

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06576

研究課題名（和文）リン酸化酵素CaMKIIの自律的長期活性化維持機構の解明

研究課題名（英文）The mechanism for maintaining long-term activation of the protein kinase CaMKII

研究代表者

大出 晃士 (Ode, Koji)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：40612122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：自己リン酸化を通して自律的活性調整を行うCaMKII / は、神経の活動履歴を分子活性として記憶する可能性がある分子として知られる。本研究では、CaMKII / がCa²⁺/CaMによる活性化を受けた後、酵素活性がどのように維持されるのか探求した。タンパク質精製を経ずにCaMKII / の活性測定が可能となる細胞抽出液系の実験系をセットアップし、これを用いて、CaMKII / の酵素活性は活性化後30分～60分程度で抑制され、この抑制は既知の抑制性自己リン酸化とは異なるメカニズムで生じていることが示唆された。また、この活性抑制機構に影響を与える代謝産物やCaMKII / 残基の存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CaMKIIは特徴的な自己リン酸化に依存した自律的活性制御機構の存在から、“記憶分子”としてシナプス可塑性への寄与が深く研究されてきた。しかし、CaMKIIのリン酸化活性を直接測定する生化学研究の多くは、反応初速度測定や定常状態でのCaMKII-CaM相互作用測定に基づいており、CaMKIIのリン酸化活性持続時間を経時的に見積もった実験は多くない。今回、CaMKIIの活性維持機構について、既知の自己リン酸化とは異なるメカニズムの存在を示し、それに関わるCaMKII残基を見出したことで、睡眠覚醒など比較的長い時間スケールの生理現象とCaMKII活性を結び付けるための、新しい観点を提示できた。

研究成果の概要（英文）：CaMKII / , a protein kinase that regulates its activity through autophosphorylation, is known to potentially store the history of neural activity as molecular activity. In this study, we investigated how CaMKII / maintains its enzymatic activity following activation by Ca²⁺/CaM for a relatively long time duration. We utilized an 293T cell extract system to measure the kinase activity of CaMKII / without protein purification. Our measurement revealed that the kinase activity of CaMKII / was suppressed around 30 to 60 minutes after the Ca²⁺/CaM-dependent activation, and this suppression mechanism is distinct from the known inhibitory autophosphorylation. Furthermore, we found metabolites and specific residues of CaMKII / that control the suppression of CaMKII / activity.

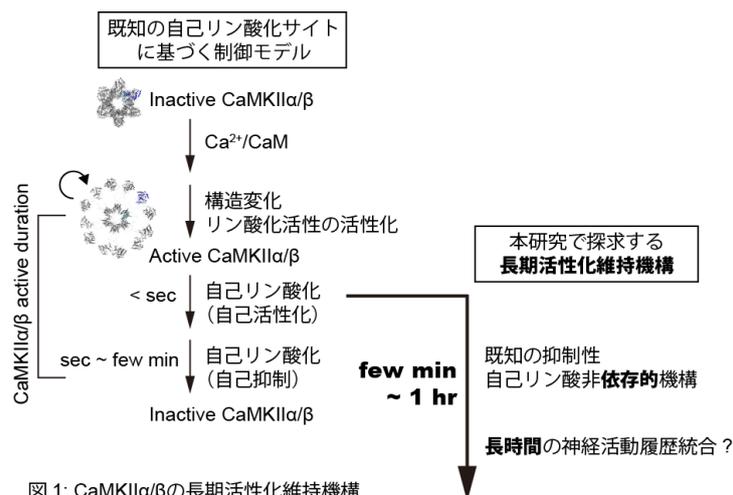
研究分野：生化学、生物物理学、時間生物学

キーワード：タンパク質リン酸化 CaMKII キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

CaMKII α/β リン酸化酵素は、シナプス可塑性をはじめとする神経機能を担う代表的な分子である。近年、申請者らは、CaMKII α/β を睡眠時間長に著明な影響を与える初の睡眠誘導型酵素として見出した (Tatsuki et al. Neuron 2016)。睡眠は、生理的には数十分から数時間の覚醒に伴う神経活動の積算として惹起される。しかし、CaMKII α/β が比較的長い時間スケールの神経活動情報をいかに積算して統合しているのかは明らかでない。CaMKII α/β の活性化タイミングは、神経発火等によって惹起された Ca²⁺ の細胞内への流入と、それによって生じる Ca²⁺/CaM の結合によって主に規定される。いったん活性化した CaMKII α/β の活性化時間長制御においては、12 量体を形成する CaMKII α/β のサブユニット間の自己リン酸化が重要とされる。CaMKII α/β には活性化や抑制に寄与する複数の自己リン酸化サイトが知られており、複雑な自己リン酸化制御を介して、リン酸化活性が自律的に制御されると考えられている (図 1)。

自己リン酸化を介した既知の CaMKII α/β 制御機構は、Ca²⁺ ダイナミクスの様態にも依存する者の、概してミリ秒から数分の間に生じる制御であるのに対して、数十分からそれ以上の時間スケールにおよぶ、遅い時定数の活性化時間長制御については未解明な部分が多い。特に、CaMKII α/β が制御する現象は、シナプス可塑性や睡眠時間長など、数分から数時間オーダーの情報の積算が必要となるものが多くあることを鑑みると、CaMKII α/β がこういった長時間の情報統合に中心的に関与するために、遅い時定数の活性化制御機構を有しているという想定は合目的のように思われる。



2. 研究の目的

そこで本研究では、CaMKII α/β が Ca²⁺/CaM による活性化を受けた後、これまでの生化学研究 (例えば酵素反応の初速度を見積もる研究) が主として着目してきた、数分以内の酵素活性ではなく、数十分からそれ以上の時間にわたって酵素活性がどのように維持されるのか (あるいはされないのか) 探求する。具体的には次の観点から研究を遂行する。

- (1) CaMKII α/β の活性化状態が維持される時間長を定量的かつ簡便に測定する実験系の確立
- (2) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える細胞内環境要因の同定
- (3) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える責任残基の同定
- (4) CaMKII α/β の活性化時間長制御残基の個体内での意義の提示

3. 研究の方法

(1) CaMKII α/β の活性化状態が維持される時間長を定量的かつ簡便に測定する実験系の確立
多変種の変異体酵素活性を効率的かつ定量的に測定するため、タンパク質の精製を必要としない培養細胞抽出液系を用いる。CaMKII α/β 発現 293T 細胞から細胞抽出液を調整し、ここに蛍光ラベルされた基質ペプチドを、Ca²⁺/CaM 添加後の任意のタイミングで加えることで、CaMKII α/β のリン酸化活性を逐次的・経時的に測定する。基質ペプチドのリン酸化状態は質量分析計および Mobility Shift Assay: MSA により分析・定量する。

(2) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える細胞内環境要因の同定

CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える細胞内の要因を調べるため、特に細胞内の低分子 (代謝産物) に着目して、それらが、上述した細胞抽出液系における CaMKII α/β 活性持続長に与える影響を定量する。

(3) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える責任残基の同定

CaMKII α/β に対する網羅的変異体ライブラリの作製を通じて、活性化時間長に影響を与える CaMKII α/β 残基を同定する。(2) において、活性化時間長に影響を与える代謝産物が見いだされたならば、その代謝産物量と活性化時間長の関係 (感受性) も指標にする。

(4) CaMKII α/β の活性化時間長制御残基の個体内での意義の提示

活性化時間長制御制御が変化した CaMKII α/β が得られた場合、変異 CaMKII α/β を発現させたマウスの表現型を、特に長い時定数の個体レベル表現型として睡眠覚醒サイクルに着目して解析する。

4. 研究成果

(1) CaMKII α/β の活性化状態が維持される時間長を定量的かつ簡便に測定する実験系の確立

タンパク質精製を経ずに活性測定が可能な細胞抽出液系を用い、CaMKII α/β の酵素活性を測定する系を構築した。まず、CaMKII α/β 発現 293T 細胞の細胞抽出液を準備し、これを長時間インキュベートした。CaMKII α/β の活性を、確立された活性化型 CaMKII α/β の指標となる自己リン酸化サイトのリン酸化抗体を用いて判定した。その結果、この抽出液系は、CaMKII α/β の自己リン酸化状態が可逆的に変遷する試験管内システムであること、および、自己リン酸化シグナルで検出される酵素活性は、Ca²⁺/CaM による CaMKII α/β 活性化後、30~60 分程度で収束することが明らかとなった (図 2)。

さらに、この活性抑制は既知の、抑制性自己リン酸化サイトを変異させた際にも生じたため、この自己リン酸化とは独立した現象であることが示された。

つぎに、この系の定量性およびスループットを向上させるため、微細流路上での電気泳動を用いた並列測定が可能な MSA 法 (Perkin Elmer 社 LabChip システム) を採用し、CaMKII α/β 発現 293T 細胞抽出液を用いたアッセイ系を構築した。クルードな細胞抽出液を微細流路上に安全にロードし、さらにペプチド基質を分離するための分離バッファー組成を検討し、図 3 で示すように、MSA 法においても発現 CaMKII α/β と Ca²⁺/CaM に依存した酵素活性を検出できるアッセイシステムを構築した (図 3)。

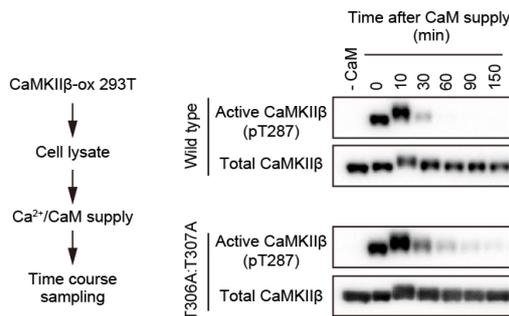


図 2: CaMKII α/β は既知の抑制性リン酸化とは関係なく、時間依存的な抑制性制御をうける

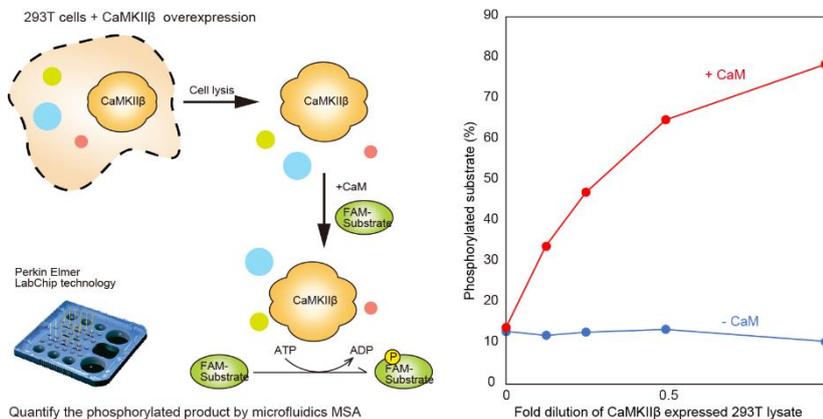


図 3: MSA アッセイによって、発現 CaMKII β レベルおよび Ca²⁺/CaM に依存したリン酸化活性を定量可能

(2) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える細胞内環境要因の同定

次に、MSA 法を用いて、細胞内の低分子化合物を中心として、CaMKII α/β の活性維持時間長に影響を与える分子を探索したところ、Ca²⁺/CaM 添加後 30~60 分後たっても、CaMKII α/β の酵素活性が高値を維持する代謝産物を見出した。この代謝産物の代謝パスウェイに存在する複数の化合物に、CaMKII α/β の活性維持効果が確認されたことから、なんらかの分子骨格が CaMKII α/β の活性維持に関与していることが想定された。

(3) CaMKII α/β 活性化時間長に影響を与える責任残基の同定

また、CaMKII α/β の特にリン酸化サイトを中心とした網羅的な変異体作製、および変異 CaMKII α/β 発現 293T 細胞抽出液を用いた MSA 法のアッセイにより、CaMKII α/β の活性維持時間が短くなったもの、より長くなったもの、の双方の変異体を得ることに成功した。この残基が、上記(2)で見いだされた代謝産物との直接的な相互作用に関与するの否かを検討することは、今後の課題である。

(4) CaMKII α/β の活性化時間長制御残基の個体内での意義の提示

特に CaMKII β について、AAV ベクターを用いて (3) で見いだされた活性化時間長に変化のある変異 CaMKII β をマウスに発現させ、その睡眠表現型を観察した。その結果、CaMKII β の活性化時間長の増減と、睡眠表現型の強弱の間に対応関係が観察された。この結果から、細胞抽出液系で観察されたリン酸化活性時間長と個体表現型の相関が示唆されたが、この関係が、(2) で示唆されたような活性化時間長制御機構に依存しているの否かを検討することは、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tone Daisuke, Ode Koji L., Zhang Qianhui, et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Distinct phosphorylation states of mammalian CaMKII control the induction and maintenance of sleep	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3001813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pbio.3001813	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 大出晃士, Zhiqing Wen, 上田泰己	4. 巻 40
2. 論文標題 睡眠覚醒制御のタンパク質リン酸化仮説	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1696 ~ 1701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7031-00001-0000171-00	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 Zhiqing Wen, 大出晃士, 上田泰己	4. 巻 -
2. 論文標題 温度変化に対する睡眠覚醒リズム応答	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 温度ストレスによる生体応答ダイナミクス	6. 最初と最後の頁 137~145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Ode Koji L., Ueda Hiroki R.	4. 巻 11
2. 論文標題 Phosphorylation Hypothesis of Sleep	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychology	6. 最初と最後の頁 575328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsyg.2020.575328	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 Yamaguchi Hiroto Q., Ode Koji L., Ueda Hiroki R.	4. 巻 24
2. 論文標題 A design principle for posttranslational chaotic oscillators	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101946 ~ 101946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101946	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 CaMKII 酵素活性を介した睡眠覚醒サイクルの制御様式
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 定量プロテオミクス分析設計の基礎と実際
3. 学会等名 JKiCセミナー 第6回質量分析講習会(招待講演)
4. 発表年 2021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

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
---------	---------