

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700371

研究課題名(和文) シナプス可塑性をみちびく CaMKII リン酸化の再構成系実験とモデルによる理解

研究課題名(英文) Understanding CaMKII phosphorylation by in vitro reconstitution experiments and model simulation

研究代表者

浦久保 秀俊 (Urakubo, Hidetoshi)

京都大学・情報学研究科・特任助教

研究者番号：40512140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：脳のシナプスにおいて、リン酸化酵素CaMKIIは記憶の確立のために非常に重要な役割を担う。我々は試験管中(in vitro)において脱リン酸化酵素PP1と共にCaMKII自己リン酸化反応を行った。その結果、CaMKII自己リン酸化はスイッチ的応答を示し、さらにNMDA受容体ペプチドが存在する場合にはヒステリシス(履歴依存性)を示して分子メモリとして機能することを発見した。CaMKII分子メモリの機能はシナプスにおけるシナプス長期可塑性の入力と維持、すなわち記憶の確立に決定的な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) has been shown to play a major role in establishing memories through complex molecular interactions including phosphorylation of multiple synaptic targets. Here we reconstituted Ca²⁺/Calmodulin-dependent CaMKII autophosphorylation in the presence of protein phosphatase 1 in vitro, and found that CaMKII phosphorylation shows a switch-like response with history dependence (hysteresis) only in the presence of an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-derived peptide. This hysteresis may be crucial for induction and maintenance of long-term synaptic plasticity at synapses.

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 再構成実験 NMDA受容体 シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

生物の脳における発達や学習には、シナプス可塑性が深く関わっている。申請者は、シナプス可塑性を導くシグナル伝達メカニズムを明らかにするために、詳細なコンピュータシミュレーションを行ってきた。その成果として、ニューロン発火のタイミングに依存して入力されるスパイクタイミング依存シナプス可塑性 (STDP) のモデル化に成功した (図1左、Urakubo et al. 2008, *J Neurosci*, 28(13) pp. 3310-3323; Urakubo et al. 2009, *HFSP J* 3(4) pp. 240-254)。モデルは、実験の STDP を再現するためには NMDA 受容体に未知のメカニズムが必要であることを予言する。このように、モデルは実験と詳細に比較することで強力な予言を行い、現象の体系的理解を導く能力がある。ところが、シナプスは体積 1fl の極小部位であるため観測が難しく、シナプス実験とモデルを直接比較することは難しい。

2. 研究の目的

申請者は、発達や学習に重要なシナプス可塑性に重要な分子 CaMKII に着目し、試験管内での再構成系における実験と数理モデルとの比較を通して CaMKII リン酸化ダイナミクスの体系的な理解を導く (図1右)。特に、リン酸化の Ca²⁺/PP1 依存性に注目し、CaMKII リン酸化の定量的観測を行い、得られたデータを元に詳細な数理モデルを構築する。観測の難しい現実のシナプスから離れた再構成系の利点を最大限に生かし、CaMKII リン酸化によるシナプス可塑性の入力・維持のメカニズムについて知見を与える。

さらに、Phos-tag を用いた CaMKII リン酸化の網羅的観測法の開発を行う。

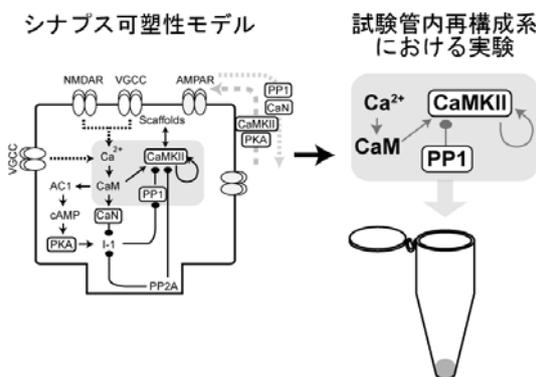


図1: シナプス可塑性モデルから再構成実験への展開。(左) シナプス可塑性モデルによるスパイクタイミング依存シナプス可塑性の再現 (Urakubo et al. 2008, *JNS*28, p. 3310)。(右) 試験管内再構成系におけるシナプス分子反応実験。シグナル伝達分子 Ca²⁺/Calmodulin(CaM)/CaMKII/PP1 を精製して試験管中で反応させる再構成系を構築し、管理された環境で CaMKII リン酸化を網羅的・定量的に観測する。

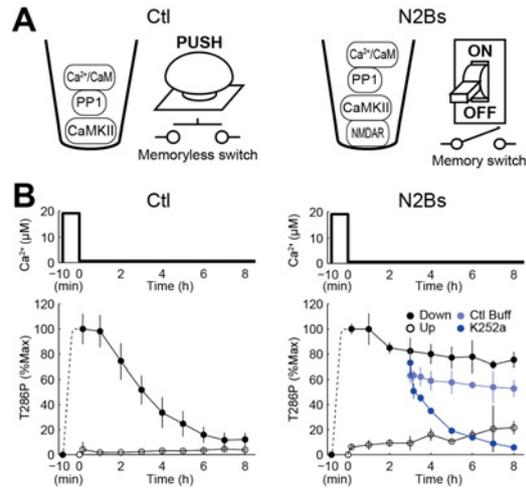


図2: (左) NMDA 受容体ペプチドを加えない場合、CaMKII はメモリ無しスイッチとして作用し (A)、Ca²⁺刺激 (上段) により上昇した T286 リン酸化レベル (下段) は時間の減衰と共に元に戻る (B)。(右) NMDA 受容体ペプチドを加えた場合、CaMKII は分子メモリスイッチとして作用し (A)、Ca²⁺刺激 (上段) により上昇した T286 リン酸化レベル (下段) は長期的にわたって維持される (B) (Urakubo et al. 2014, *Biophys J* 106, p. 1414)。

3. 研究の方法

(1) CaMKII 分子メモリ

申請者は CaMKII リン酸化に注目し、試験管内再構成系において定量的な実験を行った。まず、ターゲットとなる Ca²⁺, Calmodulin (CaM), CaMKII, PP1 の4分子のみが反応する再構成実験系を構築した (図1右)。必要分子のうち Ca²⁺および CaM は精製品を購入した。CaMKII は Sf21 細胞において遺伝子改変型タンパク質として強制発現させた上で回収して精製し、PP1 は E-Coli において強制発現させた上で回収して精製した。また、Ca²⁺-EGTA システムを用いることにより、CaMKII 溶液の Ca²⁺濃度の上昇・下降を正確にコントロールした。

(2) CaMKII 数理モデル化

さらに、観測された実験データを元に CaMKII リン酸化ダイナミクスの数理モデル化を試みた。

(3) CaMKII リン酸化の網羅的観測

また、近年開発された Phos-tag と呼ばれるリン酸化検出技術を最大限活用し、リン酸化を可能な限り網羅的に、かつ協調性や排他性といった情報を含んだ形で観測する手法の開発を試みた。

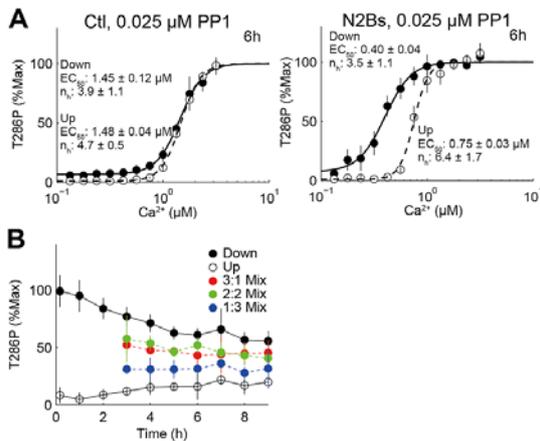


図 3: (A) NMDA 受容体ペプチドを加えない場合は、CaMKII リン酸化にヒステリシスは生じないが (左)、NMDA 受容体ペプチドを加えるとヒステリシスが生じる (右)。(B) NMDA 受容体ペプチドを加えた状態において、リン酸化 ON 状態と OFF 状態の CaMKII を混ぜると、混合比に応じて独自のリン酸化状態を取る(Urakubo et al. 2014, *Biophys J* 106, p. 1414)。

4. 研究成果

(1) CaMKII 分子メモリの発見

平成 23 年度、CaMKII リン酸化の定量的な観測を行っていたところ、当初の研究の目的には無かった予想外の発見がもたらされた。Ca²⁺、Calmodulin (CaM)、CaMKII、PP1 の 4 分子に加えて NMDA 受容体の CaMKII 相互作用部位のペプチドを適用すると、CaMKII の T286 サイトのリン酸化がヒステリシスを示し、分子メモリとして機能することが発見された。この発見は人間をはじめとする哺乳動物の記憶素子を試験管中に再現することに成功したことを示しており、非常に大きなインパクトを持つ。そこで、当初の予定 (Phos-tag による CaMKII リン酸化の網羅的観測法の開発) を変更して、発見した CaMKII 分子メモリの特性を調べた。その結果、次の 5 つの特性を持つことが明らかとなった。

(a) CaMKII 分子メモリのために必ず NMDA 受容体ペプチドが必要であった (図 2)。

(b) CaMKII 分子メモリのために CaMKII-T286P リン酸化について EC50 を与える Ca²⁺濃度が必要であった (図 3A)。

(c) CaMKII 分子メモリのために低い PP1 濃度が必要であった。Ca²⁺濃度が CaMKII-T286P リン酸化の EC50 を与える濃度で合っても、PP1 濃度が 0.5 μM 以上の場合は分子メモリは生じなかった。

(d) CaMKII 分子メモリは多値性を持った。

リン酸化 ON 状態と OFF 状態の CaMKII を各比率で混合すると、混合比に応じて独自のリン酸化状態を取った。すなわち CaMKII 溶液は多数の値を保存することができ、CaMKII は各分子が独立に分子メモリとして機能する可能性が示された (図 3B)。

(e) NMDA 受容体ペプチドのリン酸化サイト S1303 について、脱リン酸化を mimic した場合には (S1303A)、分子メモリが生じる Ca²⁺濃度の範囲が狭くなる一方 (図 4A)、リン酸化状態を mimic した場合には (S1303D) Ca²⁺濃度の範囲が広がった (図 4C)。

これら CaMKII 分子メモリの機能は海馬などのシナプスにおけるシナプス長期可塑性の入力と維持、すなわち記憶の確立に決定的な役割を果たしている可能性がある。CaMKII 分子メモリはシナプス長期可塑性の維持のメカニズムとして 2000 年に Zhabotinsky により提唱されて以来 (*Biophys J* 79, pp. 2211–2221)、多数の実験により実証が試みられてきたが、いずれも失敗に終わってきた。今回初めて試験管中における分子メモリの再構成に成功したことにより、シナプス可塑性のシグナル伝達研究が新たな展開を見せることが期待される。

投稿原稿は *Biophysical journal* に受理され、平成 25 年度中に発表された (雑誌論文 ①)。掲載誌の News and Notable にて”First Demonstration of Bistability in CaMKII, a Memory-Related Kinase” という見出しで紹介されると共に、Faculty of 1000 に推薦されるなど、各所で高い評価を頂いている。

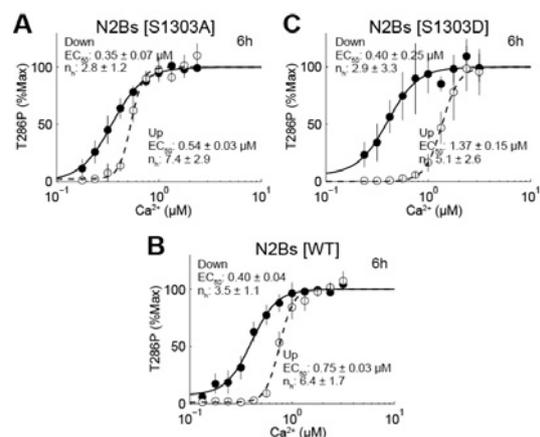


図 4: NMDA 受容体ペプチドについて、S1303 脱リン酸化型 (A) を加えた場合は、CaMKII リン酸化においてヒステリシスが生じる Ca²⁺濃度範囲が WT 型 (B) に比べて狭くなり、S1303 リン酸化型 (C) を加えた場合は WT タイプに比べて広がる。S1303 のリン酸化の有無に関わらず、ヒステリシスは生じた (Urakubo et al. 2014, *Biophys J* 106, p. 1414)。

(2) CaMKII リン酸化ダイナミクスを説明する数理モデルの開発

発見した CaMKII 分子メモリのダイナミクスを記述するために Bistability の観点に基づいた数理モデル化を行い、メモリ特性の再現に成功した。ただし、CaMKII 分子メモリのメカニズムは力学的な意味における Bistability に基づいていない可能性もあり、今後もより正確なモデル化を目指して追実験と再モデル化を試みる予定である。

また、応用の一環として、第一に開発した CaMKII モデルに基づいて側坐核有刺細胞におけるシナプス可塑性のシグナル伝達モデルを開発した。第二に、分子少数しか存在しない極小シナプスにおいて Bistability システムが示す振る舞いを明らかにするために、小脳プルキンエシナプスの Ca^{2+} スパイク現象を対象に少数分子の Stochastic モデルシミュレーションを行った。第三に、シグナル伝達モデルの制御モデルに基づく単純化の手法を提案した(雑誌論文②)。第四に、ニューロングリア回路の統計的回路推定を行う理論的研究に対して、生物学的側面からの支援を行った。いずれの応用についても雑誌論文の公表に結びつく成果が挙げられている。

(3) Phos-tag による CaMKII リン酸化の網羅的観測法の開発

一方、研究開始当初の目的の通り、CaMKII リン酸化をできる限り網羅的に、またリン酸化サイト間の協調性や排他性を観測することを目指して Phos-tag western blot 法のチューニングを行い、ある程度の成功を収めた。ただし、開発手法を用いて科学的成果を達成するためには、さらなる手法の改良が必要であり、研究助成終了時点での論文投稿は行っていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① Hidetoshi Urakubo, Miharuru Sato, Shin Ishii, Shinya Kuroda, "In Vitro Reconstitution of a CaMKII Memory Switch by an NMDA Receptor-Derived Peptide," Biophys. J., Vol. 106, 2014, pp. 1414-1420

② Minoru Honda*, Hidetoshi Urakubo*, Takuya Koumura, Shinya Kuroda, "A Common Framework of Signal Processing in the Induction of Cerebellar LTD and Cortical STDP," Neural. Netw., Vol. 43, 2013, pp. 114-124

*These authors contributed equally to this work."

[学会発表] (計5件)

- ① 浦久保秀俊, 「シナプス分子 CaMKII は分子メモリとして機能する -In vitro 実験系による実証-」 定量生物学の会, 吹田 (大阪), 2013年11月23-24日
- ② 浦久保秀俊, 石井信, 黒田真也, "In vitro Reconstitution of an Erasable Memory Switch of CaMKII," Society for neuroscience annual meeting, 2013, Sfn annual meeting abstract, No 233.17, アメリカ合衆国・サンディエゴ 2013年11月9-13日
- ③ 浦久保秀俊 (依頼), 「シナプス可塑性メカニズムの理論的基盤の構築に向けて」, 玉川大学研究所若手の会 12月談話会 (若手の会談話会第87回), 町田 (東京), 2012年12月10日
- ④ 浦久保秀俊, 石井信, 黒田真也, 「NMDA 受容体と相互作用することにより CaMKII は分子メモリとして機能する -In vitro 実験系による実証-」, 第50回日本生物物理学会年会, 名古屋 (愛知), 2012年9月22-24日, 3PT212
- ⑤ 浦久保秀俊, 黒田真也, 「再構成系における NMDA 受容体を加えることで生じた CaMKII 自己リン酸化の双安定性」, 第35回日本神経科学大会, 名古屋 (愛知), 2012年9月18-21日, P3-f03

[図書] (計1件)

- ① 浦久保秀俊 他, コロナ社, 「シグナル伝達のシミュレーション」シミュレーション辞典, 2012

[その他]

System models of cerebellar LTD and cortical STDP
<http://www.kurodalab.org/info/SystemModel/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦久保 秀俊 (URAKUBO, Hidetoshi)
京都大学・大学院情報学研究科・特任助教
研究者番号: 40512140

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし