

## 受賞者

竹本一木村 さやか

東京大学大学院医学系研究科 脳神経医学専攻 神経生化学教室

## 研究テーマ

神経細胞樹状突起ラフトにおけるCaMKシグナリングの解析

### 1. はじめに

膜マイクロドメイン（ラフト）は、様々なシグナリング分子を会合する細胞膜上の機能ドメインであり、生理的機能に加え疾患との関連が注目されている。

申請者は、神経可塑性に関与する新規分子を探索する過程で、プレニル化ならびにパルミトイル化2重脂質修飾によりラフト膜に挿入される、新規CaMキナーゼCLICK-IIIを同定した（図①、図②、Takemoto-Kimura et al. JBC 2003）。さらに、本酵素は神経樹状突起形成をラフト依存的に制御するという非常に特徴的な機能を有することを見出した（図③、Takemoto-Kimura et al. Neuron 2007）。そこで、本研究では、下記の方法を用いて、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分子機構を解明し、神経突起形成におけるラフトシグナリングの意義を新たに提示することを目的とする。

### 2. 方法

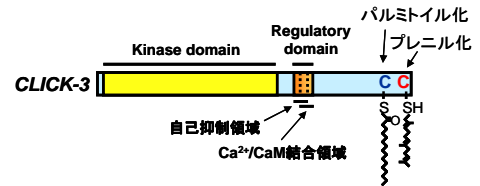
大脳皮質初代神経培養ならびにin vivo遺伝子導入法をもちいて、CLICK-IIIの機能探索を行う。表現系が見出された際には、ラフトシグナリングに焦点をあてた下流伝達系の探索を行う。

### 3. 結果 研究成果

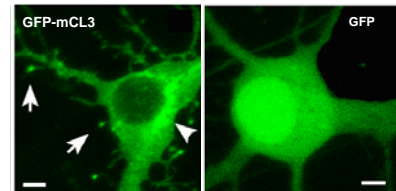
#### ① 樹状突起選択的制御の分子機構

ラフト膜に存在するCLICK-IIIは幼弱な神経細胞が伸展させる2種の突起（樹状突起・軸索）のうち樹状突起伸展を選択的に制御する。どのようにして、2種の神経突起のうち樹状突起選択性が規定されているのか。良い比較対照として、細胞質に存在する同じキナーゼファミリーのリン酸化酵素CaMKI $\cdot$ は、CLICK-IIIとは逆に、軸索伸展を制御することを見出した。両酵素の各領域を置き換えることで突起選択性の責任領域についての検討を行い候補領域を同定した（投稿準備中）。

図① CLICK-IIIの構造

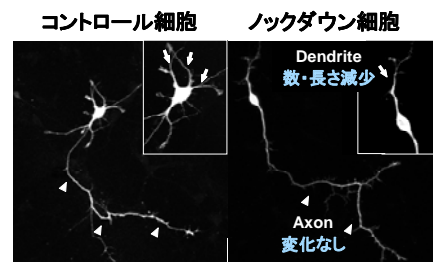


図② 神経細胞におけるGFP-CLICK-IIIの局在



Arrowhead: endomembrane compartment, Arrows: filopodia-like thin processes  
矢印：フィロポディア、矢頭：ゴルジ体  
Takemoto-Kimura et al. JBC 2003

図③ CLICK-IIIノックダウン細胞で観察された樹状突起伸展の異常

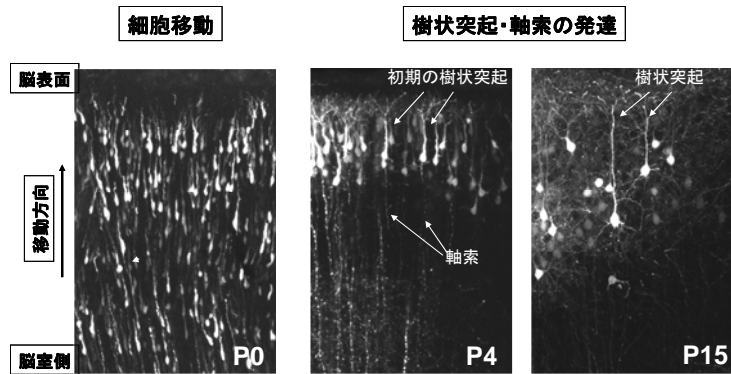


本機能発揮にはC末の脂質修飾によるラフト局在が必要であるTakemoto-Kimura et al. Neuron 2007

## ② in vivoにおける機能探索

ラフト膜シグナリングの意義を解明するためには、様々な濃度交配をもつ細胞外環境に面した実際のin vivo神経細胞にて検討することが有用である。そこで、培養系にて見出した結果をin vivoにおける役割解明へと発展させるため、in utero electroporation法をセットアップし(図④)、本酵素の発生各過程における役割を見出した。

図④ in utero electroporation 法を用いた、発生・発達各過程における神経形態の観察



## ③ リコンビナント蛋白質の精製

本研究課題を遂行するためには、プルダウン法による複合体の同定や各パルミトイル化酵素によるin vitroでのパルミトイル化効率など、リコンビナント蛋白質を用いた様々な実験結果が重要な情報を付与すると考えられるが、申請者がこれまで用いてきた大腸菌を用いた発現系では、蛋白質分解などの問題により精製度の高い全長酵素の精製を行うことができなかった。そこで、Sf9細胞を用いた発現系を新たに確立し全長の本酵素を精製することに成功した。

## 4. 考察 まとめ

本研究を通じて、培養系における突起伸展のみでなく、in vivo回路形成における機能を明らかとすることに成功した。更に、ラフト膜シグナリングの成体内における意義を解明するためには、in vivoの実験系の基礎データとなる、培養細胞を用いた研究ならびに精製蛋白質を用いた生化学的な研究も欠かすことができないが、この度はじめて全長の蛋白質精製を成功させたことは、今後の研究において大きな進歩をもたらすと考えられる。

ラフト膜を介したシグナル伝達は、Tリンパ球活性化、細胞接着・移動などの細胞機能や、アルツハイマー病や細菌・ウイルス感染などの疾患との関わりが示されてきた。一方で、神経細胞生理機能におけるラフトシグナリングの役割についての知見は乏しく、本研究を更に発展させることで、その一端を明らかにできると期待される。

## 5. 発表論文、参考文献

**Takemoto-Kimura S**, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Furuyashiki T, Arakawa Y, Narumiya S, Bito H. Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKIgamma, a novel membrane-anchored neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK). J. Biol. Chem. 278: 18597-18605, 2003.

**Takemoto-Kimura S**, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, Bito H. Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKIgamma. Neuron 54: 755-770, 2007.