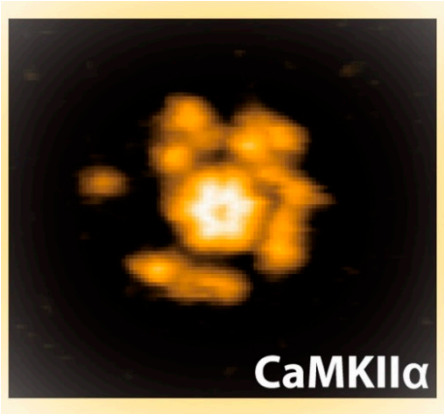
62　記憶タンパク質の1分_ナノ動態解析	柴田　幹大

【目的】脳の高次機能である、記憶の形成・忘却の詳細な分子作動メカニズムの解明は、人として幸福に人生を全うすることを助け、人類の健康寿命の延伸に大きく貢献できると考えられる。これまでの研究から、記憶・学習の細胞基盤はシナプスの長期増強（Long term potentiation : LTP）と長期抑圧（Long term depression : LTD）にあると考えられ、これらLTPやLTDの誘導には、カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼⅡ（CaMKⅡ）が重要な役割を果たすことが報告されてきた。CaMKⅡはキナーゼであると同時に、基質タンパク質としてもはたらき（自己リン酸化）、CaMKⅡの分子内にある2つのリン酸化サイトThr286とThr305/Thr306のリン酸化状態に依存して、LTPとLTDの誘導を区別する可能性が示唆されている。しかしながら、CaMKⅡの異なる部位へのリン酸化が、異なる生理機能（LTPは記憶形成、LTDは記憶忘却）をどのように生み出すことができるのか、その詳細な分子作動メカニズムは広く不明であった。本研究では、高速原子間力顕微鏡（高速AFM）をCaMKⅡに適用し、それぞれのリン酸化状態にあるCaMKⅡの1分子イメージングを試み、そのナノメートルスケールのダイナミクスから、記憶をタンパク質のリン酸化による構造変化で説明することを目的とする。

【方法】CaMKⅡ試料はHEK293細胞に過剰発現し、2種類のタグによって精製した。観察バッファー中に、Ca^{2+}/CaMとATPを加え、Thr286のリン酸化（pT286）反応を起こし、Ca^{2+}/CaM＋pT286状態のCaMKⅡの高速AFM観察を行った。また、Thr305/Thr306のリン酸化（pT305/pT306）は、pT286の後、Ca^{2+}/CaMの解離により生じるため、Ca^{2+}/CaM＋pT286状態のCaMKⅡにEGTAを加えCaMを解離させることで、pT286＋pT305/pT306状態のCaMKⅡの高速AFM観察を行った。さらに、Thr286とThr305/Thr306のリン酸化サイトをそれぞれ欠損させたT286AおよびT305A/T306V部位特異的変異体にも高速AFM観察を適用した。

【結果】野生型CaMKⅡの高速AFM観察から、CaMKⅡはハブドメインを介した12量体を形成することが分かった（図）。また、ハブ集合体には顕著な動きは観察されなかったが、各サブユニットのキナーゼドメインは、ハブ集合体の周辺を自由に動き回ることが分かり、この運動はCa^{2+}/CaMの結合（CaMKⅡの活性化）に重要であることを見出した。次に、Thr286がリン酸化した状態（Ca^{2+}/CaM＋pT286）では、キナーゼドメインの運動性は上昇するが、Thr305/Thr306もリン酸化した状態（pT286＋pT305/306）では、隣接するキナーゼドメイン同士が集合したキナーゼドメイン集合体や、ハブ集合体から遠く離れ、より活発に動くキナーゼドメインが形成することが分かった。さらに、T286AやT305A/T306V変異体の高速AFM観察より、全ての部位がリン酸化されることにより、キナーゼドメイン集合体が形成されることが分かった。また、生化学実験により、各実験条件でのCaMKⅡのリン酸化、キナーゼ活性、脱リン酸化酵素に対する耐性も明らかにした。これら生化学実験の結果と、高速AFMによる1分子イメージングの結果を統合し、12量体内のキナーゼドメインのリン酸化による構造変化が、LTPやLTDといった機能の違いを生じる分子作動機構モデルを提唱した［S. Tsujioka *et al.* **Sci. Adv.** 9, eadh 1069（2023）］。

高速原子間力顕微鏡により捉えたCaMKⅡのナノ動態



62. 記憶タンパク質の１分子ナノ動態解析

柴田　幹大

金沢大学 ナノ生命科学研究所

Key words：カルシウム／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼⅡ（CaMKⅡ），記憶学習，
長期増強，１分子イメージング，高速原子間力顕微鏡

緒　言

記憶の形成・忘却の詳細な分子作動メカニズムの解明は、人として幸福に人生を全うすることを助け、健康寿命の延伸に大きく貢献できるに違いない。これまでの研究から、カルシウム／カルモジュリン依存性プロテインキナーⅡ（CaMKⅡ）は、薬理学実験やノックアウトマウスの実験から、神経細胞内の“記憶タンパク質”と推定されてきた［1，2］。近年では、記憶の形成・忘却の細胞基盤は神経細胞シナプスの長期増強（long-term potentiation：LTP）と長期抑圧（long-term depression：LTD）であることが報告され、CaMKⅡはその両方に必須であることが分かってきた［1，2］。さらに、記憶の形成に関わる LTP には CaMKⅡの１つ目のリン酸化サイト（Thr286）のリン酸化が必要であり、忘却に関わる LTD には Thr286 に加え、2 つめのリン酸化サイト（Thr305/306）のリン酸化が必要であることが報告された［3］。これは、CaMKⅡの 2 つの異なるリン酸化状態により、記憶形成・忘却といった真逆の脳機能が発現されることを示唆するが、リン酸化によって CaMKⅡがどのように構造変化を起こし、正反対の脳機能を生じさせるのか、その分子作動メカニズムは大きな謎であった。そこで本研究は、タンパク質１分子のナノ動態をリアルタイムで直接可視化できる高速原子間力顕微鏡（高速 AFM）［4］を用い、12 量体を形成する CaMKⅡの個々のサブユニットのリン酸化に伴う構造変化を可視化し、CaMKⅡがもつ、リン酸化による記憶形成・忘却の分子作動メカニズムの解明を試みた。その結果、(i) CaMKⅡのキナーゼドメインの運動（揺らぎ）が CaMKⅡの活性化に重要であること。（ii）Thr286 がリン酸化した状態（Ca^{2+}/CaM＋pT286）では、キナーゼドメインの運動性は上昇するが、Thr305/306 もリン酸化した状態（pT286＋pT305/306）では、キナーゼドメイン集合体と、より活発に運動するキナーゼドメインの両方が形成されること。（iii）T286A や T305A/T306V 変異体の高速 AFM 観察より、3 つの部位が全てリン酸化されることで、キナーゼドメイン集合体が形成されることを明らかにした。さらに、生化学実験による機能解析と合わせて、高速 AFM による CaMKⅡの１分子イメージングから、CaMKⅡ12 量体内のキナーゼドメインのリン酸化による構造変化が、LTP や LTD の機能の違いを生み出すモデルを提唱した［5］。

方　法

1. 実験試料

野生型および T286A、T305A/T306V 変異体 CaMKⅡは、HEK293 細胞を用いてタンパク質発現を行い、2 種類のタグにより高純度な精製試料を得た。

2. 高速 AFM 観察

高速 AFM は自作の装置を使用し、AFM 基板の表面を弱い正に帯電させるため、ピラーアレーン（P[5]A＋）をマイカ表面へ修飾した。Ca^{2+}/CaM＋pT286 状態の CaMKⅡの高速 AFM 観察には、観察バッファーに Ca^{2+}/CaM と ATP を加え 30℃で 5 分静置し、Thr286 のリン酸化（pT286）反応が完了した後の試料を AFM 基板上へ展開し、高速 AFM 観察を行った。また、pT286＋pT305/pT306 のリン酸化状態は、pT286 状態の試料に対し EGTA と ATP を加え 30℃

で 5 分静置し、pT286＋pT305/pT306 のリン酸化反応が完了した CaMKⅡ試料に対して高速 AFM 観察を行った。Thr286 と Thr305/Thr306 のリン酸化サイトをそれぞれ欠損した T286A および T305A/T306V 変異体にも同様の手順を施し、高速 AFM 観察を行った。また、高速 AFM で使用した試料に対して、同様の手順で生化学実験を行い、Thr286 と Thr305/Thr306 のリン酸化状態をウエスタンブロッティングにより確認した。

結果および考察

1. 基底状態（自己抑制状態）における CaMK2.Ⅱのナノ動態

最初に、ラット由来の CaMKⅡに高速 AFM を適用した。その結果、CaMKⅡは主に 12 個の分子がリング状に集合し、美しい花びらのような多量体構造を取ることが分かった（図 1）。CaMKⅡの中心には各分子をつなぎとめるハブ集合体があり、その周囲には、基質タンパク質をリン酸化するキナーゼドメインが点在し、ハブ集合体に対して円周方向へ自由に動く様子が動画撮影された。また、CaMKⅡの阻害剤であるボスチニブの添加により、キナーゼドメインの動きが大きく抑制されることが分かった。さらに、このキナーゼドメインの動きと、CaMKⅡのキナーゼ活性を引き起こす Ca^{2+}/CaM の結合との相関を明らかにするため、2 光子蛍光寿命イメージング顕微鏡法（2pFLIM）を用いて、ボスチニブが CaMKⅡのキナーゼ活性をどのように阻害するのかを調べた。その結果、ボスチニブの結合により、Ca^{2+}/CaM の CaMKⅡへの結合が著しく阻害されることが分かった。ボスチニブはもともと ATP の競合的阻害剤と考えられていたが、CaMKⅡの ATP 結合サイトに強く結合することで、キナーゼドメインと自己抑制セグメントとの親和性を高め、Ca^{2+}/CaM を結合しにくい構造へと変化させたと考えられる。このように、高速 AFM で可視化されたキナーゼドメインのハブ集合体周辺での動きは、Ca^{2+}/CaM の結合、つまり CaMKⅡの活性化において重要な役割を果たすことを見出した。

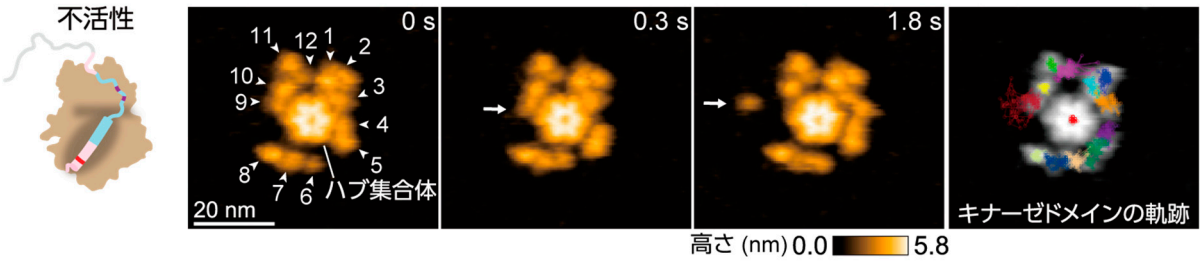


図 1. 基底状態（自己抑制状態）の CaMKⅡの連続した高速 AFM 画像
CaMKⅡは 12 個のサブユニットがハブ集合体を介して多量体を形成している。ハブ集合体の周りにはキナーゼドメインが点在し、自由に動き回る様子が撮影された。各キナーゼドメインの軌跡（右）。高速 AFM の時間分解能は 0.3 s/frame。スケールバー：20 nm。

2. 第 1 のリン酸化状態（pT286）における CaMKⅡのナノ動態

次に、CaMKⅡの Ca^{2+}/CaM 結合状態の高速 AFM 観察を試みた。その結果、ハブドメインとキナーゼドメインの間に、Ca^{2+}/CaM が結合した様子が観察され、キナーゼドメインの位置が 12 量体のリング構造の外側に約 3 nm 伸びることが分かった。この伸長構造では、キナーゼドメインの運動は制限され、リング内で隣接するサブユニットへのリン酸化を容易にする構造をとることが示唆された。さらに、ATP を加え、1 つ目のリン酸化反応が起こる条件（pT286）で高速 AFM 観察を行ったところ、Ca^{2+}/CaM の結合による伸長構造は維持されたままであったが、キナーゼドメインの運動性は自己抑制状態と同様の自由に動ける状態へ戻ることがわかった（図 2）。この結果は、Ca^{2+}/CaM の結合によってキナーゼドメインの移動範囲が一時的に制限されるが、Thr286 のリン酸化により、その制限が解除され、広範囲に運動可能な構造へと変化すると考えられる。

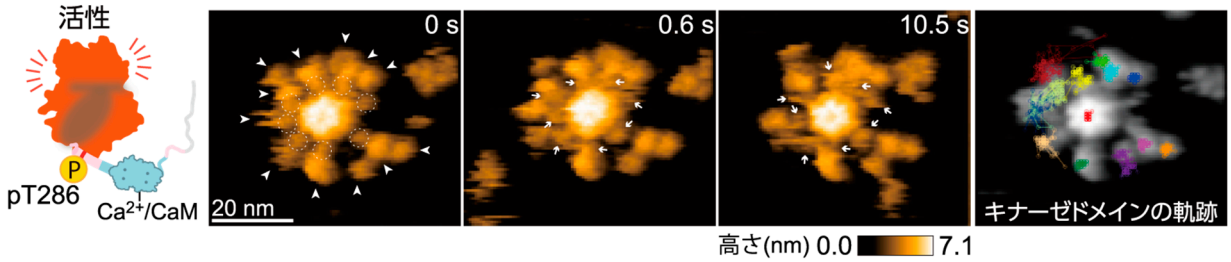


図 2.　Ca^{2+}/CaM 結合＋pT286 状態の CaMKⅡの連続した高速 AFM 画像
白点線（0 s）と白矢印（0.6 s 以降）は CaMKⅡへ結合した Ca^{2+}/CaM を示す。各キナーゼドメインの軌跡（右）。高速 AFM の時間分解能は 0.3 s/frame。スケールバー：20 nm。

3. 第 2 のリン酸化状態（pT286＋pT305/pT306）における CaMKⅡのナノ動態

さらに、残りのリン酸化（Thr305/Thr306）により生じる CaMKⅡの構造ダイナミクスを可視化するため、Ca^{2+}/CaM＋pT286 状態の CaMKⅡに、EGTA を加え、Ca^{2+}/CaM の解離を促し、Thr305/Thr306 を露出させ、pT286/pT305/pT306 状態の CaMKⅡの高速 AFM 観察を行った。その結果、中心のハブドメインから遠く離れ、非常に活発に動くキナーゼドメインと、12 量体内で隣り合うキナーゼドメインが集合する様子（キナーゼドメイン集合体）の両方が観察された（図 3）。また、リン酸化サイトを欠損した T286A や T305A/T306V 変異体を用いた実験から、Thr286/Thr305/Thr306 の 3 箇所すべてがリン酸化された場合にのみ、キナーゼドメイン集合体が形成されることが分かった。キナーゼドメインの運動性の上昇は、CaMKⅡのリンカー部位のリン酸化が、リンカー部位の 2 次構造を破壊し、ディスオーダー領域（IDR）へと変化したことに由来すると考えられる。また一方で、IDR は液液相分離の形成に重要であることが報告されており、IDR へと変化したリンカーにより、CaMKⅡの 12 量体内で局所的な液液相分離が生じ、一部のキナーゼドメインは集合体を形成したと推測できる。

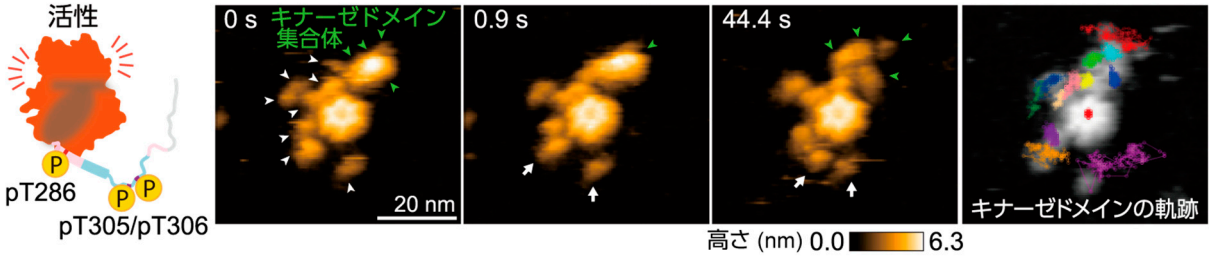


図 3.　pT286＋pT305/pT306 状態の CaMKⅡの連続した高速 AFM 画像
緑の矢じりはキナーゼドメイン集合体を示し（0 s）、白矢印はハブ集合体から遠くはなれ、運動性の高いキナーゼドメインを示す。各キナーゼドメインの軌跡（右）。高速 AFM の時間分解能は 0.3 s/frame。スケールバー：20 nm。

4. 先祖型 CaMKⅡのナノ動態

CaMKⅡは、多くの細胞種の Ca^{2+}シグナル伝達において最も重要なタンパク質の 1 つであり、さまざまな動物種において高度に保存されている［6］。そこで、我々は高速 AFM で可視化されたラット由来の CaMKⅡのキナーゼドメインのナノダイナミクスが他の種の CaMKⅡでも保存されているのかを調べた。その結果、ヒドラや線虫などの先祖型 CaMKⅡにおいても、基底状態（自己抑制状態）において、キナーゼドメインはハブ集合体の周りを自由に動き、キナーゼ活性状態である Ca^{2+}/CaM 結合や Thr286 リン酸化状態では、ラット由来の CaMKⅡと同様の伸長構造が観察された。しかしながら、興味深いことに、先祖型 CaMKⅡの Thr286/Thr305/Thr306 リン酸化状態では、ラット由来の CaMKⅡで観察されたキナーゼドメイン集合体は観察されなかった。

このラット由来の CaMKⅡで生じるキナーゼドメイン集合体は、動物が進化する過程で獲得した哺乳類に特有の分子構造であると考えられる。そこで、我々はキナーゼドメイン集合体の機能解析を試みた。まず、キナーゼドメイン集合体を形成するラット由来の野生型 CaMKⅡと、形成しない T305A/T306V 変異体および先祖型 CaMKⅡのキナーゼ活性を比較した。その結果、両者の間には有意な差はなかった。つまり、キナーゼドメイン集合体はキナーゼ活性能には影響がないと考えられる。次に、CaMKⅡの活性をオフにする脱リン酸化酵素に対する耐性を調べた。その結果、キナーゼドメイン集合体を形成するラット由来の野生型 CaMKⅡと、形成しない T305A/T306V 変異体では、優位な差は見られなかったが、先祖型 CaMKⅡと比べると、ラット由来の CaMKⅡの方が脱リン酸化酵素に対する強い耐性を優位に示した。これらの結果からでは、キナーゼドメイン集合体と脱リン酸化酵素に対する耐性に明確な相関があるとは言えず、現時点ではキナーゼドメイン集合体の生理的な意義は不明である。しかし、過去の研究から推測すると、CaMKⅡの神経細胞内での移動や局在化に関与している可能性が考えられる。これまでの研究では、CaMKⅡが pT305/pT306 状態にあると、シナプス後肥厚（postsynaptic density：PSD）との結びつきが低下すること、抑制性シナプス領域へと移動することが報告されている［3］。もしかしたら、pT286/pT305/pT306 状態でのキナーゼドメインの集合によって、PSD との結びつきが弱まり、別の場所へ移動できるようになるのかもしれない。つまり、キナーゼドメイン集合体は CaMKⅡが神経細胞内で必要な時に必要な場所へ移動するための分子メカニズムである可能性を示唆する。

一方で、pT286/pT305/pT306 状態は、哺乳類に特有の脱リン酸化酵素への耐性を示した。なぜ異なる種でこのような耐性が生じるのかはまだ解明されていないが、高速 AFM 観察によると、ラット由来の CaMKⅡにおいては、pT286/pT305/pT306 状態でのキナーゼドメインの移動範囲が、先祖型の CaMKⅡと比較して狭いことが明らかとなった。もしかしたら、ラット由来の CaMKⅡでは、キナーゼドメインとハブ集合体の間のリン酸化部位に十分なスペースがなく、脱リン酸化酵素がアクセスしにくくなることで、耐性が生じるのかもしれない。この耐性によって、哺乳類の CaMKⅡはその活性を長期間にわたって維持することが可能となり、先祖型の動物とは異なる神経活動を実現できる可能性がある。特に、Thr286/Thr305/Thr306 のリン酸化は LTD（記憶の忘却）に関与することが報告されている［3］。したがって、哺乳類は CaMKⅡのリン酸化を通じて、美しい花びら形態から伸長構造やキナーゼドメイン集合体といった、さまざまな構造へと変化する能力を獲得したことにより（図 4）、LTD の発生、最終的には記憶の忘却能力を獲得したのかもしれない。

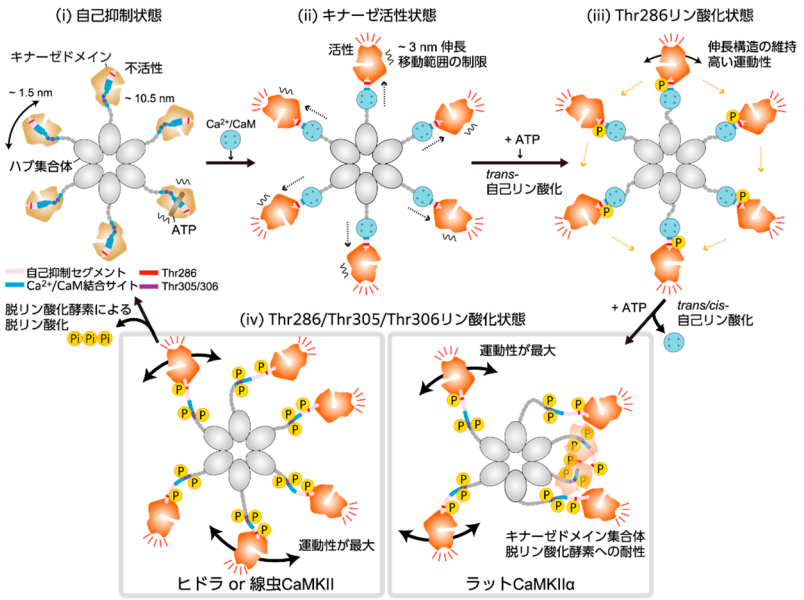


図 4. 高速 AFM 観察より明らかとなったリン酸化状態に依存した CaMKⅡの構造変化モデル
CaMKⅡのキナーゼドメインとリンカー部分がリン酸化に伴って構造変化する様子を明らかにし、このようなキナーゼドメインの運動性の変化が、CaMKⅡの機能に重要であることを明らかにした。

本研究では、記憶の形成や忘却を担うCaMKⅡのリン酸化に伴う多様な構造変化の直接観察を行った。特に、ラット由来のCaMKⅡにおいて、pT286/pT305/pT306状態では、キナーゼドメイン集合体が観察され、先祖型CaMKⅡと比べて脱リン酸化酵素に対する耐性を持つことが明らかとなった。しかし、キナーゼドメイン集合体の生理的な意義や種によるキナーゼドメイン集合体の生成メカニズムについては、さらなる検証が必要である。また、シナプスを構成するタンパク質は数百種類存在し、記憶の形成や忘却を分子レベルで完全に理解するためには、他のシナプスタンパク質のはたらく姿やCaMKⅡと協働してはたらく姿も明らかにする必要がある。高速AFMを用いた1分子イメージングがその一端を担える可能性があり、今後も引き続き研究を進めていきたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、自然科学研究機構生理学研究所脳機能計測・支援センター多光子顕微鏡室の村越秀治博士である。

文　献

1) Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. Nat. Rev. Neurosci. 2012 Feb 15;13(3):169-82. PMID: 22334212 DOI: 10.1038/nrn3192.

2) Bayer K U, Schulman H. CaM kinase: Still inspiring at 40. Neuron. 2019 Aug 7;103(3):380-394. PMID: 31394063 DOI: 10.1016/j.neuron.2019.05.033.

3) Cook S G, Buonarati O R, Coultrap S J, Bayer K U. CaMKII holoenzyme mechanisms that govern the LTP versus LTD decision. Sci. Adv. 2021 Apr 14;7(16):eabe2300. PMID: 33853773 DOI: 10.1126/sciadv.abe2300

4) Ando T, Kodera N, Takai E, Maruyama D, Saito K, Toda A. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 23;98(22):12468-72. PMID: 11592975 DOI: 10.1073/pnas.211400898. Epub 2001 Oct 9.

5) Tsujioka S†, Sumino A†, Nagasawa Y†, Sumikama T, Flechsig H, Puppulin L, Tomita T, Baba Y, Kakuta T, Ogoshi T, Umeda K, Kodera N, Murakoshi H*, Shibata M*. Imaging single CaMKII holoenzymes at work by high-speed atomic force microscopy. Sci. Adv. 2023 Jun 30;9(26):eadh1069. PMID: 37390213 DOI: 10.1126/sciadv.adh1069. Epub 2023 Jun 30.

6) Chao L. H, Stratton M. M, Lee I. H, Rosenberg O. S, Levitz J, Mandell D. J, Kortemme T, Groves J. T, Schulman H, Kuriyan J. A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human Ca^{2+}/calmodulin- dependent kinase II holoenzyme. Cell. 2011 Sep 2;146(5):732-45. PMID: 21884935 DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.038.