

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19361

研究課題名（和文）マイクロ流体デバイス内でのシナプス記憶の再構成

研究課題名（英文）Reconstruction of synaptic memory within microfluidic devices.

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）：緑色、あるいは赤色蛍光ラベルしたCaMKIIを精製した。まず、赤色ラベルしたCaMKIIとGluN2B細胞内C末端をCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン存在下で混合し、LLPSが起こさせた。そこにEGTAを加え、CaMKIIをこれ以上活性化しないようにしたところに緑色ラベルしたCaMKIIを加えたところ、緑色のCaMKII分子が濃縮相に取り込まれることが観察された。これは、CaMKIIは活性化されないと濃縮相に取り込まれないので、新たな分子が既存の濃縮相に取り込まれるときに、活性化されるものと考えられる。そこで次に野生型CaMKIIに対してT287A変異体が入り込まれるかを確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究成果は、神経科学と細胞生物学の基礎理解を深めると同時に、神経細胞内の情報処理や学習・記憶形成におけるカルシウムシグナル伝達経路の重要性を明らかにした。さらに、液-液相分離（LLPS）という現象が細胞内シグナル伝達に与える影響を明らかにすることで、将来的には神経変性疾患や精神疾患の理解や治療法の開発につながる可能性がある。この研究は、社会的には健康と福祉に大きな影響を与え、科学の発展に貢献するものと期待される。これによって、人々の生活の質が向上し、医学の進歩に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Green or red fluorescent labeled CaMKII was purified. First, red-labeled CaMKII was mixed with the C-terminus of GluN2B cells in the presence of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin to induce LLPS. EGTA was added to prevent further activation of CaMKII, and green-labeled CaMKII was added. We found the green CaMKII is taken up by the condensate. Because CaMKII needs to be in an active conformation to be incorporated into the condensed phase, the green-labeled CaMKII must be activated when it is incorporated into the existing condensates. We are currently testing if T287A mutant can be taken up.

研究分野：神経科学

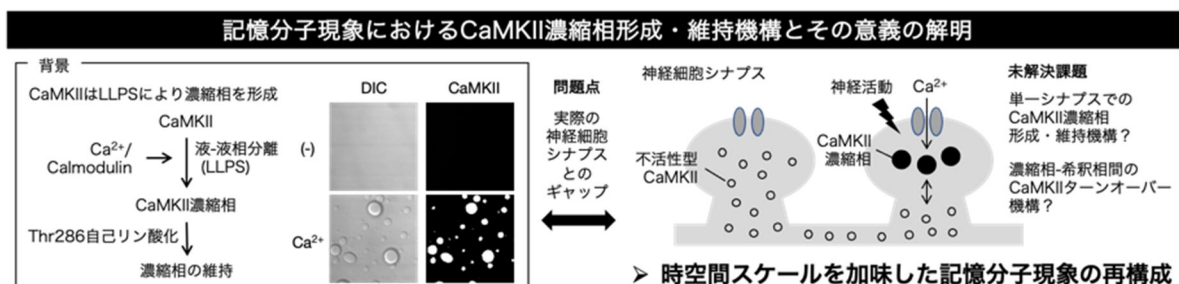
キーワード：CaMKII 液-液相分離 シナプス可塑性

## 1. 研究開始当初の背景

1つの神経細胞では1万個以上のシナプスそれぞれが、茸状のスパイン上に存在する(図右)。スパイン頸部は拡散障壁として機能し、秒単位ではスパイン毎にシナプス情報伝達は独立して調節されると考えてよいが、数分から数時間単位ではスパイン内外との分子の拡散を考える必要がある。シナプス記憶の持続機構の研究ではこの分子の時空間ダイナミクスを考慮に入れるべきであるが、これまでは殆ど重視されてこなかった。ところが最近液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS)による、細胞内の膜を持たないオルガネラの試験管内での再構成が試みられ、特にシナプスにおける記憶機能を再構築するにあたり、時空間要素は無視できない。そこで本研究ではマイクロ流体デバイスを用いて、シナプスにおける分子の時空間ダイナミクスを加味した実験系を作成し、シナプス記憶をデバイス内で再構成することで、記憶の謎に迫る。

シナプス伝達の長期増強現象(LTP)の鍵となる分子の一つに  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ II (CaMKII)がある。CaMKIIは活性化されると基質だけではなく、Thr286を自己リン酸化し、常時活性型となることから、記憶分子としての機能が考えられてきた。ところが、多量に存在すること、12量体構造を持つこと、一部の基質と安定した複合体を作ることなど、キナーゼとしては説明し難い点があった。我々はこれらの特徴がLLPSをおこす条件と合致することに気づいた。そこで精製蛋白質を用いた実験を行い、CaMKII分子が  $\text{Ca}^{2+}$ /CaMにより刺激されると、基質の一つであるNMDA型受容体サブユニットGluN2BとLLPSをおこすことを明らかにした(図左)。しかも一度刺激すると、自己リン酸化により活性化型となることで、 $\text{Ca}^{2+}$ が除去されても濃縮相を維持した(Hosokawa, Nat. Neurosci. 2021)。これらは、LLPSによるCaMKIIの濃縮相形成が、LTPにおけるシナプス微小構造調節・維持機構の基盤であり、記憶の形成・維持を担う新たな分子機構であることを示唆している。

シナプスの活性化によりCaMKIIはシナプ스에濃縮するが、その際LLPSを起こしていると考えられる(図右)。活性化された一つのシナプスで形成したCaMKIIの濃縮相は、他の大多数の活性化されていないシナプス由来の不活性型CaMKIIに囲まれつつ、そのスパインの  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が下がっても濃縮状態を保っている。しかしLLPSの濃縮相と希釈相の間では常に分子が平衡状態にあり、濃縮相に取り込まれたCaMKIIは時間経過と共に希釈相のCaMKIIと置換されている。そのため、CaMKIIが濃縮状態を保つためには、活性化型CaMKIIが不活性型CaMKIIを取り込んで、濃縮相に留める機構が必要である。実際シナプスにてGFP-CaMKIIを観察すると、濃縮したCaMKIIは全体の量は維持しつつも、常にターンオーバーしている。これは既知のCaMKII活性制御機構では説明できず、未知のオリゴマー間の調節機構によると考えられる。この分子機構を明らかにすることが、記憶の維持の分子機構を解く鍵となると思われる。



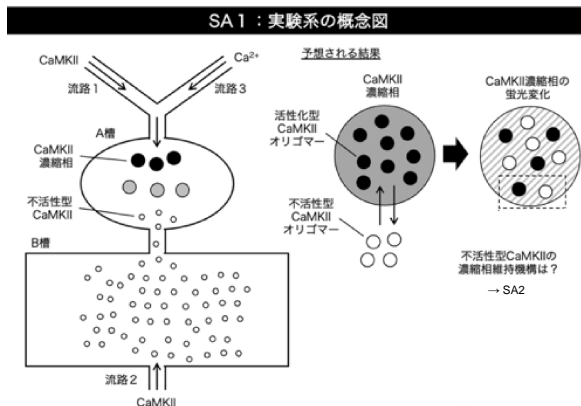
## 2. 研究の目的

これらを鑑み、本研究ではマイクロ流体デバイスを用いて、時空間ダイナミクスを加味し

た記憶の分子機構の再構成により、記憶分子現象におけるCaMKII濃縮相形成・維持機構とその意義を解明することを目的とする。以下の3つのspecific aimを設定した。

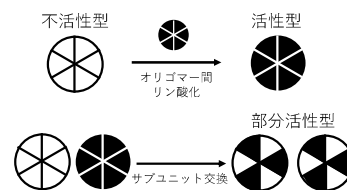
SA1. マイクロ流体デバイスを用いて分子の時空間ダイナミクスを加味した CaMKII の LLPS 維持機構の解明

シナプス局所における、一過性の  $Ca^{2+}$  濃度の上昇と、それによる CaMKII の活性化を模倣するため、スパイン形態を模倣したマイクロ流体デバイスを作成し、精製 CaMKII 溶液に一過性かつ限局領域での LLPS 誘導を実現する。その上で、周囲の不活性化型 CaMKII が濃縮相に取り込まれるか、濃縮相が持続されるかを検討する。



SA2. オリゴマー間相互作用機構の解明

もし不活性化型 CaMKII が活性化型 CaMKII の LLPS に取り込まれ、維持されることが観察されれば、活性化型 CaMKII が何らかの形で不活性化型 CaMKII を活性化していると考えられる。それはこれまで知られる CaMKII の活性化メカニズムからは説明できない。これまでの CaMKII の研究は 12 量体内での調節に限られ、LLPS のように密集した状態での挙動を研究した例はない。我々は 2 つの可能性を考えた。一つは、濃縮相内でのオリゴマー間のリン酸化、もう一つはサブユニット交換の可能性である(図)。いずれのメカニズムでも LLPS に取り込まれた CaMKII の活性化が起こり、濃縮相が維持される。



SA3. サブユニット交換の阻害による濃縮相と LTP の維持の阻害

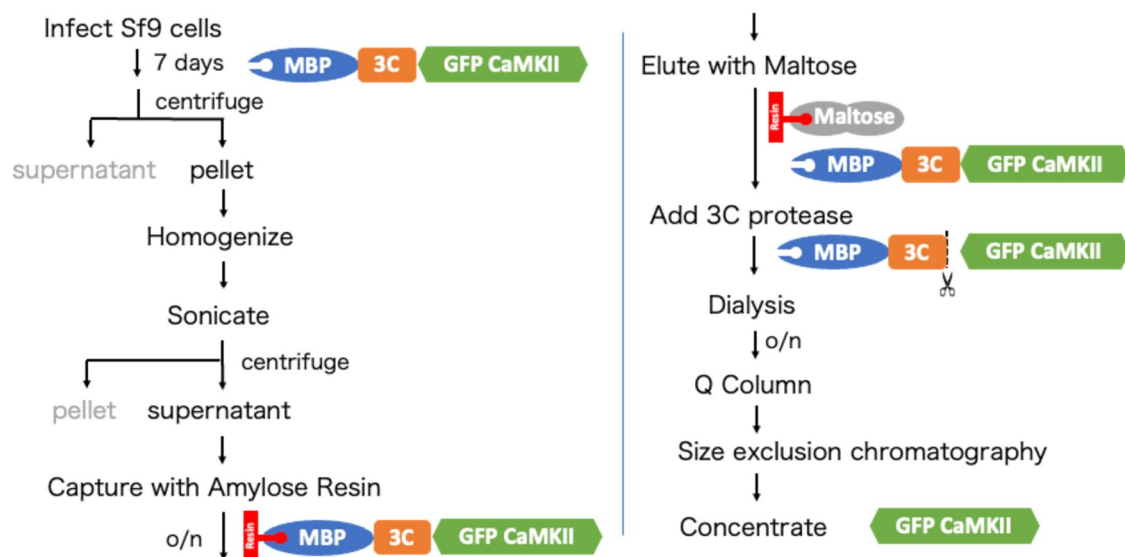
SA2.にてサブユニット交換が重要であることが示されれば次にそれを阻害し、濃縮相と LTP の維持が阻害されるかを検討する。このためには、CaMKII の 12 量体形成を担う会合ドメインにさらに二量体の蛍光蛋白質を結合させる。これにより会合を安定化すると期待される。これを海馬神経細胞に発現させ、LTP を測定する。

3. 研究の方法

コンピューター制御が可能なカッティングマシンを導入し(写真左) プラスチック薄片に細かい (<200  $\mu m$ ) 切れ込みを作成し、ピラニア酸で洗浄したスライドガラスに添付することで、それを用いたマイクロ流体経路を作成している(写真右)。この方法が、よく使われる PDMS 樹脂よりも優れているのは、ガラスの表面にさまざまな化学修飾を加えることができる点にある。現状ではまだ行えていないが、例えば抗体やその他のタンパク質、 $Ni^{2+}$ などをガラス表面につけ、LLPS を固定することも可能である。この点は今後詳細に検討を進めていく。



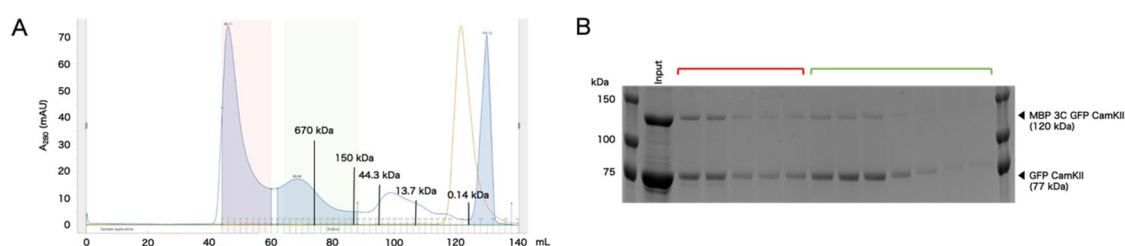
マイクロ流体経路を作成する試みと並行して、それを使わない形での予備実験を行った。ラベルなし、また GFP あるいは RFP でラベルした野生型の CaMKII を Sf9 細胞あるいは大腸菌で発現し、精製した。下図に精製プロトコルの詳細を示す。



また基質である GluN2B の細胞内 C 末端を二量体の近赤外蛍光タンパク質との融合タンパク質として大腸菌で発現、精製した。GluN2B は intrinsically disordered region がほとんどを占め、不安定で全長を精製することが不可能であったため、蛍光蛋白質と GluN2B 細胞内末端とを別々に精製し、SpyCatcher システムにより protein ligation を行なった。ラベルしていない CaMKII は Alex-488 (緑色) または 568 (赤色) で化学修飾した。

#### 4. 研究成果

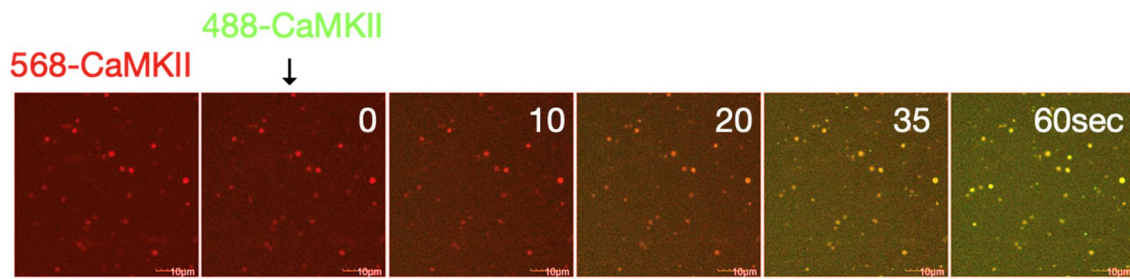
GFP-CaMKII を生成した時の、精製の最後の段階のサイズ排除クロマトグラフィーの例を下に示す。緑で囲った部分が、通常のオリゴマーを形成している、GFP-CaMKII と考えられる。MBP の切れ残りはあるが、80%以上は GFP-CaMKII の大きさに回収されている。



赤色ラベルした CaMKII と GluN2B 細胞内 C 末端を Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン存在下で混合し(プロトコルを右に示す) 蛍光顕微鏡下観察したところ、既報通り LLPS を起こした。これは EGTA で Ca<sup>2+</sup>をキレートしても残存した。そこに、緑色ラベルした CaMKII を加えたところ、取り込まれることが観察された。これは、濃縮相と稀釈相で分子のやり取りがあり、活性されていない新たな分子が濃縮相に取り込まれると解釈される。可能性が高いのは、自己阻害ドメインにある、T286 が自己リン酸化されることで、CaMKII が開いた構造となり、その結果濃縮相に取り込まれるのではないかと考えられた。そこで次に野生型 CaMKII に対して T286A 変異体を取り込まれるかを確認している。さらにキナーゼ活性がない、D135N 変異体についても試していく。

CaMKII (no label)	9μM
CaMKII (568)	0.5μM
Calmodulin	20μM
GluN2B	10μM
ATP	2.5mM
CaCl <sub>2</sub>	2mM
EGTA	4mM
↓	
CaMKII (488)	0.5μM

さらに T286 が実際にリン酸化されているかは、濃縮相に取り込まれた CaMKII を低速遠心で沈殿させることで回収し、抗 pT286 抗体にて western blot を行うことによって、確認する。



今後は、マイクロ流体経路を完成させ、濃縮相を固定化した上で、同様な実験を行うことで、より時空間分解能が高い実験ができると期待される。さらにこれがサブユニット交換によっているかは SA3 にあるとおり、2 量体蛍光タンパク質との融合蛋白質とすることによって調べる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazutoshi IKEDA, Taisei HIROUCHI, Takeo SANEYOSHI, Yasunori HAYASHI
2. 発表標題 in vitro reconstitution of persistent molecular memory in microfluidic device
3. 学会等名 Kyoto University Neuroscience Retreat, Miyazu Jan 2024
4. 発表年 2024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
---------	---------