

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06885

研究課題名(和文) シナプス可塑性をin vitroで再現する

研究課題名(英文) Reconstitution of synaptic plasticity in vitro

研究代表者

細川 智永 (HOSOKAWA, TOMOHISA)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：30602883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではシナプスタンパク質CaMKIIがシナプス後膜肥厚でタンパク質をつなぎ止め安定化するハブの役割を果たすという仮説を検証した。香港科学技術大学が2018年にシナプス後膜肥厚が液-液相分離による高いダイナミクスを持ったタンパク質の凝縮体であると報告をしたため、CaMKIIがシナプス後膜肥厚で液-液相分離を起こし凝縮体を形成する可能性に注目し、共同研究を行った。CaMKIIが興奮性刺激に応じて液-液相分離によりGluN2Bと凝縮体を可塑的に形成することを明らかにした。またこれによりシナプス後膜肥厚のStargazinのナノスケール局在を調節していることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では代表的なシナプスタンパク質CaMKIIの新たな役割を同定した。これまでその高すぎる発現量や必要性の不明な12量体構造が長らく議論の対象となってきたが、我々の発見した新たな役割、すなわち液-液相分離により蛋白質を凝縮する役割によってこれらの必然性を合理的に説明できるようになった。この凝縮により伝達物質受容体のナノスケール局在が調節されており、効率的な情報伝達を実現している。このことはシナプス可塑性と記憶形成の新たなメカニズムを示唆している。また凝縮の促進または抑制によって神経疾患への医学的応用が期待される。この成果は2021年のNature Neuroscienceに発表した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the hypothesis that CaMKII has a role to crosslink postsynaptic proteins to stabilize on postsynaptic density, like a “hub”. In 2018, Hong Kong university of Science and Technology (HKUST) reported that the postsynaptic density is the highly dynamic condensate of postsynaptic proteins via liquid-liquid phase separation (LLPS). We focused on the possibility that CaMKII undergoes LLPS to form protein condensate and started a collaboration with HKUST. We revealed that excitatory stimulation triggers the activation of CaMKII and the sustained formation of protein condensate with GluN2B via LLPS. Furthermore, the formation of protein condensate on postsynaptic density resulted in the modulation of nano-scale localization of postsynaptic proteins such as stargazin. This result demonstrates a novel mechanism of synaptic plasticity and memory formation.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 シナプス 液-液相分離 受容体 記憶

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カルシウムカルモデュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) は神経細胞に高発現する 12 量体のセリンスレオニンキナーゼであり、シナプス後膜肥厚 (PSD) の主成分として知られているが、キナーゼでありながら高発現する理由や 12 量体を形成することや自己リン酸化することで恒常活性型となり脱制御することの必然性を説明するモデルは存在しなかった。シナプス後膜肥厚 (PSD) は伝達物質受容体を含むシナプスタンパク質の集合体であり、シナプスの情報伝達の効率を決定し記憶形成に決定的な役割を果たす構造体であるが、タンパク質の離合集散の制御や集合体内部でのナノスケールの局在の制御機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では CaMKII がその発現量と 12 量体構造を活用し、興奮性刺激により活性化した CaMKII が PSD のタンパク質群を架橋し安定化することで受容体タンパク質量の増大などを通じてシナプス伝達を調節しシナプス長期増強を実行しているという仮説を検証した。特に、CaMKII が液 - 液相分離を介してシナプスタンパク質とタンパク質凝縮体 (コンデンセート) を形成している可能性に注目した。

3. 研究の方法

PSD がシナプスタンパク質群の液 - 液相分離によって形成されていることを示した論文 (ref1) の方法論に従い、タンパク質を複数のカラムを用いて高度に精製し、これを用いてガラス基板上にタンパク質集合体を形成し PSD を再現した。具体的には大腸菌 BL21RIL 株を用いて CaMKII をはじめとした PSD 蛋白質に TRX や SUMO などの可溶化タグを付加したコンストラクトを IPTG 誘導性システムによって発現した。アフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、サイジングカラムの三種類のカラムによって高度に精製したタグを切断し、ガラス基板上で混合し PSD を再構成し、そこにカルシウムを添加することで学習刺激の入力とした。

4. 研究成果

活性型 CaMKII は NMDA 受容体サブユニット GluN2B と結合することが報告されている。そこで CaMKII と GluN2B を精製し混合し、蛍光顕微鏡および SDS-PAGE にて分子集合体の形成の有無を調べた。環境中にカルシウムイオンが存在せず CaMKII が不活性状態では分子集合体の形成は見られなかったが、カルシウムイオンを添加し CaMKII を活性化すると蛍光顕微鏡および SDS-PAGE の双方で CaMKII と GluN2B により構成される球状のコンデンセートを観察した。この構造体は直径 $\sim 10 \mu\text{m}$ ほどであり、10kxg 程度の遠心によりペレットとして回収された。

球状のコンデンセートの形成は液 - 液相分離の特徴の一つである。そこで光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により分子の動態を観察したところ、液 - 液相分離に特徴的な構造体内外での分子の入れ替わりを観察した。また、構造体の様子を経時変化で観察したところ、構造体同士が融合する現象が観察された。これは構造体の物性が流動的であることを示しており、やはり液 - 液相分離に特徴的な現象である。

このコンデンセートはカルシウムイオンが環境中存在するときは安定であったが、実際の学習時のカルシウム細胞内流入はミリ秒オーダーで拡散して基底レベルまで戻ってしまう。そこで基底レベルに戻る状況を再現するためカルシウムをキレートする EGTA を添加したところ、速やかにコンデンセートが消失した。

CaMKII はカルシウムカルモデュリンと結合することで活性化コンフォメーションをとり酵素としてもハプタンパク質としても活性化するが、活性化した CaMKII は自己リン酸化により自身の立体構造を活性化コンフォメーションに固定化する。そこで環境に Mg^{2+} -ATP を添加し同様の実験を行ったところ、EGTA 添加後もコンデンセートが維持された (図 1)。このことは学習による一時的なカルシウムイオンの流入という情報がシナプス内でコンデンセートとして固定されることを意味する。

この CaMKII の役割が CaMKII の不可思議な特徴を合理的に説明すると考えた。まずコンデ

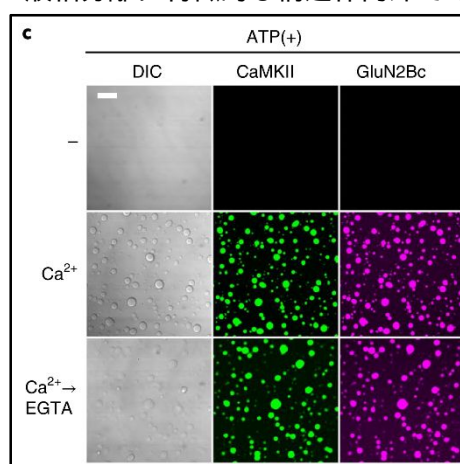


図 1 . カルシウムにトリガーされ形成されたコンデンセートが ATP 存在下で EGTA 後も維持される。

ンセートの形成は環境中に一定以上の蛋白質濃度が無ければ発生しない。このことから CaMKII の高発現量は構造蛋白質として機能するためであったと説明できる。次に CaMKII の構造変異・機能変異がコンデンセートの形成・維持にどのように働くのかを検証した。GluN2B と結合しない変異体や単量体化した CaMKII ではコンデンセートが形成されなかった。一方で自己リン酸化されない変異体やキナーゼ活性を持たない変異体はコンデンセートを維持できなかった。これらのことは、CaMKII の 12 量体はコンデンセートを形成するため、自己リン酸化による恒常活性化はコンデンセートを維持するために必須であることが示唆された。

次にこのコンデンセートの可塑的な形成が PSD のナノスケール構造に与える影響について検証した。PSD-95 は AMPA 受容体サブユニット Stargazin や GluN2B とコンデンセートを形成することが報告されている。そこで PSD-95, Stargazin, GluN2B を精製・混合し、PSD のベースとなる構造体を形成させた。その環境下で CaMKII を活性化させると、CaMKII:GluN2B で形成される“シェル”コンデンセートと PSD-95:Stargazin で形成される“コア”コンデンセートに分離する現象が観察された(図2)。この二相構造もまた EGTA 添加後にも維持されたことから、CaMKII の自己リン酸化が必須であると考えられる。

これらの結果は、CaMKII の新しい役割を示唆している。CaMKII はその高い発現量と 12 量体構造と自己リン酸化による恒常活性化を利用し、インプットに応じてコンデンセートを可塑的に形成する。このことは PSD のナノスケールの構造を変化させ複雑化させていくことでシナプスの情報伝達を調節している。このことはシナプスの超高解像顕微鏡観察により報告されている、PSD 内部で特定のタンパク質が集積しているナノドメインやナノドメインが情報伝達物質放出部位とアライメントされているナノカラムの存在と一致している。

これらの結果は 2021 年の Nature Neuroscience 誌に発表した(ref2)。

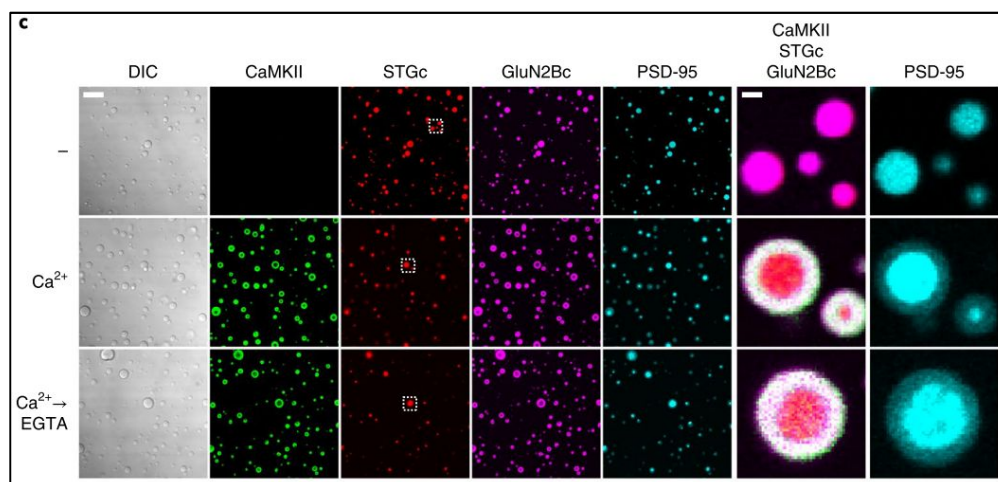


図2 .カルシウムイオンにより PSD の二相化がトリガーされ、EGTA 添加後も維持される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosokawa Tomohisa, Liu Pin-Wu, Cai Qixu, Ferreira Joana S., Levet Florian, Butler Corey, Sibarita Jean-Baptiste, Choquet Daniel, Groc Laurent, Hosy Eric, Zhang Mingjie, Hayashi Yasunori	4. 巻 -
2. 論文標題 CaMKII activation persistently segregates postsynaptic proteins via liquid phase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-021-00843-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Liu Pin-Wu, Hosokawa Tomohisa, Hayashi Yasunori	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of synaptic nanodomain by liquid?liquid phase separation: A novel mechanism of synaptic plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Neurobiology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.conb.2021.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 林 康紀、細川 智永、劉 品吾、實吉 岳郎	4. 巻 93
2. 論文標題 CaMKIIの新しいシナプス可塑性機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 191 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930191	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cai Qixu, Hosokawa Tomohisa, Zeng Menglong, Hayashi Yasunori, Zhang Mingjie	4. 巻 28
2. 論文標題 Shank3 Binds to and Stabilizes the Active Form of Rap1 and HRas GTPases via Its NTD-ANK Tandem with Distinct Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 290 ~ 300.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2019.11.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eriksen MS, Nikolaienko O, Hallin EI, Grodem S, Bustad HJ, Flydal MI, Merski I, Hosokawa T, Lascu D, Akerkar S, Cuellar J, Chambers JJ, O'Connell R, Muruganandam G, Loris R, Touma C, Kanhema T, Hayashi Y, Stratton MM, Valpuesta JM, Kursula P, Martinez A, Bramham CR.	4. 巻 288
2. 論文標題 Arc self association and formation of virus like capsids are mediated by an N terminal helical coil motif	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2930 ~ 2955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15618	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Cai Qixu, Hosokawa Tomohisa, Zeng Menglong, Hayashi Yasunori, Zhang Mingjie	4. 巻 28
2. 論文標題 Shank3 Binds to and Stabilizes the Active Form of Rap1 and HRas GTPases via Its NTD-ANK Tandem with Distinct Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 290 ~ 300.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.11.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 細川 智永、劉 品吾、林 康紀
2. 発表標題 CaMKIIの液-液相分離によるグルタミン酸受容体のシナプス内分離
3. 学会等名 Neuroscience2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川 智永、劉 品吾、林 康紀
2. 発表標題 CaMKIIの液液相分離によるグルタミン酸受容体のシナプス内区画化
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Hosokawa
2. 発表標題 Subsynaptic segregation of glutamate receptors by CaMKII-mediated liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 Neuroscience2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Hosokawa
2. 発表標題 Subsynaptic segregation of glutamate receptors by CaMKII-mediated liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 Japan Neurochemistry
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関