

## CaMK IIのキナーゼ活性と構造的役割の相互作用によるシナプス構造可塑性のゲート機構

林 康紀, 金 カラム, 岡本賢一

CaMK IIはシナプスでF-アクチンを束化することで安定化させている。LTP誘導により、細胞内Ca<sup>2+</sup>が上昇しCaMK IIが活性化されると、CaMK IIがF-アクチンより解離し、その再構成を促す。細胞内Ca<sup>2+</sup>が低下すると、CaMK IIは再構成されたF-アクチンを再び安定化させる。このメカニズムにより、CaMK IIはシナプス細胞骨格再構成のゲート機構であると考えられる。

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMK II) はCa<sup>2+</sup>により活性化されるセリン・スレオニンタンパク質キナーゼである。脳、特に興奮性シナプスに多いことで知られ、全海馬タンパク質の約2%、シナプス後膜肥厚(PSD: postsynaptic density)画分では20~30%を占める。これはCaMK IIの重要性を述べる際の枕詞のようになってしまっているが、よく考えてみると不思議だ。通常キナーゼは一分子が多数の基質をリン酸化することができるので、基質より多い必要はない。ところが、CaMK IIはほぼすべての基質タンパク質の量を凌駕しており、なぜそれほどまでに多いのかという合理的な説明はなかった。

CaMK IIにはもう1つの謎がある。それは12量体からなる回転対称体であるということである。CaMK IIは単量体同士で相互にリン酸化することで活性型になることが知られているが、それでも二量体で十分であ

る。なお12量体をとっているのはなぜであろうか。

これらの疑問を抱いていた頃、われわれはLTP (long-term potentiation, 長期増強)に伴い、樹状突起スパイン内のアクチンが急速に重合し、それに伴いスパインが拡大すること(以下structural LTP, sLTP)を報告したばかりで<sup>2)</sup>(岡本賢一: 実験医学, 23: 276-279, カレントトピックス参照)。そのシグナル伝達がどうなっているか、それにどうアプローチするかを議論していた。特にCaMK IIはNMDA受容体のCa<sup>2+</sup>流入により活性化されることが知られており、このシグナル伝達がアクチンの調節にどう結び付くかが1番の問題であった。

### CaMK IIはF-アクチン束化タンパク質である

われわれはCaMK IIはシグナル情報伝達物質として

A gating mechanism of synaptic structural plasticity consists of the interplay between the kinase and structural functions of CaMK II

Yasunori Hayashi<sup>1)~4)</sup>/Kim Karam<sup>1)</sup>/Kenichi Okamoto<sup>2)5)6)</sup> : Brain Science Institute, RIKEN<sup>1)</sup>/RIKEN-MIT Neuroscience Research Center, The Picower Institute for Learning and Memory, Department of Brain and Cognitive Sciences, Massachusetts Institute of Technology<sup>2)</sup>/Saitama University Brain Science Institute, Saitama University<sup>3)</sup>/School of Life Science, South China Normal University<sup>4)</sup>/Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital<sup>5)</sup>/Department of Molecular Genetics, Faculty of Medicine, University of Toronto<sup>6)</sup>(理化学研究所脳科学総合研究センター<sup>1)</sup>/マサチューセッツ工科大学脳・認知学部ピコワー学習記憶研究所理研-MIT神経科学研究センター<sup>2)</sup>/埼玉大学脳末梢科学研究センター<sup>3)</sup>/華南師範大学生命科学学院<sup>4)</sup>/ルネフェルド・タネンバウム研究施設マウントシナイ病院<sup>5)</sup>/トロント大学医学部分子遺伝学部<sup>6)</sup>)

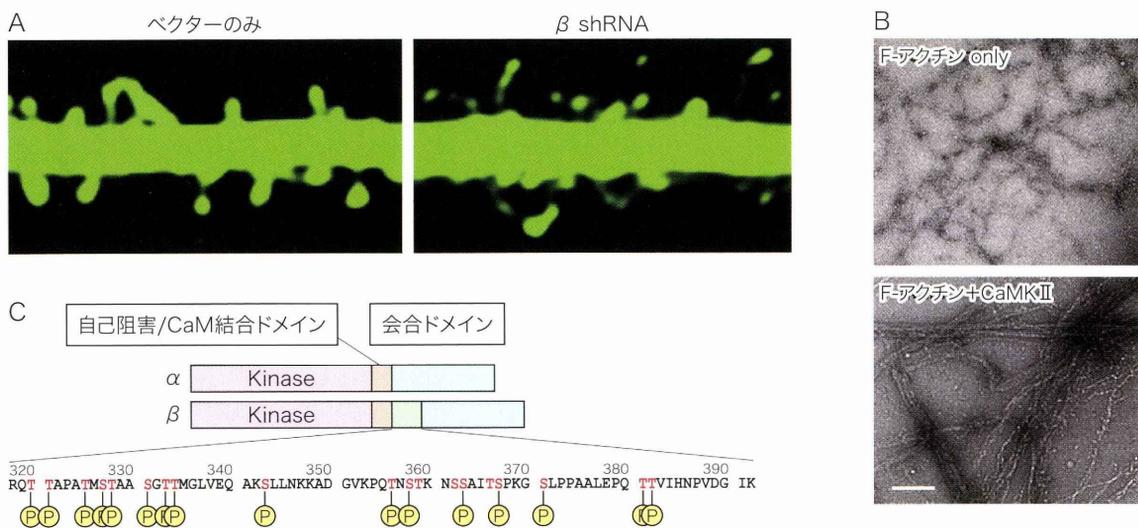


図1 CaMK IIはF-アクチンを束化し、樹状突起スパインの形態維持に寄与する  
 A) CaMK II βに対するshRNAを発現する細胞ではスパインがフィロポディア状になる。B) CaMK IIにより束化されたF-アクチンの電子顕微鏡画像。スケールバー=500 nm。C) CaMK II βにはαにはないF-アクチン結合部位(緑)があるがその部位には多数の自己リン酸化部位が存在する。(A, Bは文献3より転載)

だけではなく、じつは、細胞骨格の一部として機能するのではないかと考えた<sup>3)</sup>。まずこれを実証するため、shRNAを用い、神経細胞においてCaMK II量を減少させたところ、2つあるCaMK IIサブタイプのうち、βサブユニットを減少させたときにはスパインが小さくなりフィロポディア\*状となった(図1A)。一方、αサブユニットを減少させた場合は変化はなかった、この表現型は変異を入れキナーゼ活性をなくしたCaMK II βでもレスキューすることが可能であり、キナーゼ活性とは別にCaMK II βはスパインの構造維持に必要であることがわかった。

ではαとβサブユニットの差はなんであろうか。以前、Shenらはβサブユニットが線維状アクチン(F-アクチン)に結合することを報告していた<sup>4)</sup>。彼らはこの結合はCaMK IIがシナプスに集積するメカニズムだと考えた。ところが、CaMK IIはα、βサブユニットの12量体からなっており、1つのCaMK IIが同時に複

数のF-アクチンと結合する可能性がある。われわれはCaMK IIはそのような結合によりアクチンを束化しているのではないかと考えた。PSDにはCaMK IIはほぼアクチンと同程度存在することからも、このモデルが妥当と思われた。

そこで、精製したタンパク質を用いてCaMK II βがF-アクチンを束化することを生化学的手法、電子顕微鏡を用いて実証した(図1B)。一方、αサブユニットにはそのような機能はなかった。以上より、CaMK IIはβサブユニットを介してF-アクチンを束化することで、シナプスにおける細胞骨格系の安定化を担っていることが示唆された。

### 活性化に伴うCaMK IIの自己リン酸化によるF-アクチンからの解離がsLTP誘導に必要である

次に当然、CaMK IIのキナーゼ活性と構造的役割の相互作用が興味深い点である。われわれは当初、活性化が細胞骨格系をより安定化させるのではないかと考えていた。これは、sLTPの誘導に伴いアクチンが重合化するという知見を説明しやすい。ところが、実験結果は逆であった。CaMK IIをCa<sup>2+</sup>/カルモジュリンで活性化すると、F-アクチンからCaMK IIが解離して

#### ※ フィロポディア

(単数形: filopodium, 複数形: -dia, 糸状仮定) 移動、伸展しつつある細胞や、未熟な神経細胞で観察される。細胞表面の細く長い突起。束化させたアクチンが細胞骨格として存在する。微小管からなる線毛、鞭毛とは異なる。特に未熟な神経細胞で観察されるものは、樹状突起スパインの前駆体と考えられ、シナプスを形成するとアクチンが分枝化し、直状の成熟したスパインになる。

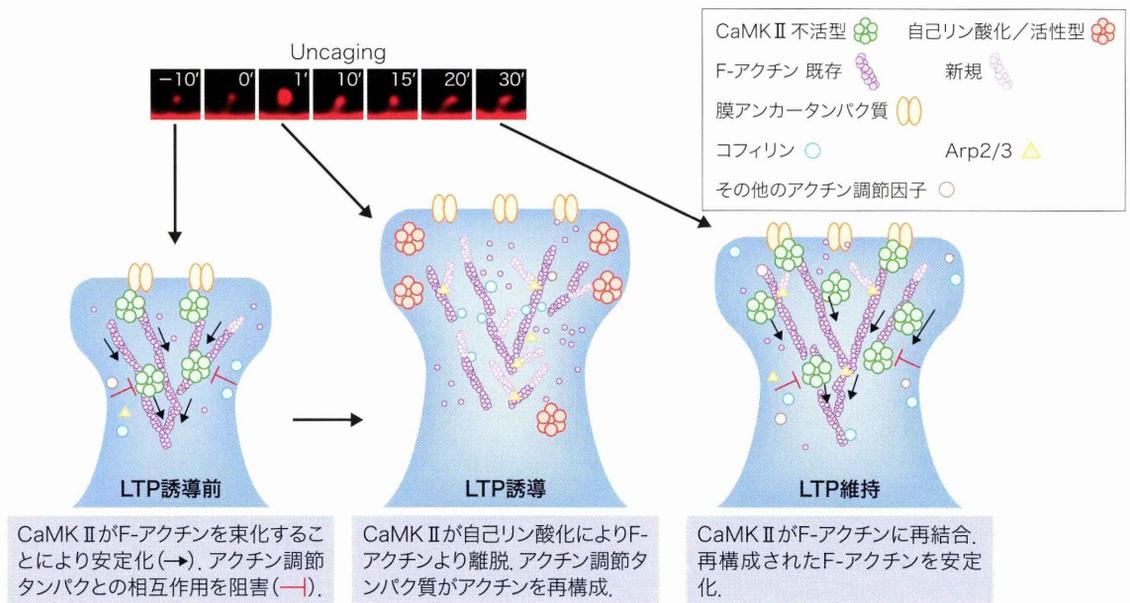


図2 CaMK IIはアクチン調節タンパク質とアクチンとの相互作用を制御することにより、スパインの構造可塑性を制御する (文献1より引用)

F-アクチンがばらけてしまう。ところがキナーゼ活性をなくすと、結合したままになる。そのためCaMK IIの活性化に伴う自己リン酸化によって、F-アクチンと結合しなくなるのではと考えた。

よく見ると、F-アクチンとの結合部位にセリンとスレオニンが18個もある<sup>1)</sup>。質量分析をしてみると、それらのほとんどが自己リン酸化されるという結果が出た(図1C)。最初は1つずつアラニン(A)変異を入れていたが、どの部位も弱く結合に影響するため、最終的に全部まとめて変異させたAll A変異体をつくった。この変異体はCa<sup>2+</sup>/カルモジュリンで活性化させてもF-アクチンに結合したままだった。つまり、CaMK IIはその活性化に伴いβサブユニットのアクチン結合部位が自己リン酸化することによって、F-アクチンから解離するのである。

それではその生理学的な意義は何であろうか。これを解くにはAll A変異体が有用であることに気づいた。この変異体は野生型と同じ程度キナーゼ活性はあるのにもかかわらず、アクチンに結合したままになる。そのため、キナーゼ活性とアクチン結合能の役割を分離することができる考えた。この変異体を発現した神

経細胞を観察したところ、sLTPが抑制されており、CaMK IIの活性化依存的なF-アクチンからの解離がsLTPにおいて必要であることを示唆した。

さらにCaMK IIとアクチンの結合と解離がsLTP誘導後どのような時間経過で起こっているのかを検討するため、Förster共鳴エネルギー移動(FRET)を用いた計測を行った。その結果、LTP誘導刺激後、スパイン内で20秒以内にほぼすべてのCaMK IIがアクチンから遊離し、1分以内に再結合することがわかった。一方、先程のAll A変異体は結合したままであった。

### CaMK IIのF-アクチンからの解離はsLTPのゲート機構として機能する

以上からsLTPの成立には、CaMK IIがいったんF-アクチンから解離する必要があることがわかった。それでは解離することによってどのような意義があるのでしょうか。解離してしまうのであれば、アクチンを安定化することはなさそうである。そこで逆に、解離することで、アクチン調節タンパク質が働くようになるのではないかと考えた。これを検証するため、代表的なアクチン調節タンパク質であるコフィリン、Arp2/3、ゲ

ルズリンとのアクチンとの相互作用を観察したところ、CaMKIIの存在下では、これらのアクチン調節タンパク質とアクチンとの結合が阻害されることがわかった。おそらく、CaMKIIがアクチンを束化することで立体障害が起き、アクチン調節タンパク質が結合できないのであろう。

それでは、CaMKIIのアクチンからの解離がsLTP誘導に十分なのであろうか。それともキナーゼ活性も同時に必要なのであろうか。そんな中で著者のひとりである岡本がおもしろい文献に気づいた。彼が見つけたのはロシアのグループが発見したKillerRedといかにもな名前がついたタンパク質である。これはGFPファミリー蛍光タンパク質であるが、おもしろいことに光を照射すると蛍光だけではなく、活性酸素を発する。これを用いると近隣の分子を不活化する照射分子不活性化法 (chromophore-assisted light inactivation: CALI) という現象を誘導することができる。有効距離は一般的に5 nm以内、だいたいFRETがよく起こる範囲である。ところがこのタンパク質は凝集しやすく、扱いづらかった。大阪大学の永井健治らは単量体にすることでそれを解決し、名前もSuperNovaとずっとスマートなものにした<sup>5)</sup>。

CaMKIIのキナーゼドメインをSuperNovaに入れ替えると、ちょうどアクチン結合部位に隣接してSuperNovaが融合される形となる。もちろんキナーゼ活性もなくなる。これを神経細胞にshRNAと共発現し、内在性のCaMKII $\beta$ をSuperNova融合タンパク質と置き換えた。この条件下でCALIを誘導すると、SuperNova融合タンパク質は局在していたスパインから流出し、アクチンから解離したことを示唆した。と

ころが、スパインの大きさはほとんど変化しなかった。そこで光照射に加え、グルタミン酸を二光子脱ケージ化により投与してみた。そうするとはじめてsLTPが起こった。つまり、CaMKIIのF-アクチンからの解離は必要であるが十分ではないということである。F-アクチンの解離とグルタミン酸受容体の下流にあるシグナルが同時に機能することで、はじめてsLTPが誘導された。

## おわりに

CaMKIIは定常状態のスパインにおいてはアクチンを束化することで、その安定性を高めているが、Ca<sup>2+</sup>により活性化されると、自己リン酸化を受け、アクチンから解離する(図2)。解離したアクチンはコフィリンなどのアクチン調節タンパク質の標的となる。この機構により一過性にF-アクチンの再構成が起こる。そして、細胞内カルシウム濃度が低下すると脱リン酸化されたCaMKIIが再びF-アクチンと結合し、新たな定常状態となる。このようにして、CaMKII自身はF-アクチンを変化させないが、アクチン調節タンパク質との相互作用を制御する一種のゲート機構であると考えられた。

これらの知見は興奮性シナプスでCaMKIIがアクチンと並ぶほど量が多いこと、特異な回転対称構造をしていることを合理的に説明でき、その発見以来の謎を解決したといえる。

COI開示：林は武田薬品工業、富士通研究所から研究資金を得ている。



### 筆頭著者のつぶやき

あれは10年ほど前のことであっただろうか。もう季節も覚えていないが、真夜中であつた。筆者の1人(林)は家への帰途、チャールズ川をわたる橋のたもとにあるロータリーを車で回っていた。そのときであつた。CaMKIIがシナプスに大量にあることと、回転対称体 (rotational symmetry) であることを同時に説明できるモデルを思いついたのは、ただそのときはそのアイデアを証明し、完全な論文に仕上げるまで10年もかかるとは夢にも思っていなかつた。論文が一部他のグループに先を越されるなど、たいへんなこともあつたが、金君、岡本君、他の共同研究者の努力に深く感謝するしだいである。

(林 康紀)

## 文献

- 1) Kim K, et al : A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron*, 87 : 813-826, 2015
- 2) Okamoto K, et al : Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci*, 7 : 1104-1112, 2004
- 3) Okamoto K, et al : The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 : 6418-6423, 2007
- 4) Shen K, et al : CaMKIIbeta functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKIIalpha/beta heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*, 21 : 593-606, 1998
- 5) Takemoto K, et al : SuperNova, a monomeric photosensitizing fluorescent protein for chromophore-assisted light inactivation. *Sci Rep*, 3 : 2629, 2013

### ● 筆頭著者プロフィール ●

林 康紀：京都大学医学部卒業。理化学研究所脳科学総合研究センター、シニアチームリーダー、埼玉大学、華南師範大学客員を兼任。脳科学辞典編集長。記憶の分子、細胞メカニズムに興味をもっている。大学院生募集中。

## Book Information

# よくわかる ゲノム医学 改訂第2版

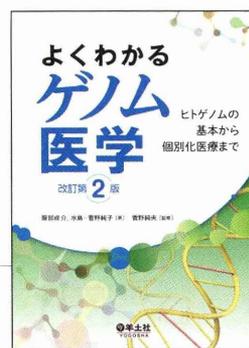
好評発売中

ヒトゲノムの基本から個別化医療まで

服部成介, 水島-菅野純子 / 著, 菅野純夫 / 監修

- ゲノム創薬や遺伝子検査など、昨今の研究動向・社会動向をふまえ、内容をアップデート。改訂によりオールカラー化
- 次世代シーケンサーやゲノム編集技術による新たな潮流も加筆
- 授業用教科書としても副読本としてもおすすめ

ゲノム情報の医療への応用がよくわかるテキスト



- ◆定価 (本体 3,700 円+税)
- ◆フルカラー B5 判 230 頁
- ◆ISBN978-4-7581-2066-1

発行 羊土社