

令和 4 年 4 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21462

研究課題名(和文) CaMKIIによる液-液相分離を介したシナプス可塑性の調節機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of synaptic plasticity through liquid-liquid phase separation of CaMKII

研究代表者

林 康紀 (HAYASHI, Yasunori)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90466037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：記憶とは一時的な情報を脳内に保存する脳機能ですが、脳内の分子が何らかの変化をすると考えられています。しかしそれがどのような変化かはわかっていませんし、体内の分子は常に別の分子と入れ替わっているため、記憶を一生涯保つこともできるのは不思議でした。我々は、学習時の刺激により脳内のタンパク質が集合体を形成することを明らかにしました。脳細胞の中は水で満たされていますが、この集合体はあたかも水に浮かぶ油のように細胞内の水から自発的に分離し集合していました。こうして分子たち自身が自分の居場所を記憶することで分子の入れ替わりを可能にし、私たちは記憶を一生涯保つことができるのです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たち人類は知識や技術を記憶することで文明を築き、大切な人の顔や出来事を記憶することで日常を過ごしています。この新発見の機構を応用することで、アルツハイマー病などの治療ができるのではないかと期待しています。記憶は人間を人間たらしめる最も重要な能力ですが、わかっていることは多くありません。加齢・病気・事故により記憶を失ってしまうことは、肉体の損傷と同じかあるいはもっと大きな悲しみを伴います。また、過去の悲しい記憶に囚われて前向きに生きられなくなることもあります。私たちは記憶形成の分子機構の研究を通じて、人間がより人間らしく生活できる世界を実現したいと願っています。

研究成果の概要(英文)：Humans built our civilization by memorizing knowledge and skills. We spend our daily lives memorizing the faces and events of our loved ones. Memory is a brain function that permanently stores information of temporary events, such as what we have seen or eaten. During this process, the molecules in the brain undergo certain changes that withstand their turnover over time beyond the lifetime of the molecules themselves. We have shown that proteins in the brain form condensates when stimulated during learning. The neurons are filled with water, but these aggregates spontaneously separate and assemble from the water in the neurons as if they were oil droplets floating on water. The molecules themselves remember their own locations, while allowing them to turnover. In this way, this mechanism allows us to retain their memories throughout our lives. We hope our finding leads to a better understanding and eventually to a treat neurological diseases such as Alzheimer's disease.

研究分野：神経科学

キーワード：CaMKII シナプス可塑性 液-液相分離 AMPA型グルタミン酸受容体 NMDA型グルタミン酸受容体 興奮性シナプス

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞小器官には核や小胞体、ミトコンドリアのように膜で囲まれる構造がある一方、染色体、核小体、中心体、RNA 顆粒のように膜がなく、構成要素が細胞質にむき出しの構造もある。そのような構造体が、どのようにその構成要素を保持しているのかは明らかでなかった。この点、最近液-液相分離(LLPS)の関与が考えられた。LLPS とは、タンパク質や RNA が溶液中で水と油を混ぜた時のように、濃縮相と希釈相の 2 つの液相に分離する現象である。凝集とは異なり液体としての流動性は保持しており、分子は相内、相間で行き来する。膜を欠く構造体は、この機構により構成要素が濃縮されることで構造を保つと提唱されている。LLPS を起こすにはいくつかの条件が必要で、まず多量体形成あるいは複数の結合ドメインが存在するなど、多価の相互作用が必要である。また分子全体としてはある程度の柔らかさが必要で、一部に天然変性領域(intrinsically disordered region)を含むものが多い。

シナプス直下にも数百種類に上るタンパク質がシナプス後膜肥厚(PSD)と呼ばれる密な構造を形成している。PSD にはシナプス伝達の調節因子や細胞骨格分子が集積し、さらにシナプスの可塑的变化に伴い PSD 自体も拡大したり縮小したりする。PSD は細胞膜直下に形成されるが、囲む膜はなく、タンパク質が PSD に留まり、かつシナプス活動に反応する機構は長らく不明であった。しかも PSD は均一な構造ではなくシナプス活動依存的にタンパク質がさらに偏在した内部構造が形成されることが知られているが、その機構も不明である。

2. 研究の目的

PSD に多量に存在するセリン/スレオニン蛋白質キナーゼである Ca^{2+} /カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMKII) は、シナプス内に流入した Ca^{2+} により活性化される。一旦活性化されると、特に自己リン酸化により活性が保ち続けられることから、記憶分子としての機能が考えられてきた。しかし CaMKII にはいくつかの謎がある。一つは PSD に多量に存在することである。キナーゼは 1 分子が多数の基質をリン酸化するため、多量に存在する必要はない。もう一つは特有の回転対称型 12 量体構造である。我々は、最近 CaMKII が複数のシナプスタンパク質と Ca^{2+} 依存的に安定な複合体を形成することを見出した。そこで、本研究では CaMKII が Ca^{2+} により活性化されると他のタンパク質と LLPS を起こすことで、シナプス活動依存的なシナプス局所へのタンパク質の移行と濃縮を起こすという新たな仮説を立てた。この実証のため、本研究では次のような Specific Aim を設定し研究を遂行した。

S.A.1 CaMKII は LLPS を起こすか

S.A.2 LLPS を起こした CaMKII はその他のタンパク質を濃縮相に留めるか

S.A.3 CaMKII による LLPS はシナプス長期増強に必要か

3. 研究の方法

CaMKII は LLPS を起こすか

CaMKII が LLPS を起こすかを検討するため、CaMKII、PSD 足場タンパク質 PSD-95、CaMKII と結合することが知られている NMDA 受容体 GluN2B サブユニットの細胞内 C 末端を大腸菌で発現・精製した。GluN2B は蛍光タンパク質 DsRed2 との融合タンパク質とし、また PSD-95、CaMKII は蛍光色素でラベルした。各タンパク質を混合の上、位相差顕微鏡で相分離しているか、また蛍光顕微鏡でそれぞれのタンパク質がどちらの相に分布するかを確認した。濃縮相の一部を光退色させることで相内、相間での分子の流動性を観察した。さらに、AMPA 受容体の細胞内 C 末端あるいは補助サブユニット Stargazin の C 末端も同様に蛍光タンパク質と融合し用いた。

LLPS を起こした CaMKII はその他のタンパク質を濃縮相に留めるか

GluN2B は、CaMKII 上の T-site と呼ばれる通常、自己阻害ドメインが結合している領域に Ca^{2+} 依存的に結合する。最近我々は、低分子 G タンパク質 Rac の活性化因子、Tiam1 も同様に CaMKII に結合し、しかもそれにより CaMKII の自己阻害が外れることを明らかにした。そこで、その他

に CaMKII と同様な結合を示すタンパク質はないかをスクリーニングした。このため CaMKII を固定したアフィニティーカラムを作成し、Ca²⁺存在下で可溶化した PSD 画分から、結合するタンパク質を単離し、質量分析により同定した。

CaMKII による LLPS はシナプス長期増強に必要なか

PSD においてシナプス長期増強は伝達物質受容体を含めた PSD タンパク質全体の増加、および内部構造の形成によるタンパク質局在の最適化により説明される。そこで超高解像度イメージングにて AMPA、NMDA 受容体をシナプス下にて検出し、CaMKII との結合が両者の分離状態を変化させるかを検討した。

4. 研究成果

CaMKII は LLPS を起こすか

Ca²⁺の非存在下では CaMKII、GluN2B も LLPS を起こさなかった (図 1)。しかし、Ca²⁺/カルモジュリンで刺激すると、タンパク質の液滴が観察され、LLPS が起こったことが示唆された。しかも、一旦起こった相分離は EGTA で Ca²⁺をキレートしても継続した。CaMKII が LLPS を起こすには、キナーゼ活性は必要なかったが、それが EGTA 添加後にも継続するためには T286 の自己リン酸化が必要であった。T286A 変異体や触媒部位に変異を入れた場合は、Ca²⁺を添加すると LLPS が起こるが、EGTA を加えると消失した。

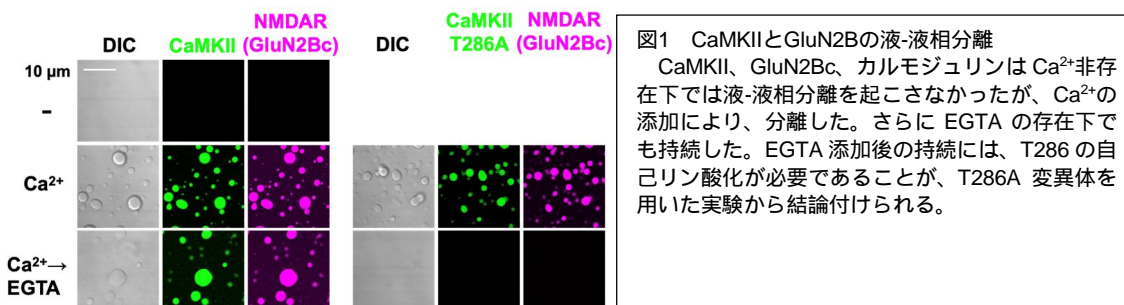


図1 CaMKIIとGluN2Bの液-液相分離
CaMKII、GluN2Bc、カルモジュリンは Ca²⁺非存在下では液-液相分離を起こさなかったが、Ca²⁺の添加により、分離した。さらに EGTA の存在下でも持続した。EGTA 添加後の持続には、T286 の自己リン酸化が必要であることが、T286A 変異体を用いた実験から結論付けられる。

さらに我々は代表的な PSD 足場タンパク質である、PSD-95、AMPA 受容体補助サブユニット Stargazin の細胞内カルボキシル末、シナプス接着因子ニューロリギンの細胞内カルボキシル末を CaMKII、GluN2B 細胞内カルボキシル末、カルモジュリンと共に LLPS を形成するかを検討した。Ca²⁺の非存在下では、CaMKII 以外のタンパク質が LLPS を起こした (図 2)。これは足場タンパク質としての PSD-95 の役割によると考えられた。ここに Ca²⁺を添加すると CaMKII が濃縮相に加わった。更に興味深いことに、濃縮相がさらに 2 つに分離した (相内相形成)。

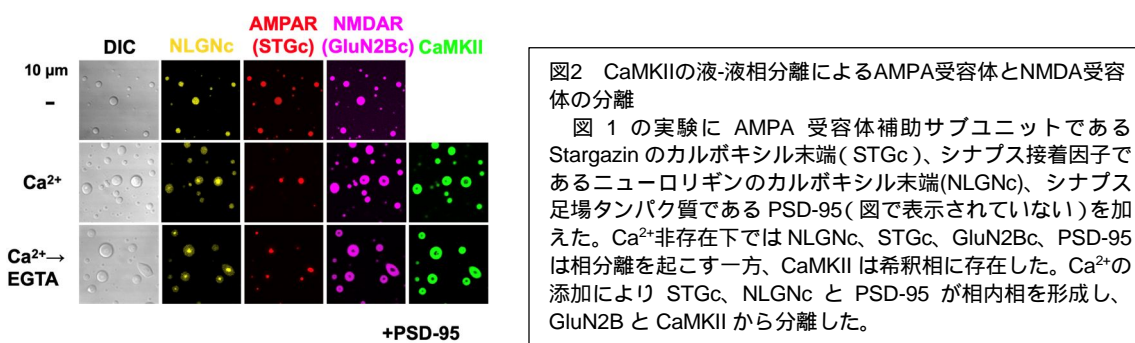


図2 CaMKIIの液-液相分離によるAMPA受容体とNMDA受容体の分離
図 1 の実験に AMPA 受容体補助サブユニットである Stargazin のカルボキシル末端 (STGc)、シナプス接着因子であるニューロリギンのカルボキシル末端 (NLGNc)、シナプス足場タンパク質である PSD-95 (図で表示されていない) を加えた。Ca²⁺非存在下では NLGNc、STGc、GluN2Bc、PSD-95 は相分離を起こす一方、CaMKII は希釈相に存在した。Ca²⁺の添加により STGc、NLGNc と PSD-95 が相内相を形成し、GluN2B と CaMKII から分離した。

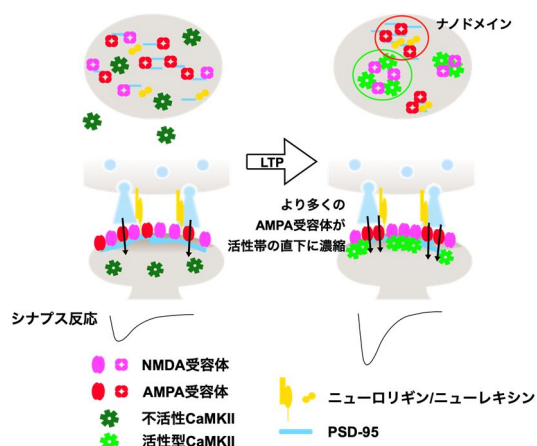
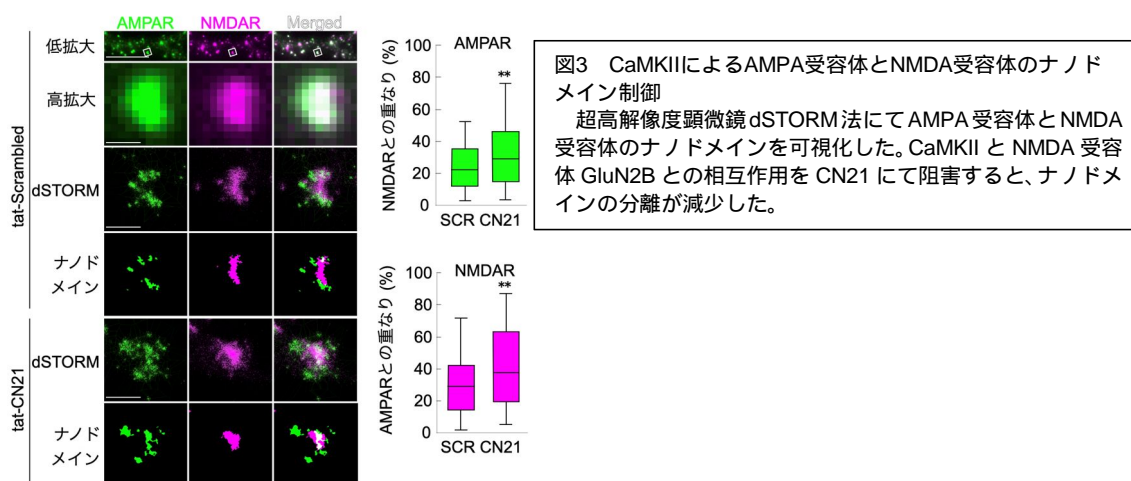
LLPS を起こした CaMKII はその他のタンパク質を濃縮相に留めるか

CaMKII のアフィニティーカラムに結合するタンパク質を質量分析で解析した結果、数百種に及ぶタンパク質が検出された。その中には GluN2B のように既に CaMKII と結合することが知られているタンパク質もあったが、多くは知られていないものであった。また結合されないとされている NMDA 受容体 GluN2A サブユニットの様に間接的な結合によるものと考えられるものもあった。また、配列からも必ずしも CaMKII に直接結合しているのかわからないタンパク質も多かった。そのため、機能がはっきりしていなかったシナプスタンパク質である Anks1B を

選り解析を進める一方で、ビオチン化法にて CaMKII と結合するタンパク質を再度検出している。

CaMKII による LLPS はシナプス長期増強に必要なか

超高解像度顕微鏡法 dSTORM により初代培養神経細胞のシナプスにおける PSD 内の AMPA 受容体と NMDA 受容体を観察すると、両者は分離して存在した。さらに、CaMKII と GluN2B との相互作用を CN21 処理により抑制すると、AMPA 受容体と NMDA 受容体の分離が減少した(図3)。このことは、CaMKII が PSD 内部のタンパク質の分布を制御していることを示唆している。ニューロリギンは、シナプス前部のニューレキシンと相互作用する。ニューレキシンはシナプス顆粒の放出部位である、活性帯の構成タンパク質とも相互作用するので、このメカニズムにより、AMPA 受容体がシナプス顆粒の放出部位直下に濃縮される可能性がある。AMPA 受容体は、シナプスのグルタミン酸に対して飽和していないため、活性化された CaMKII によって AMPA 受容体がシナプス顆粒放出部位に濃縮されることが、シナプス可塑性の一つのメカニズムであると考えた(図4)。



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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Yasunori, Ford Lenzie K., Fioriti Luana, McGurk Leeanne, Zhang Mingjie	4. 巻 41
2. 論文標題 Liquid-Liquid Phase Separation in Physiology and Pathophysiology of the Nervous System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 834 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1656-20.2020	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 Hosokawa, T., Liu, P.-W., Cai, Q., Ferreira, J.S., Levet, F., Butler, C., Sibarita, J.B., Choquet, D., Groc, L., Hosy, E., et al.	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 Nat. Neurosci., in press.	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) なし	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 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 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp/j/index.php/%E3%83%8B%E3%83%A5%E3%83%BC%E3%82%B9>

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
---------	---------