

別刷

Experimental Medicine

Vol.42-No.7 2024

実験医学 増刊

www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/



大規模データ。
AIが切り拓く

脳神経科学

編集 = 笠井清登, 榎本和生

見えてきた

行動、感情、記憶の神経基盤と

精神・神経疾患の

生物学的なサブタイプ

羊土社

9. 記憶, シナプス, 液-液相分離

細川智永, 實吉岳郎, 林 康紀

シナプスでは一過的な刺激が持続性情報へ変換されることで伝達効率が維持される。この性質をシナプス可塑性とよぶ。この過程で重要な役割を担うのが、カルシウム/カルモジュリン依存性リン酸化酵素Ⅱ (calcium-calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ, CaMK Ⅱ) である。本稿では、CaMK Ⅱが制御するシナプス機能についてタンパク質相互作用による生化学的な酵素活性のポジティブループ形成や、シナプスでつくられる液-液相分離とナノカラム形成による神経伝達物質の受け渡しの効率化など最新の知見を概説する。

はじめに

1973年にBlissとLomoが代表的なシナプス可塑性現象である長期増強現象 (long-term potentiation, LTP) を実験的に示してから半世紀の50年が経った¹⁾。これまでに記憶の重要な機構の多くがLTPをモデルとして明らかにされてきた。同時に記憶分子の探索も精力的に進められたが、1つの分子が記憶を担うという状況にはいまだ至っていない。そのなかでその発見から40年がたったCaMK Ⅱは、記憶分子の候補の1つとしていまなお新しい発見があり多くの神経科学者や生

化学者を魅了している^{2) 3)}。本稿では、記憶の基盤であるシナプス可塑性に関して、CaMK Ⅱの構造、機能を概説し、タンパク質相互作用、液-液相分離、AIによる構造生物学、などわれわれの研究を中心に最近の研究動向を含めて紹介する。

1 記憶形成の最小単位はシナプスである

学習によって得られる行動変化がその種や個体の生存確率を高める。この学習によって獲得される行動変化は、学習や経験したことを体内に記憶し、必要ときに想起することによってはじめて実現する。われわれヒトをふくむ高等生物では、多くの場合、脳に記憶情報が保存されるが、どのように記憶が保存されているかは明らかでない。記憶情報は脳内の神経回路に保持されていることが示されているが、その回路を構成する最小単位が神経細胞間を接続するシナプスである。つまり、神経回路はシナプスに記憶を保持しているとも考えることができる。シナプスには状況に応じて伝

【略語】

CaMK Ⅱ : calcium-calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ (カルモジュリン依存性リン酸化酵素Ⅱ)

LLPS : liquid-liquid phase separation (液-液相分離)

LTD : long-term depression (長期抑圧現象)

LTP : long-term potentiation (長期増強現象)

PSD : postsynaptic density (シナプス後膜肥厚)

Memory, synapse, and liquid-liquid phase separation

Tomohisa Hosokawa/Takeo Saneyoshi/Yasunori Hayashi : Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Kyoto University (京都大学大学院医学研究科システム神経薬理学分野)

達効率が変化するシナプス可塑性と呼ばれる性質がある。したがって記憶の基盤概念の1つであるシナプス可塑性を研究し、記憶の素子を理解することが記憶のメカニズムの解明につながっていく。

2 シナプス構造は変化する

よく知られているシナプスの可塑性現象には、LTPと長期抑圧現象 (long-term depression, LTD) がある。LTPは高頻度刺激を受けたシナプスでのシナプス強度が増強し、持続する現象である。また、LTDは、低頻度刺激に反応して起こるシナプス強度が持続して低下する現象である。電気生理学的に測定できるシナプス強度だけではなく、シナプス形成の場である樹状突起スパインのサイズもLTPに伴って拡大し、LTDでは縮小する。シナプスサイズとシナプス強度は正の相関を示し、シナプスには機能的な可塑性と構造の可塑性があることが知られている。

3 CaMK II は記憶分子である

海馬でみられるLTPはNMDA型グルタミン酸受容体からのカルシウム流入によってCaMK IIが活性化することで引き起こされる³⁾。CaMK IIはカルモジュリンの結合によって立体構造が変化し、自己阻害が解除され触媒部位が露出することで活性化する。その後のT286の自己リン酸化によって活性化型立体構造が固定されカルシウム非依存的な酵素活性を獲得する。この性質によってCaMK IIはカルシウム上昇のイベントを酵素活性として記憶する「記憶分子」として認識されてきた。CaMK IIの活性化がLTP成立に必要な十分条件であることは、阻害剤、ノックアウト、ノックダウンでLTPが消失すること、さらに、活性化CaMK IIの強制発現や微量注入でLTPが誘導されることで示されてきた⁴⁾。ところが、記憶形成時やLTPにおけるCaMK IIの分子活性が記憶情報としてどの程度持続するか、また基質は何かについては、いまだ論争中である。そればかりではなく、基質をリン酸化する活性は必要ではなく、最近ではカルシウム依存的な構造因子として機能するという説も登場している⁵⁾。

CaMK IIは脳のなかでも非常に多く発現するタンパ

ク質であり、その量は細胞骨格タンパク質に匹敵する。1つのキナーゼ分子がCaMK IIはいくつもの基質をリン酸化できるため、もしキナーゼとしての機能のみが重要であればこのようにたくさんある必要はない。また2量体を単位とし、6~7単位が回転対称形に重合した12~14量体をとるが、この生物学的意義はよくわかっていなかった。

4 シナプス構造可塑性を制御するアクチン細胞骨格

興奮性神経細胞ではシナプスは樹状突起にあるスパインに存在する。スパインはアクチンの豊富な構造体で、LTP誘導に伴いアクチン重合が亢進し、スパイン体積を増大させる⁶⁾。アクチンの制御においてはRho-GTPaseがCaMK IIの下流で働く主要な効果器と考えられる^{7) 8)}。ところでLTP誘導時、スパインでのカルシウム上昇やCaMK IIの活性化が一過性であるのに対して、Rho-GTPaseの活性、アクチン重合の亢進、スパインの体積変化は持続性である。このCaMK IIとRho GTPaseとの間に一過性から持続性へのシグナル変換点があると考えられる。これはどのように実現されているのだろうか。

5 CaMK II と Tiam1 は相互に活性化し合うシグナル複合体である

CaMK IIはカルシウム依存的にRac guanine nucleotide exchange factor (RacGEF)であるTiam1と結合し、安定した相互作用をする。興味深いことにTiam1のCaMK II結合部位はCaMK IIの自己阻害領域と相同性がみられ、Tiam1との結合はCaMK IIの自己阻害領域と触媒領域の分子内相互作用と競合することで、自己阻害が解除されてCaMK IIが活性化する(図1)。一方、Tiam1はCaMK IIの基質でありリン酸化されることで活性化する^{8) 9)}。つまり、CaMK IIとTiam1の結合は、互いを活性化し合う酵素と基質のシグナル複合体 (reciprocally-activated kinase-effector complex, RAKEC)であり⁴⁾、この活性化のループによって一過的なシグナルを持続性のRac活性へと変換する。活性化されたRacはアクチンを制御することで、スパイン

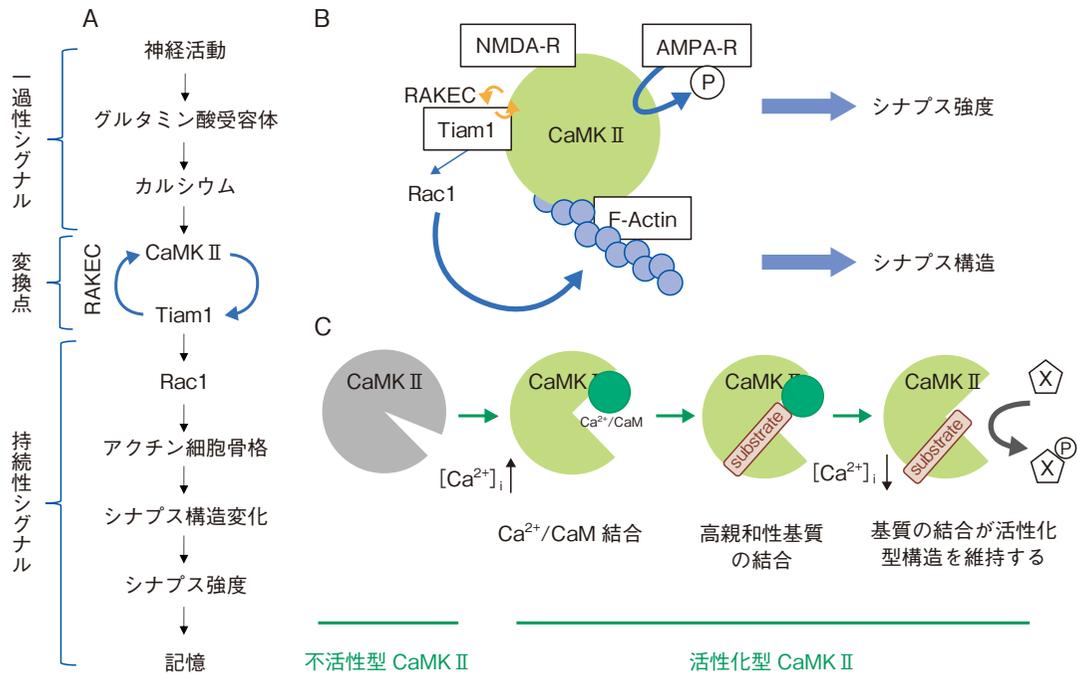


図 1 CaMK II とシナプス可塑性制御

A) 神経活動によって活性化するシグナル伝達経路。カルシウムによって活性化したCaMK IIはTiam1と相互作用し、お互いを活性化しあう酵素基質複合体 (RAKEC) によって、一過性シグナルを持続性シグナルへと変換する。B) CaMK IIはシナプス可塑性の中心分子である。CaMK IIはAMPA型グルタミン酸受容体を介してシナプス強度を増強する。またアクチン細胞骨格を介してシナプス構造を増大、維持する。C) 活性化型を維持するCaMK IIと高親和性基質との相互作用のモデル。X: CaMK IIの基質タンパク質、P: リン酸化。

体積の増大を持続させていると考えられる。いまのところ、シナプスでの持続性のCaMK II活性はこれまでのFRETセンサーでは検出できていない^{8) 10)}。今後、CaMK IIのFRETセンサーの高感度化や超解像度化が進めば、シナプス局所でのCaMK IIの持続性成分が検出されると思われる。

6 CaMK IIが特定の基質との結合によって酵素活性を獲得するしくみ

Tiam1やNMDA型グルタミン酸受容体GluN2BサブユニットなどのT-site結合基質とよばれていたタンパク質はCaMK IIのキナーゼ領域の基質認識部位の静電気力と疎水性結合を利用して相互作用し、基質の結合としては K_D $1 \mu M$ より強い親和性をもつ¹¹⁾。このことから、CaMK IIとTiam1の複合体が Ca^{2+} 非依存的な活性を持つしくみとしては、CaMK IIの分子構造が不活

性状態に戻るより早く基質と結合するため、活性化型構造をとり持続性酵素活性を獲得するものと考えられる。これまでTiam1以外にもNMDA受容体サブユニットGluN2B、足場タンパク質Densin-180、低分子量Gタンパク質Remなどに同様な結合がみられる。これらをCaMK II-associated proteins (CaMKAPs) というが³⁾、それらをカルシウム依存性にクロスリンクすることが、脳組織で大量にCaMK IIが存在する理由なのかもしれない。

7 PSDのナノドメインとナノカラム

シナプス後膜肥厚 (postsynaptic density, PSD) とは電子顕微鏡でシナプス膜直下にみられるタンパク質の密集した領域として定義されるが、STORMなどの超高解像顕微鏡技術の発展によりAMPA型グルタミン酸受容体をはじめとしたシナプスタンパク質群がPSD

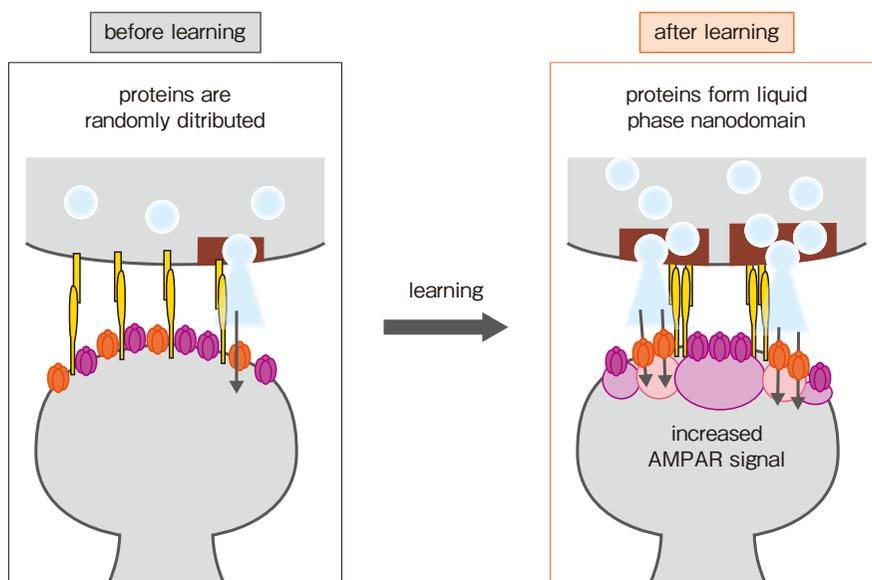


図2 ナノドメインとナノカラム

ランダムに分布していた AMPA 受容体 (赤, 左) は興奮性刺激により数十分子が集めたナノドメインを形成する (右). 同様に, NMDA 受容体 (紫), PSD-95, RIM (茶) などが同様にナノドメインを形成することがわかっている. またこれらは別々に存在するのではなく, AMPA 受容体と PSD-95 がグループをつくっていたり, 逆に NMDA 受容体とは排斥し合っていたり, 前シナプス終末の RIM の位置とアライメントされていたり, クロストークが存在している.

上で均一に分布しておらず, タンパク質の種類ごとに集合した領域を形成していることが明らかになっている¹²⁾. これをナノドメインといい (図2), シナプス活動に応じて形成される動的な構造である. またこの領域はさらにシナプス前終末の伝達物質放出部位とアライメントされナノカラムとよばれる構造をつくっている (図2)¹³⁾. 特に AMPA 型グルタミン酸受容体はグルタミン酸への親和性が低く, 通常はシナプス伝達時にもグルタミン酸で飽和しないことから¹⁴⁾, このようなシナプスタンパク質のナノスケールの局在の調節自体にシナプス伝達の効率を変化させる役割があると考えられていた.

8 液-液相分離とナノドメイン

細胞内のナノスケールの分子の局在を規定するメカニズムとして最近着目されているのが液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS) である¹⁵⁾. これは水と油のように液体と液体が分離し, それぞれ別々の集合を形成する物理現象である. 集合体内部での高

い流動性, 内外での分子の交換, 他の構造体との融合・付着・分離, 細胞内環境変化に応じた集合や離散などを通じてさまざまな細胞生理機能を担っている. これは細胞骨格タンパク質における重合や, 神経変性疾患でみられる凝集とは異なる新たな集合様式であり, これまでの1:1の結合では説明のできなかった分子動態を説明できるようになってきていた.

この現象が神経細胞でも重要な細胞機能を担うことがわかってきている¹⁶⁾. PSDにおいても, PSD-95, GKAP, Homer, Shankなどの足場タンパク質とNMDA受容体サブユニットGluN2BおよびAMPA型グルタミン酸受容体補助サブユニットStargazinの細胞内ドメインを精製し混合すると, 天然変性領域やマルチドメイン構造による多価の結合を通じた液-液相分離により液体様の性質を示す動的な生体分子集合体を形成することが明らかとなった¹⁷⁾. このことは生体内のPSDとナノドメインが動的な構造体である事実と一致している. 生体内のPSDが実際に液相の生体分子集合体であるかどうかにはさらなる検討の余地があるが, PSDという集合体の流動性や可塑性を合理的に説明してお

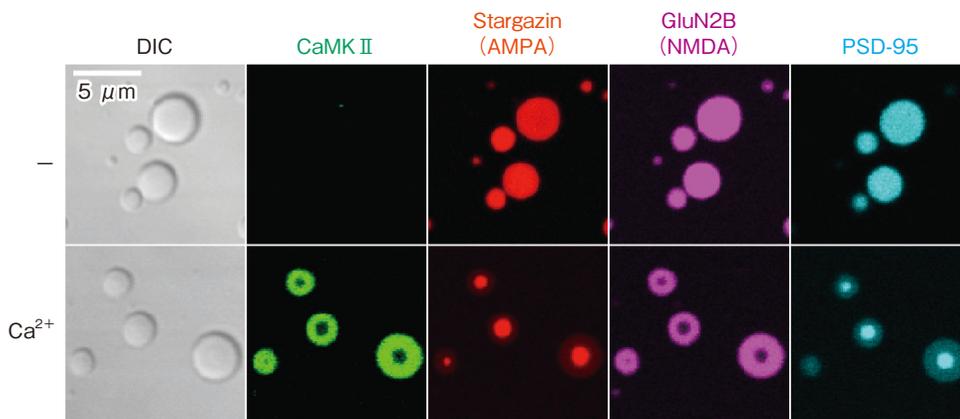


図3 精製タンパク質によるナノドメイン形成の再現

カバーガラス上に形成した生体分子凝縮体の共焦点顕微鏡画像。刺激前は一樣に分布していたStargazin (AMPA 受容体) やGluN2B (NMDA 受容体) はカルシウム刺激によりそれぞれ異なるナノドメインへ分離した。この際、PSD-95はAMPA 受容体, CaMK IIはNMDA 受容体とグループを形成していた。このことは、興奮性刺激によるカルシウムイオンの細胞内流入により、AMPA 受容体またはNMDA 受容体に受容される伝達物質の量が変化することを示唆している。

り、いずれにしろ類似の物理作用によって形成・維持されていると予想される。

9 液-液相分離とシナプス可塑性

この現象はシナプスの可塑性にも密接に関連していると考えられている。活性化型立体構造のCaMK IIはNMDA 受容体サブユニットGluN2Bと結合しLLPSを引き起こし、両者の集合体を形成することが報告されている¹⁸⁾。この集合体はATPの非存在下では自己リン酸化が起こらないのでカルシウムイオンのキレートにより離散するが、ATPの存在下では自己リン酸化により活性化型構造が維持され、結果として集合体も維持される。このことはすなわちシナプスの活性がタンパク質集合体という情報に固定されたことを意味しており、生体分子集合体が記憶素子として機能する可能性を示唆している。

ところで、水と油が混ざらないように、LLPSで生じる集合体も物性に応じて混ざるものと混ざらないものが存在する。PSDにおいても、興味深いことにCaMK II-GluN2Bの集合体とPSD-95-stargazinの集合体は統合された集合体を形成しつつ内部で混ざりあわない(図3)。われわれはこれがPSD内部での特定のタンパク質の集合として定義されるナノドメインに類似している

ことに気づいた。このことは、ナノドメインがLLPSによって形成される液相の集合体同士の混ざらない構造体として定義でき、受容体のナノスケールの局在調節と集合・離散を介したシナプス強度の調節機構を担っていることを示唆している。

10 AI活用による結合と相分離の予測

PSDのLLPSナノドメインの研究ははじまったばかりである。PSDに何種類かのナノドメインが存在し、どのPSDタンパク質がどこに属するか、学習時にどういった再構成が起きるのかの全貌は全く不明である。それを明らかにするためにはそれぞれのタンパク質の立体構造とタンパク質同士の複雑な相互作用を紐解く必要があるが、生化学的にはほぼ不溶なほど高度に凝縮しているPSDでは従来の相互作用解析は通用しにくい。そこで、われわれがAIを活用して進めている解析の一部を紹介したい。AlphaFold-Multimerは複数のタンパク質の立体構造と最も合理的な結合インターフェイスを予測するAIとして広く利用されている。これを利用し、それぞれの液相ナノドメイン形成のドライバーとなる因子(PSD-95, Shank, Homer, CaMK IIなど)と既知のPSDタンパク質を組み合わせ総当たりで結合インターフェイスを予測し、そのなかからより既知の結

合と類似するもの（例えばPDZドメイン結合モチーフなど）をピックアップすることでスクリーニングすることができる。また、逆のアプローチも考えられる。すなわち、既知の結合インターフェースの配列1つずつに変異を挿入したペプチドを全種類のアミノ酸分用意し、それらの結合インターフェースをAlphaFold-Multimerで予測する。こうすることで結合の条件が決定でき、その条件に当てはまる配列を全PSDタンパク質からスクリーニングできる。この手法は特にPDZドメイン結合モチーフのように配列の長さがある程度決まっている配列に有効である。われわれはこれまでにこれらのアプローチを用いて、実験的に実際に強力な結合がみられる未報告の組み合わせを複数同定している。

AIを用いることでそれらが相分離を駆動するかどうかもある程度予測することができる。相分離の駆動力となるのは、タンパク質の天然変性領域またはマルチドメイン構造による多価の結合で、その解離定数が適切な範囲内（通常100 nM～10 μMの範囲）である場合に顕著である。解離定数は現在のところ実験的に計測するのが確実であるが、天然変性領域やマルチドメイン構造であるかどうかを予測するAIはすでに存在している。それらの情報は多くの場合すでにUniProtなどのデータベースに登録されており、スクリーニングされた配列が天然変性領域であるかどうか、そのタンパク質がマルチドメインかどうかを調べることで相分離の起こしやすさの目安を得ることができる。われわれも、相分離を起こしやすいと思われるタンパク質を優先して実験的な計測を進めている。

おわりに

今回はシナプスサイズの調節とPSDの再編成、およびそれらの研究を促進するためのAI活用事例について紹介した。われわれにとってAIを用いた解析は初挑戦であり、手探り状態で解析を進めているが、それでも強力な結合を示す未報告の組み合わせを同定できている。今後もAIの利用がますます重要になっていくことは明白であり、注視を続けていきたい。

文献

- 1) Bliss TV & Lomo T : J Physiol, 232 : 331-356, doi:10.1113/jphysiol.1973.sp010273 (1973)
- 2) Bayer KU & Schulman H : Neuron, 103 : 380-394, doi:10.1016/j.neuron.2019.05.033 (2019)
- 3) Yasuda R, et al : Nat Rev Neurosci, 23 : 666-682, doi:10.1038/s41583-022-00624-2 (2022)
- 4) Saneyoshi T : Brain Res Bull, 170 : 58-64, doi:10.1016/j.brainresbull.2021.01.018 (2021)
- 5) Tullis JE, et al : Nature, 621 : 146-153, doi:10.1038/s41586-023-06465-y (2023)
- 6) Okamoto K, et al : Nat Neurosci, 7 : 1104-1112, doi:10.1038/nn1311 (2004)
- 7) Murakoshi H, et al : Nature, 472 : 100-104, doi:10.1038/nature09823 (2011)
- 8) Saneyoshi T, et al : Neuron, 102 : 1199-1210.e6, doi:10.1016/j.neuron.2019.04.012 (2019)
- 9) Fleming IN, et al : J Biol Chem, 274 : 12753-12758, doi:10.1074/jbc.274.18.12753 (1999)
- 10) Lee SJ, et al : Nature, 458 : 299-304, doi:10.1038/nature07842 (2009)
- 11) Özden C, et al : Cell Rep, 40 : 111064, doi:10.1016/j.celrep.2022.111064 (2022)
- 12) Nair D, et al : J Neurosci, 33 : 13204-13224, doi:10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013 (2013)
- 13) Tang AH, et al : Nature, 536 : 210-214, doi:10.1038/nature19058 (2016)
- 14) Liu G, et al : Neuron, 22 : 395-409, doi:10.1016/s0896-6273(00)81099-5 (1999)
- 15) Hyman AA, et al : Annu Rev Cell Dev Biol, 30 : 39-58, doi:10.1146/annurev-cellbio-100913-013325 (2014)
- 16) Hayashi Y, et al : J Neurosci, 41 : 834-844, doi:10.1523/JNEUROSCI.1656-20.2020 (2021)
- 17) Zeng M, et al : Cell, 174 : 1172-1187.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.06.047 (2018)
- 18) Hosokawa T, et al : Nat Neurosci, 24 : 777-785, doi:10.1038/s41593-021-00843-3 (2021)

<筆頭著者プロフィール>

細川智永：2010年東京都立大学で博士（理学）取得。博士課程では久永眞市教授のもと、シナプスタンパク質のリン酸化の研究を行う。その後、理化学研究所脳科学総合研究センター（BSI）の林康紀チームリーダーのもとでシナプス長期増強時のPSDタンパク質の修飾と動態を研究。京都大学研究員、名古屋大学理学部講師（木下専教授）を経て'23年より京都大学特任講師。特に記憶形成機構として液-液相分離とシナプスの可塑性に注目している。趣味は筋トレで、ベンチプレスの最高記録は130 kg。