

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論文題目

Diffusion of CaM, CaMKII α and CaMKII β in neurons
revealed by fluorescence correlation spectroscopy

申請者

Seyed Morteza	HEIDARINEJAD MOHAMMADI
ヘイダリネジャド モハマデイ	セイエド モルテザ

生命医科学専攻 神経生理学研究

2018年3月

論文内容の要旨

カルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMKII) は神経細胞における最も重要なタンパク質であり、その独特のオリゴマー構造（ホロ酵素）はシナプス可塑性における「分子メモリー素子」仮説の主要な部分である。CaMKII α はカルシウム濃度変化を細胞内シグナル系に変換している。カルモジュリン(CaM)もまた神経細胞におけるシグナリングの重要なタンパク質であって、カルシウムと結合し、多くの種類の CaM 結合タンパク質にシグナルを伝えている。CaM は4つの Ca イオンと結合して活性化し、CaMKII ホロ酵素に結合して CaMKII の自己活性化状態を作り出す。従って神経細胞中での CaM と CaMKII の動態の知見はシナプス可塑性と核での転写調節における CaM/CaMKII 経路の理解に必須である。

本論文は申請者が 2 光子顕微鏡による蛍光相関分光法(FCS)を用いて、HEK293 細胞とラット海馬初代培養神経細胞における CaM と CaMKII の分子動態を解析した報告である。また高速ランダムスキャン走査方式を利用した多点 FCS の実装も報告されている。多点 FCS は同時に異なる細胞内区画からの分子動態の記録を可能とした。

神経細胞の刺激により CaM の拡散は速くなり、この変化は刺激後回復したことから、CaM が結合相手から解離したものと考えられた。CaMKII α と CaMKII β タンパク質は細胞質と核で分子構成が異なることが見出された。細胞質ではよく知られた 12 量体をとっているおり、核ではもっと拡散速度が速い、すなわち、分子構成は小さいことが見出されたことから、核内では CaMKII α と β は単体あるいは更に分解した断片が存在していることが示唆された。

CaMKII の 12 量体のホロ酵素は神経細胞中で安定でなく、刺激により拡散速度が速くなり、この変化は不可逆であったことから、おそらくタンパク分解機構により断片化されることが考えられた。この変化は、既報の刺激による CaMKII のクラスター形成と平行して起きていた。こうした CaMKII の構造変化は神経細胞の興奮のたびに起こっていることが考えられ、シナプス可塑性誘導機構における CaMKII の機能について新たなメカニズムを検討する必要性を示唆した。また本研究によって多点 FCS が実用的であることが示され、神経細胞のような分極した細胞での複数コンパートメントの同時計測には有効であることが示された。

論文審査結果

2018 年 2 月 9 日に開催された公聴会で申請者は審査員との質疑に答えながら約 50 分

ライドを用いて研究発表を行った。発表後に以下のような質疑応答を通じて申請者の当該分野での学識が問われた。

1. Ca 結合により CaM の構造はどのように変わるのか、という問いに対し、CaM の原子構造がスライドで示され構造変化が説明された。また、CaMKII との結合について問われ、CaMKII と結合する時の構造について説明があった。さらに Ca が結合したときの CaM 中のヘリックスの構造が変化するか、という問いに対し、ヘリックス構造をとる N 端および C 端はそれぞれ Ca 結合部位であり、ターゲットとの結合能は低く、また、コンフォメーションは結合相手ごとに異なることが報告されていると回答された。
2. CaMKII の単量体は機能があるか、という問いに対し、Ca/CaM の結合とそれによる自己リン酸化はホロ酵素構造が必要であり単量体では機能がないと回答された。
3. CaMKII の CaM 結合部位が問われ、説明があった。
4. 研究結果を説明する模式図において CaMKII のそれぞれの構造において説明が求められ、ホロ酵素は Ca/CaM が結合すると完全活性化すること、また、分解された CaMKII 断片については、活性化したホロ酵素が calpain 切断によって活性のある断片が切り出されるという文献があることが回答された。
5. CaMKII のクラスタ構造の意味が問われ、活性化 CaMKII を細胞質から減らすために凝集（クラスタ化）するのではないかという考えが示された。
6. CaMKII のクラスタの可逆性について問われ、刺激後 1 時間経っても変化しないので可逆性については明確に答えられないという回答がされた。
7. 分子の拡散を定量する手法について長短が問われ、FCS は他の手法より多くの定量的変数が得られることが説明された。
8. 空間分解能について問われ、FCS はレーザー光の集光空間のサイズが解像度となるので、非常に小さいことが説明された。
9. 本研究のどこが新しい知見かが問われ、多点 FCS を開発したこと、神経細胞を用いた FCS は初めてであったこと、CaMKII のシグナルを核内で認めたこと、CaM と CaMKII が刺激により構造と挙動が変化したことが挙げられた。
10. 自己相関関数のグラフでの点のブレおよびグラフの解釈について説明が求められ、自己相関関数の計算方法とモデルによるフィット法が説明され、自己相関関数は正規化されていることが説明された。

11. レーザーによる熱発生についての危惧が問われ、ほとんど影響がないと考えていることが答えられた。

以上の質疑応答の後、申請者は退席し、主査と副査2名で協議を行った。本論文は、これまでやられたことのない神経細胞内でFCSを用いてタンパク質のダイナミックな分解過程を明らかにしたこと、また多点FCS技術を確立したことなど、FCS測定技術に新たな応用の可能性を与えた点において評価され、博士（理学）に相応しい内容であると意見は一致した。

2018年2月

主査 井上 貴文 博士（医学）（大阪大学）

早稲田大学理工学術院 教授

副査 大島 登志男 医学博士（山梨医科大学）

早稲田大学理工学術院 教授

副査 朝日 透 博士（理学）（早稲田大学）

早稲田大学理工学術院 教授