

細胞内現象の時空間ダイナミクス
2020年度採択研究代表者

2022年度
年次報告書

林 康紀

京都大学 大学院医学研究科
教授

記憶を司るシナプス微小構造の時空間ダイナミクス

主たる共同研究者:

浦久保 秀俊 (自然科学研究機構 生理学研究所 准教授(兼任))

浦久保 秀俊 (藤田医科大学 医学部 准教授)

大友 康平 (自然科学研究機構 生命創成探究センター 准教授(兼任))

大友 康平 (順天堂大学 大学院医学研究科 准教授)

細川 智永 (名古屋大学 理学研究科 生命理学専攻 講師)

松田 知己 (大阪大学 産業科学研究所 准教授)

研究成果の概要

林らは CaMKII と LLPS を起こす NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット GluN2B との共結晶の構造解析に成功した。これまで GluN2B 結合部位 (T-site と呼ばれてきた) は基質結合部位 (S-site) とは異なると考えられてきたが、実は同じ結合部位であることが判った。この情報をもとに既知の CaMKII のリン酸化基質の配列を見直したところ、それが確かめられた。

松田らは光増感蛍光蛋白質を用いて、光刺激によって CaMKII の 12 量体構造を不可逆的に崩壊させることにより LLPS 形成を阻害するための光遺伝学ツールを作製、評価した。その結果、そのアプローチでは 12 量体構造の崩壊は困難であると考えられたため、今後は光刺激によって自己分解を起こす蛍光蛋白質 PhoCl、光刺激によって再構成する splitTEVprotease システムを用いた CaMKII の操作に取り組んでいく。

大友らは二光子 STED 顕微鏡の解像度を更に充進させることを試みた。特に三次元的な解像度に着目し、独自で開発してきた透過型液晶素子の更なる改良、時間ゲート検出法の新規導入を実施した。これにより、厚みを持つ脳スライス標本の内部の樹状突起スパインについても 100 nm を下回る解像度での可視化に成功した。

浦久保らは CaMKII/NMDAR/AMPA/PSD95 分子同士の相互作用をモデル化してモンテカルロシミュレーションを行い、同混合体が形成する相内相分離 (phase-in-phase separation) の再現を試みた。その結果、細川らの試験管内実験の性質をおおよそ再現することに成功した。ただし、現在の計算モデルは不完全な部分も多いため、引き続きモデルの改良に取り組む。

細川らは近位依存性ラベリングを用いた質量分析と蛋白質複合体立体構造予測 AI を組み合わせ CaMKII および PSD95 の構成する LLPS の他の要素を同定している。質量分析では CaMKII と PSD95 の近位に存在するタンパク質が全く異なることがわかり、これは未刺激状態のシナプスがすでにドメイン化していることを示唆している。構造予測では GluN2B と同様の様式で結合を起こす未報告のタンパク質を複数見出している。

【代表的な原著論文情報】

- 1) Özden C, Sloutsky R, Mitsugi T, Santos N, Agnello E, Gaubitz C, Foster J, Lapinskas E, Esposito EA, Saneyoshi T, Kelch BA, Garman SC, Hayashi Y, Stratton MM (2022) CaMKII binds both substrates and activators at the active site. **Cell Reports** 40:111064.
- 2) Chang CP[†], Otomo K^{†,*}, Kozawa Y, Ishii H, Yamasaki M, Watanabe M, Sato S, Enoki R, Nemoto T* (2022) Single-scan volumetric imaging throughout thick tissue specimens by one-touch installable light-needle creating device. **Scientific Reports** 12: 10647.