

令和 4 年 9 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2019～2021

課題番号：18KK0421

研究課題名（和文）シナプス後肥厚におけるCaMKIIの構造的役割とその光制御による長期増強の誘導

研究課題名（英文）Structural role of CaMKII in PSD and the induction of LTP by optogenetics.

研究代表者

細川 智永（HOSOKAWA, TOMOHISA）

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：30602883

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,000,000円

渡航期間： 1.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：本課題では香港科学技術大学およびボルドー大学との共同研究を通じて、シナプス膜表面の神経伝達物質受容体の振る舞いに関する新しい理論を打ち立てた。現在注目を集めている液-液相分離現象を前提としたこの理論は、シナプスの超高解像顕微鏡法によって得られていた知見やCaMKIIをはじめとしたシナプスタンパク質の分子的な性質と一致しており、記憶形成とシナプス可塑性を説明する新しいメカニズムであると期待される。

この結果は2021年のNature Neuroscienceに発表したほか、国内外の複数の総説にて解説している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

記憶形成は一時的な情報がシナプス強度の増強として固定されるプロセスであるが、その詳細なメカニズムはわかっていなかった。本課題により、興奮性刺激によるカルシウム流入がシナプス蛋白質のコンデンセートの可塑性な形成を引き起こし、シナプス強度を増強していることが明らかになった。このことは認知症患者の記憶を強化するような治療戦略に利用できるほか、逆にコンデンセートの離散を誘導することでPTSDの治療に役立てることが出来る。また、タンパク質のコンデンセート形成は神経変性疾患に見られるタンパク質アグリゲートと密接に関わっていることが報告されており、本課題によりそれら疾患の原因の理解を促進できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, through the collaboration with Hong Kong University of Science and Technology and Bordeaux University Interdisciplinary Institute for Neuroscience, we established a novel theory to explain the behavior of neurotransmitter receptor on the postsynaptic membrane. This theory based on "liquid-liquid phase separation" phenomenon, which recently becomes a hot topic in biochemistry, is totally consistent with the recent report regarding nano-scale distribution of neurotransmitter receptors on synaptic membrane using super-resolution microscopy and molecular feature of representative postsynaptic protein CaMKII. This theory is expected as the novel mechanism to explain synaptic plasticity and memory formation. We reported this achievement on Nature neuroscience 2021 and several review paper.

研究分野：神経科学

キーワード：シナプス可塑性 シナプス 液-液相分離 受容体 記憶

1. 研究開始当初の背景

神経細胞樹状突起スパインのシナプス後膜肥厚 (PSD) には受容体や足場タンパク質をはじめとする様々なタンパク質が集積し、学習等のインプットに応じてシナプス伝達効率を正または負に調節する記憶素子として機能している。PSD は生化学的には界面活性剤に不溶の凝集体 (アグリゲート) に近い性質を持つが、アルツハイマー病に見られる神経原線維変化のような病的な構造体ではなく、興奮性シナプスに普遍的に観察される生理的な構造体であると言える。また近年の超高解像顕微鏡の発達により、PSD の内部では集積しているタンパク質が一様に分布しているのではなく、特定のタンパク質がさらに特定の領域に集積し区画化 (ナノドメイン) していることが分かってきた。またこのような区画化はシナプス活動依存的に生じる。このことはシナプス活動による伝達効率の調節機構、すなわち記憶と学習のメカニズムの一端であると考えられるが、シナプス活動に応じた PSD の融合集散および内部の区画化のメカニズムは不明だった。

2. 研究の目的

香港科学技術大学の Prof. Mingjie Zhang のグループは PSD タンパク質群が液 - 液相分離現象 (LLPS) により動的な分子凝縮体 (コンデンセート) を形成することを明らかにした (文献 1)。LLPS コンデンセートの持つ様々な性質は神経細胞内の PSD の性質と酷似している。そこで本課題では、シナプス活動が PSD タンパク質のコンデンセートの物性と構造に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

香港科学技術大学の Mingjie Zhang のグループは精製タンパク質をガラス基板上で混合し、蛍光顕微鏡または遠心分離・SDS-PAGE によりコンデンセートを観察している。本課題でもこの手法をベースとするため、共同研究により手技の習得を行い、学習刺激を模倣したカルシウム刺激を行った。

ボルドー大学の Daniel Choquet のグループは伝達物質受容体などが PSD 内部で形成するナノドメインを超高解像顕微鏡で観察する専門家である。そこで本課題では共同研究によりインビトロでの結果をもとに実際の神経細胞内での区画化を観察した。

4. 研究成果

細胞生物学・生化学の手技には一通りの経験があったが、タンパク質の高度な精製やコンデンセートの形成には経験が無かったため、香港科学技術大学に留学し、高度な生化学の技術を習得し実験を行った。8

カルシウムカルモデュリン依存性キナーゼ II (CaMKII) は活性化状態で NMDA 受容体サブユニット GluN2B と結合することが知られている。そこでこの両者を精製し、ガラス基板上で混合し蛍光顕微鏡による観察または遠心分離・SDS-PAGE による解析を行った。CaMKII が不活性化状態ではすべてのタンパク質が希薄相として存在しており、コンデンセートは観察されなかった。そこに学習刺激としてのカルシウムイオンを添加したところ、球状のコンデンセートの形成が観察された。

このコンデンセートが LLPS によるものであると証明するため、以下の実験を行った。

1. LLPS コンデンセートは球状である。そこでガラス基板上の CaMKII-GluN2B コンデンセートを 3D 観察したところ、球状であることが確かめられた。2. LLPS コンデンセートは内外で分子の入れ替わりが起きている。これを確かめるために光褪色後蛍光回復法を用いた。コンデンセートの一部を褪色したところ、蛍光の回復が見られた。これはコンデンセートの内部の流動性によるものである。またコンデンセート全体を退職した場合でも回復が認められた。これはコンデンセート内外で分子の交換が起きているためである。3. LLPS コンデンセートはコンデンセート同士が融合する。これを確かめるために CaMKII-GluN2B のコンデンセートの挙動を経時観察したところ、偶然触れ合ったコンデンセート同士が融合する現象を観察した。以上のことから、本課題で発見した CaMKII-GluN2B のコンデンセートは LLPS コンデンセートであることがわかった。

CaMKII は自己リン酸化により恒常活性型となり、カルシウム非依存的に活性型立体構造を維持することができ、このことは記憶形成に重要な役割を果たすと考えられている。そこで

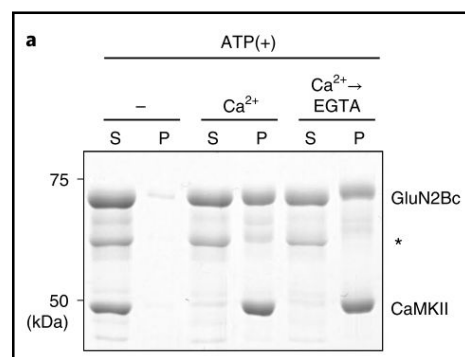


図 1. ATP 存在下ではカルシウムにより形成されたコンデンセート (P) が EGTA 後も維持される。

Mg²⁺-ATP を添加して同様の実験を行ない EGTA 添加したところ、ATP 無しではコンデンセートが消失したが ATP 有りではコンデンセートが維持された(図1)。これらのことは、学習という一時的な情報がシナプスタンパク質のコンデンセートとして固定されたことを意味する。

次に、カルシウム刺激による CaMKII の活性化および GluN2B とのコンデンセート形成が Mingjie Zhang のグループが発表した PSD コンデンセートに与える影響を検討した。PSD-95、AMPA 受容体サブユニット stargazin、GluN2B を混合したところ、先行研究と同様にカルシウムに依存しない PSD コンデンセートが形成された。そこに CaMKII 存在下でカルシウム刺激を行ったところ、タンパク質群が区画化しコア-シェル型の二層構造を持つコンデンセートが形成された。希薄相も合わせれば環境が三相に相分離したことを意味する。興味深いことにシェル側は常に CaMKII-GluN2B でありコア側は常に PSD-95-Stargazin であった。この二相構造のコンデンセートという構造はナノドメインを持つ PSD に酷似しており、カルシウムにトリガーされるコンデンセートの区画化がナノドメインの形成機構である可能性が考えられる。

CaMKII-GluN2B のコンデンセートは結合を競合阻害する CN21 ペプチドの添加によって消失することを明らかにした。そこでシナプ스에膜透過性 CN21 ペプチドを添加することで区画化に与える影響を超高解像観察した。特に今回は AMPA 受容体と NMDA 受容体の双方のナノドメインを同時に観察する必要があるため、ボルドー大学 Daniel Choquet らとの共同研究で行った。初代培養神経細胞のシナプスを観察したところ、AMPA 受容体と NMDA 受容体は基底状態ですでに区画化されていたが、細胞膜透過性 CN21 を処理すると AMPA 受容体と NMDA 受容体の脱区画化が観察された(図2)。このことはシナプス伝達を負に調節すると考えられ、実際に電気生理学によって確かめられた細胞膜透過性 CN21 の効果と一致している。

以上の結果は 2021 年に Nature Neuroscience にて発表した(文献2)。

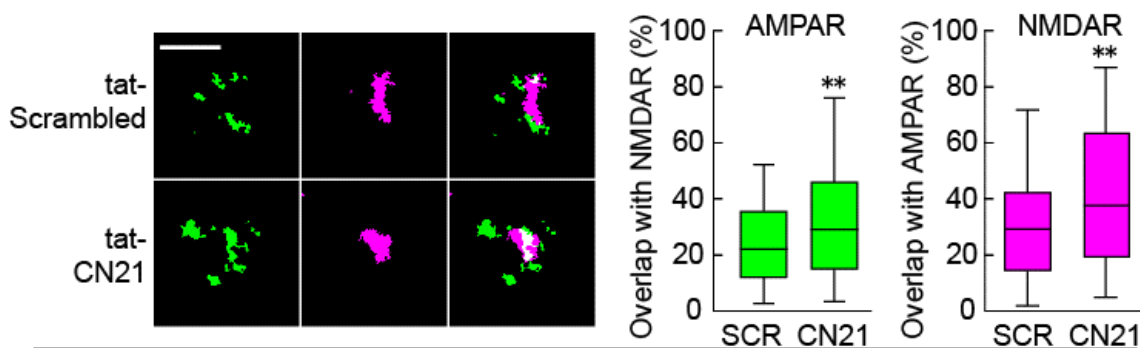


図2 .PSD におけるグルタミン酸受容体の超高解像イメージ。初代培養神経細胞では基底状態で区画化されているが、Tat-CN21 処理群では脱区画化されナノドメインの重なりが大きくなっている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hosokawa Tomohisa, Liu Pin-Wu, Cai Qixu, Ferreira Joana S., Levet Florian, Butler Corey, Sibarita Jean-Baptiste, Choquet Daniel, Groc Laurent, Hosy Eric, Zhang Mingjie, Hayashi Yasunori	4. 巻 -
2. 論文標題 CaMKII activation persistently segregates postsynaptic proteins via liquid phase separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41593-021-00843-3	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Liu Pin-Wu, Hosokawa Tomohisa, Hayashi Yasunori	4. 巻 69
2. 論文標題 Regulation of synaptic nanodomain by liquid?liquid phase separation: A novel mechanism of synaptic plasticity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Opinion in Neurobiology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.conb.2021.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 林 康紀、細川 智永、劉 品吾、實吉 岳郎	4. 巻 93
2. 論文標題 CaMKIIの新しいシナプス可塑性機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 191 ~ 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930191	査読の有無 無
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Cai Qixu, Hosokawa Tomohisa, Zeng Menglong, Hayashi Yasunori, Zhang Mingjie	4. 巻 28
2. 論文標題 Shank3 Binds to and Stabilizes the Active Form of Rap1 and HRas GTPases via Its NTD-ANK Tandem with Distinct Mechanisms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 290 ~ 300.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.str.2019.11.018	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Eriksen MS, Nikolaienko O, Hallin EI, Grodem S, Bustad HJ, Flydal MI, Merski I, Hosokawa T, Lascu D, Akerkar S, Cuellar J, Chambers JJ, O'Connell R, Muruganandam G, Loris R, Touma C, Kanhema T, Hayashi Y, Stratton MM, Valpuesta JM, Kursula P, Martinez A, Bramham CR	4. 巻 288
2. 論文標題 Arc self association and formation of virus like capsids are mediated by an N terminal helical coil motif	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 2930 ~ 2955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15618	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Hosokawa Tomohisa, Liu Pin-Wu	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation of the Stability and Localization of Post-synaptic Membrane Proteins by Liquid-Liquid Phase Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 795757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2021.795757	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 細川 智永、劉 品吾、林 康紀
2. 発表標題 CaMKIIの液-液相分離によるグルタミン酸受容体のシナプス内分離
3. 学会等名 Neuroscience2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川 智永、劉 品吾、林 康紀
2. 発表標題 CaMKIIの液液相分離によるグルタミン酸受容体のシナプス内区画化
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohisa Hosokawa
2. 発表標題 Subsynaptic segregation of glutamate receptors by CaMKII-mediated liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 Neuroscience2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	張 明杰 (Zhang Mingjie)	香港科学技術大学・Division of life science・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	- - (Cai Qixu)	香港科学技術大学・Division of life science・Researcher	

6. 研究組織（つづき）

	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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	— — (Zeng Menglong)	香港科学技術大学・Division of life science・Researcher	

	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
その他の研究協力者	— — (Choquet Daniel)	ボルドー大学・IINS・Director	
その他の研究協力者	— — (Ferreira Joana)	ボルドー大学・IINS・Researcher	
その他の研究協力者	— — (Hosy Eric)	ボルドー大学・IINS・Researcher	

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			
中国	香港科学技術大学			
フランス	ボルドー大学			