

第9回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名		助成金額
柴田 幹大	ナノ生命科学研究所・准教授		730,000円
研究課題名	高速原子間力顕微鏡による記憶の分子メカニズム解明		
研究の概要	<p>〔研究開始当初の背景, 研究の目的, 研究の方法等について記入〕</p> <p>脳機能における記憶・学習の分子メカニズム解明はライフサイエンスにおいて重要な研究課題の一つである。カルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (以下, CaMKII) は脳の神経細胞に多く存在し, 様々な薬理学実験や遺伝子欠損マウスの実験から, “記憶分子”と考えられてきた。CaMKII は巨大な 12 量体を形成し, Ca²⁺の高頻度刺激を積算(記憶)することができるため, 多量体構造の中に“記憶の分子メカニズム”が潜んでいると考えられてきたが, 実証する手法がこれまでなかった。本研究は, 高速原子間力顕微鏡(以下, 高速 AFM)を用いて, 12 量体中の個々の CaMKII の振る舞いをリアルタイムでイメージングし, CaMKII がもつ記憶の分子メカニズムを明らかにすることが目的である。特に, Ca²⁺/カルモジュリンの結合に伴う CaMKII のキナーゼドメインの動態に着目し, 活性化状態(Ca²⁺/CaM 結合状態)と不活性化状態の違いを明らかにする。</p>		
研究の成果	<p>〔成果の具体的内容、意義、重要性及び今後の展望等について記入〕</p> <p>ハブドメインのみを発現した CaMKII-Hub と, 全長 CaMKII に対し, 高速 AFM を適用し, 多量体の構造解析と, そのダイナミクス観察を行った。その結果, CaMKII-Hub は, 12 量体と 14 量体のリング構造が観察され, 14 量体がメインであった。一方, キナーゼドメインを含む全長 CaMKII では, 12 量体と 14 量体の両方のリング構造が観察されたが, メインの多量体構造は 12 量体であった。これまで, CaMKII の 14 量体構造は報告されていなかったが, 今回の高速 AFM 観察により, 初めて 14 量体の存在が確認された。さらに, 高速 AFM によるダイナミクス観察において, キナーゼドメインとリンカー部位は非常に柔軟な構造をとることが明らかとなった。特に, CaMKII 阻害剤の添加により, 柔軟なキナーゼドメインとリンカー部分の動きが制限されることを見出し, この部位の柔軟性が, Ca²⁺/CaM の結合に重要であることが示唆された。実際に, Ca²⁺/CaM との結合を高速 AFM で観察すると, リンカー部位にカルモジュリンが結合する様子を観察することができた。これらの結果から, 信号を積算するための分子集合能力はハブドメインが担い, その一方で, キナーゼドメインの存在が CaMKII の多量体構造を制御し, さらに, リンカー部分の柔軟な構造が CaMKII の活性化に重要であると結論付けた。今後は, Ca²⁺/CaM の濃度を変えることで, 活性化状態に移行する CaMKII の分子数をコントロールし, 12 量体内の活性化状態における協同性の有無を明らかにする。</p>		
研究成果発表状況	<p>〔雑誌論文, 学会発表, 図書, 新聞掲載, 研究に関連して作成した Web ページ等について記入〕</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mikihiro Shibata and Hideji Murakoshi “Visualization of asymmetric structure of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II oligomers by high-speed atomic force microscopy.” BPS18 62th Annual Meeting, San Francisco, California, USA 2018/2/17-21, Platform selected 2. 辻岡尚太郎, 村越秀治, 柴田幹大 「高速 AFM によるカルモジュリン結合に伴うカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II の動態観察」平成 29 年度生物物理学会中部支部講演会, 名古屋大学, 名古屋, 2018/3/5 		
経費の執行状況	費目	事項 (主な使用事項を記載)	執行額(円) (費目毎総額を記入)
	物品費	光学部品、試薬等	416,890 円
	旅費	62th Annual Meeting Biophysical Society に参加し口頭発表した。	313,110 円
	人件費・謝金		0 円
	その他		0 円