

令和元年5月28日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08511

研究課題名(和文) 不活性型ノックインマウスを用いてカルモジュリンキナーゼの基質蛋白質を探索する

研究課題名(英文) Exploration of substrate proteins of calmodulin kinase II by using the kinase-dead knock-in mouse.

研究代表者

山肩 葉子 (YAMAGATA, Yoko)

生理学研究所・助教

研究者番号：20210338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの高次脳機能、特に学習・記憶について理解を深め、ヒト疾患の予防・治療に貢献するためには、そのメカニズムに關与する分子の解析が欠かせない。本研究においては、その代表格である蛋白質リン酸化酵素、カルモジュリンキナーゼIIについて、機能的遺伝子改変マウスを活用することにより、学習・記憶に關わる基質蛋白質の探索を行った。同時に、このマウスを用いて、記憶の分子メカニズムに脳部位特異性があることを示し、最適な学習・記憶行動テストの選択を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、蛋白質リン酸化酵素の基質蛋白質の探索にとって機能的遺伝子改変マウスの活用が有用であること、また、脳の機能的部位に特化した解析が重要であることが判明した。今後さらに探索した基質候補蛋白質の同定を進め、実際の生体における学習・記憶の時間的経過と共に、どのようにリン酸化状態が変化するのか、また病態とどのように關連するのかを明らかにすることにより、学習・記憶に障害を来すヒト疾患の予防・治療に貢献することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To understand higher-order brain functions, especially learning and memory, and to contribute to the prevention and treatment of human diseases, molecular analyses of their mechanisms are essential. In this study, I made exploration of substrate proteins of calmodulin kinase II, one of the representative protein kinases in the brain that are indispensable for learning and memory, by using functionally modified, genetically engineered mice. At the same time, I showed that there is brain regional specificity in the molecular mechanisms of learning and memory, and made selection of appropriate behavioral memory tests for the evaluation of substrate proteins. These studies will be useful for further understanding of human brain functions and contribute to the prevention and treatment of human brain disorders.

研究分野：脳神経科学

キーワード：蛋白質リン酸化 キナーゼ 学習・記憶 行動テスト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会が進む中、ヒトの高次脳機能の代表格である学習・記憶について理解を深め、高次脳機能が障害されるヒト疾患の予防・治療に貢献することは喫緊の課題であり、そのためには、学習・記憶の本質的な分子メカニズムを明らかにすることが不可欠である。このメカニズムに関与する様々な脳内蛋白分子のうち、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II α (カルモジュリンキナーゼ II α 、CaMKII α) は、特に重要な役割を果たすと考えられている。これまでに、このキナーゼの生体内での役割を明らかにするために様々な研究が成されてきたが、学習・記憶の成立の際に本質的な役割を果たすこのキナーゼの下流のシグナル伝達経路については、未だ不明な点が多く、特に生体組織を用いた実験では十分な成果を上げていない。一方、本研究者はCaMKII α のキナーゼ活性を失活させた、機能的遺伝子改変マウスである不活性型 CaMKII α ノックインマウス (CaMKII α -KI) を作製し、学習・記憶が著しく障害されていることを明らかにしてきた。そこで、このCaMKII α -KI マウスの特徴を生かすことにより、基質蛋白質の探索に新たな道が開けるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究者が作製したCaMKII α -KI マウスは、従来の蛋白自体をなくしてしまうようなノックアウトマウスとは異なり、特定の機能、すなわちキナーゼ活性のみを完全になくした遺伝子改変マウスであることに特徴がある。従って、このマウスを用いれば、CaMKII α のキナーゼ活性に絞った解析ができるという利点がある。本研究者はこのマウスを用いて、高次脳機能を担う脳部位のひとつである海馬におけるシナプス可塑性と学習・記憶に高度の障害があることを示し、CaMKII α による蛋白質リン酸化、すなわちキナーゼ活性が、これらのメカニズムに重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

本研究の目的は、CaMKII α -KI マウスの特徴をさらに生かして、学習・記憶の成立に本質的な役割を果たすCaMKII α の基質蛋白質の探索を行うこと、同時に、学習・記憶には様々な種類があり、脳部位特異性を有することが知られているが、その脳部位特異性について解明を進め、CaMKII α -KI マウスを用いた基質蛋白質の探索に最も適した脳部位を特定すること、さらには、基質蛋白質の検証を行うために、最適な学習・記憶課題を検討することにある。

3. 研究の方法

(1) 生化学的解析

野生型マウスとCaMKII α -KI マウスの脳ホモジネート画分を用いて、CaMKII α によって特異的にリン酸化される基質蛋白質の探索を行う。具体的には、野生型マウスとCaMKII α -KI マウスの脳サンプルを採取し、並行して実験を進める。まず、それぞれの脳より、海馬ホモジネートを調製し、外来性に Ca^{2+} /カルモジュリン、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を加えて、内在性のキナーゼによってリン酸化反応を起こさせる。これを電気泳動にて分離し、野生型マウスとCaMKII α -KI マウス間で、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を取り込んだリン酸化蛋白バンドを比較する。次の段階として、それぞれの海馬ホモジネートを調製した後に、遠心分離によってCaMKII α が多く含まれるシナプトソーム画分、次いでシナプス後肥厚部画分を分画し、上記同様にリン酸化反応を起こさせ、2つのマウスグループ間でリン酸化蛋白バンドを比較する。このリン酸化反応においては、CaMKII α 以外にもCaMKII β 、カルモジュリンキナーゼ I (CaMKI)、プロテインキナーゼ C (PKC) など、 Ca^{2+} や Ca^{2+} /カルモジュリンによって活性化される他のキナーゼも活性化される可能性が高いが、野生型で検出され、CaMKII α -KI で反応が低下しているリン酸化バンドを選択することにより、CaMKII α に特異的なリン酸化バンドを特定することができるはずである。放射性 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP を用いた実験と同時に非放射性的 ATP を用いた実験を並行して行い、蛋白染色を行い、オートラジオグラフィーと重ね合わせるにより、候補となるリン酸化バンドがどの蛋白バンドに相当するかを検出する。再現性のあるリン酸化蛋白バンドについて、さらに解析を進め、同定を試みる。

(2) 行動学的解析

学習・記憶には様々な種類があり、その脳部位特異性について解明を進めるために、野生型マウスとCaMKII α -KI マウスを用いて以下の学習・記憶行動解析を行う。

① 水迷路学習

空間認識学習・記憶を評価する代表的なテストのひとつであり、マウスをプール内の水に放って泳がせ、水面下にある架台を捜させるテストである。架台に目印を付けて可視化した状態で捜させるテストと、架台には直接目印をつけずに、周囲の手がかりを基に、空間的な配置からその場所を捜させるテストの二種類から成る。前者がコントロールテストとなり、後者が空間認識学習・記憶テストとなる。空間認識学習・記憶に必要な海馬の機能が障害されていると、後者の成績のみが不良となる。

② 恐怖条件づけ学習

条件づけ学習テストのひとつであり、床グリッドのあるテスト箱にマウスを入れて、自由に探索行動をさせた後に、音を聞かせ、音の終了時に合わせて床グリッドから軽い電気フットシ

ショックを与えると、場所環境とフットショックとの条件づけと、音という手がかり刺激とフットショックとの条件づけ、の両方が成立する。一定時間後に、再度同じテスト箱に入れて恐怖反応が出現するかどうかを観察し、また、異なる箱に入れて、音の有無での恐怖反応を比較することにより、前者ではフットショックを与えられた場所環境を覚えているかを、後者ではフットショックに先行した音を覚えているかを、それぞれ調べることができる。恐怖反応形成に必要な扁桃体の機能が障害されていると、両方のテスト成績が不良となるが、場所環境記憶に必要な海馬の機能が障害されていると、前者の成績は不良となるが、後者の成績は保たれる。そのため、これら二つのテスト結果を比較することにより、扁桃体機能と海馬機能を同時に比較することが可能となる。

③ ロータ・ロッド学習

運動学習テストのひとつであり、低速で回転する棒にマウスを載せて歩かせ、徐々に回転速度を上げ、マウスが回転速度に合わせられず、落下するまでの時間を測定する。このトレーニングを繰り返すことにより、マウスは、徐々に長い時間、速い速度まで適応して歩くことができるようになる。その学習曲線を描くことにより、運動学習の獲得・記憶を評価できる。運動機能を制御する小脳や大脳基底核の機能が障害されていると、成績が不良となる。

これら一連の解析により、CaMKII α -KI マウスで障害されている学習・記憶の種類を明らかにし、最も機能的障害が強い脳部位を特定する。その情報から、野生型マウスと CaMKII α -KI マウスを活用した CaMKII α の基質蛋白質の探索に最も適した脳部位が明らかになるはずである。さらには、候補となる基質蛋白質の学習・記憶依存性の検証を行うために、最も適した学習・記憶課題を選定することができる。

4. 研究成果

(1) 生化学的解析

野生型マウスと CaMKII α -KI マウスの海馬ホモジネートを用いて、内在性の CaMKII α によって特異的にリン酸化される基質蛋白質の探索を行った結果、CaMKII α の基質と考えられる複数の蛋白バンドを見出した。野生型サンプルと比較して、KI サンプルでリン酸化の取り込みが減少している蛋白バンドは、50kDa, 60kDa の他に、高分子量のものとしては、90kDa, 150kDa, 300kDa, 低分子量のものとしては、22kDa, 15kDa が認められた。このうち、50kDa, 60kDa は CaMKII α ともうひとつのサブタイプである CaMKII β の自己リン酸化によるものと考えられる。従って、これら以外の5つのバンドが CaMKII α の有力な基質候補と考えられた。これら蛋白バンドの同定に向けてさらなる解析を進めている。

(2) 行動学的解析

野生型マウスと CaMKII α -KI マウスの個体を用いて、学習・記憶に関わる様々な行動実験を行い、CaMKII α -KI マウスに特異的な学習・記憶障害について解析を進めた。その結果、① 水迷路学習では、架台に目印を付けて可視化した場合の成績には問題がなかったが、架台に直接目印をつけない場合の空間認識学習・記憶テストの成績のみが不良であった。すなわち、海馬の機能が強く障害されていることが判明した。また、② 恐怖条件づけ学習では、フットショックと場所環境との関連については全く覚えることができなかつたのに対し、フットショックと音との関連については、一定程度覚えることができた。すなわち、海馬の機能が強く障害されているのに対し、扁桃体の機能の障害は一定程度に留まることが判明した。さらに、③ ロータ・ロッド学習では、その成績が野生型マウスに匹敵したことから、小脳や大脳基底核の機能には異常がないと考えられた。以上の結果から、CaMKII α -KI マウスにおける学習・記憶障害は海馬に選択的であるものと考えられ、CaMKII α の生体内での機能・基質蛋白質の探索には、海馬を対象とするのが最適であることが示された。このことは、CaMKII α の基質候補蛋白質の学習・記憶依存性リン酸化を検証する際にも、① 水迷路学習と② 場所環境に関わる恐怖条件づけ学習が適していることを示している。

(3) 今後の展望

本研究によって、蛋白質リン酸化酵素の基質蛋白質の探索にとって機能的遺伝子改変マウスの活用が有用であること、また、脳の機能的部位に特化した解析が重要であることを示すことができた。今後さらに探索した基質候補蛋白質について、生体における学習・記憶の際に、どのような時間的経過に従って、どのようにリン酸化状態が変化するのか、また病態との関連を明らかにすることにより、学習・記憶に障害を来すヒト疾患の予防・治療に貢献できるものと期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2018) Differential involvement of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α in hippocampus- and

amygdala-dependent memory revealed by kinase-dead knock-in mouse. *eNeuro*, 5(4): e0133-18. 2018 1-15. 査読有
doi: 10.1523/ENEURO.0133-18.2018.

- ② Cormelia Koeberle S, Tanaka S, Kuriu T, Iwasaki H, Koeberle A, Schulz A, Helbing DL, Yamagata Y, Morrison H, Okabe S (2017) Developmental stage-dependent regulation of spine formation by calcium-calmodulin-dependent protein kinase II α and Rap1. *Sci Rep*, 7:13409. 査読有
doi: 10.1038/s41598-017-13728-y.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- ① Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2019) Kinase-dead knock-in mouse revealed differential involvement of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha in hippocampus- and amygdala-dependent memory. 第 8 回生理研・霊長研・新潟脳研合同シンポジウム
- ② Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2018) Differential contribution of calmodulin kinase II alpha in hippocampus- and amygdala-dependent memory. The 49th NIPS International Symposium "Ion channels: looking back, seeing ahead"
- ③ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2018) Involvement of calmodulin kinase IIalpha in hippocampus- vs. amygdala-dependent memory revealed by kinase-dead knock-in mouse. *Neuroscience 2018*
- ④ 山肩葉子, 柳川右千夫, 井本敬二 (2018) 海馬記憶と扁桃体記憶は、カルモジュリンキナーゼ II α 活性によって異なる制御を受けている. 第 8 回名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム
- ⑤ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2018) Differential involvement of calmodulin kinase II α in hippocampus- and amygdala-dependent memory - Analysis using the kinase-dead knock-in mouse. 第 41 回日本神経科学大会
- ⑥ 山肩葉子, 柳川右千夫, 井本敬二 (2017) カルモジュリンキナーゼ II α 活性と加齢・海馬依存性記憶. 第 7 回名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム
- ⑦ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2017) Calmodulin kinase II α , aging and spatial memory - Analysis using the kinase-dead knock-in mouse. 第 40 回日本神経科学大会
- ⑧ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2016) How much kinase activity of Calmodulin kinase II α is necessary to acquire hippocampus-dependent memory? The 47th NIPS International Symposium "Decoding Synapses"
- ⑨ 山肩葉子, 柳川右千夫, 井本敬二 (2016) カルモジュリンキナーゼ II α 活性による海馬依存性記憶の特異的制御. 第 6 回名古屋大学医学研究科・生理学研究所合同シンポジウム
- ⑩ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2016) Kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α and hippocampus- and amygdala-dependent memory - Dose-response relationship revealed by the kinase-dead knock-in mouse. 第 38 回日本生物学的精神医学会・第 59 回日本神経化学学会大会合同年会
- ⑪ Yamagata Y, Yanagawa Y, Imoto K (2016) Differential involvement of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II α in hippocampus- and amygdala-dependent memory - Behavioral analysis of heterozygous kinase-dead knock-in mouse. 第 39 回日本神経科学大会, *Neuroscience 2016*

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究報告（日本語版）

http://www.nips.ac.jp/nips_research/2018/09/ii.html

研究報告（英語版）

http://www.nips.ac.jp/nips_research/eng/2018/09/ii.html

研究紹介（日本語版）

<https://www.nips.ac.jp/research/group/post-53/>

研究紹介（英語版）

<https://www.nips.ac.jp/eng/research/group/post-53/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当無し

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者 該当無し

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。