

# CaMKIIの新しいシナプス可塑性機構

林 康紀, 細川 智永, 劉 品吾, 實吉 岳郎

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性キナーゼII (CaMKII) は長期増強現象に必須なキナーゼとして知られてきた。しかし、その12量体構造の意義や、キナーゼであるのかかわらずシナプスで最多のタンパク質である点は謎であった。我々は、CaMKIIが液-液相分離を起こすことがその機能の本質ではないかと考え、その実証を試みた。その結果、CaMKIIは基質の一つであるNMDA受容体サブユニットGluN2Bと液-液相分離を起こした。この機構により、シナプスでは2種類のグルタミン酸受容体ナノドメインを形成し、それによりAMPA型受容体を活性帯の直下に濃縮する機構であることが示唆された。これは新しい、長期増強現象のメカニズムである可能性がある。さらに、CaMKIIは線維状アクチンを束化する活性も持ち、液-液相分離との関連が興味深い。一方、ヒトでの変異は、精神発達障害や自閉症、てんかんの原因となる。

## 1. 長期増強現象とCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ

記憶形成時に同時に発火した神経細胞どうしのシナプスは、長期的に強化される。この性質をシナプス反応の長期増強現象 [long-term potentiation (LTP), 図1] と呼び、それにより、それらの細胞はその後同時に発火する、「神経細胞集成体」を形成すると考えられる<sup>1)</sup>。記憶想起時にはこの神経細胞集成体が再活性化されると考えられている。シナプス反応のLTPは1973年に海馬歯状回で報告されて以来<sup>2)</sup>、記憶の細胞基盤として多くの興味を集めてきた。

シナプスにはAMPA型グルタミン酸受容体 (以下AMPA受容体) とNMDA型グルタミン酸受容体 (以下NMDA受容体) の2種類のグルタミン酸受容体が存在する (図2)。AMPA受容体は通常のシナプス伝達に寄与する一方、頻回刺激 (記憶形成時の神経活動の亢進を模倣していると考えられる) により一過性にNMDA受容体が活性化し、カル

シウムイオン (Ca<sup>2+</sup>) が細胞内に流入することがLTPを誘導する<sup>3)</sup>。細胞内に流入したCa<sup>2+</sup>は細胞内伝達系を活性化し、その結果、最終的にAMPA受容体を介したシナプス伝達を増強する。Ca<sup>2+</sup>はタンパク質キナーゼCや一部のアデニル酸シクラーゼを活性化する他、カルモジュリンと結合し、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼを活

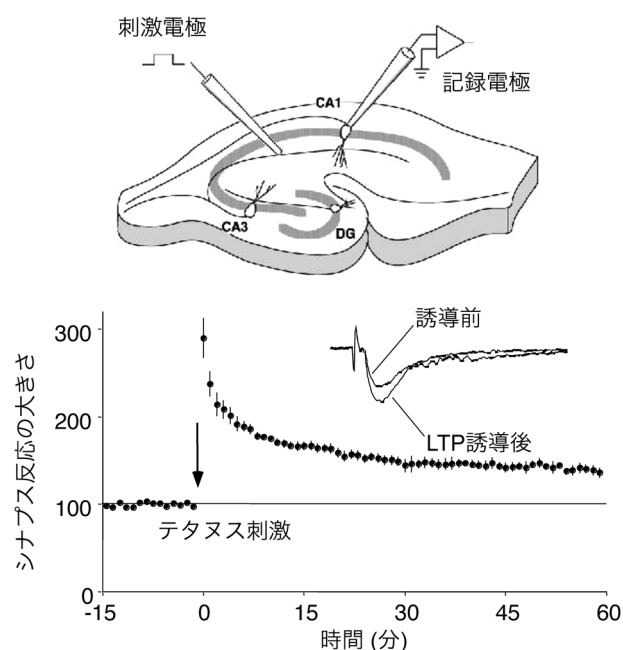


図1 海馬長期増強現象  
短時間のテタヌス刺激 (高頻度刺激, 例100Hz, 1秒) によりそれ以降のシナプス反応が長期にわたり増強する。未発表データ。

京都大学大学院医学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町A棟401号室)

Novel mechanism of synaptic plasticity mediated by CaMKII

Yasunori Hayashi, Tomohisa Hosokawa, Pin Wu Liu and Takeo Saneyoshi (Kyoto University Graduate School of Medicine, Room 401, Building A, Yoshidakonoe, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930191

© 2021 公益社団法人日本生化学会

性化させる。なかでも注目を集めてきたのは、タンパク質セリン／トレオニンキナーゼである $\text{Ca}^{2+}$ ／カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII (CaMKII) である<sup>4)</sup>。

CaMKIIはセロトニン合成の律速段階酵素であるトリプトファン水酸化酵素の活性化因子として藤澤仁、山内卓ら<sup>5-7)</sup>によって、またほぼ同時期にその他いくつかのグループ<sup>8-11)</sup>によっても独立に発見された。CAMK2A ( $\alpha$ サブユニット)、CAMK2B ( $\beta$ サブユニット)、CAMK2G ( $\gamma$ サブユニット)、CAMK2D ( $\delta$ サブユニット)の四つの遺伝子でコードされ(図3)、それぞれ選択的スプライシングにより多数のバリエーションを形成する<sup>12-14)</sup>。

特筆すべきは、CaMKIIは $\text{Ca}^{2+}$ ／カルモジュリンにより活性化されると、自己阻害ドメインにあるトレオニン286

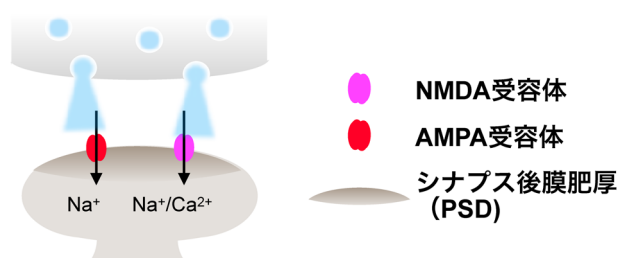


図2 2種類のグルタミン酸受容体  
AMPA型グルタミン酸受容体は $\text{Na}^{+}$ イオンのみ透過し、通常のシナプス伝達に参与する。NMDA型グルタミン酸受容体は、細胞が強く脱分極したときのみ開口し、シナプスに $\text{Ca}^{2+}$ を流入させる。その結果、細胞内情報伝達系が活性化される。

(T286) が自己リン酸化されることで、自己阻害がかからなくなり、活性持続型になる点である<sup>15)</sup>。そのことから、数秒の単位と考えられているLTP後の $\text{Ca}^{2+}$ の上昇<sup>16)</sup>を、持続的なキナーゼ活性と変換させる機能があると予想され、これに基づきLismanらはCaMKIIに記憶分子としての役割を提唱した<sup>17)</sup>。実際にCaMKIIの阻害薬を神経細胞に作用させるとLTPが阻害される<sup>18, 19)</sup>。活性化CaMKIIの細胞内導入により、LTP様のシナプス反応が亢進し、かつそれ以上のLTPも起こらなくなった<sup>20-23)</sup>。一方、CaMKII遺伝子を破壊した動物個体ではLTPのみならず、記憶学習も障害される<sup>24, 25)</sup>。さらにT286をアラニン(A)に置換したノックイン動物も作製され、同様に記憶が障害されることも確認された<sup>26)</sup>。これらの事実から、CaMKIIがLTPに密接に関与していることは明らかである。

## 2. CaMKIIは持続的に活性化されるか

それでは、CaMKIIの活性化はLTP誘導後どの程度続くのであろうか。Kennedyらは抗リン酸化T286に対する抗体を作製し、LTP誘導によってT286のリン酸化が上昇するかを検討した<sup>27)</sup>。その結果、LTP誘導後30分の時点で、T286リン酸化CaMKIIの量が上昇していることがわかった。福永らはスライス標品でLTPを誘導し、その後生化学的解析をすることで、LTP後持続活性型のCaMKIIが上昇することを見いだしている<sup>28, 29)</sup>。しかし一方、CaMKII

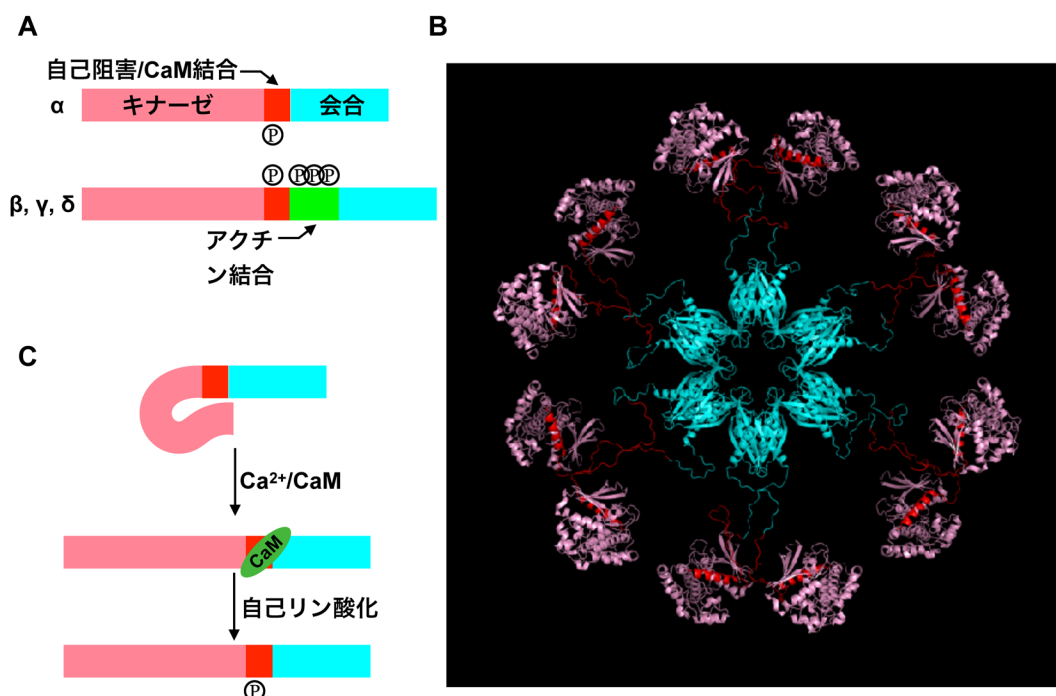


図3 CaMKIIの構造と活性化機構

(A)CaMKII $\alpha$ ならびに $\beta$ サブユニットのドメイン構造。主なリン酸化部位をPで示す。(B)凍結電子顕微鏡画像と結晶構造を元にモデル化されたCaMKII $\alpha$ のホロ酵素の立体構造。色は左と統一されている。PDB Accession 5U6Y (Myers, et al. 2017) を元に作成。(C)CaMKIIの活性化様式。通常は自己阻害ドメインがキナーゼドメインを不活性化している。 $\text{Ca}^{2+}$ /CaMがCaM結合ドメインに結合すると活性化される。その結果自己阻害ドメインがリン酸化され、 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下でも活性が継続する。

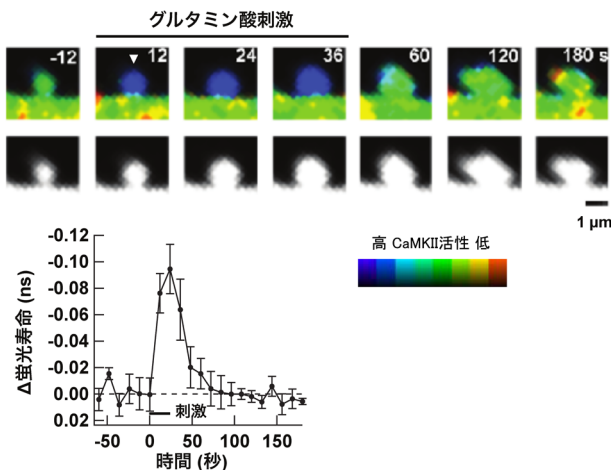


図4 FRETで観察したLTP誘導時のCaMKIIの活性化  
CaMKIIの活性は、刺激で一過性に増強するが、その後、すぐに基線レベルまで低下する。疑似カラーでは青が活性化を示すことに注意。Saneyoshiら (2019)<sup>34)</sup> から改変。

のFörster共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer: FRET) センサー Camui<sup>30, 31)</sup> を用い、ケージ化グルタミン酸の脱ケージ化 (グルタミン酸を光分解性の保護基により不活化しておき、光照射により局所で活性化) により、単一の樹状突起スパインでCaMKIIの活性化を観察すると、CaMKIIの活性化はごく短期間であり、刺激後1分以内に基線レベルまで戻った (図4)<sup>32-34)</sup>。T286A変異体を用いると、活性化の持続時間はさらに短くなり、T286のリン酸化が寄与することは確認されたが、それでもLismanのモデル<sup>17)</sup> から予想されるような、持続的な活性化は観察されなかった。さらに、燕麦の向光性に関与する光感受性タンパク質のLOV2ドメインを用いて作製した、光活性化型CaMKII阻害ペプチドphoto-activatable AIP (PA-AIP2) を用い、LTP誘導時と誘導後1分後にそれぞれAIPを活性化させたところ、誘導時に活性化したときにはLTPは阻害されたが、1分遅らせたのみで抑制されなくなった<sup>35, 36)</sup>。一方で、CaMKIIの細胞内濃度は非常に高く、単量体換算で20~80 $\mu$ Mとされており<sup>32)</sup>、光活性化されたPA-AIP2がはたして十分にCaMKIIを抑制することができるかは不明である。

### 3. LTPに必要なCaMKIIの基質

CaMKIIは多機能性リン酸化酵素であり、数百に及ぶ基質が知られている (Phosphosite Plus データベース: <https://www.phosphosite.org/>)。それがLTPに必要なCaMKIIの基質を同定するのが難しくしている。

よく知られている基質にAMPA受容体がある。LTP誘導により、AMPA受容体のカルボキシ末端に存在するセリン (S)831がCaMKIIによりリン酸化され<sup>37-42)</sup>、その結果受容体の活性が上がるという図式が想定されてきた<sup>43)</sup>。実際に、LTPに伴いチャンネルのコンダクタンスの上昇が観察されている<sup>44)</sup>。この部位のノックイン動物も作製され、LTP

の減少と記憶・学習障害が認められた<sup>45)</sup>。

ところが、その後、グルタミン酸受容体の構造上<sup>46)</sup>、リン酸化部位S831は受容体のチャンネルとは離れた部位に存在し、この図式に疑問が持たれた。我々がPhos-tag SDS-PAGE<sup>47)</sup> を用い、リン酸化される受容体の割合を調べたところ、リン酸化されているAMPA受容体の量は1%以下と非常に少なく、これまでの図式は成り立たないことがわかった<sup>48)</sup>。ある程度の割合の受容体がリン酸化されている前提で話が考えられてきたが、皮肉なことに、よく使われる抗リン酸化AMPA受容体抗体の感度が十分高かったため、実際には非常に低い割合のリン酸化を検出していたわけである。今後はリン酸化されるタンパク質の絶対量を議論する必要がある。

一方で、AMPA受容体の補助サブユニットであるStargazin [およびそれを含む一群のタンパク質transmembrane AMPA receptor regulatory proteins (TARP)] はCaMKIIによって、高い割合でリン酸化されることが知られている<sup>48-50)</sup>。このリン酸化の意義は議論があり、リン脂質との相互作用を促すことで、AMPA受容体の細胞表面での分布と安定性を変化させる一方<sup>49, 50)</sup>、シナプス後部足場タンパク質であるPSD-95との相互作用を減弱させるという報告もある<sup>51)</sup>。

SynGAPは低分子Gタンパク質であるRasの不活性化因子である。シナプス後膜肥厚 (post-synaptic densities: PSD) ではCaMKIIに次いで発現量の多いタンパク質である<sup>52, 53)</sup>。SynGAPはCaMKIIの活性化によりシナプスから離散し、その結果、Rasが活性化される<sup>54)</sup>。RasはAMPA受容体をシナプスに移行させる活性があり、それによりLTPが起こるという考えが提唱されている<sup>55)</sup>。実際、FRETセンサーを用いた研究から、RasがLTP誘導後シナプスで20分程度は活性を保ち続けることがわかっている<sup>56)</sup>。

他にもCaMKIIの基質は多数あり、どれがLTPに重要であるかという決着はまだついていない。

### 4. CaMKIIとGluN2Bの結合によるCaMKIIの活性化とシナプス移行

かねてからCaMKIIには可溶型と顆粒型 (膜画分に結合している型) があることが知られてきた<sup>57)</sup>。実験動物の断頭後の直後よりも1時間後に調製した膜画分、特にPSDに結合するCaMKIIが増加することも見いだされてきた<sup>58)</sup>。当初は、虚血による非生理学現象と思われてきた。ところが同様な現象が、精製したCaMKIIとPSDや脳スライス標品でも再現され、しかもこれがCaMKIIの自己リン酸化によって制御されていることがわかった<sup>59)</sup>。GFPを融合したCaMKIIでの生細胞イメージング実験で、LTPに伴いCaMKIIが自己リン酸化依存的にシナプスへ移行することが見事に実証された<sup>60-62)</sup>。

CaMKIIが神経活動依存的にシナプスに集積するのであれば、PSDタンパク質のどれかに結合していると考え



られる。Colbranらはゲルオーバーレイアッセイにより、190kDa付近にCaMKIIの結合タンパク質があることを見だし、それがNMDA受容体GluN2B (NR2B) サブユニットであることを示した(図5)<sup>63</sup>。この結合により、CaMKIIがNMDA受容体の直下に置かれることになり、カルシウム流入がより効率よくCaMKIIを活性化する機構であると想定された。興味深いことにCaMKIIとの結合はGluN2Bサブユニット特異的で、GluN2AやGluN1など他のサブユニットとは結合しない<sup>63</sup>。GluN2BのCaMKII結合部位をノックインにより変異させると、CaMKIIの活動依存性のシナプス移行が阻害されると同時に、シナプス可塑性の異常、ならびに記憶学習の障害も観察された<sup>64</sup>。

BayerらはGluN2BとCaMKIIの結合をより詳細に解析し、GluN2BのCaMKIIとの相互作用部位はCaMKIIの自己阻害ドメインと相同性があり(図6)、同じ部位(T286

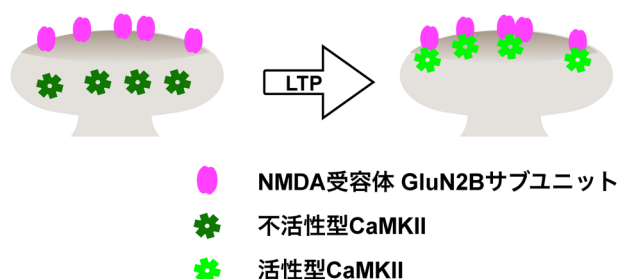


図5 活性化されたCaMKIIのGluN2Bサブユニット依存的シナプス移行

活性化されたCaMKIIはNMDA受容体GluN2Bのカルボキシ末端に結合することで、シナプスへ移行する。

周囲の配列であることからT-siteと呼ばれる)に結合すると考えられた<sup>65</sup>。我々は最近GluN2Bに結合した状態のCaMKIIの結晶化に成功している(図6)<sup>66</sup>。

興味深いことに、この結合により、CaMKIIはCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン非存在下でも活性化状態を保った。すなわち、T-siteにGluN2Bが結合することで、自己阻害が機能しなくなり、一部のCaMKIIがシナプス直下で活性を保つと考えられる。これは、一見前述したCaMKIIのFRETセンサーを用いてCaMKIIの活性化が一時的であるというLeeらの実験の結果(図4)<sup>32</sup>と整合性がないが、CaMKIIは一つのPSDに5600分子(単量体換算)、一方NMDA受容体は20分子と<sup>53</sup>、量が圧倒的に違うため、NMDA受容体に結合することができず、結合して活性型になるのはごく一部と予想される。また、Leeらは、基線レベルを原点として刺激前との差をみているが、刺激前のCaMKII活性の有無には言及していない。そのため、刺激前のシナプスでCaMKIIの活性があることも十分考えられる。この点は、より詳細な研究が必要となる。

## 5. reciprocally-activating kinase-effector complex (RAKEC)

さらに實吉らは低分子Gタンパク質Racの活性化因子(グアニンスクレオチド交換因子GEF)であるTiam1もGluN2Bと同様、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性にCaMKIIのT-siteに結合し(図6)、CaMKIIの活性を持続させることを見いだした(図7)<sup>34</sup>。Tiam1はCaMKIIによりリン酸

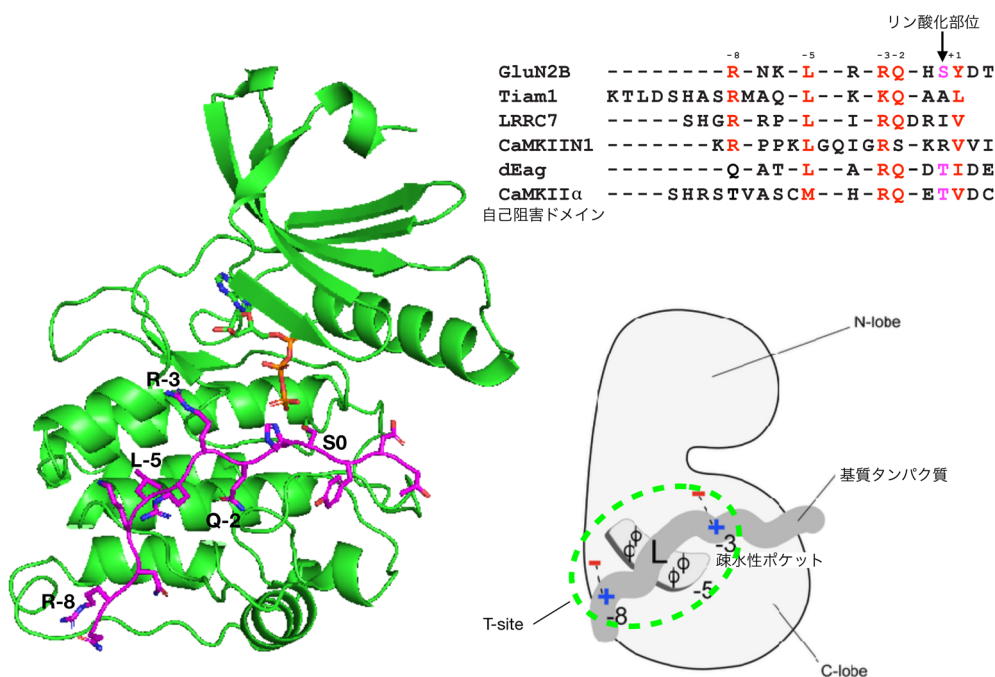


図6 CaMKII T-siteと基質タンパク質との結合

CaMKII (触媒サブユニット、緑)とNMDA受容体GluN2Bサブユニット(細胞内領域、マゼンタ)との共結晶のX線構造。複数の基質との比較により、L-X-R/K-QモチーフがT-siteとの結合に重要であることがわかった。Ozden et al. (2020) *bioRxiv* 2020.10.25.354241.

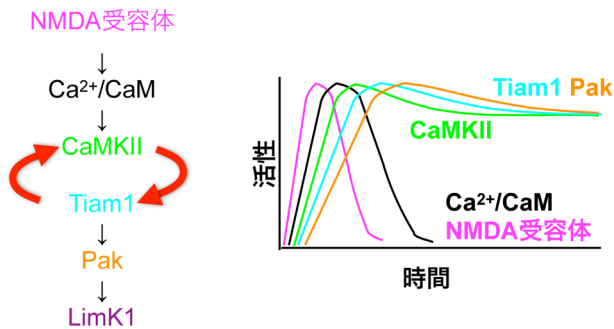


図7 RAKECによる一過性のカルシウムシグナルによる持続的な情報分子の活性化

NMDA受容体の活性化と $\text{Ca}^{2+}$ の上昇は一過性である。しかし、CaMKIIとTiam1は安定した複合体を形成する。Tiam1はCaMKIIの自己阻害ドメインと拮抗して結合するため、CaMKIIの活性化が保たれる。一方、Tiam1はCaMKIIによるリン酸化によって活性化されるので、複合体が形成されている間は、その下流シグナルは持続する。このメカニズムをreciprocally-activating kinase-effector complex (RAKEC)と呼ぶことを提唱した (Saneyoshi, 2019)<sup>34)</sup>。

化され活性化するため、Tiam1とCaMKIIの複合体は、相互に活性化させることで、その活性を持続させるメカニズムではないかと考え、これをreciprocally-activating kinase-effector complex (RAKEC)と名づけた。FRETを用い、CaMKIIとTiam1の結合をモニターしたところ、LTP誘導から少なくとも30分にわたって継続した<sup>34)</sup>。このメカニズムにより、一過性のカルシウムが持続的な生化学的シグナルに変換されると考えられ、細胞内シグナルの一種の特異点であるといえる。これと一致して、下流のRacの活性化も持続した<sup>34, 67)</sup>。実際にTiam1のCaMKII結合部位の変異のノックインマウスは学習障害を示した<sup>68)</sup>。

それでは、RAKECはさらに一般化できるであろうか。GluN2BとTiam1以外にもCaMKIIのT-siteに結合するタンパク質はEther à-go-go (eag) potassium channel (*Drosophila*)、GJD2/コネキシン36、LRRC7/densin-180、endogenous CaMKII inhibitor peptide (CaMKIIN)、L型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル、低分子Gタンパク質であるRem2などいくつかが同定されている (図6)<sup>69-74)</sup>。CaMKIIの圧倒的な発現量を鑑みれば、さらに他にもCaMKIIのT-siteと結合するタンパク質があると予想される。

## 6. CaMKIIによって起こされる液-液相分離 (LLPS)

CaMKIIはキナーゼとしては非典型的な性質を持つ。まず、量が非常に多く、たとえば海馬では全タンパク質の2%、PSDの10~20%を占める<sup>53, 75, 76)</sup>。この量は、アクチンやチューブリンなど、細胞骨格タンパク質に匹敵する。キナーゼであれば、酵素反応により1分子のキナーゼが多数の基質をリン酸化することができるので、こんなに多量にある必要はない。また特徴的な回転対称型の12量体構造をしている (図3)<sup>77-79)</sup>。キナーゼがこのような形態を持つ必要はなく、何らかの構造的な役割があるのではないかと

と考えられた<sup>4)</sup>。

最近、細胞内の非膜オルガネラの形成に液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) の関与が注目されている。LLPSとはソフトマター物理学でかねてからの研究対象であり、特に生物学的なLLPSではタンパク質やRNAなどの高分子化合物が、囲む膜を必要とせず、自発的に濃集相を形成する現象である。最近LLPSが、核小体、タンパク質-RNA複合体、ストレス顆粒など数多くの生命科学的現象に関わると考えられるようになった<sup>80, 81)</sup>。シナプスへのタンパク質の集積にも関与すると考えられ、シナプス顆粒タンパク質のシナプシン、PSD足場タンパク質であるSynGAP1、PSD-95、Homer、Shank、GKAPなどもLLPSを起こすことが報告された<sup>82-85)</sup>。

LLPSを起こしやすいタンパク質にはいくつかの性質が知られている<sup>80, 81)</sup>。一つは多価の相互作用であり、多量体形成や、複数の結合ドメインを持つ場合が相当する。もう一つは、特定の立体構造を持たない天然変性領域を持つことである。天然変性領域にはセリン、グルタミン、グルタミン酸、アルギニン、リシンなどの電荷を持つアミノ酸が多い一方、バリン、ロイシン、イソロイシンなどの疎水性アミノ酸は少ない。そのため、これらの残基による静電的相互作用がLLPSに寄与する。

我々は、CaMKIIの多量に存在する点、12量体タンパク質であるという点、さらにGluN2BやTiam1といった一部の基質と安定した複合体を作る点がLLPSを起こすのに最適な性質を持っているのではないかと考えた。CaMKIIの結合するGluN2Bの細胞内カルボキシ末端は、ほぼ全領域が天然変性領域である点もこれと矛盾しない。そのため、細川、劉らはCaMKIIとGluN2Bのカルボキシ末端 (実際の受容体のオリゴマー構造を模倣するため、二量体の蛍光タンパク質と融合した) を精製した上で、混合し、蛍光顕微鏡下で観察した。Ca<sup>2+</sup>の非存在下ではいずれのタンパク質もLLPSを起こさなかった (図8)<sup>86)</sup>。しかし、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリンで刺激すると、タンパク質のボール状の液滴が観察され、LLPSが起こったことが示唆された。しかも、いったん起こった相分離はEGTAでCa<sup>2+</sup>をキレートしても継続した。CaMKIIがLLPSを起こすのには、キナーゼ活性は必要なかったが、それがEGTA添加後にも継続するためにはT286の自己リン酸化が必要であった。T286A変異体や触媒部位に変異を入れた場合は、Ca<sup>2+</sup>を添加するとLLPSが起こるが、EGTAを加えると消失した。

神経細胞に発現したGFP-CaMKIIを、シナプスで蛍光退色させると数分で回復することから、シナプスのCaMKIIはシナプスに濃縮されてはいても、動的な状態にあることが示唆されていた<sup>62, 87)</sup>。このことは実際にPSDのCaMKIIがLLPS状態であることを示唆している。これらの結果から、CaMKIIのシナプスでの意義は、Ca<sup>2+</sup>依存性にLLPSを起こすことにあるのではないかと考えられた。

さらに我々は代表的なPSD足場タンパク質である、PSD-95、AMPA受容体補助サブユニットStargazinの細胞

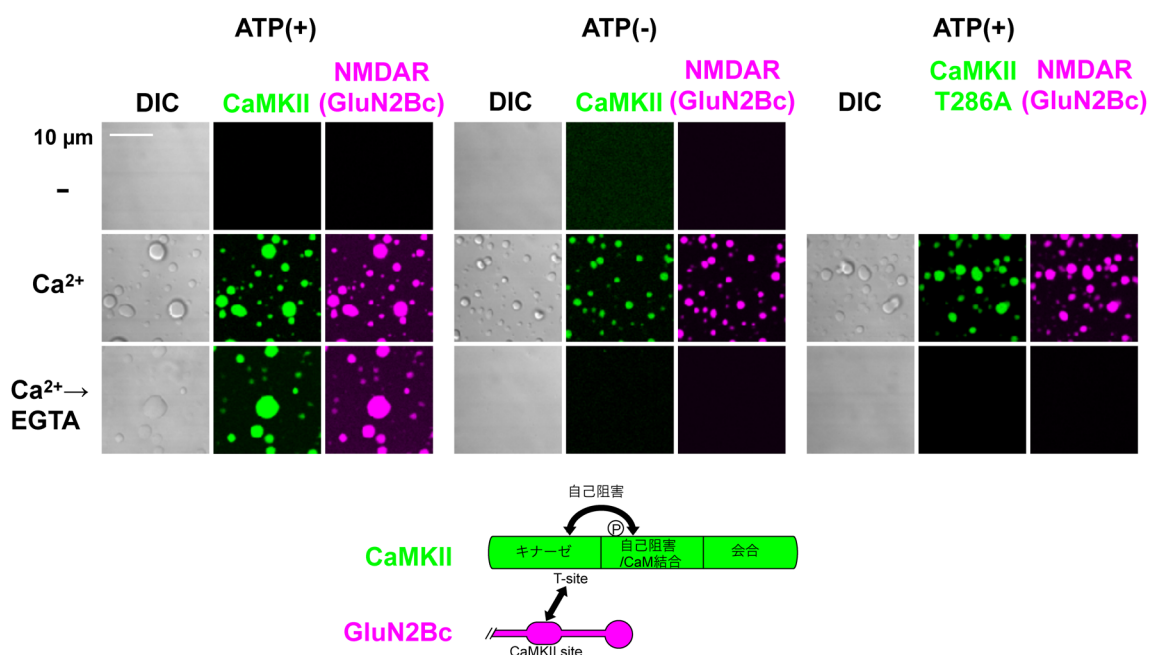


図8 CaMKIIとGluN2Bの液-液相分離

CaMKIIとGluN2Bカルボキシ末端 (GluN2Bc) を精製した。GluN2Bcは実際の受容体での stoichiometry に合わせるため、二量体蛍光タンパク質でラベルした。CaMKII, GluN2Bc, カルモジュリンはCa<sup>2+</sup>非存在下では液-液相分離を起こさなかったが、Ca<sup>2+</sup>の添加により、分離した。さらにEGTAの存在下でもそれは持続した。EGTA添加後の持続には、T286の自己リン酸化が必要であることが、ATPを除外した実験、またT286A変異体を用いた実験から結論づけられる<sup>86)</sup>。

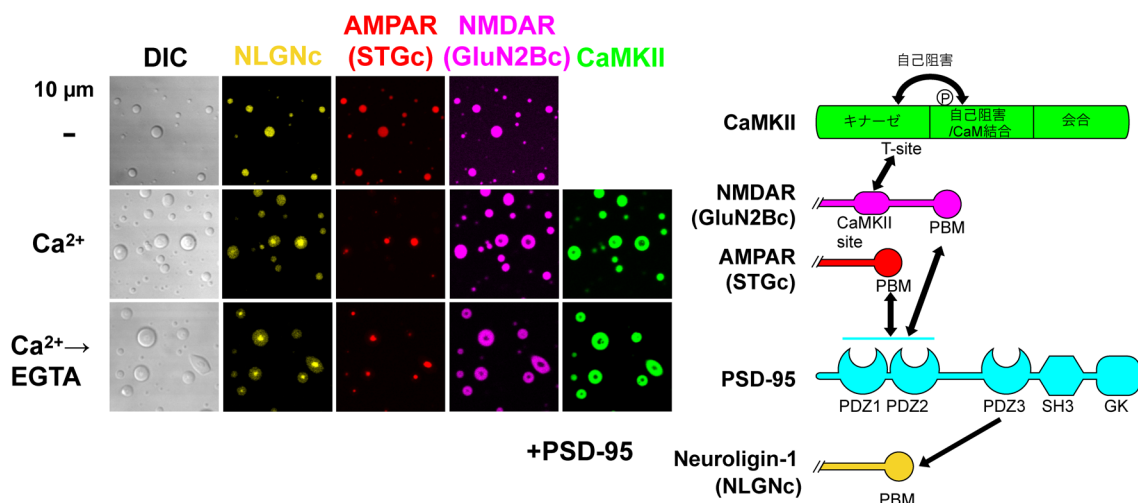


図9 CaMKIIの液-液相分離によるAMPA受容体とNMDA受容体の分離

図8の実験にAMPA受容体補助サブユニットであるStargazinのカルボキシ末端 (STGc), シナプス接着因子であるニューロリギンのカルボキシ末端 (NLGNc), シナプス足場タンパク質であるPSD-95 (図で表示されていない) を加えた。Ca<sup>2+</sup>非存在下ではNLGNc, STGc, GluN2Bc, PSD-95は相分離を起こす一方、CaMKIIは希釈相に存在した。Ca<sup>2+</sup>の添加によりSTGc, NLGNcとPSD-95が相内相を形成し、GluN2BとCaMKIIから分離した。AMPR: AMPA受容体, NMDAR: NMDA受容体<sup>86)</sup>。

内カルボキシ末端、シナプス接着因子ニューロリギンの細胞内カルボキシ末端をCaMKII, GluN2B細胞内カルボキシ末端、カルモジュリンとともにLLPSを形成するかを検討した。Ca<sup>2+</sup>の非存在下では、CaMKII以外のタンパク質がLLPSを起こした (図9)<sup>86)</sup>。これは足場タンパク質としてのPSD-95の役割によると考えられた。ここにCa<sup>2+</sup>を添加するとCaMKIIが濃縮相に加わった。さらに興味深い

ことに、濃縮相がさらに二つに分離した (相内相形成)。CaMKIIとGluN2Bがともに外側の相を形成し、Stargazin, PSD-95, ニューロリギンが内側の相を形成した。実際に超高分像顕微鏡による初代培養神経細胞のシナプスにおけるPSD内のタンパク質分布を観察すると、AMPA受容体とNMDA受容体は互いに強く分離して存在する。さらに、CaMKIIとGluN2Bとの相互作用をCN21処理により抑制



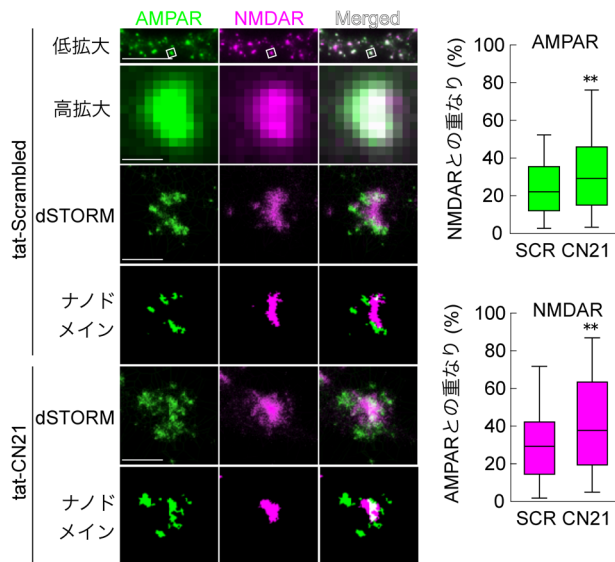


図10 CaMKIIによるAMPA受容体とNMDA受容体のナノドメイン制御

超高解像度顕微鏡dSTORM法にてAMPA受容体とNMDA受容体のナノドメインを可視化した。CaMKIIとNMDA受容体GluN2Bとの相互作用をCN21にて阻害すると、ナノドメインの分離が減少した。AMPR:AMPA受容体, NMDAR:NMDA受容体<sup>86)</sup>。

すると、AMPA受容体とNMDA受容体の分離が減少した(図10)<sup>86)</sup>。このことは、CaMKIIがPSD内部のタンパク質の分布を制御していることを示唆している。ニューロリギンは、シナプス前部のニューレキシンと相互作用する<sup>88)</sup>。ニューレキシンはシナプス顆粒の放出部位である、活性帯の構成タンパク質とも相互作用するので、このメカニズムにより、AMPA受容体がシナプス顆粒の放出部位直下に濃縮される可能性がある。AMPA受容体は、シナプスのグルタミン酸に対して飽和していない<sup>89-91)</sup>。また、シナプス前部から放出されたグルタミン酸はシナプス間隙でごく局所にしか広がらない。そのため、活性化されたCaMKIIによってAMPA受容体がシナプス顆粒放出部位直下に濃縮されることにより、AMPA受容体活性が増加することが、シナプス可塑性の一つのメカニズムである可能性がある(図11)<sup>92)</sup>。

LLPSには外部のタンパク質を選別し取り込んだり排斥したりする性質があり、取り込まれるタンパク質はクライアントと呼ばれる。すなわち、LTPの誘導に伴い、シナプスのGluN2BとCaMKIIが相互作用し、シナプスでLLPSを起こすと、それに対してクライアントタンパク質が取り込まれると考えられる。これにより、LTPに伴うシナプスの再構成が起こると考えられる<sup>62)</sup>。実際にどのようなクライアントがあるかが今後の重要な課題になっていくであろう。

## 7. アクチン結合因子としてのCaMKII

CaMKIIサブユニットのうち、 $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ サブユニットには調節ドメインと会合ドメインの間に特有の配列がある。こ

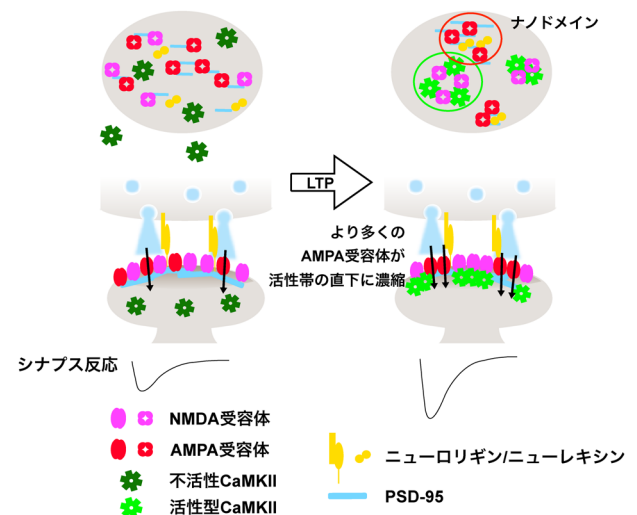


図11 CaMKIIの新たな働きによるシナプス可塑性

CaMKIIによりAMPA受容体とNMDA受容体のナノドメインが分離し、さらにより多くのAMPA受容体が活性帯の直下に濃集される。その結果、シナプス反応が大きくなる。これは新しいシナプス可塑性のメカニズムである可能性がある<sup>86)</sup>。

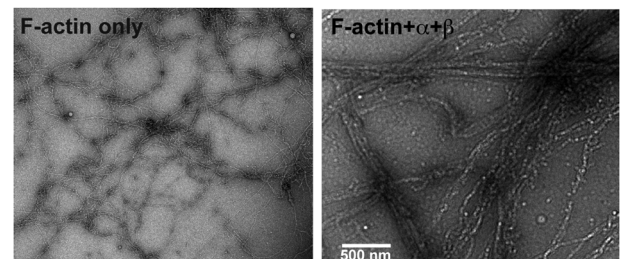


図12 CaMKIIによるF-アクチンの束化

F-アクチンをCaMKII $\alpha/\beta$ ヘテロオリゴマーの非存在下(左)、存在下(右)で電子顕微鏡で観察した。CaMKII $\alpha/\beta$ 存在下では束化が観察された。

の領域は天然変性領域であり、線維状アクチン(F-アクチン)と結合することが知られている(図3A, 緑)<sup>93)</sup>。前脳では $\alpha$ と $\beta$ サブユニットが平均約3:1の割合で共発現している。CaMKIIは12量体であるため、一つのアホ酵素(オリゴマー)に平均して3分子程度の $\beta$ サブユニットを含んでいると考えられる<sup>8)</sup>。そのため、一つのアホ酵素が複数のF-アクチンと同時に相互作用し、これにより単に結合するだけではなく、F-アクチンを束化するのではないかと考えられた。我々はこれを実証するため、電子顕微鏡観察(図12)と生化学的解析を行い、CaMKII $\beta$ サブユニットがF-アクチンを束化することを確認した<sup>94, 95)</sup>。さらにサブユニット特異的なshRNAを神経細胞で用いたところ、 $\beta$ サブユニットに対するshRNAを用いたときにのみスパイン形態が縮小した。一方、 $\alpha$ サブユニットに対するshRNAでは変化がなかった<sup>94)</sup>。このスパインの縮小は、 $\beta$ サブユニットの野生型だけではなく、キナーゼ活性を失わせた変異体でもレスキューできたことから、CaMKIIの酵素活性が必要なのではなく、F-アクチン束化活性が重要であることが示唆された<sup>94)</sup>。

アクチン結合部位には、多数のセリン、トレオニンが存在し、そのほとんどが自己リン酸化され、それによりF-アクチンとの結合が減弱する(図3A)<sup>96)</sup>。FRETを用い、CaMKII $\beta$ サブユニットとF-アクチンとの結合をモニターしたところ、LTP誘導直後に両者は乖離し、1分程度で再結合することがわかった<sup>97)</sup>。この間に、コフィリンやArp2/3などのアクチン調節因子がアクチンに作用し、スパインの形態を変化させる。この過程をセリン、トレオニンをアラニンに変異させて阻害すると、LTPも阻害された<sup>97)</sup>。

アクチン束化因子としてのCaMKIIの役割にLLPSがどのように関与しているかはまだ不明であり、今後の研究の進展が待たれる。

## 8. CaMKIIとヒト疾患

近年のエクソームシーケンシングの発展により、ヒトにおいてCaMKIIの遺伝変異が見いだされた。秋田らは976人の知的能力障害(知的発達症)の全エクソーム解析を行い、3例のCaMKII $\alpha$ サブユニット、2例のCaMKII $\beta$ サブユニットの*de novo*変異を見いだしている<sup>98)</sup>。またKüryらはヨーロッパならびにアメリカで見つかったそれぞれ12例、7例の*de novo*変異<sup>99)</sup>、さらに1例のCaMKII $\gamma$ サブユニットの変異<sup>100)</sup>を、ChiaらもヨルダンのCaMKII $\alpha$ サブユニット変異1家系2例を報告している<sup>101)</sup>。いずれも患者は臨床的には重篤な知的能力障害、症例によっては痙攣や、画像上、脳萎縮を呈する例もある。またIossifovらは自閉症を示す患者のエクソーム解析からCaMKII $\alpha$ サブユニット変異を1例見いだしている<sup>102)</sup>。

これらは主にコーディング領域の変異であるが、イントロンのスプライス領域と考えられる変異も見つかっている。コーディング領域の変異は、キナーゼドメインにあるもの、自己阻害ドメインにあるもの、会合ドメインにあるものなど多岐にわたる。興味深いことに、CaMKII $\alpha$ サブユニットのPro212、Pro235の変異は秋田ら、Küryらのいずれにも独立して見いだされており、CaMKII機能へ重要であることが示唆される。また自閉症患者でみられたCaMKII $\alpha$ のE183V変異体は、E183V変異もKüryらによっても検出されている。この変異はノックイン動物も作られ、詳細に解析されている<sup>103)</sup>。

我々にとって興味深いのは、F98S変異である<sup>99)</sup>。F98は、BayerらによりT-siteを構成しGluN2Bとの結合に重要なアミノ酸残基として同定されており、CaMKIIのLLPSを阻害することが予想される。したがって、ヒトでの変異により重篤な症状が出たということは、CaMKIIのLLPS形成能がその機能に重要であること示している。

## 9. おわりに

LTPは最初の報告から40年以上、CaMKIIも発見以来すでに30年以上が過ぎ、関わっている研究者も世代交代し

ている。それでもなお新たな知見が集まりつつあり、その研究の奥深さを感じざるをえない。いまだにCaMKIIがLTPにいかに関与しているかについてはすべてが明らかになっておらず、今後の発展を期待したい。

## 謝辞

本稿で紹介した研究に関わった多くの共同研究者の方々に感謝いたします。また、溝口萌さん、白川日菜実さん、杉山優衣さんにはコメントをいただきましたことを感謝いたします。理研理事長ファンド、京都大学SPIRITS 2019、科研費18H05434、20K21462、上原記念財団、内藤記念科学振興財団、武田科学振興財団、日本応用酵素協会、Human Frontier Science Foundationの援助を得て行われました。この場をお借りしてお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) ヘップ, D.O. (2011) 行動の機構 脳メカニズムから心理学へ。岩波書店, 東京。
- 2) Bliss, T.V. & Lomo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, **232**, 331–356.
- 3) Bliss, T.V. & Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, **361**, 31–39.
- 4) Kim, K., Saneyoshi, T., Hosokawa, T., Okamoto, K., & Hayashi, Y. (2016) Interplay of enzymatic and structural functions of CaMKII in long-term potentiation. *J. Neurochem.*, **139**, 959–972.
- 5) Yamauchi, T. & Fujisawa, H. (1983) Purification and characterization of the brain calmodulin-dependent protein kinase (kinase II), which is involved in the activation of tryptophan 5-monooxygenase. *Eur. J. Biochem.*, **132**, 15–21.
- 6) 藤澤 仁 (1992) 多機能性カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素。生化学, **64**, 14–25.
- 7) 山内 卓 (2007) カムキナーゼIIから記憶・学習の分子の基盤へ。 *Yakugaku Zasshi*, **127**, 1173–1197.
- 8) Bennett, M.K., Erond, N.E., & Kennedy, M.B. (1983) Purification and characterization of a calmodulin-dependent protein-kinase that is highly concentrated in brain. *J. Biol. Chem.*, **258**, 2735–2744.
- 9) Kuret, J. & Schulman, H. (1984) Purification and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase from rat brain. *Biochemistry*, **23**, 5495–5504.
- 10) Schworer, C.M., McClure, R.W., & Soderling, T.R. (1985) Calmodulin-dependent protein kinases purified from rat brain and rabbit liver. *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 137–145.
- 11) Kelly, P.T., McGuinness, T.L., & Greengard, P. (1984) Evidence that the major postsynaptic density protein is a component of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 945–949.
- 12) Tobimatsu, T. & Fujisawa, H. (1989) Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17907–17912.
- 13) Brocke, L., Srinivasan, M., & Schulman, H. (1995) Developmental and regional expression of multifunctional  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase isoforms in rat brain. *J. Neurosci.*, **15**, 6797–6808.



- 14) Cook, S.G., Bourke, A.M., O'Leary, H., Zaegel, V., Lasda, E., Mize-Berge, J., Quillinan, N., Tucker, C.L., Coultrap, S.J., Herson, P.S., et al. (2018) Analysis of the CaMKII $\alpha$  and  $\beta$  splice-variant distribution among brain regions reveals isoform-specific differences in holoenzyme formation. *Sci. Rep.*, **8**, 5448.
- 15) Schworer, C.M., Colbran, R.J., & Soderling, T.R. (1986) Reversible generation of a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent form of  $\text{Ca}^{2+}$ (calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8581–8584.
- 16) Nishiyama, J. & Yasuda, R. (2015) Biochemical computation for spine structural plasticity. *Neuron*, **87**, 63–75.
- 17) Lisman, J.E. & Goldring, M.A. (1988) Feasibility of long-term storage of graded information by the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5320–5324.
- 18) Malinow, R., Schulman, H., & Tsien, R.W. (1989) Inhibition of postsynaptic pkc or camkii blocks induction but not expression of ltp. *Science*, **245**, 862–866.
- 19) Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A., & Waxham, M.N. (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature*, **340**, 554–557.
- 20) Pettit, D.L., Perlman, S., & Malinow, R. (1994) Potentiated transmission and prevention of further ltp by increased camkii activity in postsynaptic hippocampal slice neurons. *Science*, **266**, 1881–1885.
- 21) Lledo, P.M., Hjelmstad, G.O., Mukherji, S., Soderling, T.R., Malenka, R.C., & Nicoll, R.A. (1995) Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11175–11179.
- 22) Shirke, A.M. & Malinow, R. (1997) Mechanisms of potentiation by calcium-calmodulin kinase II of postsynaptic sensitivity in rat hippocampal CA1 neurons. *J. Neurophysiol.*, **78**, 2682–2692.
- 23) Hayashi, Y., Shi, S.H., Esteban, J.A., Piccini, A., Poncer, J.C., & Malinow, R. (2000) Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: Requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science*, **287**, 2262–2267.
- 24) Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., & Wang, Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in  $\alpha$ -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, **257**, 201–206.
- 25) Silva, A.J., Wang, Y., Paylor, R., Wehner, J.M., Stevens, C.F., & Tonegawa, S. (1992)  $\alpha$  calcium/calmodulin kinase II mutant mice: Deficient long-term potentiation and impaired spatial learning. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **57**, 527–539.
- 26) Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., & Silva, A.J. (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the  $\alpha$  calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, **279**, 870–873.
- 27) Ouyang, Y., Kantor, D., Harris, K.M., Schuman, E.M., & Kennedy, M.B. (1997) Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocampus. *J. Neurosci.*, **17**, 5416–5427.
- 28) Fukunaga, K., Stoppini, L., Miyamoto, E., & Muller, D. (1993) Long-term potentiation is associated with an increased activity of  $\text{Ca}^{2+}$  calmodulin-dependent protein kinase-ii. *J. Biol. Chem.*, **268**, 7863–7867.
- 29) Fukunaga, K., Muller, D., & Miyamoto, E. (1995) Increased phosphorylation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II and its endogenous substrates in the induction of long-term potentiation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6119–6124.
- 30) Takao, K., Okamoto, K., Nakagawa, T., Neve, R.L., Nagai, T., Miyawaki, A., Hashikawa, T., Kobayashi, S., & Hayashi, Y. (2005) Visualization of synaptic  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II activity in living neurons. *J. Neurosci.*, **25**, 3107–3112.
- 31) Kwok, S., Lee, C., Sanchez, S.A., Hazlett, T.L., Gratton, E., & Hayashi, Y. (2008) Genetically encoded probe for fluorescence lifetime imaging of CaMKII activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 519–525.
- 32) Lee, S.J., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E.M., & Yasuda, R. (2009) Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*, **458**, 299–304.
- 33) Chang, J.Y., Parra-Bueno, P., Laviv, T., Szatmari, E.M., Lee, S.R., & Yasuda, R. (2017) CaMKII autophosphorylation is necessary for optimal integration of  $\text{Ca}^{2+}$  signals during LTP induction, but not maintenance. *Neuron*, **94**, 800–808.e804.
- 34) Saneyoshi, T., Matsuno, H., Suzuki, A., Murakoshi, H., Hedrick, N.G., Agnello, E., O'Connell, R., Stratton, M.M., Yasuda, R., & Hayashi, Y. (2019) Reciprocal activation within a kinase-effector complex underlying persistence of structural LTP. *Neuron*, **102**, 1199–1210.e1196.
- 35) Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T., & Fujisawa, H. (1995) A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 806–812.
- 36) Murakoshi, H., Shin, M.E., Parra-Bueno, P., Szatmari, E.M., Shibata, A.C., & Yasuda, R. (2017) Kinetics of endogenous CaMKII required for synaptic plasticity revealed by optogenetic kinase inhibitor. *Neuron*, **94**, 37–47.e35.
- 37) McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H., Tan, S.E., Brickey, D.A., & Soderling, T.R. (1993) Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature*, **362**, 640–642.
- 38) Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C., & Soderling, T.R. (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*, **276**, 2042–2045.
- 39) Barria, A., Derkach, V., & Soderling, T. (1997) Identification of the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32727–32730.
- 40) Mammen, A.L., Kameyama, K., Roche, K.W., & Huganir, R.L. (1997) Phosphorylation of the  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32528–32533.
- 41) Roche, K.W., O'Brien, R.J., Mammen, A.L., Bernhardt, J., & Huganir, R.L. (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron*, **16**, 1179–1188.
- 42) Lee, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., & Huganir, R.L. (2000) Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature*, **405**, 955–959.
- 43) Derkach, V., Barria, A., & Soderling, T.R. (1999)  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3269–3274.

- 44) Benke, T.A., Luthi, A., Isaac, J.T., & Collingridge, G.L. (1998) Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*, **393**, 793–797.
- 45) Lee, H.K., Takamiya, K., Han, J.S., Man, H., Kim, C.H., Rumbaugh, G., Yu, S., Ding, L., He, C., Petralia, R.S., et al. (2003) Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory. *Cell*, **112**, 631–643.
- 46) Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G.Q., & Gouaux, E. (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature*, **395**, 913–917.
- 47) Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y., Aoki, Y., Okita, K., & Koike, T. (2008) Separation of phosphoprotein isotypes having the same number of phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics*, **8**, 2994–3003.
- 48) Hosokawa, T., Mitsushima, D., Kaneko, R., & Hayashi, Y. (2015) Stoichiometry and phosphoisotypes of hippocampal AMPA type glutamate receptor phosphorylation. *Neuron*, **85**, 60–67.
- 49) Sumioka, A., Yan, D., & Tomita, S. (2010) TARP phosphorylation regulates synaptic AMPA receptors through lipid bilayers. *Neuron*, **66**, 755–767.
- 50) Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C.M., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P., & Choquet, D. (2010) CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron*, **67**, 239–252.
- 51) Zeng, M., Diaz-Alonso, J., Ye, F., Chen, X., Xu, J., Ji, Z., Nicoll, R.A., & Zhang, M. (2019) Phase separation-mediated TARP/MAGUK complex condensation and AMPA receptor synaptic transmission. *Neuron*, **104**, 529–543.e526.
- 52) Cheng, D., Hoogenraad, C.C., Rush, J., Ramm, E., Schlager, M.A., Duong, D.M., Xu, P., Wijayawardana, S.R., Hanfelt, J., Nakagawa, T., et al. (2006) Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 1158–1170.
- 53) Sheng, M. & Hoogenraad, C.C. (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: A more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 823–847.
- 54) Araki, Y., Zeng, M., Zhang, M., & Haganir, R.L. (2015) Rapid dispersion of SynGAP from synaptic spines triggers AMPA receptor insertion and spine enlargement during LTP. *Neuron*, **85**, 173–189.
- 55) Zhu, J.J., Qin, Y., Zhao, M., Van Aelst, L., & Malinow, R. (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell*, **110**, 443–455.
- 56) Harvey, C.D., Yasuda, R., Zhong, H., & Svoboda, K. (2008) The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science*, **321**, 136–140.
- 57) Yamauchi, T., Sekihara, S., & Ohsako, S. (1990) Subcellular distribution of alpha and beta subunit proteins of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II expressed in Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett.*, **266**, 55–58.
- 58) Suzuki, T., Okumura-Noji, K., Tanaka, R., & Tada, T. (1994) Rapid translocation of cytosolic Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II into postsynaptic density after decapitation. *J. Neurochem.*, **63**, 1529–1537.
- 59) Strack, S., Choi, S., Lovinger, D.M., & Colbran, R.J. (1997) Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.*, **272**, 13467–13470.
- 60) Shen, K. & Meyer, T. (1999) Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science*, **284**, 162–166.
- 61) Shen, K., Teruel, M.N., Connor, J.H., Shenolikar, S., & Meyer, T. (2000) Molecular memory by reversible translocation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nat. Neurosci.*, **3**, 881–886.
- 62) Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., & Hayashi, Y. (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron*, **82**, 444–459.
- 63) Strack, S. & Colbran, R.J. (1998) Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20689–20692.
- 64) Halt, A.R., Dallapiazza, R.F., Zhou, Y., Stein, I.S., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A.J., & Hell, J.W. (2012) CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J.*, **31**, 1203–1216.
- 65) Bayer, K.U., De Koninck, P., Leonard, A.S., Hell, J.W., & Schulman, H. (2001) Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature*, **411**, 801–805.
- 66) Özden, C., Sloutsky, R., Santos, N., Agnello, E., Gaubitz, C., Lapinskas, E., Esposito, E.A., Kelch, B.A., Garman, S.C., Hayashi, Y., et al. (2020) CaMKII binds both substrates and effectors at the active site. *bioRxiv*, 10.25.354241.
- 67) Hedrick, N.G., Harward, S.C., Hall, C.E., Murakoshi, H., McNamara, J.O., & Yasuda, R. (2016) Rho GTPase complementation underlies BDNF-dependent homo- and heterosynaptic plasticity. *Nature*, **538**, 104–108.
- 68) Kojima, H., Rosendale, M., Sugiyama, Y., Hayashi, M., Horiguchi, Y., Yoshihara, T., Ikegaya, Y., Saneyoshi, T., & Hayashi, Y. (2019) The role of CaMKII-Tiam1 complex on learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **166**, 107070.
- 69) Chang, B.H., Mukherji, S., & Soderling, T.R. (1998) Characterization of a calmodulin kinase II inhibitor protein in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10890–10895.
- 70) Walikonis, R.S., Oguni, A., Khorosheva, E.M., Jeng, C.J., Asuncion, F.J., & Kennedy, M.B. (2001) Densin-180 forms a ternary complex with the  $\alpha$ -subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and  $\alpha$ -actinin. *J. Neurosci.*, **21**, 423–433.
- 71) Sun, X.X., Hodge, J.J., Zhou, Y., Nguyen, M., & Griffith, L.C. (2004) The eag potassium channel binds and locally activates calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, **279**, 10206–10214.
- 72) Alev, C., Urschel, S., Sonntag, S., Zoidl, G., Fort, A.G., Hoher, T., Matsubara, M., Willecke, K., Spray, D.C., & Dermietzel, R. (2008) The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 20964–20969.
- 73) Wang, X., Marks, C.R., Perfitt, T.L., Nakagawa, T., Lee, A., Jacobson, D.A., & Colbran, R.J. (2017) A novel mechanism for Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II targeting to L-type Ca<sup>2+</sup> channels that initiates long-range signaling to the nucleus. *J. Biol. Chem.*, **292**, 17324–17336.
- 74) Royer, L., Herzog, J.J., Kenny, K., Tzvetkova, B., Cochrane, J.C., Marr, M.T. 2nd, & Paradis, S. (2018) The Ras-like GTPase Rem2 is a potent inhibitor of calcium/calmodulin-dependent kinase II activity. *J. Biol. Chem.*, **293**, 14798–14811.
- 75) Erondy, N.E. & Kennedy, M.B. (1985) Regional distribution of

- type II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurosci.*, **5**, 3270–3277.
- 76) Miller, S.G. & Kennedy, M.B. (1985) Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J. Biol. Chem.*, **260**, 9039–9046.
  - 77) Kanaseki, T., Ikeuchi, Y., Sugiura, H., & Yamauchi, T. (1991) Structural features of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II revealed by electron microscopy. *J. Cell Biol.*, **115**, 1049–1060.
  - 78) 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. (2011) A mechanism for tunable autoinhibition in the structure of a human  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase II holoenzyme. *Cell*, **146**, 732–745.
  - 79) Myers, J.B., Zaegel, V., Coultrap, S.J., Miller, A.P., Bayer, K.U., & Reichow, S.L. (2017) The CaMKII holoenzyme structure in activation-competent conformations. *Nat. Commun.*, **8**, 15742.
  - 80) Hyman, A.A., Weber, C.A., & Julicher, F. (2014) Liquid-liquid phase separation in biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 39–58.
  - 81) 白木賢太郎 (2019) 相分離生物学. 東京化学同人.
  - 82) Milovanovic, D., Wu, Y., Bian, X., & De Camilli, P. (2018) A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*, **361**, 604–607.
  - 83) Zeng, M., Shang, Y., Araki, Y., Guo, T., Hugarir, R.L., & Zhang, M. (2016) Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity. *Cell*, **166**, 1163–1175.e1112.
  - 84) Zeng, M., Chen, X., Guan, D., Xu, J., Wu, H., Tong, P., & Zhang, M. (2018) Reconstituted postsynaptic density as a molecular platform for understanding synapse formation and plasticity. *Cell*, **174**, 1172–1187.e1116.
  - 85) Hayashi, Y., Ford, L.K., Fioriti, L., McGurk, L., & Zhang, M. (2021) Liquid-liquid phase separation in physiology and pathophysiology of nervous system. *J. Neurosci.*, **41**, 834–844.
  - 86) Hosokawa, T., Liu, P.-W., Cai, Q., Ferreira, J.S., Levet, F., Butler, C., Sibarita, J.B., Choquet, D., Groc, L., Hosy, E., et al. CaMKII activation persistently segregates postsynaptic proteins via liquid phase separation *Nat. Neurosci.*, in press.
  - 87) Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., & Hayashi, Y. (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.*, **7**, 1104–1112.
  - 88) Futai, K., Kim, M.J., Hashikawa, T., Scheiffele, P., Sheng, M., & Hayashi, Y. (2007) Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neurologin. *Nat. Neurosci.*, **10**, 186–195.
  - 89) Patneau, D.K. & Mayer, M.L. (1990) Structure-Activity-Relationships for Amino-Acid Transmitter Candidates Acting at N-Methyl-D-Aspartate and Quisqualate Receptors. *J. Neurosci.*, **10**, 2385–2399.
  - 90) Tong, G. & Jahr, C.E. (1994) Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron*, **13**, 1195–1203.
  - 91) Liu, G., Choi, S., & Tsien, R.W. (1999) Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron*, **22**, 395–409.
  - 92) Xie, X., Liaw, J.S., Baudry, M., & Berger, T.W. (1997) Novel expression mechanism for synaptic potentiation: Alignment of presynaptic release site and postsynaptic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6983–6988.
  - 93) Shen, K., Teruel, M.N., Subramanian, K., & Meyer, T. (1998) CaMKII $\beta$  functions as an F-actin targeting module that localizes CaMKII $\alpha/\beta$  heterooligomers to dendritic spines. *Neuron*, **21**, 593–606.
  - 94) Okamoto, K., Narayanan, R., Lee, S.H., Murata, K., & Hayashi, Y. (2007) The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 6418–6423.
  - 95) O'Leary, H., Lasda, E., & Bayer, K.U. (2006) CaMKII $\beta$  association with the actin-cytoskeleton is regulated by alternative splicing. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4656–4665.
  - 96) Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H.E., Khan, M., Suzuki, A., Kato-Hayashi, M., Narayanan, R., Luyben, T.T., Matsuda, T., Nagai, T., et al. (2015) 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.
  - 97) Kim, K., Suzuki, A., Kojima, H., Kawamura, M., Miya, K., Abe, M., Yamada, I., Furuse, T., Wakana, S., Sakimura, K., et al. (2019) Autophosphorylation of F-actin binding domain of CaMKII $\beta$  is required for fear learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **157**, 86–95.
  - 98) Akita, T., Aoto, K., Kato, M., Shiina, M., Mutoh, H., Nakashima, M., Kuki, I., Okazaki, S., Magara, S., Shiihara, T., et al. (2018) De novo variants in CAMK2A and CAMK2B cause neurodevelopmental disorders. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **5**, 280–296.
  - 99) Kürty, S., van Woerden, G.M., Besnard, T., Proietti Onori, M., Latypova, X., Towne, M.C., Cho, M.T., Prescott, T.E., Ploeg, M.A., Sanders, S., et al.; Undiagnosed Diseases Network; GEM HUGO; Deciphering Developmental Disorders Study. (2017) De novo mutations in protein kinase genes CAMK2A and CAMK2B cause intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, **101**, 768–788.
  - 100) Proietti Onori, M., Koopal, B., Everman, D.B., Worthington, J.D., Jones, J.R., Ploeg, M.A., Mientjes, E., van Bon, B.W., Kleefstra, T., Schulman, H., et al. (2018) The intellectual disability-associated CAMK2G p.Arg292Pro mutation acts as a pathogenic gain-of-function. *Hum. Mutat.*, **39**, 2008–2024.
  - 101) Chia, P.H., Zhong, F.L., Niwa, S., Bonnard, C., Utami, K.H., Zeng, R., Lee, H., Eskin, A., Nelson, S.F., Xie, W.H., et al. (2018) A homozygous loss-of-function CAMK2A mutation causes growth delay, frequent seizures and severe intellectual disability. *eLife*, **7**, 7.
  - 102) Iossifov, I., O'Roak, B.J., Sanders, S.J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H.A., Witherspoon, K.T., Vives, L., Patterson, K.E., et al. (2014) The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, **515**, 216–221.
  - 103) Stephenson, J.R., Wang, X., Perfitt, T.L., Parrish, W.P., Shonessy, B.C., Marks, C.R., Mortlock, D.P., Nakagawa, T., Sutcliffe, J.S., & Colbran, R.J. (2017) A novel human CAMK2A mutation disrupts dendritic morphology and synaptic transmission, and causes ASD-related behaviors. *J. Neurosci.*, **37**, 2216–2233.



## 著者寸描

## ●林 康紀 (はやし やすのり)

京都大学大学院医学研究科システム神経薬理学分野教授、博士(医学)。

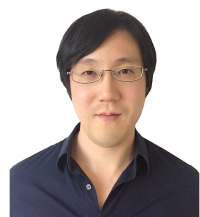
■略歴 1990年京都大学医学部卒業、94年同大学院修了。日本学術振興会特別研究員(東京大学医学部)、ポスドク(コールドスプリングハーバー研究所)を経て、2000年理研-MIT神経科学研究センターにて独立、09年理研脳科学総合研究センターチームリーダー、16年より現職。

■研究テーマと抱負 記憶の分子基盤に興味を持っている。最近はさらにシステムレベルの課題にも取り組む。一緒に研究してくれる若手を募集中。

■ウェブサイト <http://glutamate.med.kyoto-u.ac.jp>

■趣味 鉄道旅行。

## ●細川 智永 (ほそかわ ともひさ)



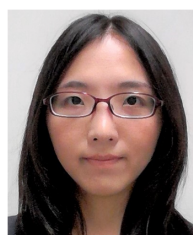
名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻情報機構学講師、博士(理学)。

■略歴 2004年東京都立大学理学部卒業、10年同大学院修了、PhD取得。同年から理化学研究所脳科学総合研究センター(理研BSI)の林康紀チームにてポスドク、17年より林教授に付いて京都大学に移籍、21年より現職。

■研究テーマと抱負 シナプスの形成と役割、特にシナプス活動に伴う構造的長期増強とシナプス後膜肥厚(PSD)の蛋白質の動態に興味を持っている。シナプス可塑性の分子機構の核心を明らかにし、その医学的应用を通して社会貢献したい。

■趣味 筋トレ。

## ●劉 品吾 (りゅう ぴんうー)



京都大学大学院医学研究科システム神経薬理学分野教務補佐員、博士(医科学)。

■略歴 2011年台湾の中央大学理学部卒業、15年台湾大学心理科学研究科修了、20年京都大学大学院医学研究科修了。同年より現職、21年PhD取得。

■研究テーマと抱負 記憶に基づく動物行動に興味を持っている。分子レベルと行動レベルにはいまだに深い溝があり、

これからそれを埋めて対応付けていきたい。分子から行動まですべてをこなす研究者になりたい。

■趣味 料理と小旅行。

## ●實吉 岳郎 (さねよし たけお)

京都大学大学院医学研究科システム神経薬理学分野准教授、博士(医学)。

■略歴 1996年北海道大学農学部卒業、2002年東京大学大学院医学系研究科修了。米国オレゴン健康科学大学ボラム研究所、産業技術総合研究所、理化学研究所を経て、16年より現職。

■研究テーマ 記憶を維持する分子メカニズム。

■抱負 物質は入れ替わるが、記憶は変わらない、この仕組みを解明したい。

■趣味 魚釣り。