

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02595

研究課題名（和文）記憶形成に伴うシナプスタンパク質の集積・維持の制御機構

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of synaptic protein accumulation and maintenance during memory formation.

研究代表者

実吉 岳郎（Saneyoshi, Takeo）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00556201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：シナプス可塑性における、シナプス局所でのリン酸化シグナルを増強・維持するため、CaMKIIがグルタミン酸受容体GluN2Bサブユニットと液-液相分離し、リン酸化酵素を取り込む一方で脱リン酸化酵素を排除する機構によって、コフィリンタンパク質のリン酸化および分子活性の空間的分離を実現することを見出した。この機構がシナプス構造可塑性を持続させる分子メカニズムの一つであることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々ヒト個人を個人たらしめるのが記憶である。しかし、記憶がどのように維持されているのかはまだわかっていない。我々は記憶の素子であるシナプスにどのような形で情報が保存されているのか、その一端を明らかにした。実際の記憶は脳内の神経回路網に保持されると考えられているが、本研究の成果は、脳内のどこへ記憶が貯蔵されているかの手がかりとなる可能性がある。また、分子機構がわかると、記憶の維持に関わる疾患に対する治療法の開発や創薬へとつながっていくと期待される。

研究成果の概要（英文）：To maintain local protein phosphorylation, we found that CaMKII induces liquid-liquid phase separation (LLPS) with the glutamate receptor GluN2B subunit to achieve spatial separation of phosphorylation and molecular activities of the cofilin protein by a mechanism that includes cofilin kinase LIMK1 but excludes phosphatase, slingshot. During long-term potentiation (LTP), we found that the gradient of molecular activity of the cofilin protein is achieved by an LLPS mechanism that incorporates kinases but excludes phosphatases in neurons. This mechanism may be one of the molecular mechanisms that persists synaptic structural plasticity.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス 記憶 CaMKII 液-液相分離 リン酸化 アクチン細胞骨格 コフィリン 長期増強

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。

1. 研究開始当初の背景

神経細胞同士が情報を伝達する場であるシナプスの機能が長期間増強する現象を長期増強 (LTP) と呼ぶ。これまでの研究から LTP は、神経伝達物質を受容するシナプス後部に起こる変化が重要であり、LTP の誘導にはグルタミン酸受容体である NMDA 受容体 (NMDAR) を介した Ca^{2+} のシナプス後部への流入が必須であること、 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) がシナプスで活性化すること、LTP 発現の実体が AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) のシナプス後部での機能増強であること、細胞骨格アクチンが長期的に重合し、シナプスが拡大することが明らかになってきた (図 1)。これらの研究から LTP に伴う分子機能の大枠については理解が進んだが、LTP についての本質的な問いである、「どのようにシナプス機能と形態が一過性の Ca^{2+} シグナルによって増大し、長期的にその状態を維持するのか？」は未解明である。

この様な状況の中で、ここ数年の間に非膜オルガネラへのタンパク質集積について、液-液相分離 (LLPS) が関与することを示す報告が増加している。LLPS とは、特定のタンパク質や核酸が自発的に濃縮した液相をつくる現象であり、RNA 顆粒、染色体、核小体などの非膜オルガネラの形成に関与する。LLPS により特定の分子が濃縮され、代謝経路や情報伝達の効率を高まると考えられる。シナプス後部膜には電子顕微鏡観察で電子密度の高い非膜オルガネラであるシナプス後膜肥厚 (postsynaptic density: PSD) が存在するが、これも LLPS により形成されるユニークな膜直下のタンパク質凝集構造としてとらえることが可能である。

一方、CaMKII は Ca^{2+} によって活性化されるが、一旦活性化すると自己リン酸化により自己阻害が解除され、恒常的なキナーゼ活性を獲得するため、記憶分子として示唆されていた。加えて、CaMKII は PSD に 20-30% と多量に存在するにも関わらず LTP 誘導に伴いさらに PSD に移行すること、回転対称な 12 量体構造をとることなど、キナーゼの機能としては説明できないユニークな特徴がある。われわれは、この CaMKII のユニークな性質は、PSD で LLPS を起こすのに必要な性質ではないかという発想に至った。CaMKII を含む PSD の構成分子は数分から数時間でターンオーバーするにも関わらず、全体としての同一性は保たれている。また光褪色後蛍光回復法で部分退色しても数分で分子が混ざることから、PSD 内での CaMKII は液としての性質を持つ (Neuron, 2014)。これらの性質は CaMKII による相分離で合理的に説明できる。実際、CaMKII は活性化すると、基質タンパク質と LLPS を起こすことを実証している。しかも一旦形成された LLPS は Ca^{2+} をキレートしても継続する。つまり、この CaMKII がつくる LLPS は分子記憶の性質を持っていたのである。

さらに、CaMKII はアクチン細胞骨格を制御する Rac 活性化因子 Tiam1 と Ca^{2+} /カルモデュリン依存的に複合体を形成する (Neuron, 2019)。興味深いことに、Tiam1 は CaMKII の自己阻害ドメインの結合する領域に相互作用し、自己阻害を解除する。そのため、CaMKII が一旦 Tiam1 と結合すると、 Ca^{2+} 非依存的な活性により、Tiam1 をリン酸化し続ける。われわれはこの両者が相互に活性化し合う複合体を RAKEC (reciprocal activation within a kinase-effector complex) と名付けた。この機構により、CaMKII は一過性のシグナル入力に対し持続的なシグナルを出力する、スイッチング回路として働くことが予想される。

本研究計画では、シナプスを「生化学的変化を記憶する超分子集合体」と捉え、LTPに伴うタンパク質の集積・維持の制御に LLPS および RAKEC という新しいコンセプトを導入し、長年にわたり議論されてきた LTP の分子レベルでの実体を明らかにしていく。

2. 研究の目的

LTP が記憶学習の細胞レベルでの基盤であることから様々な研究がなされてきた。ところが、LTP 成立後にシナプス強度を維持するメカニズムは不明のままである。本研究計画の問いは以下の二つ：

(1) どのように細胞骨格の制御分子群がシナプスへ集積し生化学活性を維持しシナプス構造を保つのか、

(2) どのように AMPAR のシナプス後膜でのナノドメインと引き続くシナプス前膜と連結しシナプス強度が維持されるのか。申請者は、CaMKII が活性化により LLPS を形成する性質を見出しているため、新しいコンセプトである LLPS と RAKEC を組み合わせることで上記の問いを説明できるか、検証していく。

上記の「問い」を解決すべく、以下の3点を具体的な仮説として設定する。

仮説1 CaMKII は相分離により一過性の Ca^{2+} 上昇を長期的な情報伝達の切り替えスイッチとして機能する

仮説2 CaMKII は相分離によりシナプス内部構造制御を介しシナプス伝達効率を向上させる

仮説3 CaMKII の相分離を光制御すると、シナプス可塑性が誘導あるいは解除される

これらの仮説に焦点を当て、本研究では、CaMKII の酵素活性と LLPS との関係、細胞骨格の制御とシナプス形態の拡大に至る経路、AMPAR のシナプス局在の制御機構など、CaMKII が引き起こすシナプス可塑性における LLPS の役割について検討していく。

3. 研究の方法

仮説1 CaMKII は相分離により一過性の Ca^{2+} 上昇を長期的な情報伝達の切り替えスイッチとして機能する

仮説1 では、RAKEC と LLPS を組み合わせることで、特定のシグナル経路全体に活性化状態を拡張できるかを試みる。まず Tiam1 下流のキナーゼカスケードである PAK ならびに LIMK1 が CaMKII とシナプス局所で LLPS を起こすことで、Tiam1-Rac-PAK-LIMK1 経路を長期に活性化させるかテストする。シナプスの PAK、LIMK1 が活性化された CaMKII と相互作用することはすでに蛍光寿命 FRET イメージングで確認している。並行して局所翻訳などのシグナル経路への拡張を図る。

方法 蛍光標識した精製 PAK、LIMK1、CaMKII、カルモデュリンを Ca^{2+} 非存在下で混合する。 Ca^{2+} を加え反応を開始し、EGTA や Rac、脱リン酸化酵素 SSH1L (Soosairajah *et al.* 2005) の添加による LLPS 形成への影響を確認する。LIMK1 活性は、コフィリンを基質としリン酸化抗体を用い検証する。さらに他のシグナル系にも拡張する。CaMKII と同様な安定した相互作用をするタンパク質として RNA 結合タンパク質やタンパク質翻訳経路分子などを同定している(未発表)。これらの情報を元に、CaMKII と LLPS を引き起こすタンパク質を検証していく。

仮説2 CaMKII LLPS はシナプス内部構造制御を介し伝達効率を向上させる

われわれは、CaMKII の LLPS が2種類のグルタミン酸受容体 (AMPAR と NMDAR) を分

離させるという結果を得ている。AMPAはグルタミン酸への親和性が低くシナプス顆粒から放出されるグルタミン酸では飽和しない。一方、シナプス顆粒から放出されたグルタミン酸は放出部位から100 nm程度の範囲しか届かない。そのため、AMPAとグルタミン酸放出部位との距離によりシナプス伝達効率が変化することが予想され、放出部位の直下にAMPAが濃縮すると伝達効率が最大化すると考えられる。すなわちこれまで考えられていたAMPAの単なるシナプスへの局在ではなく、LLPSによるシナプス前膜との協調作用がシナプス強度を制御するという全く新しいシナプス可塑性機構ではないかと考えた。本研究では、超高解像度顕微鏡を用いて、神経細胞のAMPA、NMDARならびにシナプス前部の活性帯を検出し、CaMKIIの活性化がAMPAを活性帯の下に濃縮するかを検討する。これには複数の技術開発が必要である。

方法 AMPAならびにNMDARナノドメインの検出にはintegrating exchangeable single-molecule localization (IRIS)(Kiuchi *et al.* 2015) (図5)とナノボディを組み合わせた超高解像度顕微鏡法を開発する。可視化したい分子に対するプローブは蛍光修飾した単鎖抗体、あるいはリガンドを用いる。活性帯の検出にはsynapto-pHluorinを用いる(Miesenböck *et al.* 1998)。さらにAMPAナノドメインでのグルタミン酸濃度を検出し、グルタミン酸を感知するAMPAの数をグルタミン酸センサータンパク質GluSnFRを用いて検出する(Helassa *et al.* 2018)。GluSnFRと内在性のAMPAとの共存が認められない場合、Mikuniらの方法を用いて内在性のAMPA遺伝子を改変し、GluSnFRを挿入する(Mikuni *et al.* 2016)。

仮説3. CaMKII相分離の光制御により、シナプス可塑性が誘導あるいは解除される

CaMKIIのLLPSによりシナプス微小構造がどのように変化するかを観察する。そのために、すでに開発を開始した光活性化CaMKII(PA-CaMKII)を用いる。Phototropinタンパク質由来LOV2ドメインをCaMKIIに融合するとキナーゼ活性を光で誘導できることは確認している。このPA-CaMKIIを精製し照射にてLLPSを起こすかを実証する。

一方、細胞内でLLPSを人為的に解除する方法を開発する。TEV protease認識配列(ENLYFQGS)をCaMKIIの会合ドメインとキナーゼドメインの間に挿入し、TEV酵素切断により基質に結合するキナーゼドメインから会合ドメイン切り離す。12量体を維持できなくなるためLLPSが解除されると期待される。光活性化型TEVの開発は、分割TEVとFKBP/FRBペアを用いたラパマイシン誘導ヘテロ二量体形成(Wehr *et al.* 2006)を応用し光誘導ヘテロ二量体形成モチーフであるCRY/CIB(Taslimi *et al.* 2016)と融合させ作成する。また、照射によりペプチド鎖が切断される蛍光タンパク質PhoCL(Zhang *et al.* 2017)も検討する。融合タンパク質の光制御の効果は精製タンパク質を用いて確認後、神経細胞に導入し、LLPSを操作した際のシナプス微小構造やシナプス伝達効率への影響を検討する。

4. 研究成果

4-1 シナプスでは液-液相分離によってシグナルタンパク質の分離がおこる

ポストシナプス構成要素であるCaMKIIの下流シグナル分子、Pak1およびLIMK1について精製タンパク質を用いた再構築実験を試みた。しかし、CaMKIIとPak1、LIMK1ともにカルシウムイオンの有無に関わらず液滴は形成しなかった。一方でグルタミン酸受容体GluN2Bサブユニットとはカルシウム依存的な液滴形成がみられた。さらに、この液滴にはLIMK1およびTIAM1も取り込まれることがわかった。シナプス可塑性時にみられたシナプスでのPak1とLIMK1もしくはは

CaMKII と Pak1 の相互作用から、Pak1 もこの液滴とりこまれると予想したが、GluN2B と CaMKII がつくる液滴から反対に排除された。Pak1 の液滴への取り込みに必要な因子を探索すると、Pak-interacting exchange factor (PIX) と GIT1、SHANK が必要であることがわかった。

CaMKII と GluN2B から構成される液滴には、CaMKII のアクチン細胞骨格制御での下流分子が取り込まれることがわかった。この経路は最終的にアクチン切断因子であるコフィリンをリン酸化してアクチン線維を安定化させるシグナルである。コフィリンのリン酸化酵素は LIMK1 で液滴に取り込まれる。リン酸基を外し、コフィリンのアクチン切断活性をあげる脱リン酸化酵素は slingshot (SSH1) である。これらの要素を精製して液滴から排除された。液滴形成はカルシウム依存的な過程であることから、シナプ스에 刺激が入ることで、コフィリンのリン酸化を最終目的としたシグナル分子が集合し、抑制要素である脱リン酸化酵素を排除するしくみが考えられた。これが神経細胞のスパインシナプスでも見られるか検討したところ、LIMK1 は常にスパイン先端に局在するのに対して、SSH1 は刺激に応じてスパイン先端から離れ、スパイン頭部下に集積することがわかった。これらの局在に対応して基質であるコフィリンのリン酸化も動いていた。これらの結果から、シナプス可塑性において、シナプス局所でのリン酸化シグナルを増強・維持するため液-液相分離による関連タンパク質の空間的分離が機能していることが考えられる (投稿準備中)。

4-2 CaMKII がつくる液-液相分離による液滴維持には多量体構造が必須である

シナプスでの液-液相分離がポストおよびプレシナプス構造を維持する原理であることは多くの研究成果によって支持されている。一方で、シナプス可塑性による神経活動依存的な液-液相分離誘導には CaMKII が関わっている。この CaMKII の液-液相分離に関しては、カルシウムとカルモデュリンによる CaMKII の構造変化、酵素活性化、そして自己リン酸化が必要である。これまで CaMKII が制御する現象が、その酵素活性によるものか、構造タンパク質としての機能によるものかを切り分けるのに使われていた酵素活性のない変異体 (K42R や D135N) は自己リン酸化できないため液-液相分離した液滴をカルシウム非存在下では維持できない。また、CaMKII の高親和性ペプチド阻害剤 CN21 は、低濃度で使用すると酵素活性のみを、高濃度の場合は構造タンパク質としての機能も阻害するが、いずれの濃度でも酵素活性を阻害する。そこで仮説 3 の CaMKII の液滴と特異的に消失させるツール開発を目的として、TEV protease 認識配列 (ENLYFQGS) を CaMKII の会合ドメインとキナーゼドメインの間に挿入した CaMKII を作製した (CaMKII_TEV)。CaMKII_TEV は通常はゲルろ過カラムで 1 2 量体を示し、TEV 酵素消化により単量体になる。また、GluN2B との液-液相分離による液滴形成は通常 CaMKII と違いがなかった。形成された液滴は TEV 酵素消化によって速やかに消失した。つまり CaMKII の液滴維持には CaMKII の多量体が必要条件である。このことを細胞内で検証するため、光活性化型 TEV の開発を、分割 TEV と FKBP/FRB ペアを用いたラパマイシン誘導ヘテロ二量体形成 (Wehr *et al.* 2006) を応用し光誘導ヘテロ二量体形成モチーフである CRY/CIB (Taslimi *et al.* 2016) と融合させた split-TEV を作製した。この分割 TEV、さらにこれとは別の原理のラパマイシン依存的改変型 TEV (Renna *et al.*, 2022) も使用して細胞内での TEV 酵素消化と CaMKII の単量体化を試みた。調べたいいくつかの条件では、細胞内部のベーサルな活性により CaMKII_TEV を消化してしまうことがわかった。発現時間を短くすれば、影響を小さくできるため、神経細胞で使用する諸条件を検討中である。また、タンパク質の発現誘導系と組み合わせたシステムも構築中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 實吉岳郎、林康紀	4. 巻 74 (1)
2. 論文標題 シナプスとアクチングナル	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 62-66
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 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 Can Ozden, Roman Sloutsky, Tomohiro Mitsugi, Nicholas Santos, Emily Agnello, Christl Gaubitz, Joshua Foster, Emily Lapinskas, Edward A. Esposito, Takeo Saneyoshi, Brian A. Kelch, Scott C. Garman, Yasunori Hayashi, and Margaret M. Stratton	4. 巻 40(2)
2. 論文標題 CaMKII binds both substrates and activators at the active site	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 111064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111064	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 Saneyoshi Takeo	4. 巻 12
2. 論文標題 Changing the size of dendritic spines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e91566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.91566	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 Ripoli Cristian, Dagliyan Onur, Renna Pietro, Pastore Francesco, Paciello Fabiola, Sollazzo Raimondo, Rinaudo Marco, Battistoni Martina, Martini Sara, Tramutola Antonella, Sattin Andrea, Barone Eugenio, Saneyoshi Takeo, Fellin Tommaso, Hayashi Yasunori, Grassi Claudio	4. 巻 9
2. 論文標題 Engineering memory with an extrinsically disordered kinase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadh1110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adh1110	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 Yasunori Hayashi, Miquel Bosch, Pin-Wu Liu, Tomohisa Hosokawa, and Takeo Saneyoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Underlying Synaptic Tagging and Consolidation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Synaptic Tagging and Capture	6. 最初と最後の頁 63-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-031-54864-2	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 Kaizuka Takeshi, Hirouchi Taisei, Saneyoshi Takeo, Shirafuji Toshihiko, Collins Mark O., Grant Seth G. N., Hayashi Yasunori, Takumi Toru	4. 巻 22
2. 論文標題 FAM81A is a postsynaptic protein that regulates the condensation of postsynaptic proteins via liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3002006	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 該当する

1. 著者名 細川智永, 實吉岳郎, 林 康紀	4. 巻 42
2. 論文標題 記憶, シナプス, 液 - 液相分離	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学 増刊 大規模データ・AIが切り拓く脳神経科学	6. 最初と最後の頁 1068-1073
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 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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 実吉岳郎
2. 発表標題 シナプスで液-液相分離したCaMKIIは、記憶の分子実体か
3. 学会等名 臨界期生物学オンライン研究交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 実吉 岳郎
2. 発表標題 シナプスタンパク質の生物学的相分離の操作による可塑性、臨界期誘導法の開発
3. 学会等名 臨界期生物学領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 実吉 岳郎
2. 発表標題 CaMKIIの液-液相分離した集合体は記憶の分子実体か
3. 学会等名 次世代脳シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 実吉 岳郎
2. 発表標題 CaMKIIの液-液相分離した集合体は記憶の分子実体か
3. 学会等名 2023年度神経病理・神経化学合同大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 実吉 岳郎
2. 発表標題 樹状突起スパイン内部のコフィリンは液-液相分離によって分子活性のグラディエントを形成する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 実吉岳郎
2. 発表標題 シナプス可塑性の相分離
3. 学会等名 第97回日本薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	細川 智永 (Hosokawa Tomohisa) (30602883)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

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			
米国	University of Massachusetts			
イタリア	University Cattolica del Sacro Cuore			
英国	University of Edinburgh			