

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 鈴木 敢 三

カルシウム/カルモデュリン依存性蛋白リン酸化酵素群は、細胞内のカルシウム上昇に伴い活性化する分子である。これまでに、大脳皮質発達期神経細胞において、CaMKI γ が樹状突起伸展を制御し、一方、同じアイソフォームである CaMKI α が軸索伸展を選択的に制御していることを明らかにしてきた。しかしながら、同じアイソフォームであるにもかかわらず、両酵素が、いかに樹状突起・軸索を選択的に制御しているのか、不明な点が多い。本研究は、樹状突起伸展に関わる CaMKI γ の選択的な活性化について検証し、以下の結果を得ている。

1. CaMKI γ -KO マウス大脳皮質由来の培養神経細胞を用いて、BDNF 依存的な形態変化を観察したところ、BDNF 依存的な樹状突起伸展の消失を認めた。更に、初代培養細胞に CaMKI γ もしくは CaMKI α を強制発現させ、免疫沈降により酵素を回収し、*in vitro* で活性を測定する実験系を確立した。BDNF 刺激によって、CaMKI γ が選択的に活性化し、また、CaMKI を活性化する上流のキナーゼである CaMKK α,β -DKO マウス培養神経細胞では、その活性化ほとんど認められなかった。これらの結果から、BDNF-CaMKK-CaMKI γ -樹状突起伸展経路の存在を示唆した。
2. より詳細な生化学的解析を行うため、リコンビナント蛋白を作成した。バキュロウイルス蛋白発現系を用いて、各種リコンビナント酵素を発現させ、アフィニティークラムならびにイオン交換カラムを用いることにより、リコンビナント酵素を精製した。SDS-PAGE で均一バンドであることを確認した。精製 CaMKI γ と CaMKI α は、CaMKK によるリン酸化によって最大活性を示した。
3. CaMKI γ と CaMKI α のカルシウム/カルモデュリン依存性に違いがあるのか検討した。MBP を基質として、*in vitro* キナーゼアッセイを行い、さまざまな濃度のカルモデュリン存在下で、CaMKI γ と CaMKI α のカルシウム依存性酵素活性を測定した。CaMKI γ と CaMKI α 共にベルシェイプ型のカルシウム依存性を示し、それぞれのカルシウム応答性に違いがあること見出した。CaMKI α に比べ、CaMKI γ は、低濃度のカルシウム条件下において活性を有し、カルシウムに対する EC₅₀ も低いことが分かった。よって、低濃度のカルシウムで、CaMKI γ が選択的に活性化することを示唆した。
4. リコンビナント酵素とペプチドライブラリーを用いて、CaMKI γ と CaMKI α の至適リン酸化モチーフの同定をした。最適基質ペプチドを作成し、基質特異性を検討した。CaMKI γ と CaMKI α の最適かつ選択性を示しうる基質ペプチド(I γ -tide ならびに

I α -tide)を設計し、基質特異性を検討したところ、CaMKI γ と CaMKI α は、それぞれの最適ペプチドを有意にリン酸化した。以上の結果から、CaMKI γ と CaMKI α は、基質選択性が異なることが示唆された。

5. 最適基質ペプチドを用いて、カルシウム依存的活性を測定した。低濃度のカルシウム存在下における CaMKI γ の選択的な活性化は、I γ -tide を用いたときに認められた。したがって、低濃度のカルシウム依存的な CaMKI γ 選択な活性化に基質特異性が必須であることが示唆された。

以上、本論文は、CaMKI γ の酵素学的な解析から、大脳皮質発達期神経細胞において、BDNF 刺激に伴った CaMKK-CaMKI γ カスケード依存的な樹状突起伸展に、低濃度のカルシウムによる特異的活性化や基質特異性が重要であることを示唆した。本研究は、カルシウムシグナリングにおける樹状突起伸展の分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。