

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02528

研究課題名(和文) 記憶の形成・維持におけるCaMKIIが構成する自己活性型タンパク質複合体の解析

研究課題名(英文) A reciprocal-activation-within-a-kinase-effector-complex regulates formation and maintenance of memory

研究代表者

実吉 岳郎 (Saneyoshi, Takeo)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00556201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、シナプス単位の記憶が、Tiam1とCaMKIIからなるRAKECとして形成、維持されるメカニズムとその個体での役割を明らかにした。この成果をもとにわれわれは記憶分子が、タンパク質間相互作用として存在するという新しいコンセプトを提案している。CaMKIIはホモ12量体として存在しているため、Tiam1と結合したCaMKIIは同時に11個の別のRAKECを形成できることになる。今後は、CaMKIIや他のキナーゼが形成するRAKEC分子を同定/解析することにより、一過的な刺激を長期持続シグナルへ変換する分子機構が明らかになり、長期記憶の理解が深まることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により分子記憶の一つはCaMKIIとTiam1によって構成されるタンパク質間相互作用として存在する事を示した。CaMKIIは、Rac1活性化だけではなく、様々な情報伝達経路に関わっていることが知られており、今回のTiam1のみならず多くの分子との相互作用が予想される。CaMKIIはシナプスで非常に高い濃度で存在するため、CaMKIIが維持する情報がRAKECを形成する分子間相互作用である事が示唆される。今後は、分子記憶の個体レベルでの検証を続けるとともに、RAKECを新しい創薬ターゲットとした認知症などの新規治療法につなげていくことを期待している。

研究成果の概要(英文)：Some of neuronal activity pattern can induce a persistent change in the efficacy of synaptic transmission, a phenomenon known as synaptic plasticity. One form of plasticity, long-term potentiation (LTP) has been extensively studied as the cellular basis of memory. In LTP, the potentiated synaptic transmission persists along with structural changes in the synapses. As a memory molecule, CaMKII has been attracted researchers for long time. However, it has not yet been understood how CaMKII is regulated during LTP. In this study, we found a new CaMKII regulation: reciprocal activation within a kinase effector complex (RAKEC) that is made between CaMKII and its effector protein, which is mediated by a persistent interaction between CaMKII and a pseudosubstrate sequence on Tiam1, resulting in reciprocal activation of these two molecules. Through the RAKEC mechanism, CaMKII can maintain memory as biochemical activity in a synapse-specific manner.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 記憶 CaMKII 分子間相互作用 酵素基質複合体 アクチン細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞レベルでの記憶の基盤である長期増強(LTP)は、グルタミン酸受容体からシナプスへ  $Ca^{2+}$  が流入し、脳内に豊富に存在するカルシウム / カルモデュリン依存性リン酸化酵素 CaMKII の活性化をへて長期にわたりシナプス伝達強度が増強する現象である。LTP 刺激を受けたシナプスでは一過的な  $Ca^{2+}$  濃度上昇と CaMKII の活性化が見られる。これに対してシナプスの形を支えるスパインそのものの体積拡大とそれを担うアクチン重合は30分間以上持続する。この非常に短い  $Ca^{2+}$  濃度の上昇がどのように長期間持続するシナプス伝達強度へと変換するのか全く解っていない。

そこでわれわれは、CaMKII とアクチン細胞骨格制御分子に着目して、LTP における一過的なカルシウムシグナルが持続する生化学反応へと変換するメカニズムとその記憶への関与の解明を試みた。

## 2. 研究の目的

リン酸化酵素である CaMKII は基質と2通りの結合をする。一つは S-site と呼ばれる部位に一時的に結合し、リン酸化すると外れる。もう一つの結合部位は T-site (T286 interaction site) と呼ばれ、通常 T286 を含む自己阻害ドメインと安定した複合体を作っている。われわれは、低分子量 G タンパク質 Rac 活性化因子である TIAM1 が CaMKII の T-site に結合することを見出した。この結合により、自己阻害ドメインが結合できなくなる結果、CaMKII が活性化される。一方、TIAM1 は CaMKII によりリン酸化され、活性化されることが知られており、このタンパク質複合体内では、CaMKII の活性状態とそれによる TIAM1 のリン酸化が相互に維持され活性が持続する。実際、FRET を用い観察したところ、TIAM1 と CaMKII の相互作用は LTP 後に増強すること、そして相互作用部位の変異体を用いると LTP 後のスパインの構造変化が起こらなくなった。我々はこのような相互に活性化しあう酵素基質複合体を RAKEC (Reciprocal Activating Kinase Effector Complex) と名付けた。

CaMKII はシナプスに多量に存在するため、TIAM1 以外にも同様な結合をする分子があると考えられる。実際我々はアクチン脱重合因子コフィリンを不活化する LIMK1 も CaMKII と T-site を介して安定な複合体を形成することを見出した。これらの結果と CaMKII の T-site を阻害するペプチドが LTP 維持を抑制することや (Sanhueza et al., 2011)、記憶形成後にドミナントネガティブ CaMKII を発現すると記憶が消去されることを合わせると (Rossetti et al., 2017) 記憶維持のメカニズムは活性化した CaMKII が様々なシグナル分子と T-site を介して結合し、CaMKII の酵素活性とそれによる基質のリン酸化が続きシナプス強度を維持することではないかと気づいた。そこで本研究では、記憶の形成・維持において、「CaMKII と基質による T-site 結合を介した自己活性化型タンパク質複合体 (RAKEC) がシナプス強度を持続させる分子実体である」という概念を確立し、実証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

計画1 T-site を介したタンパク質複合体ができない CaMKII ノックインマウスによる記憶学習解析 われわれは TIAM1 の CaMKII との複合体形成不全マウスや CaMKII の T-site 結合変異 (I205K) ノックインマウスを作成し、CaMKII とのタンパク質複合体が記憶学習に必須であることの直接証明を試みる。

## 【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

計画1-1 ノックインマウスのシナプス可塑性 ノックインマウス由来海馬の構造可塑性は培養海馬切片を使い、ケージドグルタミン酸の脱ケージ刺激によるスパイン形態の変化をライブイメージングにて解析する。

計画1-2 ノックインマウスの記憶行動試験 CaMKII の T-site 結合が記憶の形成、維持、想起のプロセスに関わりをノックインマウスを利用して検討する。記憶学習の行動レベルの評価法として行動バッテリー試験を行う。

計画2 CaMKII ノックインマウスを用いた CaMKII 結合因子の網羅的探索およびリン酸化解析 CaMKII と T-site を介した相互作用により LTP 維持に寄与する RAKEC 分子の同定と解析を行う。

計画2-1 CaMKII-T-site 結合タンパク質の網羅的解析 CaMKII と RAKEC を形成する分子を同定するため、野生型および I205K ノックインマウスの脳より抗 CaMKII 抗体を用いた免疫沈降を行い、共沈降するタンパク質を質量分析計によって同定する。

計画2-2 脳内タンパク質リン酸化定量解析 野生型およびノックインマウスの脳内タンパク質のリン酸化量を iTRAQ 法で比較検討する。

計画3 CaMKII 複合体によるシナプス可塑性制御: CaMKII-LIMK1 複合体の解析 我々は LTP 刺激を受けたスパイン内で LIMK1 が、T-site 結合を介した持続する CaMKII との複合体および LIMK1 ホモ二量体を形成することを見出した。そこで、CaMKII-LIMK1 複合体を新規 RAKEC のモデルとして LTP への関与を検証する。

計画3-1 CaMKII-LIMK1 は新規 RAKEC か CaMKII の LIMK1 との結合による酵素活性への影響を検討する。また、LTP 刺激により LIMK1 のリン酸化が持続するか解析する。

計画3-2 LIMK1 内の CaMKII 結合部位の同定と LTP への関与 LIMK1 内の CaMKII 結合部位を同定後、CaMKII と結合できない LIMK1 変異体を作成し LTP への関与を検討する。

## 4. 研究成果

Tiam1 と CaMKII はシナプス刺激により安定した複合体を形成する

海馬神経細胞のシナプスにケージドグルタミン酸の光による脱ケージ刺激で LTP を誘導するとスパインの体積拡大がおこる。この LTP 誘導時スパインでの生化学活性を FRET によるライブイメージングを用いて観察、測定した。カルシウム依存性リン酸化酵素 CaMKII の活性は LTP 刺激直後より上昇するが 1 分間程度で刺激前状態に戻っていた。一方、アクチン細胞骨格制御因子 Rac1 の活性が 30 分以上持続していた。さらにこの一過性の CaMKII の酵素活性を持続性の Rac1 活性へ変換する Rac1 の活性化分子について検討した。はじめに Rac 活性化分子である GTP/GDP 交換因子について CaMKII との相互作用を調べたところ、Tiam1 が CaMKII と安定して結合することがわかった。生化学的手法により結合条件を検証するとこの相互作用は、カルシウムにより誘導されるが、一度結合が成立するとカルシウムは必要なくなることがわかった。

Tiam1 と CaMKII は相互の分子活性を維持する酵素基質複合体 (RAKEC) である

さらに Tiam1 と CaMKII の相互作用の酵素活性に与える影響を検証したところ、Tiam1 との結合で CaMKII はカルシウム非依存的な酵素活性を示し、CaMKII によるリン酸化は Tiam1 を活性化させた。つまり、Tiam1 と CaMKII が作る複合体はお互いを活性化し合う酵素と基質の相互活性化型シグナル複合体 (RAKEC) であった。LTP 誘導時のスパイン内での RAKEC の挙動を FRET 観察すると、Tiam1/CaMKII 複合体は刺激により急速に形成され、30 分間以上持続した。また、分子置換法による検討で、Tiam1/CaMKII 複合体は Rac1 活性化およ

## 【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

び構造的 LTP に必須である事がわかった。つまり、LTP における一過的なカルシウムシグナルを持続する生化学反応へ、CaMKII と Tiam1 が作る RAKEC によって変換されていたのである。

Tiam1 と CaMKII による RAKEC は、長期記憶をつくる

RAKEC の記憶への関わりを検討するため、RAKEC 形成不全変異を Tiam1 に導入したノックインマウスを作成した。このノックインマウスは、外見上の大きな変化は見られず、正常マウスと同じように生育し繁殖していた。神経細胞の形態を詳細に観察するとスパインの密度と頭部サイズが減少していた。また記憶試験である新規物体認識試験を行うと学習 1 日目の記憶は統計的に有意ではないが低下傾向が見られ、さらに学習後 7 日目では長期記憶に障害が見られた。すなわち、Tiam1/CaMKII で構成される RAKEC は個体レベルでの長期記憶の形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

以上の結果から、シナプス単位の記憶が、Tiam1 と CaMKII からなる RAKEC として形成、維持されるメカニズムとその個体での役割を明らかにできた。本研究は、記憶分子は、タンパク質間相互作用として存在するという新しいコンセプトを提案するものである。CaMKII はホモ 12 量体として存在しているため、Tiam1 と結合した CaMKII は同時に 11 個の別の RAKEC を形成できることになる。今後は、CaMKII や他のキナーゼが形成する RAKEC 分子を同定 / 解析することにより、一過的な刺激を長期持続シグナルへ変換する分子機構が明らかになり、長期記憶の理解が深まることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Saneyoshi Takeo   | 4. 巻<br>170                   |
| 2. 論文標題<br>Reciprocal activation within a kinase effector complex: A mechanism for the persistence of molecular memory                                    | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Brain Research Bulletin   | 6. 最初と最後の頁<br>58 ~ 64         |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.brainresbull.2021.01.018  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Saneyoshi Hisao, Ohta Takayuki, Hiyoshi Yuki, Saneyoshi Takeo, Ono Akira  | 4. 巻<br>21                    |
| 2. 論文標題<br>Design, Synthesis, and Cellular Uptake of Oligonucleotides Bearing Glutathione-Labile Protecting Groups  | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Organic Letters   | 6. 最初と最後の頁<br>862 ~ 866       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.orglett.8b03501   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Mizuta Kotaro, Saneyoshi Takeo  | 4. 巻<br>86                    |
| 2. 論文標題<br>Amyloid- $\beta$ -Dependent Neuronal Circuit Rearrangement in Presymptomatic Alzheimer's Disease   | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Biological Psychiatry   | 6. 最初と最後の頁<br>167 ~ 168       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.biopsych.2019.06.002  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Kojima Hiroto, Rosendale Morgane, Sugiyama Yui, Hayashi Mariko, Horiguchi Yoko, Yoshihara Toru, Ikegaya Yuji, Saneyoshi Takeo, Hayashi Yasunori | 4. 巻<br>166                   |
| 2. 論文標題<br>The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory  | 5. 発行年<br>2019年               |
| 3. 雑誌名<br>Neurobiology of Learning and Memory   | 6. 最初と最後の頁<br>107070 ~ 107070 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.nlm.2019.107070   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                     |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>実吉 岳郎                        | 4. 巻<br>51 (14)     |
| 2. 論文標題<br>記憶分子再考: CaMKIIの新しい活性制御      | 5. 発行年<br>2019年     |
| 3. 雑誌名<br>細胞                           | 6. 最初と最後の頁<br>14~17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-           |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Saneyoshi Takeo, Matsuno Hitomi, Suzuki Akio, Murakoshi Hideji, Hedrick Nathan G., Agnello Emily, O'Connell Rory, Stratton Margaret M., Yasuda Ryohei, Hayashi Yasunori | 4. 巻<br>102        |
| 2. 論文標題<br>Reciprocal Activation within a Kinase-Effector Complex Underlying Persistence of Structural LTP  | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Neuron  | 6. 最初と最後の頁<br>1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.neuron.2019.04.012  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する       |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>實吉 岳郎                        | 4. 巻<br>276(8)        |
| 2. 論文標題<br>記憶の持続メカニズムを解明 新たな分子記憶の原理    | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>医学のあゆみ                       | 6. 最初と最後の頁<br>807-808 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著<br>-             |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>林 康紀、細川 智永、劉 品吾、實吉 岳郎                       | 4. 巻<br>93(2)      |
| 2. 論文標題<br>長期増強現象とCa <sup>2+</sup> /カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ | 5. 発行年<br>2021年    |
| 3. 雑誌名<br>生化学   | 6. 最初と最後の頁<br>1-12 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                        | 査読の有無<br>無         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難                | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takeo Saneyoshi and Yasunori Hayashi  |
| 2. 発表標題<br>Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP |
| 3. 学会等名<br>Neuro2019   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takeo Saneyoshi   |
| 2. 発表標題<br>Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP |
| 3. 学会等名<br>Current Trends and Future Directions of Synapse-Circuit Plasticity Research                     |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>實吉 岳郎  |
| 2. 発表標題<br>シナプス機能の増強を維持する記憶のメカニズム                       |
| 3. 学会等名<br>〔脳構築の時計と場〕〔スクラップビルド〕〔マルチスケール脳〕－ 合同若手シンポジウム － |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takeo Saneyoshi   |
| 2. 発表標題<br>A regulatory mechanism of persistence of LTP and memory |
| 3. 学会等名<br>UK-Japan Neuroscience symposium 2020                    |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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                      |                                |                             |
|---------|------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| 米国      | Max Planck Florida Institute | Duke University Medical Center | University of Massachusetts |