

知的障害を引き起こすリン酸化酵素の異常を解明 ——蛍光を使って病気の仕組みに迫る——

1. 発表者：

藤井 哉 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生化学分野 講師)
城所 博之 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 助教)
竹本 さやか (名古屋大学環境医学研究所神経系分野 I/大学院医学系研究科分子神経科学 教授)
尾藤 晴彦 (東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻神経生化学分野 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆遺伝子変異によって CaMKII α (カムケーツーアルファ)が異常に活性化し、知的障害を引き起こすことが分かった。
- ◆蛍光を使った測定システムを独自に開発し、知的障害に伴う CaMKII α の異常活性化を世界で初めて解明した。
- ◆知的障害の発症の仕組みの解明や、治療方法の開発が期待される。

3. 発表概要：

脳が正常に働くためには CaMKII α (カムケーツーアルファ、注 1)が適切に活性化することが重要である。東京大学大学院医学系研究科の藤井哉講師、尾藤晴彦教授、名古屋大学大学院医学系研究科の城所博之助教、名古屋大学環境医学研究所/大学院医学系研究科の竹本さやか教授らの研究グループは、CaMKII α に P212L 変異(CaMKII α タンパク質の 212 番目のアミノ酸がプロリン(P)からロイシン(L)に変化している変異)があることによって、CaMKII α が異常に活性化して知的障害を引き起こしていることを明らかにした(図 1)。

今回、研究グループは知的障害のある患者の全エクソームシーケンス解析(注 2)を行い、CaMKII α の遺伝子に P212L 変異があることを発見した(図 1)。以前から P212L 変異が知的障害を引き起こすことは知られていたが、この変異によって CaMKII α の機能がどのように変わって知的障害を引き起こされるのかという仕組みは全く分かっていなかった(図 1)。そこで、CaMKII α の活性化を蛍光で測定する方法を独自に開発し、細胞から抽出した溶液(注 3)や生きた神経細胞・シナプスで CaMKII α の活性化を解析した(図 1)。その結果、P212L 変異のある CaMKII α は神経活動によって異常に活性化されることを世界で初めて明らかにした(図 1)。また、認知症の治療に使われるメマンチンを使うと P212L 変異のある CaMKII α の異常な活性化を抑えられることを明らかにした。

この成果は CaMKII α 変異による知的障害の仕組みの解明につながると考えられる。また、CaMKII α の異常な活性化を抑えることで知的障害の治療法の開発につながることが期待される。

本研究成果は、2022 年 9 月 1 日 (日本標準時) にスイス科学誌「Frontiers in molecular neuroscience」のオンライン版に掲載された。

本研究は日本医療研究開発機構 (AMED) ・脳とこころの研究推進プログラム (JP19dm0207079) 、文部科学省新学術領域研究「記憶・情動における多領域間脳情報動態の光学的計測と制御」(JP17H06312)、科学研究費補助金(JP17K13270, JP22H00432, JP22H05160, JP21H05091) の支援により実施された。

4. 発表内容：

研究の背景・先行研究における問題点

脳の機能には神経活動に伴う Ca^{2+} の濃度上昇によって CaMKII α (注 1)が適切に活性化して、様々なタンパク質をリン酸化することでシナプスの特性を変えることが重要である。近年、ゲノム解析によって知的障害や発達障害、精神疾患の患者から様々な CaMKII α の変異が見つかってきている。こうした変異によって CaMKII α の機能が異常になっていることが予想されるが、実際にこれらの変異が Ca^{2+} による CaMKII α の活性化をどのように変化させるのかを調べた研究はほとんどなく、知的障害を引き起こす仕組みは十分に分かっていなかった。

研究内容（具体的な手法など詳細）

知的障害のある患者に対して全エクソームシーケンス解析(注 2)を行い、CaMKII α の遺伝子に P212L 変異を認め、それが両親から受け継いだものではなく患者で新しく獲得された *de novo* 変異であることを明らかにした(図 1)。P212L 変異は知的障害から見つかった CaMKII α の変異の中では最も報告例数の多いものであり、これまでの研究ではタンパク質の安定性や CaMKII α 自身に対するリン酸化、神経細胞の移動に対する影響が調べられたが、変異のない野生型との違いが認められず、P212L 変異によって CaMKII α の機能がどのように変わるのかは分かっていなかった。こうしたことから、CaMKII α の特に重要な特徴である $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ による活性化を定量的に、感度よく、効率的かつ手軽に計測して比較する必要があると考えた。そのために、CaMKII α の活性化を蛍光で検出できる FRET プローブ(注 4)(図 2)を使って、細胞から抽出した溶液(注 3)や生きた神経細胞・シナプスで CaMKII α の活性化を計測できるシステムを独自に開発した(図 1)。細胞から抽出した溶液を使った実験から、P212L 変異を持った CaMKII α は変異のない野生型に比べて $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存的な活性化が亢進していることが明らかになった(図 1)。次に、神経細胞では、グルタミン酸の光融解刺激(注 5)に対して、CaMKII α の応答の大きさが増大し、さらに活性化の上昇は速く、下降は遅くなっており、全体として活性化が異常に亢進していることを世界で初めて明らかにした(図 1)。また、樹状突起のシナプスの中でも、P212L は活性化応答が大きくなっていた。CaMKII α は刺激の頻度が高くなるほど活性化が大きくなる頻度依存的な応答を示し、脳の機能に重要であると考えられているが、P212L ではこの頻度と応答の関係が、より低頻度の刺激でも大きな応答を示すようにチューニングされていることを明らかにした。こうした解析を、これまでに知的障害の患者から見つかった 9 つの CaMKII α の *de novo* 変異にも適応したところ、そのうちの 6 つでも CaMKII α の活性化の異常亢進が起きていることを明らかにした。こうした異常活性化を抑えることが治療戦略になると考えられるが、今のところ CaMKII α の阻害剤で臨床応用されている薬剤はない。そこで、認知症の治療薬として用いられるメマンチンを使って上流の Ca^{2+} を阻害することで P212L 変異体の異常活性化を抑えられることを示し、新たな治療コンセプトを提示した。

社会的意義・今後の予定

今回の成果に基づいて、今後 CaMKII α の異常な活性化亢進を抑えることで知的障害を治療できるかを明らかにすることが重要な課題である。また、疾患モデル動物などを作成することで、CaMKII α の異常な活性化亢進によってどのように知的障害が引き起こされているのか、その発症のメカニズムの解明につながると考えられる。また、CaMKII α は知的障害に加えて発達障害や統合失調症の患者からも様々な変異が見つかったので、今回新しく開発した計測システムによって新たな発症機構の解明や治療コンセプトの提示につながると考えられる。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Frontiers in molecular neuroscience」 (オンライン版：9月1日)

論文タイトル：Förster resonance energy transfer-based kinase mutation phenotyping reveals an aberrant facilitation of Ca²⁺/calmodulin-dependent CaMKII α activity in de novo mutations related to intellectual disability

著者：Hajime Fujii^{†*}, Hiroyuki Kidokoro[†], Yayoi Kondo, Masahiro Kawaguchi, Shin-ichiro Horigane, Jun Natsume, Sayaka Takemoto-Kimura, Haruhiko Bito^{*}

*: corresponding author

†: equally contribution

DOI 番号：doi: 10.3389/fnmol.2022.970031

アブストラクト URL：

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.970031/abstract>

6. 用語解説：

(注 1) CaMKII α (カムケーターアルファ、Ca²⁺/CaM-dependent kinase II α) 脳内のタンパク質の1%を占めるリン酸化酵素であり、学習や記憶に重要な役割を果たしている。CaMKII α の重要な特徴はCa²⁺/カルモジュリン(Ca²⁺/CaM) (Ca²⁺と結合したカルモジュリン)によって活性化することである。Ca²⁺が低い濃度の状態では酵素活性は自身の自己抑制部位によって抑えられているが、シナプスの入力や神経活動によって細胞内でCa²⁺が上昇すると、Ca²⁺/CaMがCaMKII α を活性化する。神経活動に応じて神経細胞やシナプスにあるタンパク質をリン酸化してその機能を制御する重要な分子であると考えられている。

(注 2) 全エクソームシーケンス解析

ヒトゲノムの中で、タンパク質をコードしている重要な領域だけをシーケンスして効率よく解析する方法。

(注 3) 細胞から抽出した溶液

界面活性剤や超音波などを使って細胞膜を破壊し、細胞の中にあるタンパク質などの生体分子を抽出した溶液。

(注 4) FRET (Förster resonance energy transfer)プローブ

タンパク質のコンフォメーションの変化を2色の蛍光の強さの変化としてとらえることのできる機能性プローブ。本研究では、CaMKII α が活性化する時のコンフォメーション変化をFRETプローブで検出した(図2)。

(注 5) グルタミン酸の光融解刺激

ケージドグルタミン酸は保護基によってグルタミン酸としての働きが抑えられているが、光をあてることによって保護基が脱離してグルタミン酸として働き神経細胞のグルタミン酸受容体を活性化することができる。光の照射のタイミングや領域を絞ることで、自由なパターンで神経細胞を刺激することも可能である。

不活性化CaMKII α

活性化したCaMKII α

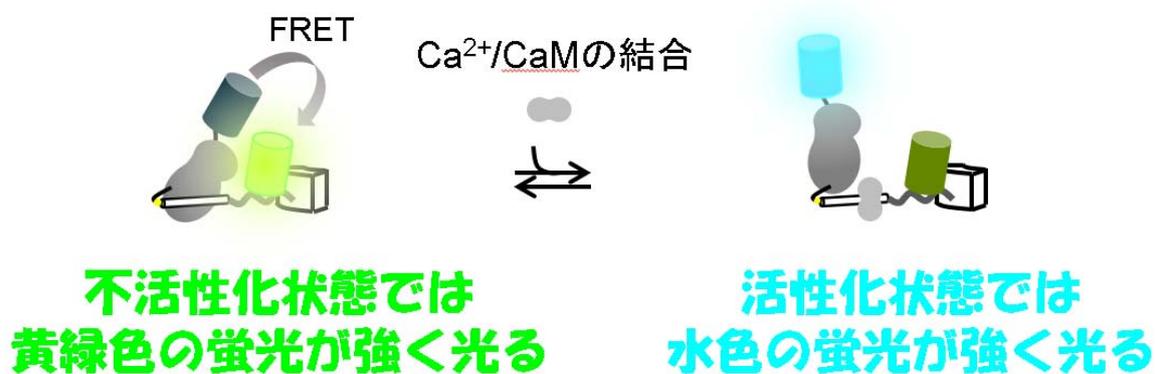


図 2、独自に開発した CaMKII α の活性化を蛍光の色の変化で観察できる蛍光プローブ(FRET
プローブ)