

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14947

研究課題名(和文) CaMKIIはシナプスでタンパク質を集積させ活性化するハブとして機能する

研究課題名(英文) CaMKII acts as a protein hub to accumulate and activate synaptic proteins

研究代表者

細川 智永 (Hosokawa, Tomohisa)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：30602883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：FRET技術を用いてPSDのCaMKIIの活性を測定した。PSDにおけるCaMKIIの結合パートナーを質量分析により網羅的に探索したところ、既知の結合パートナーを含む多数の蛋白質が同定された。

この結合の生理的意義を調べるため、香港科技大学との共同研究のもと、人工PSDを用いた。これは精製したPSDタンパク質を混合していくことでPSDと似た性質を持つ構造体をin vitroで作成する手法である。CaMKIIの存在下でカルシウムを添加しCaMKIIを活性化させたところ、PSDの顕著な拡大が見られた。このことは本研究の仮説であるCaMKIIの構造的役割を強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シナプス可塑性の分子メカニズムは、これまでのCaMKIIの活性化によるAMPA受容体のリン酸化というモデルが複数の論文によって覆され、新たなモデルを提案する必要があった。本研究では、CaMKIIの酵素活性よりもその構造的役割に注目している。本研究によるとCaMKIIはカルシウムに反応しPSDにリクルートされ、その12量体で様々な蛋白質を繋ぎ留めることでシナプスタンパク質の量を増加させ、ひいては長期増強を実現している。このことは、CaMKIIの高すぎる発現量や特徴的な12量体構造の謎を解決するとともに、シナプス可塑性及び学習機構の新たなモデルを提唱するものである。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of CaMKII for postsynaptic density (PSD), the activity of CaMKII was observed by FRET technology at PSD. We found that actually around half of CaMKII is already active. Its downstream substrates are also already phosphorylated and decreased by CaMKII inhibitor. We tried non-biased identification for CaMKII interactor and we got many candidates including known substrates and interactor.

To examine the significance of this interaction, we tried artificial PSD as the collaboration with Prof. Zhang, HongKong University Science and Technology. Using this method, we can make PSD like structure under microscope. Activation of CaMKII by adding calcium ion resulted in the expansion of artificial PSD. This result strongly suggests the structural role of CaMKII.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性

1. 研究開始当初の背景

神経細胞シナプスの構造・可塑性の研究は、記憶・学習の分子機構の解明のみならず神経変性疾患や精神疾患の解明に資する、現代の社会的要請の極めて高い研究である。後シナプスの形成の場である樹状突起棘(スパイン)には多様なタンパク質が密集する領域(シナプス後膜肥厚、PSD)があり、複雑なシグナル経路を形成しシナプスの構造と性質を決定しているが、「なぜタンパク質が密集できるのか、なぜこうも複雑な経路が正しく制御でき破綻しないのか」という根本的な疑問が解決していない。スパインの形態異常やシグナル経路の破綻は疾患に深く関与する(Robinson 2014)ため、これは喫緊な課題である。そこで申請者は CaMKII に注目した。

CaMKII は阻害剤や遺伝子破壊動物を用いた研究からシナプス可塑性、学習・記憶に重要な機能を果たしている事が知られている。これまでシナプスの CaMKII は長期増強(LTP)誘導に伴う NMDA 受容体からの Ca^{2+} 流入により活性化され、その結果 T286 が自己リン酸化され常時活性化型になりシナプスの伝達効率を決定する AMPA 受容体のリン酸化を維持し LTP を維持する、と考えられてきた(Griffith 2004)。しかしこれまでに申請者は、学習時のこのリン酸化は定量的に 1%以下の分子にしか起こっていなかったことを明らかにし(Hosokawa et al., Neuron 2015)、CaMKII に他の役割があることを示唆した。実は CaMKII にはキナーゼらしからぬ特徴が多い:

1. 脳、特に興奮性シナプスに多く、海馬では全タンパク質の約 2%、PSD 画分では 20-30%をしめる。通常キナーゼは一分子が多数の基質をリン酸化するので、基質より多い必要はない。ところが CaMKII はほぼ全ての基質タンパク質の量を凌駕している。
2. 他にない特徴的な 12 量体からなる回転対称体を形成しているが、必然性はわかっていない。
3. LTP 誘導とともにシナプスへ急速に移行し、量が増加する。すでに多量にある CaMKII の移行にどのような意義があるかは不明である。
4. PSD の CaMKII は刺激されていない状態でもすでに 40%ほどが、T286 がリン酸化された「活性化型」である。これは申請者が貢献してきた、リン酸化タンパク質を定量的に分離可視化する手法(Hosokawa et al., Mol.Cell.Proteomics 2010, 研究業績 8)によって見出された知見である。CaMKII バイオセンサーによっても同様の事実が確認されており、シナプス後部の構造を維持する役割があることがわかってきた。これらの特徴はキナーゼというより、むしろ構造タンパク質としての特徴に類似している。では、CaMKII が構造タンパク質として働くことが考えられるだろうか。

CaMKII は基質と 2 通りの結合をする事が知られ、多くの基質は S-site と呼ばれる部位に一時的に結合しリン酸化される一方、NMDA 受容体サブユニット NR2B とは通常自己阻害ループが結合する T-site にそれを置き換える形でより安定に結合し、しかも Ca^{2+} 濃度が低下しても CaMKII 活性を維持する。これは活性化した CaMKII が LTP を起こしたスパインに集積し活性を維持し近傍のタンパク質をリン酸化するメカニズムとして考えられた(局在と活性を同時に獲得)。実際に NR2B の結合部位の変異体をノックインすると、シナプス可塑性に異常がおこる。

我々は偶然に低分子 G タンパク質 Rac の活性化因子 RacGEF である TIAM1 も同様に CaMKII T-site に結合することを見出した。また結合により活性を獲得した CaMKII は TIAM1 をリン酸化して活性化させており、相互に活性化し合う関係であることを突き止めた。

これらの安定な結合は CaMKII がキナーゼと構造タンパク質の役割を同時に担っていることを示唆している。12 量体の CaMKII は NR2B と TIAM1 をクロスリンクしつつ相互に活性化することになるからだ。しかしながら NR2B や TIAM1 の発現量は CaMKII に比べ極めて低く、CaMKII の定常活性 40% を説明するには不十分であり T-site 結合タンパク質は他にも多数存在すると考えられ、それらを密集させ構造の要になりつつ活性化し続けシグナル経路の要にもなる役割が想定される。これらのことから CaMKII の本来の役割は、シナプス活動に伴い活性化されるとその 12 量体で様々なシナプス分子と結合し、スパインへ密集させかつ活性

を互いに維持する機構ではないかと着想した。

2. 研究の目的

SA1: CaMKII T-site 結合因子の網羅的探索：候補分子によらずに CaMKII の T-site に結合するタンパク質の網羅的スクリーニングを行なう（すでに信頼できる候補を 100 以上同定済）。

SA2: CaMKII による同定された分子の機能調節：その分子が CaMKII T-site と相互作用をしているか、またその相互作用によってリン酸化されかつ活性化されるかを検討する。

SA3: CaMKII 結合による同定された分子のシナプスへの集積およびその集積がシナプス構造変化(構造的 LTP)に必須である証明:得られた分子が CaMKII の T-site 依存的に LTP 誘導に伴いシナプスへ集積するかどうかを二光子顕微鏡観察下のグルタミン酸脱ケージ化(Bosch, 2014)により検討する。また FRET-FLIM にて結合を証明し、結合変異型タンパク質存在下で構造的 LTP(シナプスが肥大化することで定義される LTP)が抑制されることを確かめる。さらに定常状態でのシナプス構造の維持に 12 量体 CaMKII が必須であることを確かめる。

3. 研究の方法

SA1:T-site 変異 CaMKII のアフィニティーカラムを用いて質量分析により神経細胞抽出物から T-site 特異的な結合タンパク質を同定する。

SA2:生化学・遺伝子改変手法により結合の確認、結合部位の同定、結合の結果として基質のリン酸化および CaMKII 活性の測定を行う。

SA3:二光子顕微鏡下の海馬スライスを用いシナプス構造に摂動を与えるため単一スパインに LTP を誘導するグルタミン酸脱ケージ化手法を主軸とし、GFP を融合した候補タンパク質が LTP 誘導によりスパインへ集積すること、その集積が CaMKII に依存すること、T-site 変異 CaMKII に候補タンパク質を集積させる能力が無いことを確かめる。さらに FRET FLIM により結合を証明し、結合部位を欠損させた候補タンパク質を用いてこの結合がスパインの拡大と維持に必須であることを証明する。

4. 研究成果

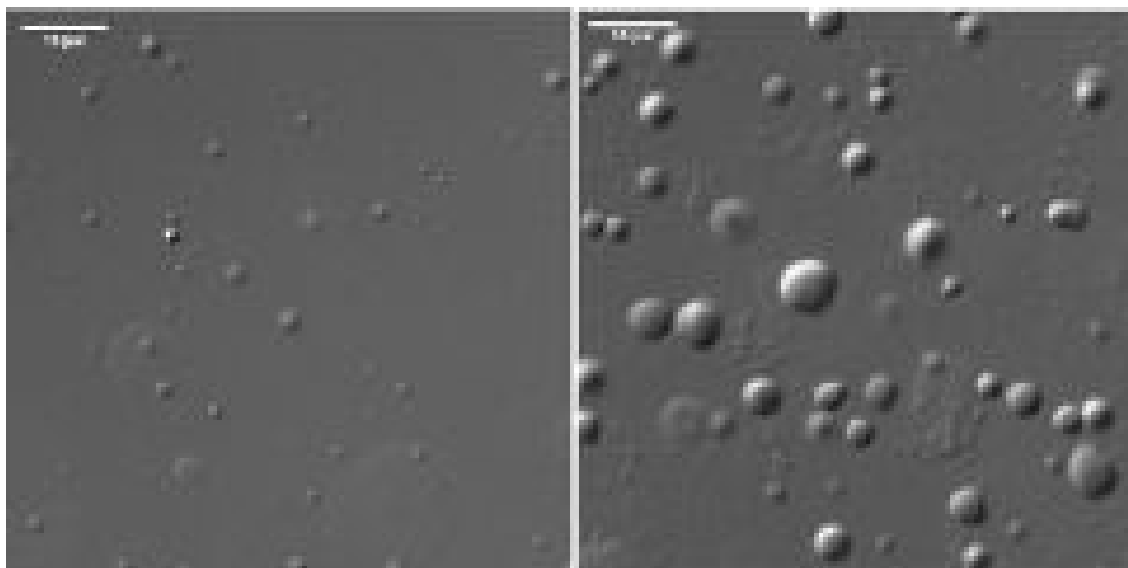


図 1 1 :カルシウム添加前(左)と後(右)の人工 PSD の顕微鏡画像
1um 以下の大きさだった人工 PSD が~5um ほどの大きさに成長している。
これは長期増強刺激による後シナプスの肥大化と PSD の安定化を再現している。Hosokawa et al., 未発表

CaMKII のシナプス後肥厚 (PSD) における役割を探るため、FRET 技術を用いて

PSD の CaMKII の活性を測定したところ、半数近くの CaMKII 分子が活性化状態にあることが明らかになった。そこで CaMKII の阻害剤を用いて下流基質のリン酸化状態を観察したところ、徐々にリン酸化を失っていくことが分かった。これらのことは、CaMKII が定常状態のシナプスにおいてシグナル伝達を制御していることを示している。そこで PSD における CaMKII の結合パートナーを質量分析により網羅的に探索したところ、既知の結合パートナーを含む多数の蛋白質が同定された。これらの蛋白質と CaMKII の結合は生化学的手法によっても確認された。

この結合の生理的意義を調べるため、香港科技大学との共同研究のもと、人工 PSD を用いた。これは精製した PSD タンパク質を混合していくことで PSD と似た性質を持つ構造体を *in vitro* で作成する手法である。CaMKII の存在下でカルシウムを添加し CaMKII を活性化させたところ、PSD の顕著な拡大が見られた(図 1、2)。このことは本研究の仮説である CaMKII の構造的役割を強く示唆している。

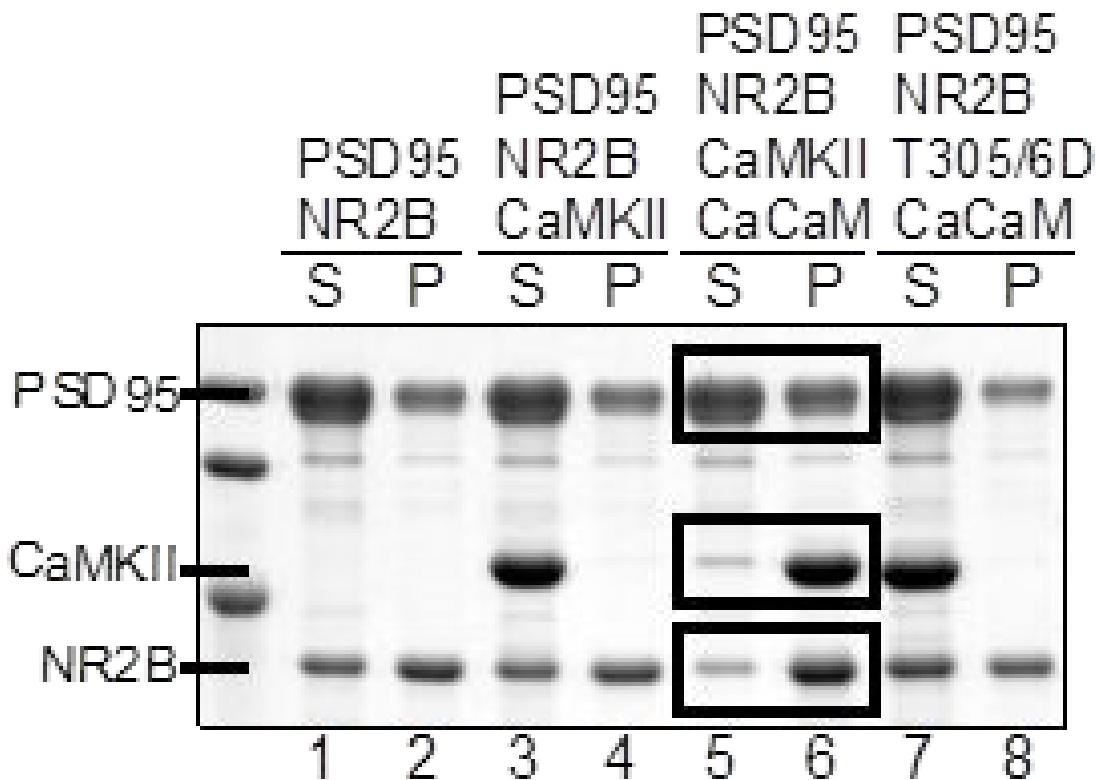


図 2:人工 PSD の生化学的解析

カルシウムイオンの添加により遠心分離されるタンパク質の量が増加している。これは長期増強時のシナプス後肥厚におけるタンパク質量の増加と安定化を再現している。Hosokawa et al., 未発表

5 . 主な発表論文等

Structure of monomeric full-length ARC sheds light on molecular flexibility, protein interactions, and functional modalities.

Hallin EI, Eriksen MS, Baryshnikov S, Nikolaienko O, Grødem S, Hosokawa T, Hayashi Y, Bramham CR, Kursula P.

[雑誌論文](計1件)

Hallin EI, Eriksen MS, Baryshnikov S, Nikolaienko O, Grødem S, Hosokawa T, Hayashi Y, Bramham CR, Kursula P. Structure of monomeric full-length ARC sheds light on molecular flexibility, protein interactions, and functional modalities. J Neurochem. 査読有, Nov;147(3):323-343. doi: 10.1111/jnc.14556. Epub 2018 Sep 26.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.14556>

〔学会発表〕(計2件)
2018年度 日本神経科学学会大会
2017年度 日本神経科学学会大会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。