



# Distribution and intracellular localization of a mouse homologue of Ca<sub>2+</sub>/calmodulin-dependent protein kinase I $\beta$ 2 in the nervous system

上田, 隆宏

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2123

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002123>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	うえだ たかひろ 上 田 隆 宏	（福岡県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1266号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	Distribution and intracellular localization of a mouse homologue of $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase $\text{I}\beta$ 2 in the nervous system （カルシウム／カルモジュリン蛋白キナーゼ $\text{I}\beta$ 2 のマウス相同体の神経系における分布および細胞内局在）	
審査委員	主査 教授 市 橋 正 光 教授 山 村 博 平	教授 寺 島 俊 雄

## 論文内容の要旨

### 要約

カルシウム／カルモジュリン蛋白キナーゼ（CaMK）は、神経系の発達、機能発現において重要な役割を果たすと考えられている。その中で CaMK は Synapsin をリン酸化することのできる蛋白キナーゼとしてラットの脳より抽出された。そのタンパク質電気泳動にて37–42kDa のポリペプチドを示したことより、CaMK はいくつかのアイソフォームを持つことが示唆されていた。近年、3種類の CaMKI アイソフォーム、CaMKI $\alpha$ 、CaMKI $\beta$  そして CaMKI $\gamma$  が、ラットの脳由来の cDNA ライブラリより同定され、そのうち CaMKI $\beta$  は、オルタナティブスプライシングにより更に CaMKI $\beta$  1, CaMKI $\beta$  2 の存在が明らかになっている。ラットでは、ノザンプロット解析より CaMKI $\beta$  1 は、比較的ユビキタな臓器分布を示すのに対して、CaMKI $\beta$  2 は主に中枢神経系に発現が認められ、神経系の機能発現に大きな役割を果たすことが示唆されていたが、詳細は明らかでなかった。今回我々は、マウスの *mCaMKI $\beta$* 、とくにそのアイソフォームである *mCaMKI $\beta$  2* の同定に成功し、マウス神経系の発生時期および成獣中枢神経系での機能発現についての研究を行った。

マウス始原生殖細胞において発現している蛋白キナーゼの検索を行うためにこの細胞の cDNA を元にして、蛋白キナーゼでよく保存されているアミノ酸配列をもつ適当なプライマーを作成した。PCR 産物をサブクローニングしたのち、シーケンスを施行した。いくつかの蛋白キナーゼが確認され、そのうちのひとつがラットの CaMKI $\beta$ （CaMKI $\beta$  1 および  $\beta$  2）と同一であった。これをプローブとして、マウス胎生期（胎生13.5日）cDNA ライブラリを用いて、スクリーニングを行いマウス *mCaMKI $\beta$  2* を持つクローンの単離に成功した。塩基配列を検討したところこのクローンは343アミノ酸よりなる蛋白質をコードし予想される分子量は、38kDa であった。また、このアミノ酸配列はラットの  $\beta$  2 と99パーセントの相同生が認められた。アミノ酸配列では ATP-結合部、カルモジュリン結合部と思われる部分を確認することができた。更に、CaMKI $\alpha$  の177番目アミノ酸であるスレオニン（カルモジュリン活性キナーゼによりリン酸化され、活性化されるアミノ酸）に相当するアミノ酸も存在して

いた。ラットの  $\text{CaMKI}\beta 2$  は  $\text{CaMKI}\beta 1$  と同様にラット  $\text{CaMKI}\alpha$  の177番目のアミノ酸、スレオニン  
をリン酸化し活性をあげることが報告されており、 $m\text{CaMKI}\beta$  もまた同様の作用を持つことが示唆さ  
れる。

次にノザンブロット解析により、 $m\text{CaMKI}\beta$  の組織分布を検索した。 $m\text{CaMKI}\beta 2$  に特異的なプロ  
ーブを用いたところ有効なシグナルを認めることができなかったため  
 $m\text{CaMKI}\beta 1$  および  $\beta 2$  どちらとも認識することのできるプローブを用いた。マウス成獣の組織分布  
は、脳において最も強い発現が確認された。また、卵巣、心臓でも比較的強い発現を認め、精巣、肺、  
骨格筋では弱い発現が見られた。

一方、胎生期での発現であるが、いくつかの時期の単なる RNA を用い発現の変化を調べたところ  
 $m\text{CaMKI}\beta 1$  および  $\beta 2$  は胎生10日で発現を確認することができ、徐々に発現が増強している。次に  
胎生後期および生後の神経系組織での発現を検索した。その結果、広く発現が確認されたが、  
中でも23日のマウス中脳でいくぶん強い発現が示された。

$m\text{CaMKI}\beta$  の発現が主に神経系に認められたため、この発現が神経の分化に関わっているかどうか検  
索した。P19EC 細胞はレチノイン酸で処理すると神経細胞へ分化することが知られている。そこで  
 $m\text{CaMKI}\beta 2$  特異的なプライマーを用い、RT-PCR 法により、この細胞の神経分化による発現の変化  
を調べたところ分化をかける前でも発現は認められたが、分化するにつれその発現は増加しており、  
分化後6日目では2-3倍の発現となっていた。

更に詳しくその発現の局在を知るため、 $m\text{CaMKI}\beta 2$  特異的なアンチセンスオリゴプローブを作成  
し *in situ* hybridization を行った。胎生13.5日、18日では、 $m\text{CaMKI}\beta 2$  は、主に神経系（脳、脊索、  
三叉神経神経節、網膜を含む）に発現している。中枢神経系において  $m\text{CaMKI}\beta 2$  遺伝子の発現は脳  
室帯よりも外套層に認められ、神経細胞の分化に関わっている可能性を示唆した。その他の臓器、胸  
腺、心、肺、肝、腎、腸管では発現していなかった。骨、軟骨部のシグナルの発現は、コントロール  
画像でも変化がなく、非特異的なシグナルと考えられた。

成獣の脳では  $m\text{CaMKI}\beta 2$  遺伝子の発現は前嗅覚、梨状葉、外側中隔核、分界条、海馬の錐体細胞、  
歯状回顆粒層、扁桃体、視床下核、外側傍脚核、孤束核に強い発現を認めている。それに対し、脈絡  
叢および白質では著明な発現は認められず、 $m\text{CaMKI}\beta 2$  の mRNA はグリア細胞ではなく主にニュー  
ロンに発現していると考えられる。この遺伝子発現様式は  $\text{CaMKI}\alpha$ ,  $\text{CaMKI I}$ ,  $\text{CaMKI V}$  と全く異  
なっている。これより、 $m\text{CaMKI}\beta 2$  は他の  $\text{CaMK}$  とは異なる神経に関わる機能をもつことが示唆さ  
れる。その中でも注目すべきは特に視床下核に大変強い発現を認める点である。ここでは、トランス  
クリプションファクターである CREB（サイクリック AMP 応答配列結合蛋白質）が、光ないしは体  
内時計によりリン酸化されている。ゆえに、 $m\text{CaMKI}\beta 2$  は、この部位で CREB のリン酸化に関わっ  
ている可能性がある。

続いて  $m\text{CaMKI}\beta 2$  蛋白の細胞内局在をみる為に、フラッグエピトープを持つ発現ベクターへ、  
 $m\text{CaMKI}\beta 2$  遺伝子を組み込んだ。COS 細胞、および NG108細胞を用いてトランスフェクトを行っ  
た。蛋白の発現は、これらの細胞の whole cell lysate を抗フラッグ抗体でイムノブロットすることで  
確認された。予想される38kDaの蛋白を明瞭に抽出することができた。細胞内の  $m\text{CaMKI}\beta 2$ -flag  
蛋白の局在は、発現ベクターを NG108細胞と NGF（nerve growth factor）で処理した PC12細胞へ一過  
性に発現された後、抗フラッグ抗体で免疫染色することで、観察した。PC12細胞は NGF で処理する  
ことにより未分化な交感神経前駆体細胞から成熟した交感神経ニューロンへと変換することが知られ

ている。免疫染色の結果 NG108細胞および NGF で処理した PC12細胞どちらにおいても *mCaMKI $\beta$  2* -flag 蛋白は細胞内の細胞質、核に局在しているが核小体には認められない。このことは、*mCaMKI $\beta$  2* 蛋白は、神経系において細胞質、核どちらにおいても機能していることがうかがえる。過去に CaMKI (主に CaMKI $\alpha$  であると考えられる), CaMKIV の細胞内局在が報告されている。それによると CaMKI (CaMKI $\alpha$ ) は、細胞質に、CaMKIV は、核内に局在している。*mCaMKI $\beta$  2* 蛋白は細胞内の細胞質、核に局在しており、CaMKI (CaMKI $\alpha$ ), CaMKIV と異なった分布を示した。このことは CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\beta$  2, CaMKIV それぞれがカルシウムシグナルにより異なった役割を果たすと考えられる。カルシウム/CaMK カスケードは、神経系において転写と分化の調節に関わっていることがいわれており、CaMKI $\beta$  2 は、神経細胞の核、細胞質どちらにも見られることから神経系の機能を調節するカルシウム/CaMK カスケードに関わっていると考えられることができる。

## 論文審査の結果の要旨

カルシウム/カルモジュリン蛋白キナーゼ (CaMK) は、神経系の発達、機能発現において重要な役割を果たすと考えられている。近年、3種類の CaMKI アイソフォーム、CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\beta$  そして CaMKI $\gamma$  が、ラットで同定され、そのうち CaMKI $\beta$  は、更に CaMKI $\beta$  1, CaMKI $\beta$  2 の存在が明らかになっている。CaMKI $\beta$  1 に関してはノザンプロット解析では、比較的広範な臓器分布を示すのに対して、 $\beta$  2 は主に中枢神経系に発現が認められ、神経機能発現に大きな役割を果たすことが示唆されていた。今回、マウスの *mCaMKI $\beta$  2*、とくにそのアイソフォームである。

*mCaMKI $\beta$  2* の同定に成功し、マウス神経系の発生時期および成獣中枢神経系での機能発現の解明を試みた。

マウス始原生殖細胞において発現している蛋白キナーゼの検索を行うためにこの細胞の cDNA を元にして、蛋白キナーゼでよく保存されているアミノ酸配列をもつ適当なプライマーを作成した。PCR 産物をサブクローニングしたのち、シーケンスほを施行した。その結果いくつかの蛋白キナーゼが確認され、そのうちのひとつがラットの CaMKI $\beta$  (CaMKI $\beta$  1 および  $\beta$  2) と同一であった。これをプローブとして、マウス胎生期 cDNA ライブラリを用いて、スクリーニングを行いマウス *mCaMKI $\beta$  2* を持つクローンの単離に成功した。塩基配列を検討したところこのクローンは343アミノ酸よりなる蛋白質をコードし予想される分子量は、38kDa であった。また、このアミノ酸配列はラットの CaMKI $\beta$  2 と99パーセントの相同性が認められた。

次にノザンプロット解析により *mCaMKI $\beta$*  の組織分布を検索した。プローブは、*mCaMKI $\beta$  1* および  $\beta$  2 どちらも認識することのできるプローブを用いた。マウス成獣の組織分布では、脳において最も強い発現が確認された。胎生後期および生後の神経系組織では、広く発現するも成獣マウス中脳でいくぶん強い発現が示された。発現が主に神経系に認められたため、この発現が神経の分化に関わっているかどうか検索したところ分化するにつれその発現は増加しており、分化後6日目では2-3倍の発現となっていた。

更に詳しくその発現の局在を知るため、*mCaMKI $\beta$  2* 特異的なアンチセンスオリゴプローブを作成し *in situ* hybridization を行った。胎生13.5日、18日では、*mCaMKI $\beta$  2* は、主に神経系に発現していた。中枢神経系において *mCaMKI $\beta$  2* 遺伝子の発現は脳室帯より外套層に認められ、神経細胞の分化に関わっている可能性を示唆した。成獣の脳では *mCaMKI $\beta$  2* 遺伝子の発現は前嗅核、梨状葉、外側中隔核、分界条、海馬の錐体細胞、歯条回顆粒層、扁桃体、視床下核、外側傍脚核、狐束核に強い発

現を認めた。それに対し、脈絡叢および白質では著明な発現は認められず、*mCaMKI $\beta$  2* の mRNA はグリア細胞ではなく主にニューロンに発現していると考えられた。この遺伝子発現様式は CaMKI $\alpha$ , CaMKII, CaMKIV と全く異なっている。これらの結果より、*mCaMKI $\beta$  2* は他の CaMK とは異なる神経に関わる機能をもつと考えられる。その中でも注目すべきは特に視交叉上核に大変強い発現を認める点である。ここでは、トランスクリプションファクターである CREB (サイクリック AMP 応答配列結合蛋白質) が、光ないしは体内時計によりリン酸化されている。ゆえに、*mCaMKI $\beta$  2* は、この部位で CREB のリン酸化に関わっている可能性がある。

続いて *mCaMKI $\beta$  2* 蛋白の細胞内局在をみる為に、フラッグエビトープを持つ発現ベクターへ、*mCaMKI $\beta$  2* 遺伝子を組み込んだ。COS 細胞、および NG108細胞を用いてトランスフェクトを行った。*mCaMKI $\beta$  2* 蛋白は細胞内の細胞質、核に局在しており、CaMKI (CaMKI $\alpha$ ), CaMKIV と異なった分布を示した。これらの事実からは CaMKI $\alpha$ , CaMKI $\beta$  2 と CaMKIV はそれぞれカルシウムシグナルにおいて異なった役割を果たすと考えられる。カルシウム CaMKI カスケードは、神経系において転写と分化の調節に関わっていると考えられており、CaMKI $\beta$  2 は、神経細胞の核、細胞質どちらにも見られることから神経系の機能を調節するカルシウム/CaMK カスケードに関わっていると考えられることができる。

本研究は *mCaMKI $\beta$  2* の塩基配列とその組織内分布、機能発現について研究を行ったものであるが、従来報告された CaMK と異なる分布、神経細胞内局在について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。