

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700356

研究課題名（和文） CaMKIIのシナプス構造可塑性を制御する細胞骨格系のゲートとしての役割

研究課題名（英文） The role of phosphorylation in F-actin binding domain of CaMKII in structural and functional plasticity

研究代表者

KIM KARAM (KIM KARAM)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム研究チーム・研究員

研究者番号：60568856

研究成果の概要（和文）：

本プロジェクトでは、CaMKIIβのアクチン結合ドメインに於ける18の新しいリン酸化部位を同定した。それらはサブユニット間でリン酸化され、それらのリン酸化反応はスパインへの局在およびCaMKIIβのFアクチン結束において重要である。生化学的方法により、CaMKIIβを介したFアクチン結束がFアクチンを安定させ、アクチンとその制御タンパク質間の相互作用だけでなくアクチンに対するそれらの活動をも抑制することを示した。それは、CaMKIIβの非リン酸化型変異体がケージドグルタミン酸のケージ解除により引き起こされるスパインの拡大、およびラットの海馬スライスを用いた電気生理学的方法で測定されたLTPの両方を抑える *in vivo* との関連性がある。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we identified 18 new phosphorylation sites in actin-binding domain of CaMKIIβ. They are phosphorylated via inter-subunit manner and their phosphorylation is important in spine localization and F-actin bundling of CaMKIIβ. Using biochemical methods, we showed that CaMKIIβ-mediated F-actin bundling stabilizes F-actin and it inhibits the not only interactions between actin and its regulator proteins, but also their activities against actin. It has *in vivo* relevance so that phosphor-resistant mutant form of CaMKIIβ suppresses both enlargement of a spine induced by glutamate uncaging and LTP measured with electrophysiological method in rat hippocampal slices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：CaMKII, シナプス可塑性, アクチン, スパイン, 海馬

1. 研究開始当初の背景

樹状突起スパインは、興奮性シナプスの多くが存在する小さな構造物である。スパインは、神経活動に応じてそれらの接続と強さを変更する動的構造である。また、この特性は、脳回路構成と記憶学習の原理であると考えられる。我々は、スパイン中の構造変化がシナプス伝達の機能転換を伴うことを見出した。スパインは LTP 誘導に応じて新たに形成または拡大する一方、LTD 誘導が消失もしくは収縮をもたらすと。

スパインの構造を規制するシグナル経路はまだ解明されるべき点が多くある。NMDA 受容体および CaMKII の抑制は LTP 自体と同様に構造的可塑性をも阻害する。一方、スパインの主な細胞骨格成分であるアクチンは、単量体 (G アクチン) と線状体 (F アクチン) の間の動的均衡に存在する。F アクチンは次々と多くのアクチン結合タンパク質による架橋結合で束あるいは網状組織のような複雑な構造を組織する。興味深いことに、LTP は F アクチン/G アクチンの均衡を F アクチンに変え、LTD は G アクチンへ変える。また、このプロセスは NMDA 受容体活性化をも要求する。したがって、NMDA 受容体、CaMKII 活性化、アクチンの規則の間の関連性は、非常に興味深いものがある。

LTP 中の CaMKII 活動の重要性は一般的に受け入れられているが、CaMKII は長い間解明されない謎の存在であった;それは脳タンパク質全体の 1 ~ 2%、および後シナプス肥厚 (PSD) の 10 ~ 30% を構成する。他の情報伝達分子よりはるかに多く、アクチンのような構造タンパク質に匹敵する。このことが、スパイン中の CaMKII の構造的役割を果たしていると考えられる。実際、我々は CaMKII が F アクチンの束化タンパク質であることを発見した。それだけでなく、一旦 CaMKII が活性化されれば、それは F アクチン束化キャパシティーを解き放つ。これらの観察から、CaMKII がカルシウムによってネガティブに規制されるユニークな F アクチン束化タンパク質であるとわかった。

2. 研究の目的

このプロジェクトで、我々は次の観点から樹状スパインの構造および機能的可塑性における CaMKII の役割を調査した。

1) F アクチン束化制御における CaMKII 自己リン酸化の役割の探索。

CaMKII のアクチン束化ドメイン上の多数のリン酸化部位を同定する。これらのリン酸化が F アクチンから CaMKII を分離し、そのために F アクチンを切り離すと想定する。

2) CaMKII に引き起こされた F アクチン束化とアクチン制御タンパク質とのタンパク質間相互作用へ与える影響の検証。

CaMKII による F アクチンの束化が構造的硬直性を強化するだけでなく、cofilin や profilin、および modification を防ぐような他のアクチン制御タンパク質のアクセシビリティを制限することを仮定した。

3) CaMKII によるアクチン分離の抑制がシナプス可塑性とアクチン制御タンパク質のシナプス転位を防ぐかどうかの試み。

我々は、刺激を引き起こす LTP による F アクチン分離が、LTP に関連したタンパク質組成の改造同様にシナプス可塑性にとって重要かどうかを検討した。

3. 研究の方法

1) リン酸化の特性の検証

私たちは、CaMKII β のアクチン結合ドメインの新しいリン酸化特異抗体を作成した。それらの抗体で、CaMKII におけるリン酸化の基礎特性を調べた。

2) アクチン束化と synaptic targeting に対するリン酸化の影響

アクチン束化に与えるリン酸化の役割を検討するために、昆虫細胞を用いて野生体および変異型 (All A: phosphor-resistant, All D: phosphor-mimic) CaMKII β を発現、精製し、それらを精製アクチン標本を用いてアクチン束化を分析した。さらに、野生体および変異型 CaMKII β のスパイン局在を培養ラット海馬スライスを用いて検討した。

3) アクチン束化に与えるアクチン制御タンパク質の影響

CaMKII β の存在および非存在下において、cofilin, gelsolin あるいは Arp2/3 複合体のような多くのアクチン制御タンパク質によるアクチン束化を検討した。アクチンとそれ

らの制御タンパク質間の相互作用は、生化学的に調査された。さらに、アクチン重合および脱重合は pyrene-actin からの蛍光を使用した分光蛍光光度計で 365nm の excitation と 407nm での emission によって観察した。

4) スパイン中の CaMKIIβ のターンオーバーに対するリン酸化の影響
 ラットの海馬スライスに、光活性化 (PA)GFP-fused CaMKIIβ を発現させた。GFP は 720nm のレーザー光線を備えたスパインの照明によって活性化され、蛍光をモニターした。

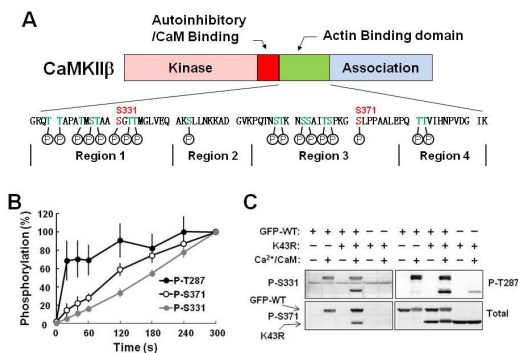
5) 構造可塑性に対するリン酸化の影響
 培養された海馬スライス中の野生体および突然変異体 CaMKIIβ を発現した後に、スパイン拡大は 720nm のレーザーで uncaging of glutamate によって誘発される。スパインはアンケイジング後 30 分間モニターした。

6) 機能的可塑性に対するリン酸化の影響
 CaMKIIβ の shRNA および shRNA 非感受性 CaMKIIβ を発現するレンチウイルスを新生児ネズミの海馬に注入した。2 週間後に、海馬スライスを作り、感染した海馬の CA1 領域での LTP を測定した。

4. 研究成果

1) リン酸化の特性化

CaMKIIβ のアクチン結合ドメインのリン酸化は、T287 リン酸化より比較的ゆっくり生じる。また、これは近隣のサブユニットによってリン酸化される。

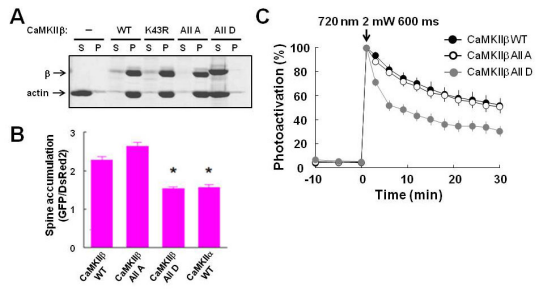


CaMKIIβ のアクチン結合ドメインのリン酸化の確認および特性化

- (A) CaMKIIβ のドメイン構造。リン酸化部位は色をつけた。
- (B) リン酸化の時間的経過。
- (C) サブユニット間リン酸化

2) アクチン結合ドメインがリン酸化される

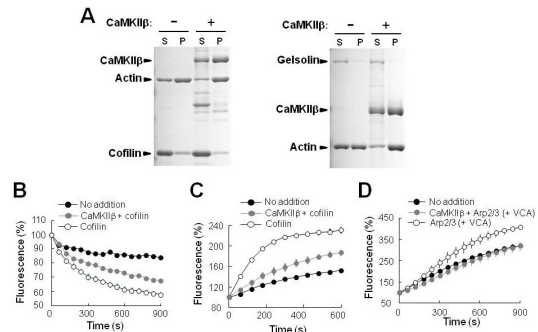
場合、CaMKIIβ は アクチン束化活動を失い、スパイン localization が縮小される。



アクチン束化と synaptic targeting に対するリン酸化の影響

- (A) アクチン束化解析。K43R、キナーゼ-deficient 変異体; All A、リン酸化部位のアラニン変異株; All D、リン酸化部位のアスパラギン酸変異体。
- (B) 様々な CaMKII タンパク質のスパイン蓄積。
- (C) スパイン中の PAGFP-CaMKII の蛍光減衰曲線。

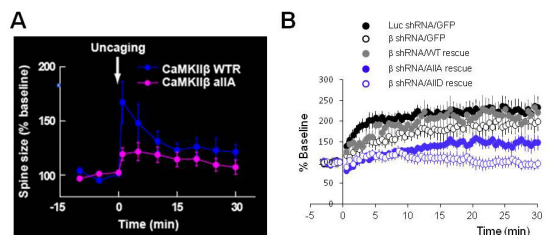
3) CaMKIIβ を媒介とした F アクチンは、アクチン制御タンパク質、アクチン、それらの活動の間の相互作用を抑制する。



アクチン制御タンパク質とアクチンとの相互作用は、CaMKIIβ によって抑制される。

- (A) cofilin と gelsolin でのアクチン結合分析。
- (B-D) cofilin および Arp2/3 複合体の CaMKIIβ による抑制。

4) アラニン変異株は構造および機能的可塑性を阻害する。



アクチン結合ドメインのリン酸化はシナプス可塑性において重要である。

(A) アラニン変異株はスパイン拡大を阻害する。

(B) アラニン変異体・アスパラギン酸変異体は機能的 LTP を阻害する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① Karam Kim, CaMKII gates rapid structural plasticity in hippocampal dendritic spines, Neuroscience 2011 (Annual meeting of Society for Neuroscience), 2011 November 16th, Washington DC

② Karam Kim, CaMKII gates rapid structural plasticity in hippocampal dendritic spines, Neuroscience 2010 (Annual meeting of Society for Neuroscience), 2010 November 17th, San Diego

③ Karam Kim, Structural plasticity mediated by CaMKII, the 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuro2010), 2010 September 3rd, Kobe

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

K I M K A R A M (KIM KARAM)

独立行政法人理化学研究所・記憶メカニズム
研究チーム・研究員

研究者番号：60568856