

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21463

研究課題名（和文）記憶を維持する生物学的相分離によるシグナルタンパク質の濃縮機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of signaling molecule condensation by liquid-liquid phase separation for memory maintenance

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：CaMKIIとRhoファミリーシグナル分子は生物学的相分離を起こす。試験管内での再構築実験に成功したものは、CaMKII、Pak1、LIMK1、Tiam1、betaPIX、GIT1である。これらのタンパク質はCaMKII活性化、リン酸化を引き金とし相分離することを見出した。また、海馬神経細胞にLTP誘導時におけるCaMKIIとLIMK1、Pak1との相互作用をFRET観察すると刺激に応じたシナプスでの相互作用の上昇が観察された。今後、シナプスでの相互作用が液-液相分離した液滴であるか、検証していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、記憶の長期保持をCaMKIIの相分離の観点からアプローチしたものである。CaMKIIの変異がヒトの知的能力障害や自閉症の家系に見つかり、記憶障害などの病理にも関わることがわかってきた。Rhoファミリーシグナル分子も発達障害などとの関連が見つかっており、これらの情報伝達経路が一つにつながる可能性が出てきた。つまり、CaMKIIが引き起こす相分離による長期記憶形成および維持の理解は、基礎生物学のみならず臨床医学や創薬の観点からも非常に重要である。

研究成果の概要（英文）：CaMKII and the Rho family signaling molecules underwent phase separation. We have been performed in vitro reconstitution experiments with CaMKII, Pak1, LIMK1, Tiam1, betaPIX, and GIT1. We found that these proteins were phase-separated by which activated CaMKII phosphorylated them. FRET observation of the interaction between CaMKII, LIMK1 and Pak1 during LTP induction in hippocampal neurons revealed an increase in the interaction at the synapse in response to stimulation. In the future, we plan to verify whether the synaptic interactions are mediated by the liquid-liquid phase-separation.

研究分野：神経科学

キーワード：生物学的相分離 CaMKII アクチン細胞骨格 リン酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

記憶は、脳内の神経回路網に貯蔵されると考えられている。神経回路網を構成するニューロン間の連絡はシナプスで行われ、シナプス間の連絡しやすさ(シナプス強度)を維持することで情報を維持している。記憶の細胞単位の現象である長期増強現象(LTP)は、シナプスを高頻度、短期間刺激すると、急速にシナプス強度が上昇し、それが長期間にわたり持続する現象である。LTPは、グルタミン酸受容体からのカルシウム流入、それに続くカルモデュリンキナーゼ2(CaMKII)の活性化により引き起こされ、シナプス強度が長期にわたり維持される。申請者は、刺激を受けたシナプスでLTP及び記憶を維持するメカニズムとして、CaMKIIとTiam1から構成されるシグナル複合体が一過的な刺激を長期持続性情報に変換する分子機構であることを報告した(*Neuron*, 2019; *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2019)。しかし、このシグナル複合体はタンパク質のターンオーバーによって消失してしまうため、一過的である特定の刺激を長期間維持するためにはシナプス内でのタンパク質活性を長期間維持できる何らかの変化が必要であると思われる。

最近、細胞内で特定のタンパク質の局在化や濃縮される液-液相分離(liquid-liquid phase separation)という現象が見直されている。相分離したタンパク質は細胞内で区画化されるが、分子は区画内外を移動出来る。つまり、相分離したタンパク質は分子の新陳代謝を乗り越えて酵素活性などの情報を長期間保持できると考えられる。

本研究計画は、シナプスでの情報保持機構の新しいモデルとして、CaMKIIなどのキナーゼが、刺激依存的に効果器であるシグナル分子と相分離を起こし、分子活性化状態を維持するという仮説を立てた。この仮説検証のため、以下の3つの研究計画に従って研究を進める。

研究計画1 CaMKIIとRhoファミリーシグナル分子は生物学的相分離を起こす CaMKIIとRhoファミリー経路のキナーゼ、シグナル分子が相分離を起こすか、リン酸化など刺激の影響を受けるか精製タンパク質を用いた再構成の実験系で検討する。

研究計画2 生物学的相分離による酵素反応効率化の実験的証明 光遺伝学のアプローチで光依存的な相分離を起こした場合、乖離させた場合の細胞反応を検討する(Dine et al., 2018)。

研究計画3 分子間相互作用のスパイン内での挙動の観察と光操作 生きているスパインでLTP誘導時におけるCaMKIIとLIMK1、Pak1との相互作用をFRET法で観察する。また、LTP成立後に相分離を操作した際の影響を調べる。

## 2. 研究の目的

本研究は、LTPによってもたらされる分子活性化とタンパク質間相互作用を、精製タンパク質を用いて試験管内で再構築し、それらの相分離の性質を検討するとともに、神経細胞でのタンパク質間相互作用や分子活性のライブイメージングを光操作と組み合わせてスパイン内での相互作用の挙動を調べることで、シグナル分子の相分離が記憶情報を保持するメカニズムであるという仮説を検証するものである。

## 3. 研究の方法

研究計画1 CaMKIIとRhoファミリー経路との関与

モデル分子としてLTPに関わるPak1、Rock1、LIMK1、Tiam1、betaPIX、Kalirin-7を想定してい

る (*Neuron*, 2014, 2019)。各分子は大腸菌もしくは昆虫細胞にヒスチジンタグ融合タンパク質として発現、Ni カラム、イオン交換カラム、ゲルろ過カラムで精製する。蛍光ラベルした精製タンパク質は等モル量ずつ混合し、ガラスプレパラート上でのドロップレットを顕微鏡観察する。さらに相分離は、遠心分離可能なため、リン酸化など分子活性を調べる。また、各タンパク質の相分離に必要なドメイン、アミノ酸を同定し、相分離変異体を作成する。

研究計画 2 生物学的相分離による酵素反応効率化の実験的証明 光遺伝学のアプローチで光依存的な相分離を起こした場合の細胞反応を検討する。線維芽細胞に PixD, PixE プローブを発現させ、450 nm の光刺激の細胞形態やアクチン重合への影響をモニターする。酵素活性化は、FRET プローブもしくは生化学的なリン酸化などで検討する。

研究計画 3 分子間相互作用のスパン内での挙動の観察と光操作 海馬神経細胞に PixD, PixE 融合タンパク質として発現させ、LTP 誘導時における CaMKII と LIMK1、Pak1 との相互作用を FRET 法で観察する (*Neuron*, 2014)。また、LTP 成立前後に相分離を光操作、もしくは計画 1 の相分離変異体を用いて、各相互作用、アクチン重合への影響を調べる。

#### 4 . 研究成果

本件研究計画の成功のキモは、純度の高いタンパク質を用意することであった。本研究で使用したタンパク質のうち、精製に成功したものは、CaMKII、Pak1、LIMK1、Tiam1、betaPIX、GIT1、である。これらのタンパク質のうち、CaMKII は GluN2B と CaMKII 活性化、リン酸化を引き金とし相分離する。この相分離した濃縮相には、LIMK1 や Tiam1 がクライアントとして含まれる。一方、betaPIX と GIT1 は、それ自体で液滴を形成する。後述するように、シナプスではグルタミン酸刺激によって CaMKII、Pak1、LIMK1 がそれぞれと相分離するが、インビトロの再構築実験では、Pak1 が CaMKII、LIMK1、GluN2B から排除された。すべての要素が相分離する条件を検討したところ、シナプス足場タンパク質である Shank3 を加えることで CaMKII、Pak1、LIMK1、GluN2B が betaPIX と GIT1 を含む液滴に共存できることがわかった。つまり、シグナルタンパク質のシナプスでの局在と共存には液 液相分離による液滴の形成が必要であることが考えられた。さらに、この液滴内でのリン酸化反応では、CaMKII による複数タンパク質のリン酸化とその液滴形成に対する必要性を明らかにできた。現在はリン酸化特異抗体を作製しており、神経細胞内やシナプスでのリン酸化を証明していく予定である。

研究計画 2 生物学的相分離による酵素反応効率化の実験的証明 計画 1 での液滴形成には、CaMKII の基質認識結合が必要であることをいくつかの変異体を用いて示した。また、米国 Stratton 博士との共同研究によってその基質認識様式を構造生物学的に検証し、CaMKII 側での疎水性結合ポケットの存在などを明らかにすることができた。

研究計画 3 分子間相互作用のスパン内での挙動の観察と光操作 海馬神経細胞に GFP 融合タンパク質と mCherry 融合タンパク質を共発現させ、LTP 誘導時における CaMKII と LIMK1、Pak1 との相互作用を 2 光子蛍光寿命測定顕微鏡法での FRET 反応を観察した。調べた全てのキナーゼが LTP 刺激を受けて相互作用することが観察されたが、CaMKII と下流のキナーゼ (Pak1、LIMK1) Pak1 と LIMK1、LIMK1 同士の相互作用に関しては、異なる時間軸で相互作用のピークを持つことがわかった。現在 LTP 刺激を受けた相互作用の反応時間の違いが、上記の液 液相分離による液滴の形成で説明できるか検討中である。相互作用の光操作に関して、CaMKII や LIMK1 について PixD, PixE との融合タンパク質 (Dine et al., 2018) を作製したが、細胞内で凝集した。これを防ぐようなリンカー長など最適化をしているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saneyoshi Takeo	4. 巻 170
2. 論文標題 Reciprocal activation within a kinase effector complex: A mechanism for the persistence of molecular memory	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research Bulletin	6. 最初と最後の頁 58 ~ 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2021.01.018	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 実吉岳郎
2. 発表標題 Liquid-liquid Phase Separation Determines Kinase signaling Persistency during LTP
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 / 第1回CJK国際会議（国際学会）
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
---------	---------