決定する特異的ペプチドの配列は確定していない。そこでミトコンドリアに局在するタンパク質を実際にタンパク質化学的、生化学的に解析する事ができる様、高純度のオルガネラの分離法の確立を試みた。これによって、さらに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事も可能になる。

またミトコンドリア機能の低下による原虫の増殖への影響をさらに詳細に調べる目的でヒトに感染する熱帯熱マalaria原虫に加え、ベクターである蚊のステージの原虫についても解析可能なネズミマalaria原虫 *Plasmodium berghei* について、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) の遺伝子破壊株を昨年作成したが、本年度はその影響を詳細に調べた。さらにこれまでゲノム上に同定できなかった複合体 II および ATP 合成酵素のアンカーサブユニットに関してゲノム上での検索を試みた。

#### (倫理面への配慮)

本研究はほとんどの部分が *in vitro* の実験系であり、倫理面の問題は無い。またマウスのマalaria感染実験は共同研究を行っている自治医科大学の動物実験倫理規定に従って行った。

#### C. 研究結果

これまでの結果を踏まえ、熱帯熱マalaria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を分離し、さらにその相互作用を調べる目的で、パーコールの種類、遠心条件、添加剤など種々の処理、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、またアピコプラストに関しては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。昨年度までの結果で Nocodazole を 10  $\mu$ M、細胞破碎後に加えて粗ミトコンドリア画分を調製し、ここに Dnase I を添加する事、また Percoll PLUS を用いることにより大きく分離が改善される事が判ったが、さらに条件を検討した結果、Dnase I 処理は加えず、パーコールの遠心後に最上層部に分離される褐色のヘモグロビンを含む固まりを取り除き、再度遠心する事によって、ミトコンドリアとアピコプラストを完全にそれぞれ異なった画分として分離する事ができた。

また複合体 II の生理的機能を明確にする目的で、昨年度は触媒サブユニットであるフラボプロテインサブユニットの遺伝子破壊株を *P. berghei* を用いて作成した。本年度はその性質、また増殖への影響を詳細に調べた。最初に、ミトコンドリアを単離し生化学的な解析を行なった。その結果、コハク酸-ユビキノン還元酵素活性は消失し、また免疫プロットで調べたところ、Fp サブユニットおよび Ip サブユニットは検出されなかった。次に赤血球内型および蚊のステージへの影響を調べた。赤血球内型では形態や増殖速度などほとんど野生型と変化がなかったのに対し、蚊のステージではオーキネトへの分化が20%に低下し、オーシストの形成は全く見られなかった。また、マウスを用いた感染性に関する実験では、遺伝子破壊株を吸血した蚊からは次の感染は全く起らなかった。

さらにマラリア原虫の複合体 II が実際に生理機能を持ち、そのミトコンドリアが酸化リン酸化を行なう事ができるのかを確認する目的で、複合体 II からユビキノンへの電子伝達と酵素の膜への局在に不可欠なアンカーサブユニットおよび ATP 合成に必要な ATP 合成酵素の疎水性サブユニット群をゲノム上で探索した。その結果、両酵素ともに候補となるポリペプチド群を見出す事ができた。

#### D. 考察

マラリア原虫のミトコンドリアやアピコプラストはこの原虫の生存と増殖に必須のオルガネラである。その中で重要な役割を果たしているカルシウム動態を解析するためには、赤色シフト型 FRET 型カルシウムセンサーの導入系が必要である。本研究では、オルガネラ特異的局在を規定するシグナル配列に関する情報を得る事が可能な高純度のオルガネラ分離法を確立し、さらにゲノム解析から酸化リン酸化に関わるミトコンドリアタンパク質の膜アンカー部分の候補を見出した。この 2 種の情報および分離したオルガネラの実際のペプチド解析からオルガネラへの局在に関わる特異的配列を明らかにし、これを用いてカルシウムセンサーを導入する道筋を開く事ができた。

また、ミトコンドリアのマーカー酵素であり、TCA 回路と呼吸鎖を直接結ぶ複合体 II の遺伝子破壊が蚊の体内のマラリア原虫の分化を阻害し、さらにこれまで見つかっていなかった本酵素のアンカーサブユニットの候補をゲノム解析から見出した。これは ATP 合成酵素の疎水性サブユニット候補も同定できた事と合わせ、マラリア原虫が酸化リン酸化によって ATP を合成できる事を示しており、今後のマラリア原虫の代謝研究に重要な知見である。

#### E. 結論

今回の結果から、マラリア原虫のミトコン

ドリアとアピコプラストに関し、それぞれのオルガネラのみを含む画分を得る事ができた。これにより、各オルガネラに含まれるタンパク質のアミノ酸配列の詳細な解析が可能となり、各オルガネラへの局在に必要なシグナル配列の性質に関する最終的結論を得る事ができると考えられる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Identification of New Inhibitors for Alternative NADH Dehydrogenase (NDH-II). Mogi, T., Matsushita, K., Murase, Y., Kawahara, Miyoshi, H., Ui, H., Shiomi, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) FEMS Microbiol. Lett. 291, 157-161
- 2) Mitochondrial Dehydrogenases in the Aerobic Respiratory Chain of the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. Kawahara, K., Mogi, T., Tanaka, Q. T., Hata, M., Miyoshi, H. and Kita K. (2009) J. Biochem. 145, 229-237
- 3) Novel Mitochondrial Complex II Isolated from *Trypanosoma cruzi* is Composed of Twelve Peptides Including a Heterodimeric Ip Subunit. Morales, J., Mogi, T., Mineki, S., Takashima, E., Mineki, R., Hirawake, H., Sakamoto, K., Ōmura, S. and Kita, K. (2009) J. Biol. Chem. 284, 7255-7263
- 4) Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum* with specific inhibitor, flutolanil. Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and Kita, K. (2009) Acta Crystallographica, F65, 941-944

- 5) Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits *a* and *b* in *Plasmodium* spp. Mogi, T. and Kita, K. (2009) *Mitochondrion*, 9, 443-453
  - 6) Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., Kita, K. and Harada, S. (2009) *Acta Crystallographica*, F65, 933-936
  - 7) Three redox states of *Trypanosoma brucei* alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry. Maréchal, A., Kido, Y., Kita, K. Moore, A. and Rich, P. (2009) *J. Biol. Chem.* 284, 31827-31833
  - 8) The *Plasmodium* HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival, Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., Kita, K., Sato, S., (2009) *FEBS Lett.* 583, 1446-1450
  - 9) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) *Acta Crystallographica* F66, 275-278
  - 10) Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and Kita, K. (2010) *Acta Crystallographica* F66, 304-308
  - 11) Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. (2010) *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* 1797, 443-450
  - 12) Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and Kita, K. (2010) *Mitochondrion*, 10, 158-165
  - 13) Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. Mogi, T. and Kita, K. *Parasitol. Int.* in press
2. 学会発表
- 1) 北 潔 「低酸素適応におけるミトコンドリアの役割」第 82 回日本生化学会大会 平成 21 年 10 月
  - 2) 原田倫世、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウム：マイトソームの生化学解析に向けた実験系の確立 第 69 回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成 21 年 10 月

3) 原田倫世、藤本陽子、城戸康年、坂元君年、松崎素道、藪義貞、鈴木高史、笹原武史、中井裕、北潔 「ミトコンドリア」を持たない寄生原虫・クリプトスポリジウムにおける呼吸鎖の生化学的解析 第82回日本生化学会大会 平成21年10月

4) 原田倫世、松崎素道、城戸康年、坂元君年、藪義貞、中井裕、北潔

*Cryptosporidium parvum* マイトソームの調製法の確立とシアン耐性酸化酵素 (AOX) の解析 第8回感染症沖縄ワークショップ 平成22年2月

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

研究分担者 菊地和也 大阪大学大学院工学研究科教授

## 研究要旨

新規原理に基づいて開発した $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性検出 $^{19}\text{F}$  MRIプローブを用いて、細胞内遺伝子発現の可視化を試み、固定化した細胞内の遺伝子発現の可視化に成功した。また、新たに生きた細胞の遺伝子発現を可視化する目的で、 $\beta$ -ラクタマーゼの活性検出 $^{19}\text{F}$  MRIプローブをデザインし、合成を行った。このプローブを用いて、生きた細胞における遺伝子発現を $^{19}\text{F}$  NMRを用いて可視化することに成功した。

## A. 研究目的

*in vivo*における酵素活性の可視化は、基礎研究のみならず遺伝子治療などの医療応用にも関わる重要な技術であり、近年大きな注目を集めている。MRIは、生体深部の断層画像を高い空間分解能で撮像可能であり、生体分子の可視化研究への応用が注目されている。本研究では物理化学および有機化学原理に基づいて、酵素反応を可視化するMRIプローブを設計し、生体サンプル中の遺伝子発現の検出に応用した。

## B. 研究方法

前年度までに、リポータータンパク質である $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を検出する $^{19}\text{F}$  MRIプローブGd-DFP-galを開発している。本年度はこのプローブを用いて、細胞内の遺伝子発現の可視化を試みた。 $\beta$ -ガラクトシダーゼは細胞内の可溶性画分に発現する酵素であるため、まずGd-DFP-galの細胞膜透過性について検討した。続いて、細胞をホルムアルデヒドで固定化して細胞膜透過性を高めた後、細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の検出を $^{19}\text{F}$  NMR、 $^{19}\text{F}$  MRIによって測定した。また、固定したマウス胎仔脳内の遺伝子発現の可視化も試みた。

続いて、生きた細胞における遺伝子発現を可視化するために、リポータータンパク質を細胞膜上に発現する手法が適していると考え、新たに $\beta$ -ラクタマーゼに着目した。 $\beta$ -ラクタマーゼは質量約30kDaの小さなタンパク質であり、哺乳類細胞内におい

て活性が見られないことから、リポータータンパク質として有用な特性を持つ。また、 $\beta$ -ラクタマーゼは単量体で働くため、他のタンパク質と融合させても活性を失わない。

まず、 $\beta$ -ラクタマーゼの活性を $^{19}\text{F}$  MRIによって検出するプローブGd-FC-lacを常磁性緩和促進効果の原理に基づいてデザイン・合成した。続いて、 $\beta$ -ラクタマーゼのタンパク質を大腸菌で発現・精製し、Gd-FC-lacを添加し、 $^{19}\text{F}$  NMRのスペクトルおよび緩和時間変化を調べた。また、 $^{19}\text{F}$  MRIも測定した。続いて、膜タンパク質と融合させてHEK293T細胞の細胞膜上に発現させた。培養液にGd-FC-lacを添加し、 $^{19}\text{F}$  NMR測定を行った。

## (倫理面への配慮)

動物実験については規則に則り、仕様動物数を可能な限り最小限に留め、無痛処理を行った。

## C. 研究結果

Gd-DFP-galの細胞膜透過性について検討した結果、細胞膜透過性を有していないことが明らかになった。そこで、細胞を固定化して、細胞膜透過性を高めプローブの導入を行ったところ、細胞内の $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性すなわち遺伝子発現の $^{19}\text{F}$  MRIによる可視化に成功した。また、固定脳を用いた実験では、MRIシグナルの増大は観察されたものの、脳内遺伝子発現の部

位の特定までは至っていない。

次に、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性検出プローブ Gd-FC-lac を合成し、緩和時間測定を行ったところ、 $\beta$ -ラクタマーゼの存在下において、短縮していた緩和時間の増大が見られた。また、 $^{19}\text{F}$  NMR スペクトルに関してもピークのシャープ化および強度増大が観察された。このプローブを用いて、細胞膜上に発現させた  $\beta$ -ラクタマーゼ活性の  $^{19}\text{F}$  NMR による検出に成功した。

#### D. 考察

昨年度までに開発した  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を検出するプローブ Gd-DFP-gal を用いて、細胞内の遺伝子発現の可視化に成功した。しかしながら、細胞を固定化する必要がある、動物個体において生きたまま遺伝子発現を検出するには、細胞膜透過性に問題があることが明らかになった。

そこでさらに、別のリポータータンパク質である  $\beta$ -ラクタマーゼをターゲットにした新たなプローブ Gd-FC-lac を作製した。このプローブを用いて、生きた細胞における遺伝子発現を  $^{19}\text{F}$  NMR によって検出可能であることを示した。この結果は、MRI を用いた生きた細胞における遺伝子発現を可視化できることを強く示唆するものである。

#### E. 結論

常磁性相互作用を利用することにより、リポーター遺伝子産物である  $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび  $\beta$ -ラクタマーゼの活性を検出するプローブ Gd-DFP-gal および Gd-FC-lac の開発に成功した。これらのプローブを用いることで細胞レベルにおいて遺伝子発現を  $^{19}\text{F}$  MRI によって可視化することに成功した。

F. 健康危険情報  
特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., **Kikuchi, K.** Covalent protein labeling based on noncatalytic  $\beta$ -lactamase and a designed FRET substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 5016-5017, 2009.

2. Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., **Kikuchi, K.** Dual-function probe to detect protease activity for

fluorescence measurement and  $^{19}\text{F}$  MRI. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 3641-3643, 2009.

3. Mizukami, S., Watanabe, S., **Kikuchi, K.** Development of ratiometric fluorescent probes for phosphatases by using a  $\text{pK}_a$  switching mechanism. *Chembiochem.*, 10, 1465-1468, 2009.

4. Yamaguchi, S., Miura, C., **Kikuchi, K.**, Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., Miura, T. Zinc is an Essential Trace Element for Spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 10859-10864, 2009.

5. **Kikuchi, K.**, Hashimoto, S., Mizukami, S., Nagano, T. Anion sensor-based ratiometric peptide probe for protein kinase activity. *Org. Lett.*, 11, 2732-2735, 2009.

6. Mizukami, S., Okada, S., Kimura, S., **Kikuchi, K.** Design and synthesis of coumarin-based  $\text{Zn}^{2+}$  probes for ratiometric fluorescence imaging. *Inorg. Chem.*, 48, 7630-7638, 2009.

7. Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., **Kikuchi, K.** Photoactive yellow protein-based protein labeling system with turn-on fluorescence intensity. *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 16610-16611, 2009.

8. Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., **Kikuchi, K.** Noncovalent-Interaction-Promoted Ligation for Protein Labeling. *Chembiochem.*, 11, 646-648, 2010.

##### 2. 学会発表

1. **Kikuchi, K.** Development of Imaging Probes with Tunable Switches for Biological Applications. (The 238<sup>th</sup> ACS National Meeting, Washington, DC, USA., 8.19, 2009) 招待講演

2. **Kikuchi, K.** Design, Synthesis of MRI Probes for in Vivo Imaging. (The 13<sup>th</sup> Asian Chemical Congress, Shanghai, China., 9.15, 2009) 招待講演



3. Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in vivo* Imaging. (International Symposium on Molecular Sensing and Fluorescent Imaging, Dalian, China., 9.18-20, 2009) 招待講演
4. Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in vivo* Imaging. (2<sup>nd</sup> Asian Conference on Coordination Chemistry, Nanjing, China., 11.1, 2009) 招待講演
5. Kikuchi, K. Design, Synthesis of MRI Probes for *in Vivo* Imaging. (Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry(SABIC-2009) ., Mumbai, India, 11.6, 2009) 招待講演
6. 菊地和也。生体イメージングプローブ開発による金属イオン機能及び遺伝子発現解析。(日本微量元素学会年会, 7.2-3, 2009, 東京) 招待講演。
7. 菊地和也。光で視る生きた状態の分子の動き。(日本バイオイメーキング学会第18回年会, 9.5, 2009, 岡山) 招待講演。
8. 菊地和也。生体イメージングプローブ開発による金属イオン機能及び遺伝子発現解析。(日本磁気共鳴医学会年会, 10.2, 2009, 横浜) 招待講演。
9. 菊地和也。 *in vivo*イメージングを可能とする化学プローブ開発。(日本化学会フォーラム, 10.21, 2009, 大阪) 招待講演。
10. 菊地和也。物理化学原理に基づくプラズモニクスの高感度分子イメージングへの応用。(大阪大学フォトニクス先端融合研究センター第3回シンポジウム, 11.18, 2009, 東京) 招待講演。
11. 菊地和也。 *in vivo*イメージングを目標とした分子プローブのデザイン・合成・生物応用。(理研シンポジウム「第10回分析・解析技術と化学の最先端」, 12.10, 2009, 和光) 招待講演。
12. Mizukami,S., Kikuchi,K. Development of MRI Probes for Detecting Biological Signals. (Gordon Research Conference-Bioorganic Chemistry, Andover, NH,USA.,6.14-19,2009) 口頭発表。
13. Tanaka,M., Tonai,K., Mizukami,S., Kikuchi,K. A LUMINESCENT LANTHANIDE PROBE FOR PROTEASE ACTIVITIES. (14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 7.26-28,2009, 名古屋) ポスター発表
14. 水上進, 松下尚嗣, 滝川利佳, 菊地和也。レポーター酵素活性を検出する<sup>19</sup>F MRIプローブ。(第4回日本分子イメージング学会, 5.14-15, 2009 東京) 口頭発表。
15. 堀雄一郎, 芝田茜, 菊地和也。小分子化合物を用いた膜蛋白質の分解法研究。(日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会, 5.18-19, 2009 神戸) 口頭発表。
16. 堀雄一郎, 上野秀樹, 菊地和也。Photoactive Yellow Proteinをタグ蛋白質とした蛍光強度増大型ラベル化法の開発。(第24回生体機能関連化学シンポジウム, 9.13-15, 2009, 福岡) 口頭発表。
17. 岡田智, 水上進, 菊地和也。Gd<sup>3+</sup>錯体と刺激応答性ポリマーを応用した新規MRIプローブの開発。(第59回錯体化学討論会, 9.25-27, 2009, 長崎) ポスター発表。
18. 松下尚嗣, 水上進, 杉原文徳, 白川昌宏, 菊地和也。遺伝子発現を可視化するβ-ラクタマーゼ活性検出用<sup>19</sup>F MRI プローブの開発。(日本化学会日本化学会第90春季年会, 3.26-29, 2010, 大阪) 口頭発表。
19. 堀雄一郎, 上野秀樹, 中木恭兵, 菊地和也。Photoactive Yellow Proteinをタグ蛋白質とした蛍光強度増大型蛋白質ラベル化法の開発。(日本薬学会第130年会, 3.28-30, 2010, 岡山) ポスター発表。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得・申請

発明の名称：タンパク質を蛍光標識する  
方法

出願番号：PCT/JP2010/054024

出願者：大阪大学

発明者：菊地和也，堀雄一郎，上野秀樹

出願日：2010年3月10日

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

認知活動感受性プロモーターの開発

研究分担者 奥野 浩行 東京大学大学院医学系研究科・助教

研究要旨

カルシウムシグナル破綻による神経機能の異常を可視化するため、シナプスから核へ至るシグナリングの readout である神経活動依存的な遺伝子発現のレポーターシステムを構築した。このレポーターシステム組み込んだトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、レポーター性能によるスクリーニングを行った結果、大脳の神経活動モニタリングに適した複数の Tg ラインが得られた。

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ト・レポーター分子を構築し、このレポーターをモデル細胞や動物個体に導入するために、①ウイルスベクターの作成、精製、濃縮、および感染プロトコルの確立、②トランスジェニックマウスの作成を行う。さらに実際にこのようなレポーター動物を用いて、大脳の神経活動と関連した遺伝子発現を検出することを目的とする。

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とが知られており、現在最も信頼性の高い神経活動の分子マーカーとして広

く使用されている。我々は、この *Arc* 遺伝子の発現制御領域を単離・解析し、*Arc* の活動依存的な遺伝子発現の分子制御機構の一端を解明した

(Kawashima et al., 2009)。この発見に基づき前年度までに、単離した *Arc* 遺伝子制御領域下に蛍光タンパク

(Venus) や発光タンパク (luciferase) を配置したレポーターを構築し、①レンチウイルスやアデノ随伴ウイルス等の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マウス (Tg) の作成を行った。本年度は、この Tg マウスにおけるレポーター性能の評価を行い、大脳の神経機能のモニタリングに適したラインの選定を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた組換え DNA 実験は、所属機関組換え DNA 委員会の承認（医学部承認番号 17）を得た上、法律および機関ガイドラインを遵守し行った。同様に動物実験に関しても所属機

関動物実験委員会による審査・承認を得たうえでガイドラインを順守した。

### C. 研究結果

これまでの *Arc* 遺伝子の活動依存的転写活性化メカニズムに関する研究成果 (Kawashima et al., 2009) に基づき作成された、*Arc* プロモータートランスジェニックマウス (*Arc-pro-Tg* マウス) のレポーター性能に関して以下の刺激を用いてスクリーニングを行い、各レポーター毎にラインの選定を行った。

#### 1. 電撃痙攣刺激 (maximum electro-convulsive seizure)

マウスに電撃痙攣刺激を与えると、全身で痙攣様反応が誘発されると共に、大脳の様々な領域において一過的に活動依存的遺伝子発現が亢進することが知られている。この擬似病態刺激を用いてレポーターの発現を蛍光タンパク *Tg* マウスおよび発光タンパク *Tg* マウスの複数のラインにおいて、刺激後のレポーター発現が確認された。特に、海馬歯状回、梨状葉皮質などに強いレポーターの誘導が観察された。*in situ* hybridization (ISH) 法や免疫組織染色法等により、これらレポーター発現と内在性 *Arc* の発現は極めて良くオーバーラップしており、レポーター発現制御の忠実さが示された。

#### 2. 視覚刺激

上記電気刺激によるスクリーニング

を通過した *Tg* マウスに対して、非侵襲的刺激である光刺激を用いて、生理的な反応を検討した。暗所飼育により光感覚入力を制限した *Tg* マウスを明所に暴露することにより、強い光刺激を与えた。複数のラインにおいて、この刺激後 2 時間～4 時間後にマウス一次視覚野において、強いレポーター発現の誘導が認められた。さらに、片眼遮蔽によって視覚入力を一方の眼に制限すると、反応する領域も対応する半球に限局することが確認され、刺激一応答の特異性が示された (図 1)。

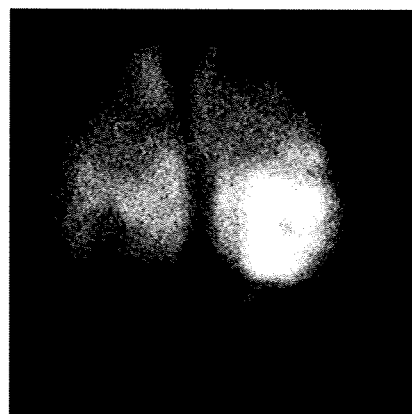


図 1. 発光タンパクレポーター *Tg* マウス一次視覚野におけるレポーター応答。片眼光刺激に対応した反対側半球の視覚野に強い発光シグナルが観察される。

#### 3. 新奇環境探索行動

さらに生理的な刺激に対する応答によるスクリーニングのため、新奇環境暴露による大脳情報処理経路の活性化応答を検討した。 *Tg* マウスを通常飼育しているケージから、これまで経験したことのない新しいケージ (新奇環境) 移す。蛍光タンパクレポーター *Tg*

マウスの3ラインにおいて、新奇環境へ暴露2時間後の脳切片を解析したところ、海馬歯状回の顆粒細胞においてレポータータンパク発現細胞の数が有意に上昇していた(図2)。

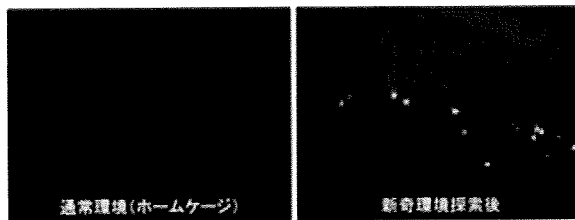


図2. 蛍光タンパクレポーターTgマウス海馬歯状回におけるレポーター応答。顆粒細胞において強いレポーターの誘導が観察された。

#### D. 考察

上記スクリーニングによって、痙攣刺激などの非生理的な強い刺激にのみ応答する Tg マウスラインや、生理的的刺激である感覚刺激や探索行動などの認知活動に反応する Tg ラインが選定された。このことは、カルシウムシグナル破綻の様々な段階に応じた異なるレポーターシステムとしてこれらの Tg マウスを有効に利用できる可能性があることを意味する。利用法としては図1および2で示されるように、発光タンパクレポーターマウスは脳の活動領域を鋭敏に感度良く捉える目的に適しており、また蛍光タンパクレポーターは、単一神経細胞レベルにおける遺伝子応答をモニタリングする目的に適していると考えられる。

#### E. 結論

本研究によって樹立された神経活動依存な遺伝子発現の可視化法は、カルシウムシグナル破綻を生きた脳または神経細胞において可視化し、非・低侵襲的に調べることが可能な技術であり、このような測定法の確立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極めて有効なツールとなる可能性が高い。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Inoue, M., Yagishita-Kyo, N., Nonaka, M., Kawashima, T., **Okuno, H.**, and **Bito, H.** Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity. *Commun. Integr. Biol. in press*, 2010.
- (2) 奥野浩行. シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現: 前初期遺伝子 *Arc* の発現制御メカニズムを中心に. *生化学*, *in press*, 2010.
- (3) Redondo, R., **Okuno, H.**, Spooner, PA., Frenguelli, BG., **Bito, H.**, and 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.

(4) 奥野浩行、川島尚之、野中美応、尾藤晴彦. シナプスから核へのシグナリング：シナプス可塑性を長期化する分子機構. *細胞工学*, **28**, 894-899, 2009.

(5) 井上昌俊、川島尚之、野中美応、竹本-木村さやか、奥野浩行、尾藤晴彦. シナプス長期可塑性の分子基盤. *Cognition and Dementia*, **8**, 117-182, 2009.

#### 招待講演

Okuno, H. Activity-dependent gene regulation and nucleus-to-synapse signaling for synaptic plasticity. メキシコ国立自治大学神経生物研究所シンポジウム "Learning and Memory", 2009.11.12-13, Juriquilla, Mexico, 招待講演 (発表日：2009.11.12)

#### 国際学会

(1) Redondo, RL., Okuno, H., Spooner, PA., Frenguelli, BG., Bito, H., and Morris, RGM. Differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. *Soc. Neurosci. Abstr.* **235.3**, 2009. 第39回北米神経科学学会年会, 2009.10.17-10.21, Chicago, USA. Poster (発表日：2009.10.18)

(2) Okuno, H., Kawashima, T., Nonaka, M., Kyo, N., Bito, H. A Critical genomic element for synaptic activity-dependent expression of *Arc/Arg3.1*. *J. Physiol. Sci.* **59 Suppl.1**, **182**. 第36回国際生理学会世界大会 (IUPS2009), 2009.7.27-8.1, Kyoto, Japan. Poster (発表日：2009.7.28)

#### 国内学会

(1) 川島尚之, 奥野浩行, 尾藤晴彦. Multiple regulatory elements in the *Arc/Arg3.1* promoter essential for synaptic activity-responsive gene expression in activated neurons. 第32回日本分子生物学会年会 2009.12.9-12.12, 4P-0215. 横浜パシフィコ横浜, poster (発表日：2009.12.12)

HH. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

## 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
Yagishita-Kyo, N., Inoue, M., Nonaka, M., <b>Okuno, H.</b> , <b>Bito, H.</b>	CREB	Sangdun Choi	<i>Encyclopedia of Signaling Molecules</i>	Springer	New York		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
Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, <b>Okuno H, Bito H.</b>	Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase cascade.	J. Neurosci.	29	13720-13729	2009
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, <b>Bito H.</b> Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME.	Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers.	Nature	465	182-187	2010
Takemoto-Kimura S, Suzuki K, Kamijo S, Ageta-Ishihara N, Fujii H, <b>Okuno H, Bito H.</b>	Differential roles for CaM kinases in mediating excitation-morphogenesis coupling during formation and maturation of neuronal circuits.	Eur. J. Neurosci.			In press
竹本一木村さやか、上田(石原)奈津実、布施俊光、上條諭志、尾藤晴彦。	神経疾患と細胞骨格	分子細胞治療	8	243-248	2009

Osanai, A., Harada, S., Sakamoto, K., Shimizu, H., Inaoka, D. K., and <b><u>Kita K.</u></b>	Crystallization of mitochondrial rhodoquinol-fumarate reductase from the parasitic nematode <i>Ascaris suum</i> with specific inhibitor, flutolanil	Acta Crystallographica,	F65	941-944	2009
Mogi, T. and <b><u>Kita, K.</u></b>	Identification of mitochondrial Complex II subunits SDH3 and SDH4 and ATP synthase subunits <i>a</i> and <i>b</i> in <i>Plasmodium</i> spp.	Mitochondrion,	9	443-453	2009
Matoba, K., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Inaoka, D.K., <b><u>Kita, K.</u></b> and Harada, S.	Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist <i>Trypanosoma cruzi</i> . Crystallization and preliminary X-ray analysis of aspartate transcarbamoylase from the parasitic protist <i>Trypanosoma cruzi</i> .	Acta Crystallographica	F65	933-936	2009
Sasaki, N., Hirai, M., Maeda, K., Yui, R., Itoh, K., Namiki, S., Morita, T., Hata, M., Murakami-Murofushi, K., Matsuoka, H., <b><u>Kita, K.</u></b> , Sato, S.	The <i>Plasmodium</i> HU homolog, which binds the plastid DNA sequence-independent manner, is essential for the parasite's survival.	FEBS Lett.	583	1446-1450	2009
Maréchal, A., Kido, Y., <b><u>Kita, K.</u></b> , Moore, A. and Rich, P.	Three redox states of <i>Trypanosoma brucei</i> alternative oxidase identified by infrared spectroscopy and electrochemistry	J. Biol. Chem.	284	31827-31833	2009



Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM., Harada, S. and <b><u>Kita, K.</u></b>	Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of <i>Trypanosoma brucei</i> <i>gambiense</i> glycerol kinase	Acta Crystallographica	F66	304-308	2010
Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and <b><u>Kita, K.</u></b>	Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from <i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i> .	Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)	1797	443-450	2010
Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and <b><u>Kita, K.</u></b>	Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from <i>Trypanosoma brucei</i> <i>brucei</i>	Acta Crystallographica	F66	275-278	2010
Paranagama, M. P., Sakamoto, K., Amino, H., Awano, M., Miyoshi, H. and <b><u>Kita, K</u></b>	Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species (ROS) from <i>Ascaris</i> <i>suum</i> mitochondrial complex II	Mitochondrion,	10	158-165	2010
Mogi, T. and <b><u>Kita, K.</u></b>	Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists <i>Plasmodium</i> and <i>Cryptosporidium</i> .	Parasitol. Int.			In press
Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., <b><u>Kikuchi, K.</u></b>	Covalent protein labeling based on noncatalytic $\beta$ -lactamase and a designed FRET substrate.	J. Am. Chem. Soc.	131	5016-5017	2009

Mizukami, S., Takikawa, R., Sugihara, F., Shirakawa, M., <b>Kikuchi, K.</b>	Dual-function probe to detect protease activity for fluorescence measurement and <sup>19</sup> F MRI.	Angew. Chem. Int. Ed.	48	3641-3643	2009
Mizukami, S., Watanabe, S., <b>Kikuchi, K.</b>	Development of ratiometric fluorescent probes for phosphatases by using a pK <sub>a</sub> switching mechanism.	ChemBioChem	10	1465-1468	2009
Yamaguchi, S., Miura, C., <b>Kikuchi, K.</b> , Celino, F. T., Agusa, T., Tanabe, S., Miura, T.	Zinc is an Essential Trace Element for Spermatogenesis.	Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.	106	10859-10864	2009
<b>Kikuchi, K.</b> , Hashimoto, S., Mizukami, S., Nagano, T.	Anion sensor-based ratiometric peptide probe for protein kinase activity.	Org. Lett.	11	2732-2735	2009
Mizukami, S., Okada, S., Kimura, S., <b>Kikuchi, K.</b>	Design and synthesis of coumarin-based Zn <sup>2+</sup> probes for ratiometric fluorescence imaging.	Inorg. Chem.	48	7630-7638	2009
Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., <b>Kikuchi, K.</b>	Photoactive yellow protein-based protein labeling system with turn-on fluorescence intensity.	J. Am. Chem. Soc.	131	16610-16611	2009
Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., <b>Kikuchi, K.</b>	Noncovalent-Interaction-Promoted Ligation for Protein Labeling.	Chem. Bio. Chem	11	646-648	2010
Redondo, R.L., <b>Okuno, H.</b> , Spooner, P.A., Frenguelli, B.G., <b>Bito, H.</b> and Morris, R.G.M.	Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation.	J. Neurosci.	30	4981-4989	2010
Inoue, M., Yagishita-Kyo, N., Nonaka, M., Kawashima, T., <b>Okuno, H.</b> and <b>Bito, H.</b>	Synaptic Activity Responsive Element (SARE): a unique genomic structure with an unusual sensitivity to neuronal activity	Commun. Integr. Biol.			In press
奥野浩行、川島尚之、野中美応、尾藤晴彦	シナプスから核へのシグナリング:シナプス可塑性を長期化する分子機構	細胞工学	28	894-899	2009

井上昌俊、川島尚之、野中美応、竹本-木村さやか、奥野浩行、尾藤晴彦	シナプス長期可塑性の分子基盤	Cognition and Dementia	8	117-182	2009
奥野浩行	シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現: 前初期遺伝子Arcの発現制御メカニズムを中心に.	生化学			In press

# Control of Cortical Axon Elongation by a GABA-Driven $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Cascade

Natsumi Ageta-Ishihara,<sup>1</sup> Sayaka Takemoto-Kimura,<sup>1</sup> Mio Nonaka,<sup>1</sup> Aki Adachi-Morishima,<sup>1</sup> Kanzo Suzuki,<sup>1</sup> Satoshi Kamijo,<sup>1</sup> Hajime Fujii,<sup>1</sup> Tatsuo Mano,<sup>1</sup> Frank Blaeser,<sup>2</sup> Talal A. Chatila,<sup>3</sup> Hidenobu Mizuno,<sup>4,5</sup> Tomoo Hirano,<sup>4,5</sup> Yoshiaki Tagawa,<sup>4,5</sup> Hiroyuki Okuno,<sup>1,5</sup> and Haruhiko Bito<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurochemistry, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan, <sup>2</sup>Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Leipzig, 04129 Leipzig, Germany, <sup>3</sup>Division of Immunology, Allergy, and Rheumatology, Department of Pediatrics, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California 90095-1752, <sup>4</sup>Department of Biophysics, Kyoto University Graduate School of Science, Kyoto 606-8502, Japan, and <sup>5</sup>Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Saitama 332-0012, Japan

$\text{Ca}^{2+}$  signaling plays important roles during both axonal and dendritic growth. Yet whether and how  $\text{Ca}^{2+}$  rises may trigger and contribute to the development of long-range cortical connections remains mostly unknown. Here, we demonstrate that two separate limbs of the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMKK)–CaMKI cascades, CaMKK–CaMKI $\alpha$  and CaMKK–CaMKI $\gamma$ , critically coordinate axonal and dendritic morphogenesis of cortical neurons, respectively. The axon-specific morphological phenotype required a diffuse cytoplasmic localization and a strikingly  $\alpha$ -isoform-specific kinase activity of CaMKI. Unexpectedly, treatment with muscimol, a GABA<sub>A</sub> receptor agonist, selectively stimulated elongation of axons but not of dendrites, and the CaMKK–CaMKI $\alpha$  cascade critically mediated this axonogenic effect. Consistent with these findings, during early brain development, *in vivo* knockdown of CaMKI $\alpha$  significantly impaired the terminal axonal extension and thereby perturbed the refinement of the interhemispheric callosal projections into the contralateral cortices. Our findings thus indicate a novel role for the GABA-driven CaMKK–CaMKI $\alpha$  cascade as a mechanism critical for accurate cortical axon pathfinding, an essential process that may contribute to fine-tuning the formation of interhemispheric connectivity during the perinatal development of the CNS.

## Introduction

The formation of cortical neural circuits requires precisely controlled development of axons and dendrites. Although the molecular mechanisms underlying axon guidance in the CNS have been intensively studied (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Dickson, 2002), the intracellular signaling and cytoskeletal re-

modeling mechanisms implicated in the precise extension and targeting of axonal arbors still remain mostly unsolved.

$\text{Ca}^{2+}$  plays a central role in the regulation of neuronal morphogenesis. It is believed that there is an elevated optimal range for the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration that supports maximal neurite outgrowth in various types of neurons (Kater et al., 1988; Gomez and Zheng, 2006).  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs), a major  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent kinase family, are good candidates as potential downstream effectors of calcium elevation in neurons (Soderling and Stull, 2001; Hudmon and Schulman, 2002). Although the essential role of CaMKII subfamily members in neuronal plasticity has been shown, much less is known about the function of the CaMKI/IV subfamily, which forms several distinct kinase cascades downstream of CaMK kinase  $\alpha$  (CaMKK $\alpha$ ) and/or CaMKK $\beta$  (Soderling, 1999; Hook and Means, 2001; Hudmon and Schulman, 2002; Bito and Takemoto-Kimura, 2003). The CaMKI family includes four isoforms:  $\alpha$  (Nairn and Greengard, 1987),  $\beta$ /Pnck (Yokokura et al., 1997),  $\gamma$ /CL3 (Takemoto-Kimura et al., 2003), and  $\delta$ /CKLiK (Ishikawa et al., 2003). Recently, a few reports from several laboratories, including ours, have started to suggest, *in vitro*, that CaMKI activity may participate in the regulation of neuronal morphology such as growth cone motility (Wayman et al., 2004), neurite outgrowth (Schmitt et al., 2004; Uboha et al., 2007), activity-dependent growth of dendrites (Wayman et al., 2006; Takemoto-Kimura et al., 2007), and stabilization of spines (Saneyoshi et al., 2008). However, evidence based on materials

Received June 25, 2009; revised Aug. 18, 2009; accepted Sept. 29, 2009.

This work was supported in part by grants-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (S.T.-K., Y.T., T.H., H.O., H.B.) and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H.B.), 21st Century Center of Excellence (COE) and Global COE Programmes (H.B.), by a grant from the National Institutes of Health (T.A.C.), and by awards from the Astellas Foundation for Research on Metabolic Disorders (H.B., S.T.-K.), the Naito Foundation (S.T.-K.), the Cell Science Research Foundation, the Takeda Foundation, and the Toray Science Foundation (H.B.). N.A.-I. and M.N. were predoctoral and postdoctoral fellows funded by Japan Society for the Promotion of Science, respectively. We thank all members of the Bito laboratory for support and discussion, T. Soderling and G. Wayman for constructive comments on a previous version of this work, and M. Kano for initially providing access to a validated working stock of muscimol. We are grateful to H. Tokumitsu (Kagawa University) for CaMKK- $\beta$  WT and V269F cDNA; to J. Nabekura (National Institute for Physiological Sciences, Aichi, Japan) and K. Nakayama (Showa University, Tokyo, Japan) for a KCC2 plasmid; to R. Y. Tsien (Howard Hughes Medical Institute and University of California, San Diego, La Jolla, CA) for mRFP1 and mCherry cDNAs; and to K. Fukunaga and J. Kasahara (Tohoku University) for a rabbit anti-CaMKI $\alpha$  antibody. BDNF was supplied by Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. through the courtesy of C. Nakayama and T. Ishiyama. We are also indebted to assistance from K. Saiki, Y. Kondo, and T. Kinbara.

Correspondence should be addressed to Haruhiko Bito, Department of Neurochemistry, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan. E-mail: hbito@m.u-tokyo.ac.jp.

N. Ageta-Ishihara's present address: Division of Biological Sciences, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3018-09.2009

Copyright © 2009 Society for Neuroscience 0270-6474/09/2913720-10\$15.00/0