

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21122

研究課題名(和文)1分子イメージングによる記憶の分子作動メカニズムの解明への挑戦

研究課題名(英文)Challenge to elucidate the molecular mechanism of memory by single molecule imaging

研究代表者

柴田 幹大 (Shibata, Mikihiro)

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：80631027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳機能における記憶形成機構を分子レベルで理解することを目指し、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)をカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII(CaMKII)に適用し、その活性化状態を1分子レベルで可視化した。その結果、12量体を形成するCaMKIIは、中心にあるサブドメインが安定な構造をとる一方、周囲のキナーゼドメインはその周りを自由に動き回ることが分かった。さらに、Ca²⁺/CaMの結合とATPによるリン酸化状態では、キナーゼドメインはサブドメインから遠く離れ、より自由に動くサブユニットが出現することが分かった。これらの結果から、CaMKIIの信号積算メカニズムを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代では、医療の大幅な発展により、ヒトの生物としての寿命が大幅に延びる一方、脳の機能障害による病気や精神疾患には、未だに有効な治療法が確立されていない。記憶を分子(タンパク質)レベルで明らかにし、その詳細な分子作動メカニズムを解明することは、人として幸福に人生を全うすることを助長し、人類の健康の増進に大きく寄与するに違いない。本研究は、記憶タンパク質ともいわれるCaMKIIの信号積算メカニズムの一端を高速AFMの1分子イメージングにより明らかにした。この研究成果は、脳内の神経細胞に形成される記憶をタンパク質1分子の構造変化やナノ動態で説明がつく可能性を示し、学術的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Decoding Ca²⁺ signaling in spine mediated by serine/threonine kinases including Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) is crucial to synaptic plasticity that underlie learning and memory. CaMKII forms 12 subunits, all of which is a kinase that is activated by the binding of Ca²⁺/CaM. Despite the unique oligomer and importance in memory formation, the mechanism by which CaMKII integrates Ca²⁺ signals within its oligomer remains elusive. Here, we show flexibility of kinase domains in the CaMKII oligomer in basal state and activated state by directly visualizing nano-dynamics using HS-AFM. HS-AFM videos of CaMKII oligomer reveal that flexibility of kinase domains are changed dramatically depending on the binding of Ca²⁺/CaM and phosphorylated state, which causes both the autoinhibition and the positive cooperativity of phosphorylation. Our HS-AFM data provide a signal-integration mechanism in the CaMKII oligomer, which are fundamental to the molecular memory in brain.

研究分野：生物物理学

キーワード：バイオイメージング 原子間力顕微鏡 記憶・学習 タンパク質 脳機能

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) カルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (以下, CaMKII) は脳の神経細胞のスパイン部分に豊富に存在し、記憶・学習の形成に重要な役割を果たす。細胞内への Ca^{2+} 流入により Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) が CaMKII へ結合し、活性化した CaMKII は、CaMKII 多量体内の隣のサブユニットの Thr286 を自己リン酸化する。自己リン酸化した CaMKII は、グルタミン酸受容体 (AMPA, NMDAR) 等、記憶形成の細胞基盤といえる長期増強 (Long-term potentiation, LTP) に関わる様々なタンパク質をリン酸化し、後シナプスへとシグナル伝達を行う。

(2) CaMKII は、N 末端から順に、触媒ドメインであるキナーゼドメイン、2つのリン酸化サイト (Thr286 と Thr305/306)、 Ca^{2+} /CaM 結合サイトを含む自己阻害ドメイン、リンカー領域、多量体の形成に関わるハブドメインで構成される。これまでの主に電子顕微鏡を用いた研究から、CaMKII はハブドメインを介した 12 量体を形成し、2017 年に発表された電子顕微鏡画像の単粒子解析では、12 量体の中心に 2 層のハブ集合体を形成し、その周辺にキナーゼドメインがランダムな位置にある 3D 多量体構造モデルが提唱された。この構造により、各キナーゼドメインのサブユニットは十分近い距離を保つことができ、 Ca^{2+} /CaM の結合 (CaMKII の活性化) と隣のサブユニットのリン酸化に対して正の協同性を示すことが推測され、高頻度な Ca^{2+} 入力信号のデコード (受信信号の積算能力) を発揮する能力をもつと考えられてきた。

2. 研究の目的

しかしながら、12 量体を形成する CaMKII の活性化状態やリン酸化状態、協同的に Ca^{2+} /CaM の結合が起こる様子を 1 分子レベルで明らかにした例はなく、これまでに信じられている CaMKII オリゴマー内に潜むシグナル積算分子メカニズムには実験的な証拠はない。CaMKII のサブユニットのキナーゼドメインのナノ動態や Ca^{2+} /CaM の結合やリン酸化状態に伴う構造変化を 1 分子レベルで可視化できれば、その詳細なシグナル積算メカニズムを明らかにできる。そこで、本研究は、高速原子間力顕微鏡 (以下、高速 AFM) を用いて CaMKII の 1 分子観察を試みた。

3. 研究の方法

高速 AFM は生体分子の動態をナノメートルスケールかつ、リアルタイムで可視化できる顕微鏡技術であり、我々のグループを含め、これまでに様々なタンパク質の機能中の構造変化を可視化し、その分子作動メカニズムの解明に大きく貢献してきた。特に、タンパク質の多量体構造や、多種のタンパク質で構成された複合体の動態を 1 分子レベルで可視化できる利点をもつ。

4. 研究成果

(1) 最初に、野生型 CaMKII α および、ハブドメインとキナーゼドメインの間のリンカーを削除した no-linker CaMKII α (nlCaMKII α) に対して高速 AFM 観察を行った。その結果、ハブ集合体とその周りで自由に動く 12 個の球状構造が見られた。この球状構造は、これまでに報告された CaMKII α の電子顕微鏡画像と比較して、キナーゼドメインと考えられる。また、両方の CaMKII α において、溶液中の全長 CaMKII α は 97 % 以上で 12-mer を形成するが、3 % 以下で、14-mer を形成されることが分かり、過去の研究結果と一致する。このように、CaMKII の 12 量体構造の高速 AFM 画像は、過去の研究結果と多くの部分で一致し、ハブドメインとキナーゼドメインの構造と動態を明確に区別することができる。

(2) 次に、我々は、CaMKII α のキナーゼドメインの運動性に注目した。キナーゼドメインの動きを解析するために、高速 AFM 画像の各キナーゼドメインの最大の高さを示す座標を各フレームで抽出し、軌跡を示し、ハブ集合体の中心から各キナーゼドメインとの距離を計測した。その結果、CaMKII オリゴマー内のキナーゼドメインの運動性はリンカーの長さが重要であることを見出した。

(3) さらに我々は、各キナーゼドメインの運動方向を解析するために、各フレームのキナーゼドメインの動きに対して、主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行った。その結果、キナーゼドメインの運動の 50 % 以上はハブ集合体を中心とした円周運動であることが分かった。また、CaMKII 多量体内のキナーゼドメインの運動の相関を調べるため、各キナーゼドメイン間で Pearson correlation coefficient を計算し、隣り合うキナーゼドメインのもの、それ以外をハブ集合体の円周方向と動径方向で比較した。その結果、多量体内で隣り合うキナーゼドメイン同士の運動には、円周方向の動きに高い相関があることが分かった。つまり、隣り合うキナーゼドメイン同士には、相互作用があることを示唆し、連動して円周運動を起こすか、または、集合して動かないのどちらかである。

(4) さらに我々は、CaMKII 阻害剤の存在下においてキナーゼドメインの運動性を調べた。阻害剤には、nlCaMKII α の自己抑制状態の結晶構造解析で用いられたボスチニブを用いた。高速 AFM

観察の結果、キナーゼドメインの運動性が大きく低下する様子が観察された。ボスチニブは元来、キナーゼドメイン内の ATP 結合サイトへ結合することで、キナーゼドメインへの ATP の結合を阻害し、CaMKII のキナーゼ活性を阻害すると考えられていたが、我々の高速 AFM 観察により、ボスチニブの結合により、キナーゼドメインと自己阻害ドメインの相互作用が強まり、キナーゼドメインの運動性が失われ、その結果、CaMKII のキナーゼ活性が低下したとも考えられる。実際に、細胞を用いた実験により、ボスチニブが CaMKII の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合も阻害することが分かり、キナーゼドメインの運動性が CaMKII の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合、つまり、活性化に重要であることが分かった。

(5) 次に、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合に伴う CaMKII α オリゴマーの構造変化を可視化した。最初に、CaMKII α の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合による典型的な高速 AFM 画像を得るため、90%以上の CaMKII が $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と結合する条件で高速 AFM 観察を行った。その結果、ハブドメインとキナーゼドメインの間に新たに球状構造が見られ、高速 AFM 観察中に解離する様子が見られた。つまり、この新たに可視化された球状構造が、CaMKII に結合した $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と考えられる。そして、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が結合したキナーゼドメインは、ハブ集合体の中心から外側へ離れ、かつ、運動性が失われた。このように、CaMKII オリゴマーにおいて、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合により、各キナーゼドメインはハブ集合体の動径方向へ移動し、運動性が低下した構造へ変化する。では、ATP 存在下において、リン酸化状態のキナーゼドメインはどのような構造へ変化するのだろうか？

(6) 我々は、チューブ内で 50 nM の CaMKII に対して 800 nM の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と 1 mM の ATP を加え、30 °C で 5 分間リン酸化反応を起こした後、EGTA を加え Ca^{2+} をキレートし、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ を解離することで、完全にリン酸化状態にある CaMKII オリゴマーの高速 AFM 観察を行った。その結果、キナーゼドメインはハブ集合体からさらに遠く離れ、その周りを激しく動き回る様子を捉えた。この構造変化は、CaMKII オリゴマー内において、リン酸化状態にあるキナーゼドメインの両隣に大きなスペースを生み、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合サイトを長時間露出する事が可能となる。

(7) それでは、CaMKII オリゴマー内のキナーゼドメインがリン酸化することにより、その近傍のキナーゼドメインはリン酸化状態へ移行しやすくなっているのだろうか？我々は、CaMKII オリゴマー内のポジション依存的なリン酸化状態への遷移を調べるため、低濃度の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 下において高速 AFM 観察を行った。先の高速 AFM 観察から、リン酸化状態にあるキナーゼドメインは、ハブ集合体の中心から遠く離れた位置にあることが分かった。それを元に、以下に記述する基準で CaMKII オリゴマー内のキナーゼドメインがリン酸化状態かどうかを判断した。約 30 フレームの高速 AFM 観察の間に、ハブ集合体の中心からの距離が CaMKII α の場合は最大 17 nm を超え、かつ、その平均距離が 14 nm をとるキナーゼドメイン、nlCaMKII α の場合は、最大 15 nm を超え、平均距離が 12 nm をとるキナーゼドメインをリン酸化状態と判断した (図 1a 中の白矢印)。その結果、両方の CaMKII α において、CaM の濃度に依存して、2 個以上のキナーゼドメインがリン酸化状態にあるオリゴマーの数、および、キナーゼドメインの数が増加することが分かった。また、様々な CaM 濃度において、オリゴマー中のリン酸化状態にあるキナーゼドメインの数を解析すると、どの CaM 濃度においても明確なピークは見られず、ブロードな分布を示すことが分かった。特に、CaM 濃度が低い条件 (5-25 nM) においても、リン酸化状態にあるキナーゼドメインを複数個もつ CaMKII オリゴマーがいくつか見られた。一方で、CaM 濃度が高い場合においても (200-400 nM)、リン酸化状態にあるキナーゼドメインを 1 つも持たないオリゴマーが存在する。これは、オリゴマー内にリン酸化したキナーゼドメインが存在するほど、残りのキナーゼドメインもリン酸化しやすく、その逆に、オリゴマー内にリン酸化したキナーゼドメインがない場合は、例え CaM 濃度が高い場合でも、リン酸化が進まないことを意味する。つまり、これらの実験事実は、オリゴマー内のキナーゼドメインのリン酸化反応に正の協同性があることを示唆する。

(8) さらに我々は、CaMKII オリゴマー内のキナーゼドメインが 2 個以上リン酸化状態にあるオリゴマーを対象に、オリゴマー内のどの位置がリン酸化状態になりやすいのかを解析した (図 1b)。解析方法は、オリゴマー内で 2 つ以上のキナーゼドメインがリン酸化状態にあるオリゴマーだけを解析対象とし、リン酸化状態にある 1 つ目のキナーゼドメインの位置を固定し、2 つ目以降のリン酸化状態にあるキナーゼドメインがどの位置にあるのかをカウントした (図 1b)。また、オリゴマー中のキナーゼドメインは 12 個あり、1 つのキナーゼドメインがリン酸化状態にあるとすると、残り 11 個のキナーゼドメインがリン酸化状態に移行する確率は $1/11=9.1\%$ となる。CaMKII オリゴマーは対称リング構造であるため、それぞれの位置にあるキナーゼドメインがリン酸化状態になる確率は $9.1 \times 2 = 18.2\%$ (ランダムなリン酸化) と仮定できる。これを元にして、オリゴマー中のリン酸化したキナーゼドメインの確立を規格化し、CaM 濃度依存性を示した図を図 1b に示す。その結果、両方の CaMKII において、position 1 つまり隣のキナーゼドメインは、ランダムに起こるリン酸化よりも、十分高い確率でリン酸化状態にあることが分かり、一方で、反対側の position 6 に位置するキナーゼドメインがリン酸化状態にあることがほとんどないことが分かった。このように、CaM 濃度依存性の CaMKII オリゴマーの高速 AFM 解析から、オリゴマー内でリン酸化状態にあるキナーゼドメインをもつオリゴマーほど、他のキナーゼ

ドメインもリン酸化状態にあることと、隣り合うキナーゼドメインは高確率でリン酸化状態にあることが1分子観察により明確に示された。

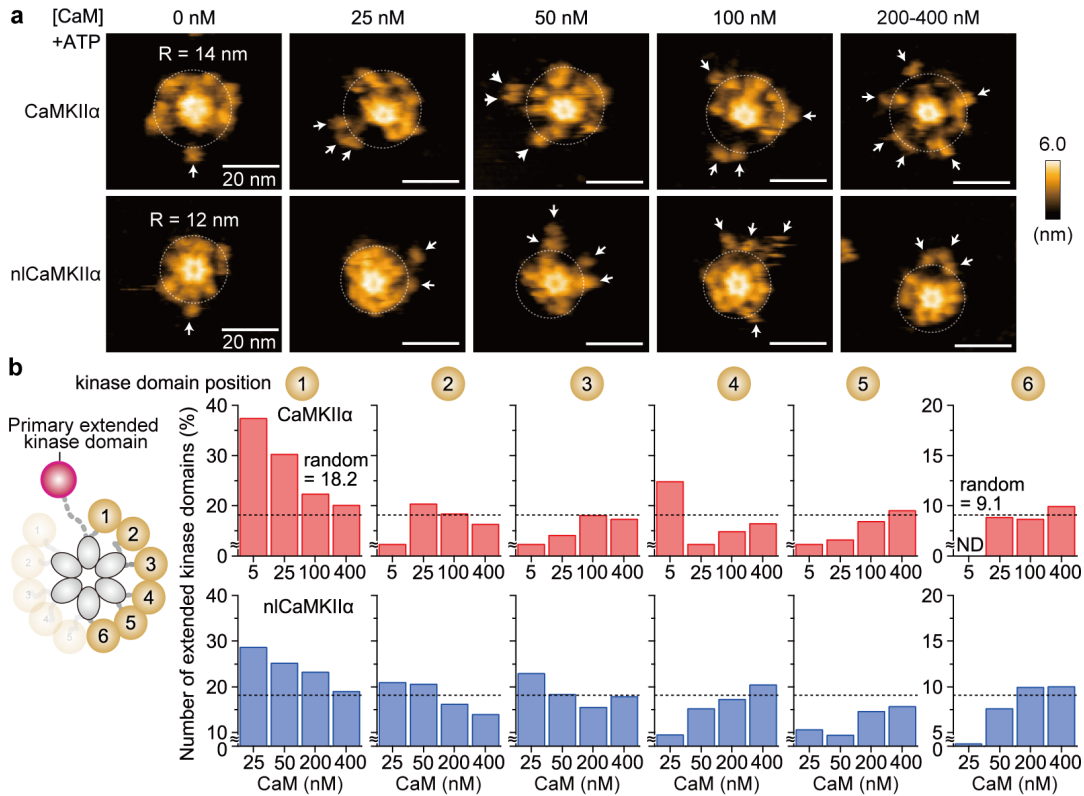


図1 異なる $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 濃度における CaMKIIα および nCaMKIIα のリン酸化状態における高速 AFM 画像

(9) まとめ

本研究では、高速 AFM を用いて CaMKII オリゴマー中のキナーゼドメインのナノ動態を1分子レベルで可視化した。CaMKII オリゴマー内のキナーゼドメインはハブ集合体の周りを自由に動く。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合サイトはハブドメインとキナーゼドメインの間にあるため、キナーゼドメインの自由な運動により、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は、その結合サイトへアクセス可能となる。次に、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ がキナーゼドメインへ結合し、ATP の加水分解を用いたリン酸化状態になると、オリゴマー内のキナーゼドメインはハブ集合体から離れ、最大の運動性をもつ。高速 AFM 画像には、ハブ集合体とキナーゼドメインを繋ぐリンカー構造が見えないが、自己阻害ドメインとリンカー領域が、リン酸化によって構造が壊れ、IDR 化したためと考えられる。IDR 化した構造が高速 AFM で観察できないのは、基板から浮くか、非常に速く動いているためだと考えられる。この構造変化により、ハブ集合体と各キナーゼドメインとの間の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合サイトが長時間、大きく開くことになり、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ が結合サイトへよりアクセスしやすくなり、近傍のキナーゼドメインは $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合を受けやすい構造となる。つまり、正の協同性が生じると考えられる。一方で、リン酸化状態にあるキナーゼドメインがない CaMKII オリゴマーは、自己抑制機能により、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 結合サイトを開かないため、リン酸化状態に遷移し難い。これは、負の協同性と考えられる。このように、オリゴマー内に1個でもリン酸化状態にあるキナーゼドメインが存在すれば、CaM 結合サイトが長時間露出されることになり、リン酸化状態を持たない他のオリゴマーに比べて、優先的にリン酸化状態へ移行する。これにより Ca^{2+} 信号の積算が可能となる。このように、CaMKII オリゴマーの1分子観察により、これまでの生化学実験で示唆されていた CaMKII 活性化の協同性は、ハブ集合体周辺に位置するキナーゼドメインの運動性と構造変化に由来すると説明できる。不活性状態とリン酸化状態の大きな構造変化は、0 と 1 の2つの状態を明確に区別し、熱的に戻ることができないため、その大規模な構造変化が Ca^{2+} 信号の記憶とみなせる。また、ハブ集合体で自由に動くキナーゼドメインの運動は、外部エネルギーを必要とせず、熱揺らぎで起こる。つまり、CaMKII はリング状のオリゴマー構造を自発的に形成し、熱揺らぎとリンカー領域の長さを巧みに使って、 Ca^{2+} 信号の記憶と積算を生む出していると考えられる。生物がもつ信号記憶積算メカニズムは、ここに示したように、2つの球をフレキシブルなひもでつなぎ、熱揺らぎだけで完了する非常に低エネルギーな機構であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tetsuya Ueta, Keiichi Kojima, Tomoya Hino, Mikihiro Shibata, Shingo Nagano, Yuki Sudo*	4. 巻 119
2. 論文標題 Applicability of Styrene-Maleic Acid Copolymer for Two Microbial Rhodopsins, RxR and HsSRI.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical journal	6. 最初と最後の頁 1760-1770
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2020.09.026	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 Rina Hirano, Yasuhiro Arimura, Tomoya Kujirai, Mikihiro Shibata, Aya Okuda, Ken Morishima, Rintaro Inoue, Masaaki Sugiyama, Hitoshi Kurumizaka	4. 巻 4
2. 論文標題 Histone variant H2A.B-H2B dimers are spontaneously exchanged with canonical H2A-H2B in the nucleosome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-021-01707-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Puppulin Leonardo, Kanayama Daiki, Terasaka Naohiro, Sakai Katsuya, Kodera Noriyuki, Umeda Kenichi, Sumino Ayumi, Marchesi Arin, Weilin Wei, Tanaka Hideo, Fukuma Takeshi, Suga Hiroaki, Matsumoto Kunio, Shibata Mikihiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Macrocyclic Peptide-Conjugated Tip for Fast and Selective Molecular Recognition Imaging by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 54817 ~ 54829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmi.1c17708	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 Kishi Koichiro E.et al.	4. 巻 185
2. 論文標題 Structural basis for channel conduction in the pump-like channelrhodopsin ChRmine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 672 ~ 689.e23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.01.007	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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柴田幹大, 村越秀治
2. 発表標題 高速AFMを用いたCaMKII多量体のCa ²⁺ 信号積算メカニズムの解明
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会 第46回討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による柔軟なタンパク質動態のナノスケール撮影
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 神谷孫斗, 柴田幹大, 上田直子, 角野歩
2. 発表標題 高速 AFM によるハブ毒液由来脂質分解酵素 PLA2の膜認識機構の解明
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikihiro Shibata
2. 発表標題 Visualizing single-molecule dynamics of protein complexes by high-speed AFM.
3. 学会等名 「全原子・粗視化分子動力学による細胞内分子動態の解明」ウェブセミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田幹大, 服部素之, 角野 歩
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡による膜中TRPV1 チャネルの動態観察
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向 大地, Yimeng Zhao, 柴田幹大, 服部素之, 角野 歩
2. 発表標題 Structural dynamics of the cytoplasmic domain of transient receptor potential vanilloid1(TRPV1) in lipid bilayer observed by high speed atomic force microscopy (HS-AFM).
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤津綜隆, 平野里奈, 柴田幹大, 鯨井智也, 滝沢由政, 江原晴彦, 関根俊一, 胡桃坂仁志
2. 発表標題 ヒストンバリエントH2A.Bによるヌクレオソーム構造変化が転写に与える影響の解明
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田幹大
2. 発表標題 高速AFMによる記憶分子CaMKIIの構造ダイナミクス観察
3. 学会等名 ブルカージャパン表面計測事業部主催【第2回】高速AFMオンラインシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------