

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790221

研究課題名（和文） 脂質修飾型 CaM キナーゼによる神経機能制御

研究課題名（英文） Regulation of neuronal functions by a lipid-anchored CaM kinase

研究代表者

竹本一木村 さやか (TAKEMOTO-KIMURA SAYAKA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70372365

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者が分子同定を行い、神経樹状突起形成における役割と脂質修飾過程を明らかとしてきた、膜挿入型カルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素 (CaMK) である CLICK-III/CaMKI $\gamma$  に焦点を当て、本酵素のマウス個体における生理的機能の解明を目指す。そのために、*in vitro* 培養系によるシグナリング経路の解明に加えてノックアウトマウスを用いた脳組織構築異常、行動異常の探索を行った。また、マウス脳内への遺伝子導入法を確立し、より詳細な細胞形態異常について検討した。

研究成果の概要（英文）：We previously identified and cloned CLICK-III/CaMKI $\gamma$ , a novel lipid-anchored neuronal CaM kinase, which we further showed played a critical role in dendritogenesis in cultured cortical neurons. Here, we attempted to investigate the physiological functions of this kinase in mouse tissues *in vivo*. In order to obtain clues about the neuronal functions associated with CLICK-III/CaMKI $\gamma$ , we generated a knockout mouse with a view to carrying out histological and behavioral analyses. Furthermore, we established *in vivo* gene transfer methods to study the impact of CLICK-III and related CaMKI isoforms in regulating fine neuronal morphologies during brain development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：樹状突起、CaMK、脂質修飾

## 1. 研究開始当初の背景

神経カルシウム流入は、神経回路形成において必須である神経細胞の形態変化・細胞移

動や脳の層構造構築にとってきわめて重要な意義を有する。しかしながら、実際にカルシウムによって制御される回路形成・再編成

機構や、カルシウムの下流分子機構には不明な点が多く、これらの過程の障害が脳機能の異常の引き金となると考えられることから、その分子機構の探索は喫緊の課題である。

カルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素群(CaM キナーゼまたは CaMK)は、カルシウム/カルモジュリン複合体によって速やかに活性化され神経系において発現が高いという性質を有し、神経回路機能における役割が注目される。研究代表者は、自ら発見した新規膜挿入型カルシウム/カルモジュリン依存性蛋白質リン酸化酵素(CaM キナーゼまたは CaMK)である CLICK-III/CaMKI $\gamma$  (Takemoto-Kimura et al. JBC 2003) が、脂質修飾によりラフト膜へ選択的に挿入され、その結果カルシウム依存的な樹状突起伸展を制御することを明らかにした

(Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007)。そこで、本研究課題は、研究開始時に既に得られていたこれらの成果に基づき、脂質修飾型 CaMK である CLICK-III による神経機能制御を更に推進し、神経回路形成・回路再編成における機能や、個体行動制御における CaMK 脂質修飾の意義を総合的に理解し立証することを旨とした。

## 2. 研究の目的

ラフト膜挿入型 CaMK である CLICK-III がラフト膜挿入され樹状突起形成を制御する細胞内シグナリング機構を解明する。またノックアウトマウスを用いてマウス個体の神経回路形成や、神経回路再編成、更には個体行動制御における CLICK-III 機能を明らかにし、CaMK 脂質修飾の意義を個体レベルで立証する。これらの研究を通して、酵素・細胞・個体といった多階層生命現象における CaMK 脂質修飾の意義を総合的に理解することを旨とする。

## 3. 研究の方法

(1) 神経突起伸展を制御する CLICK-III を中心とした情報伝達系の解明。

① 大脳皮質初代神経培養を用い、ノックダ

ウンベクターや過剰発現ベクターを発現させた際の神経突起伸展を計測することで、細胞内情報伝達機構の解明を行う。

② これまで大腸菌での精製が困難であった全長のリコンビナントリン酸化酵素を、Sf9 細胞を用いて発現・精製し、至適活性化条件や下流基質の同定を生化学的な手法を用いて推進する。

(2) ノックアウトマウス作出によるマウス個体内神経機能における CLICK-III の役割解明。

① 脳組織構築の異常や細胞形態の異常が認められるか、組織学的な手法により検討する。

② 生体脳内にて CLICK-III の発現が多い辺縁系機能に着目した行動解析を行う。

## 4. 研究成果

(1) 初代大脳皮質神経細胞培養における CLICK-III 樹状突起伸展作用の分子機構を更に探索するため、類似キナーゼによる突起伸展作用を検討した結果、同じファミリーに属する CaMKI $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ は樹状突起伸展作用を有していないことが分かった。一方、CaMKI $\alpha$ は樹状突起ではなく軸索伸長を促進させる作用を有することを新たに見出し、類似 CaM キナーゼによる軸索・樹状突起伸展という他に類を見ない細胞現象を発見した

(Ageta-Ishihara et al. J. Neurosci. 2009)。

### “in vitro culture”

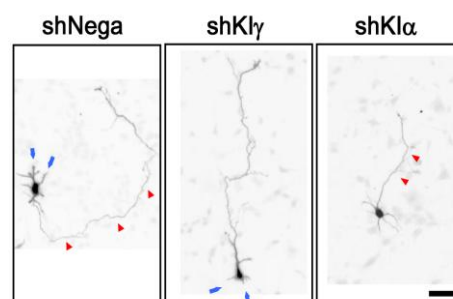


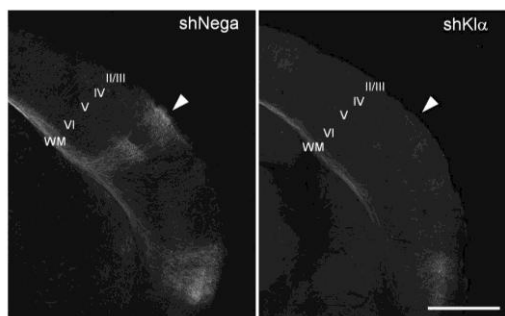
図1:CLICK-III ノックダウン (shKl $\gamma$ ) と CaMKI $\alpha$  ノックダウン (shKl $\alpha$ ) による、樹状突起短縮 (青矢印) と軸索短縮 (赤矢頭)。

(2) *in vitro*にて生化学的特性を明らかにするために、これまで全長の精製が非常に困難であった、全長 CLICK-III リコンビナント蛋白質発現を、Sf9 細胞を用いて確立することに成功した。精製方法を確立後、リコンビナントタンパク質の酵素活性を検討し、*in vitro*における本酵素の活性化には  $Ca^{2+}/CaM$  ならびに上流リン酸化酵素によるリン酸化が重要であることを明らかとした。

(3) CLICK-III ノックアウトマウスを用いた脳組織構築異常の探索を行い、顕著な異常が認められないことを明らかとした。また各種神経細胞マーカーとの2重染色を行い、本酵素の脳内における分布を検討した。

(4) これまで技術的困難により進展が比較的遅れていた、*in vivo*における各酵素の機能を解明するために、*in utero* electroporation や *in utero* virus infection の実験系を確立し、それぞれの酵素のノックダウンベクターを導入した。その結果、CaMKI $\alpha$ のノックダウンにより *in vivo*においても軸索伸長が障害されることを示した(図2)。本知見は、これまで不明であったCaMKIファミリーの初めての*in vivo*機能として注目される。

図2: 交連線維軸索先端における CaMKI $\alpha$ -ノックダウンの効果



ウンの効果

更に、CLICK-III ノックアウトマウスを用いて *in utero* electroporation 法やレンチウイルスを用いて神経細胞の形態を可視化し、*in vivo*における樹状突起形態異常の有

無を検討した。

(5) 生体脳内において CLICK-III の発現が多い辺縁系機能に着目した行動解析を、世界に先駆けて作出した CLICK-III ノックアウトマウスを用いて着手し、複数の行動実験系においてノックアウトマウスで異常を認める可能性を見出した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者は下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ①Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H, Control of cortical axon elongation by a GABA-driven  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase cascade. The Journal of neuroscience 29, 13720-9 (2009) 査読有
- ②Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H, Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 316-21 (2009) 査読有
- ③井上昌俊, 川島尚之, 野中美応, 竹本一木村さやか, 奥野浩行, 尾藤晴彦, シナプス長期可塑性の分子基盤 Cognition and Dementia 8, 177-182 (2009) 査読無
- ④竹本一木村さやか, 上田(石原)奈津実, 布施俊光, 上條諭志, 尾藤晴彦, 神経疾

患と細胞骨格 分子細胞治療 8, 243-248  
(2009) 査読無

- ⑤尾藤晴彦, 野中美応, 布施俊光, 藤井哉,  
竹本一木村さやか, 奥野浩行, シナプス  
機能と PSD 構築を制御する分子機構 蛋白質  
核酸酵素 53, 418-423 (2008) 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ①上田 (石原) 奈津美、竹本一木村さやか、  
野中美応、安達一森島亜希、水野秀信、平  
野丈夫、田川義晃、奥野浩行、尾藤晴彦。  
Control of cortical axon elongation by  
a GABA-driven  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent  
protein kinase cascade. 第 82 回日本生  
化学大会, 2009. 10. 21-10. 24, 4P-413  
(4T10p-3). 神戸ポートアイランド, Oral  
and Poster (口演・発表日:2009. 10. 24).

- ②Takemoto-Kimura S, Adachi-Morishima A,  
Ageta-Ishihara N, Suzuki K, Nonaka M,  
Okamura M, Nishimura VY, Kawauchi T,  
Nakajima K, Okuno H, Bito H. A pivotal  
role of a  
 $CaMKK-Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein  
kinase I cascade in the radial migration  
of layer 2/3 cortical pyramidal neurons.  
Soc. Neurosci. Abstr. 409.13, 2009. 第  
39 回北米神経科学学会年会,  
2009. 10. 17-10. 21, Chicago, USA. Poster.  
(発表日: 2009. 10. 19)

- ③Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N,  
Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K,  
Bito H. Activity-dependent regulation  
of dendritic growth. Neurosci. Res. 65  
Suppl. 1: S5, 2009. 第 32 回日本神経科学  
大会, 2009. 9. 16-18. 名古屋国際会議場,  
Symposium (講演日:2009. 9. 16).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹本一木村 さやか

(TAKEMOTO-KIMURA SAYAKA)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70372365

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし