

氏 名	木村 (竹本) さやか
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2648 号
学位授与の日付	平成 15 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学研究科脳統御医科学系専攻
学位論文題目	Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKI γ , a novel membrane-anchored neuronal Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) に関する研究 (新規膜アンカー蛋白質, CLICK-III/CaMKI γ のクローニング並びに分子制御機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教授 月田承一郎 教授 中西重忠 教授 武藤 誠 教授 成宮 周

論 文 内 容 の 要 旨

申請者らは、神経細胞内において転写因子 CREB の活性化を制御する新規の CREB キナーゼの同定を試みており、現在までに新規分子を含む幾つかの分子を同定し、CLICK (CaMK-like CREB kinase 候補)-I, -II, -III と呼び解析を進めている。

このうちアミノ酸配列により、CLICK-III は Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase I ファミリーに属する CaMKI γ のマウス ortholog である事、また C 末領域のアミノ酸配列は、他の CaMKI アイソフォームと比較して非常に長く、脂質修飾の一種である prenyl 化を受けることが知られる CAAX motif を有している事が判明した。

CLICK-III の mRNA の分布を調べたところ、各種臓器のうちで特に脳において発現が多いことが観察された。そこで脳内における分布を *in situ* hybridization 法にて検討した。その結果、CLICK-III の発現は神経細胞に特異的に認められること、また、これらのシグナルは扁桃体中心核や視床下部腹内側核といった特定の神経核で特に強く存在し、特徴的な分布を示していることが分かった。

また、COS-7 を用いて発現させた CLICK-III は *in vitro* において Ca²⁺/CaM 及び CaMKK に依存して活性化され MBP 並びに CREM を基質とすることが分かった。更に、CLICK-III の活性型変異体は、COS-7 において CREB による転写活性を増強することが示された。

次に、細胞内局在を調べる目的で神経細胞並びに COS-7 に CLICK-III を発現させると、興味深い事に細胞内の特定の部位への局在が観察された。細胞質に diffuse に存在する GFP と異なり、GFP-CLICK-III は Golgi 体や形質膜に局在する像が観察された。これらの結果と一致して、超遠心にて可溶性分画ならびに不溶性分画を分離すると、GFP 単独では 95% 以上が可溶性分画に存在するのに対して、CLICK-III の約 50% が不溶性分画に存在する事が分かった。では、どのような機構でこのような細胞内局在を示しているのだろうか？

脂質修飾が蛋白質の細胞内膜器官への局在化に重要な働きをする事が現在までに多数報告されているため、CLICK-III の CAAX motif に注目した。Prenyl 基の付加されるアミノ酸残基を欠失させた点変異体 (C474S) を作製し、細胞内局在を検討した結果 Golgi 体や形質膜への局在は認められなくなり細胞質に diffuse に局在するようになった。同じ目的で、Prenyl 基の前駆体であるメバロン酸を細胞内で枯渇させる HMG-CoA reductase 阻害薬 (compactin) で細胞を処理すると、GFP-CLICK-III は、同様に細胞質に diffuse に存在することが観察された。以上より、CLICK-III の膜器官へ局在化には、prenylation が必須である事が示された。

このような CLICK-III の脂質修飾による形質膜や細胞内膜器官への局在には、どのような生理的意義があるのだろうか？ CLICK-III は、神経細胞特異的に発現する Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase であり、膜の直下に存在することで神経活動に伴い生じる局所的な Ca²⁺ の上昇を効率的に標的蛋白質のリン酸化へと転換する能力を有している可能性が示唆される。

神経細胞内における CLICK-Ⅲ の局在や標的基質の詳細を明らかにし、仮説の是非を明らかにしていく事が今後の課題であると考ええる。

論文審査の結果の要旨

Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) 依存性リン酸化酵素 (CaMK-I, -II, -IV) は、いずれも脳内での発現が高く、神経活動に伴った Ca^{2+} 流入により速やかに活性化されるリン酸化酵素群として、脳高次機能との関連が注目されている。

申請者は、CaMKI アイソフォームの一つ CLICK-Ⅲ/CaMKI γ (以下 CLICK-Ⅲ) を新規に同定し、本酵素が脂質修飾によってゴルジ体や形質膜などに局在することを見出した。膜直下での局所的 Ca^{2+} 上昇は種々の神経細胞機能において重要とされており、脂質修飾による CLICK-Ⅲ の膜器官への局在は、限局した Ca^{2+} 上昇を生化学的変化に変換する新たな分子機構として注目される。

また、CLICK-Ⅲ mRNA は、恐怖条件づけに関わる扁桃体中心核や、満腹中枢と呼ばれる視床下部腹内側核の神経細胞に際立って強い発現を示す。今まで、記憶・学習と CaMK との関連が報告されているが、CLICK-Ⅲ の分布は他の CaMK と全く異なったパターンを示しており、今後の解析により CaMK の関与する脳高次機能について更なる知見が得られることが期待できる。

このような分子特性を持つ本酵素の発見は、神経細胞内情報伝達経路の解明に貢献し、神経科学の発展に寄与する所が大きい。従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年7月4日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。