

【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、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ と ATP を加え、Thr286 のリン酸化 (pT286) 反応を起こし、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$ 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、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の解離により生じるため、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$ 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 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 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 ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}+\text{pT286}$) 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

