

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650204

研究課題名(和文)非天然アミノ酸を利用したカルモデュリンキナーゼ2基質同定法の開発

研究課題名(英文) Identification of cellular substrate for CaMKII using unnatural amino acid incorporation

研究代表者

実吉 岳郎 (Saneyoshi, Takeo)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00556201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：カルモデュリンキナーゼ2(CaMKII)は多機能タンパク質リン酸化酵素で、記憶を司るシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。ところがCaMKIIによって制御される多くの現象は、標的分子が同定されていないため、分子レベルで理解しているとは言い難い。酵素-基質相互作用が一過的であるため、従来の生化学的、プロテオミクス的手法では基質の同定は技術的に難しい為である。CaMKIIをモデルとして非天然アミノ酸の部位特異的導入、光刺激による分子間架橋の形成を成功させた。

研究成果の概要(英文)：It is widely accepted that Calmodulin-kinase II (CaMKII) plays important roles in learning and memory. Although plasticity of synapse regulated by CaMKII, direct targets of CaMKII has poorly identified. To obtain cellular CaMKII substrates, we tried to apply unnatural amino acid incorporation method. Several phenylalanine residues in catalytic domain of CaMKII were made for subsequent incorporation of an unnatural amino acid pBpa. The pBpa were successfully incorporated on CaMKII in HEK293 cells. The covalent bonds were formed upon UV irradiation in cells expressing CaMKII mutants, especially residues, F16, F157, F171. This mutants are useful molecules to identify cellular substrate for CaMKII.

研究分野：脳神経科学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学、脳神経科学

キーワード：シナプス CaMKII 酵素 非天然アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

カルシウムイオンは細胞が利用する最も普遍的なセカンドメッセンジャーの一つである。細胞はこのカルシウムイオン濃度の強弱、振動、頻度を変化させることで、異なる反応を引き出すことができる。神経細胞ではこの単一イオン濃度の強弱により、長期増強現象 (LTP) や長期抑圧現象 (LTD) といった正反対の現象までも制御している。カルモデュリンキナーゼ (CaMK) は、カルシウムイオンより活性化したカルモデュリンからの刺激をタンパク質リン酸化に変換する主要な酵素である。中でもCaMKIIは、シナプス可塑性を担う記憶の分子実態として多くの研究がなされている。しかし、CaMKIIによって制御される分子、すなわち標的分子の多くは同定されていない。神経細胞内におけるCaMKIIの標的分子の同定は、脳における情報伝達の分子メカニズムを理解することであり、記憶や学習のみならず広くはヒトを理解することにつながるため重要である。タンパク質間相互作用解析は質量分析技術の進歩で大きく前進しているが、未だ酵素基質間相互作用のような速い一過的な相互作用を単離・解析することは技術的に非常に難しい。本研究計画の目的は、神経細胞で機能するCaMKIIをモデルにしたタンパク質リン酸化酵素の標的分子を同定する方法論の開発である。本研究計画は、クロスリンク可能な非天然アミノ酸と申請者の開発した光活性化CaMKIIを組み合わせ、“速い”相互作用をプロテオミクスの手法で同定し、CaMKII以外の酵素に適用し得る一般的な酵素基質相互作用の方法論のモデルを提唱するものである。非天然アミノ酸と光活性化タンパク質の二つの新しい技術を組み合わせることで従来の生化学的手法では検出できなかった酵素-基質に代表される速い相互作用を簡単に同定できる一般的な解析法を提供できるほか、カルシウムシグナルとCaMKIIの関与がわかっていたが、その分子メカニズムが不明な

神経生理学的現象を分子間相互作用による制御で説明できるようになるなど、情報伝達カスケードにおける新しい分子間相互作用の発見が期待される。また新技術として非天然アミノ酸をタンパク質へ導入する方法と申請者の開発した光活性化型CaMKIIを神経細胞に適用することにより、刺激とタンパク質間相互作用を同時に解析できる時空間解像度の高い生化学実験の実現の可能性がある。非天然アミノ酸導入タンパク質による機能解析はタンパク質間への共有結合形成のほか、蛍光アミノ酸付加などの応用も可能で、神経細胞生物学の解析に今後威力を発揮するものと考えらる。

2. 研究の目的

カルモデュリンキナーゼ 2 (CaMKII) は多機能タンパク質リン酸化酵素で、記憶を司るシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。ところがCaMKIIによって制御される多くの現象は、標的分子が同定されていないため、分子レベルで理解しているとは言い難い。酵素-基質相互作用が一過的であるため、従来の生化学的、プロテオミクスの手法では基質の同定は技術的に難しい為である。本研究計画の目的は、CaMKIIをモデルとして非天然アミノ酸、光活性化タンパク質という二つの新しい技術を応用し、タンパク質リン酸化酵素の基質を同定する方法論を確立することである。

3. 研究の方法

リン酸化反応を代表とする“速い”タンパク質間相互作用は安定な複合体を形成しないものが多い。しかし、確実にリン酸基の受け渡しを行う相互作用の瞬間がある。CaMKと基質タンパク質の相互作用の瞬間とは、カルシウム結合カルモデュリンが結合している状態である。試験管内では、カルシウム、カルモデュリンが存在している状態、細胞内ではカルシウム濃度が上昇した瞬間である。タンパク質相互作用を同定するため、共有結合を形成させる方法が大腸菌、ほ乳類細胞で報告された (Chin JW et al., 2002, 2003; Sakamoto K.

et al., 2002; Zhang Z. et al., 2004; Liu W. et al., 2007)。この方法は、目的のタンパク質にクロスリンク材として光感受性の非天然アミノ酸(p-benzoyl-L-phenylalanine, 以下、pBpa)を導入し、光刺激を加えてその近傍にある相互作用分子との間に共有結合を形成させるものである。神経細胞での実施例もあり、非天然アミノ酸の導入は実現可能である(Wang W. et al., 2007)。ただ、どのグループもタンパク質間相互作用解析への可能性は記述しているものの、実施例はひとつもない。本研究計画では非天然アミノ酸、pBpaを利用して酵素基質間のような速い分子間相互作用を“細胞内で”共有結合によってつなぎ止める事を試みる。また申請者の開発した光活性化型CaMKIIと非天然アミノ酸を組み合わせにより、CaMKIIの酵素活性依存的な相互作用を完全に光で制御でき、極めて特異性の高い相互作用解析法になり得る。

4. 研究成果

カルモデュリンキナーゼ2 (CaMKII)は多機能タンパク質リン酸化酵素で、記憶を司るシナプス可塑性に重要な役割を果たしている。CaMKIIによって多くの神経機能が制御されている事が知られているにもかかわらず、直接の標的分子はほとんど同定されていない。これは酵素-基質相互作用が一過的であるため、従来の生化学的、プロテオミクスによる手法では基質の同定は技術的に難しい為であると思われる。本研究では、CaMKIIをモデルとして非天然アミノ酸、光活性化タンパク質という二つの新しい技術を応用し、タンパク質リン酸化酵素の基質を同定する方法論を確立することである。

はじめに非天然アミノ酸である p-benzoyl-L-phenylalanine(pBpa)をCaMKIIへ導入する事を試みた。CaMKII分子の結晶構造はすでに解明されており、CaMKII分子の触媒領域でのチロシン、フェニルアラニン残基、F16, F24, F89, F157, F171 についてア

ンバーコドン、TAGへ置換した。このアンバーコドンを認識するトランスファーRNAをphoto-crosslinkableなアミノ酸、pBpaとともにHEK293細胞内へ導入し、紫外線照射によって近傍タンパク質に架橋を形成するかを検討した。上記のpBpa導入CaMKIIは全て全長タンパク質が生成されたが、F16, F157, F171にpBpaを導入した場合、CaMKII分子間での架橋が観察された。CaMKIIにF89G変異を入れることで、内在性の酵素活性に影響を与える事なく光活性化型CaMKII活性のみを阻害剤PP1により抑制できる。この変異を光活性化型CaMKII導入出来れば、特異性、活性制御の時間解像度を上げる有用な手段であると考えた。ところが、光活性化型CaMKIIの触媒領域に変異を導入したF89G変異を導入すると光活性化が起こらなくなった。従って、F89G変異を持つ光活性化型CaMKIIの作成は新しいスクリーニングが必要と思われる。また、光活性化型CaMKIIへのアンバーコドンの導入も非天然アミノ酸がバルキータンパク質の為に、本来の光活性化が得られなかった。すなわち、光活性化型CaMKIIと非天然アミノ酸をもちいた手法の組み合わせは更なる変異、条件の検討が必要である。本研究により、網羅的タンパク質解析の為に分散海馬神経細胞を用いたスパインの形態変化をもたらす化学LTPの条件を決定できた。相互作用分子を網羅的に同定する為には、ハイタンパク質の量は重要な要素である。HEK293細胞で発現させる光活性化型CaMKIIのタンパク質収量は非常に悪い為、使用する発現プロモーター、標識タグ、使用コドンの最適化等を行った。使用する発現プラスミドのプロモーター、タグ、コドン使用頻度の変更の条件検討を行った。結果としてプロモーターはベータアクチンプロモーター、タグは赤色蛍光タンパク質mCherryをもちいることで良好な結果が得られた。使用コドンの最適化でヒトコドンを用いたが、顕著な改良は認

められなかった。以上、本研究では、非天然アミノ酸 pBa を用いた細胞内直接基質の同定のための種々の条件検討を行った。光活性化型 CaMKII との組み合わせはうまくいかないものの、シンプルな非天然アミノ酸導入 CaMKII の細胞内での発現条件などを決定出来た。今後は本研究の成果を活用し、CaMKII 相互作用分子、特に細胞内基質を同定して行く予定である。

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 3件)

1. Saneyoshi T, Hayashi Y. Synapse reorganization--a new partnership revealed. EMBO J., In press, 2014
査読なし
2. Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. Neuron 82(2):444-59. 2014
査読あり、DOI: 10.1016/j.neuron.2014.03.021.
3. Saneyoshi T, Hayashi Y. The Ca²⁺ and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. Cytoskeleton. 69(8):545-54. 2012
査読あり、DOI: 0.1002/cm.21037.

[学会発表](計 2件)

1. 発表者、Saneyoshi, Takeo. Hayashi, Yasunori. US-Japan Symposium of neuronal plasticity, Seattle, USA、発表表題、Persistent Interaction between CaMKII and TIAM1 during long-term potentiation, 発表年月日、2013年7月15日～21日
2. 発表者、Saneyoshi, Takeo. Hayashi, Yasunori, Neuro2013, 京都、発表表

題、 Regulation of synapse structural plasticity using photoactivatable signaling molecule. 発表年月日、2013年6月20日～22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

実吉岳郎 (Saneyoshi, Takeo)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00556201

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：