

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1992) 37(10):1577-1589.

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ 2 の構造とアミン代謝

石田敦彦, 藤沢仁

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIの 構造とアミン代謝

石田敦彦・藤澤 仁

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIは代表的な多機能性セリン・スレオニンプロテインキナーゼの1つであり、細胞内のCa²⁺シグナル情報伝達系において中心的な役割を担っているものと考えられている。脳にはとくに多く存在し、神経伝達物質の生合成や放出、さらには海馬における長期増強などに深くかかわっていると考えられ、その中枢神経系において果たしている役割が注目を集めている。本酵素は自己リン酸化により、自らの活性を調節するというきわめてユニークな性質を備えているが、最近の研究により、その制御機構の一端が明らかにされつつある。本稿では、これらの問題について最近の知見を整理してみた。

はじめに Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaM キナーゼII) はCa²⁺/カルモデュリン (以下、カルモデュリンをCaMと略記) によって活性化されるセリン・スレオニンプロテインキナーゼであり、Aキナーゼ、Cキナーゼなどとともに代表的な多機能性プロテインキナーゼのひとつとして、細胞内情報伝達系においてCa²⁺をセカンドメッセンジャーとする基本的な経路の1つを構成しているものと考えられている¹⁻⁶。Ca²⁺/CaMによって活性化されるプロテインキナーゼにはこれまで少なくとも7種類のもので報告されているが、それらの中でも特にCaMキナーゼIIは基質特異性が広く、あらゆる組織に分布しているため、Ca²⁺シグナリングの分子機構の解明という観点から多くの研究者の興味をひいてきた。ことに脳に豊富に存在することから、中枢神経系において果たしている役割が注目を集めている。ごく最近、CaMキナーゼIIと同じく広い基質特異性を有するCa²⁺/CaM依存性プロテインキナーゼとして、CaMキナーゼIVが報告された^{1,7,8}。

CaMキナーゼIIは1980年にラット脳においてセロ

トニン生合成の律速酵素トリプトファンヒドロキシラーゼを活性化する新しいタイプのCa²⁺/CaM依存性プロテインキナーゼとしてその存在が見いだされた⁹が、それ以降に別々の研究室でそれぞれ独立に発見された酵素と同一のものであることがあとになって判明した^{4,10}。これまでの研究から、本酵素は次のような際立った特徴を備えていることが明らかとなっている。(1) 脳に豊富に存在する。(2) 可溶性と顆粒結晶型がある。(3) 基質特異性が広い。(4) 臓器特異性アイソフォームが存在する。(5) 自己リン酸化によって活性を制御する。以下、とくに構造と機能の問題に焦点をあてて最近の知見をまとめてみた。なお、与えられた論題は“構造とアミン代謝”ということであるが、紙数の関係上、モノアミン生合成の調節に関しては詳しい解説は割愛せざるをえなくなった。詳しくは最近の総説^{11,12}をご覧ください。とくに読者諸賢のご寛恕を請いたい。

Atsuhiko Ishida, Hitoshi Fujisawa, 旭川医科大学第一生化学教室 (〒078 旭川市西神楽4線5号3-11) [Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078, Japan]

Structure of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II and Monoamine Metabolism

[Key word] 【多機能性プロテインキナーゼ】【Ca²⁺シグナリング】【チロシンヒドロキシラーゼ】【自己活性制御】

I. CaM キナーゼ II の構造

ラット大脳皮質可溶性画分から精製された CaM キナーゼ II は分子量 540~650 K のオリゴマー酵素であり、従来、これらは α および β/β' の 2 種のサブユニットからなることとされていた¹⁰⁾。しかし、後述するように、最近の cDNA クローニングの結果から、 γ サブユニット、 δ サブユニットの存在も示唆されている^{22,24)}。精製法としては種々の方法が報告されている¹⁰⁾が、筆者らの研究室では、DeLorenzo らの方法を改変した方法を用いて良好な結果を得ている¹³⁾。精製酵素は SDS-PAGE 上、 α サブユニットは分子量 50 K、 β サブユニットは分子量 60 K (β' は 58 K) を示す。 α と β の比率は脳の部位によって異なり、大脳由来の酵素では $\alpha : \beta = 3 : 1^{14,15)}$ 、小脳由来では $\alpha : \beta = 1 : 4^{15,16)}$ という値が報告されている。また、同じ大脳由来の酵素でも生後の発達過程によって α と β の構成比が異なるという報告がある¹⁷⁾。このように α と β の構成比が異なることの生理的意義については不明であるが、大脳由来の酵素と小脳由来の酵素では酵素の自己リン酸化による不活性化(後述)の程度に違いがみられるという¹⁸⁾。また従来、本酵素は α と β/β' のヘテロオリゴマーであると考えられていたが、ごく最近、電顕を用いた解析により本酵素が α と β/β' のそれぞれのホモオリゴマー (8 または 10 量体) の混合物であることが示された¹⁹⁾。また、このデータに基づいて CaM キナーゼ II のサブユニット構造についての詳細な立体モデルが提示されている(詳細については本号 pp. 1590~1597 を参照のこと)。

cDNA クローニングによる解析も進んでいる。これまでにラット脳の cDNA ライブラリーから、 $\alpha^{20,29)}$ 、 $\beta^{21)}$ 、 $\beta'^{22)}$ 、 $\gamma^{23)}$ 、 $\delta^{24)}$ の 5 種類の cDNA が得られており、各サブユニットの一次構造が推定されている。それらによると、 α サブユニットは 478 個のアミノ酸 (分子量 54,111)²⁰⁾、 β サブユニットは 542 個のアミノ酸 (分子量 60,333)²¹⁾、 β' サブユニットは 527 個 (分子量 58,705)²²⁾ のアミノ酸からなる蛋白質であることが示された。また、 γ 、 δ は α 、 β とは異なる cDNA として見いだされたもので、それぞれ 527 個 (分子量 59,080)²³⁾、533 個 (分子量 60,080)²⁴⁾ のアミノ酸からなるポリペプチドをコードしていると考えられる。これらの 5 つの cDNA のうち、 β と β' は同じ遺伝子から RNA のスプライシングの違いにより生じたものである²²⁾が、 α 、 β 、 γ 、 δ はそれぞれ異なる遺伝子からつくられたもので

ある。これら 4 種のポリペプチドの一次構造の比較から、図 1a に示すような CaM キナーゼ II のドメイン構造が明らかとなった。これらの 4 種のポリペプチド間の相同性は 88% ときわめて高く、とくに N 末端側には 89~93% ときわめてよく保存された領域 (N-領域) が存在する²⁴⁾。この N-領域はこの酵素の活性に必須の領域であり、ATP 結合部位、触媒部位、カルモデュリン結合部位などが存在する。また、C 末端 (C-領域) も 75~80% と比較的相同性が高く、N-領域と C-領域の間に挟まれて相同性の低い D-領域が存在している²⁴⁾。D-領域と C-領域の役割については不明であるが、サブユニットの会合や顆粒への結合などに働いているのではないかと考えられている。

II. CaM キナーゼ II の分布

CaM キナーゼ II ははじめ、ラット大脳において見いだされたことからわかるように、脳にはとくに豊富に存在する。モノクローナル抗体やポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的手法により、本酵素の脳内分布が詳しく調べられている²⁵⁻²⁷⁾。それらによると、記憶と密接な関係にあると考えられている海馬にはとくに多く存在し、その存在比は実に全蛋白質の 2% にも達するといわれている²⁵⁾。このほか、大脳皮質や脳幹にも多く存在するが、小脳では比較的少ない。CaM キナーゼ II ははじめ、主としてラット大脳可溶性画分から精製され、その性質が調べられてきたが、研究が進むにつれ、PSD (post synaptic density) とよばれる蛋白質複合体に含まれる major PSD protein とよばれてきたものが、実は CaM キナーゼ II と同じ蛋白質であることが明らかになってきた²⁾。PSD とはシナプス後膜直下の細胞質に存在する電顕的に不透明な部分を指し、1% Triton X-100 でも可溶化されない不溶性の強固な蛋白質複合体で、CaM キナーゼ II のほかに、アクチン、フォドリン、アクチン結合蛋白質、CaM 結合蛋白質、チューブリン、GABA 受容体やグルタミン酸受容体、各種イオンチャンネル、種々の糖蛋白質を含んでいることが知られている。CaM キナーゼ II は脳の部位によってはこの PSD の実に 30~50% にも及ぶほど多量に存在しており、ポストシナプス側における神経機能の制御、たとえばシナプスの可塑性などに重要な役割を果たしているものと考えられる^{2,5,28)}。PSD の CaM キナーゼ II は可溶化が困難であることもあって不明な点が多いが、きわめて不溶性であるという点を除いては、可溶性の CaM キナーゼ

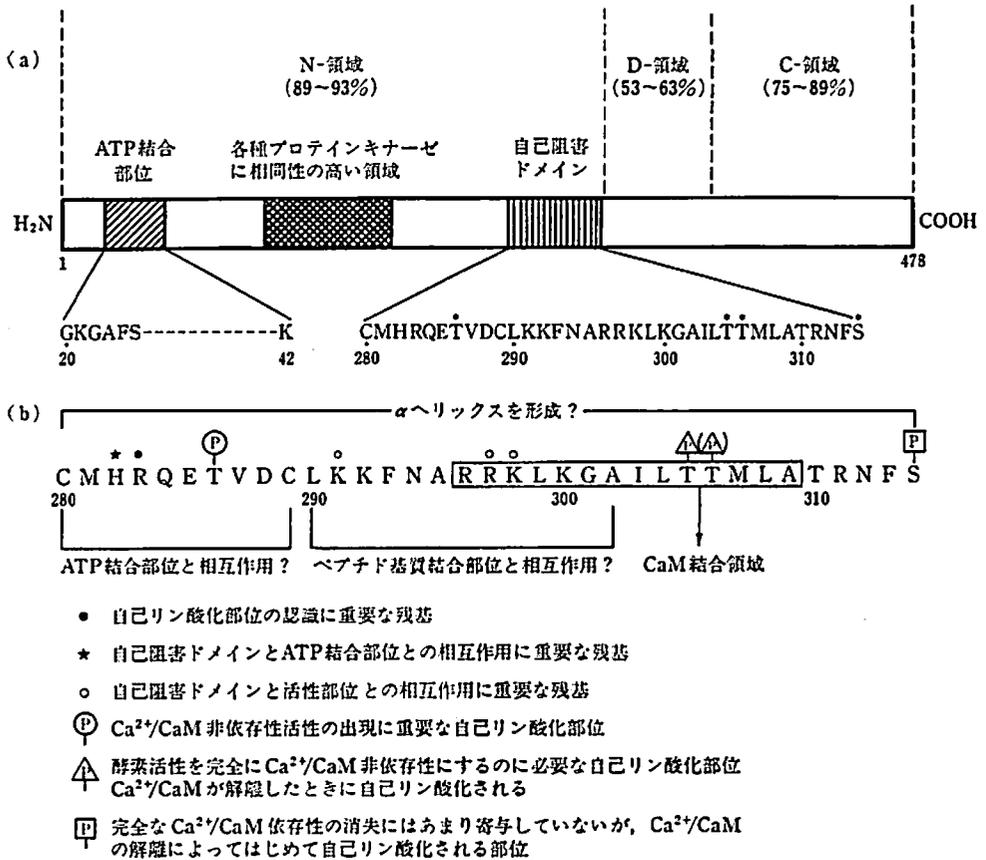


図1. CaM キナーゼIIのドメイン構造 (a) と自己阻害ドメインの構造 (b)

(a) 部分アミノ酸配列の下に示した数字は α サブユニットにおけるアミノ酸配列番号に対応する。*は自己リン酸化部位を示す。(△)内の%はCaM キナーゼIIの4つのポリペプチド間の相同性を示す。その他の説明は本文I節を参照のこと。

(b) 自己阻害ドメインと考えられている領域のアミノ酸配列 (α サブユニット) と、これまでに得られている知見をまとめた。詳細は本文IV-4を参照のこと。

IIと生化学的・免疫学的に大きな違いはなく、現在までのところ、これらは同一の蛋白質であると考えられている³¹。

脳酵素に対するポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、脳以外の種々の臓器にもCaM キナーゼIIのアイソザイムと考えられる酵素が存在することが示されており²⁰、またラット以外の種々の動物にも種を越えて広く分布している(表1)。これらはいずれも50~60Kのサブユニットからなる分子量300~700Kのオリゴマー酵素であり、基質特異性が広く、自己リン酸化による活性制御を行なうなど共通した特徴を備えているが、細かい点では種々の違いがみられる³¹。このほか、アメフラン^{29,201}、ウニ³¹、ヤリイカ³²、ショウジョウバエ³³、酵母³⁴、カビ³⁵などにもCaM キナーゼIIの同族体と思

われる酵素が存在することが示されており、ショウジョウバエ²⁰や酵母^{37,38}の酵素についてはcDNAクローニングも行なわれている。

先に述べたラット脳の $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ の4種のcDNAをプローブにしてラット脳の各部位におけるそれぞれのmRNAの発現が調べられた^{23,24}。それによると β, γ, δ は大脳皮質、小脳、脳幹のいずれにおいても発現しているが、 α は小脳ではほとんど発現しておらず、大脳皮質と脳幹において発現していることが示された。 α のプローブを用いてラット脳の*in situ*ハイブリダイゼーションも行なわれており、免疫組織化学の結果とよく一致したデータが得られている²⁰。また、 α のmRNAの発現は生後の発達過程で大きく変化することも示されている²⁰。各種臓器についてもmRNAの発現が調べられ

表 1. CaM キナーゼ II のアイソザイム⁴⁾

組 織	分子量 (×1000)	
	native	サブユニット (比)
ラット前脳	550~650	50, 60(3:1)
ラット小脳	508~615	50, 60(1:4)
ウサギ肝臓	275~300	51, 53(1:1)
ウサギ骨格筋	580~696	58, 54(4:1)
イス心臓	550	55
ラット脾臓	420	51
ラット肺	519	51, 60
ブタ網膜	520	50, 60(3:1)
ラット乳腺	1,000	54
ウツ甲状腺	500	56
ヒト副甲状腺	550	49
ニワトリ小腸刷毛線	490	50
シチメンチョウ赤血球	500	58
シビレニイ発電器官	500	62, 54
ラット脾臓 ^{7a)}	380	50/51, 20/21, 18 (1.0:1.1:0.4)

文献 2 の Table II を改変・追加

a) 肩付き番号を付したものの以外の文献は文献 2 の Table II を参照のこと。

た²⁴⁾。その結果、 α と β はかなり脳に特異的に発現しているが、 γ と δ は種々の臓器で広く発現していることが明らかとなった。 γ , δ についてはまだ蛋白質レベルでの詳しい解析は行なわれていないが、これらについては今後の課題といえよう。

III. CaM キナーゼ II の基質と生理的役割

1. CaM キナーゼ II の基質

CaM キナーゼ II は基質特異性が広く、実に多くの蛋白質が CaM キナーゼ II の基質になりえることが報告されている^{5,40)}。

表 2 にこれまでに報告されているおもな基質とリン酸化による作用を示す。CaM キナーゼ II は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存的にこれらの残基のセリン・スレオニン残基をリン酸化する。種々の合成ペプチドを用いた実験から、CaM キナーゼ II によるリン酸化部位の共通配列は Arg-X-Y-Ser/Thr であると推定されている^{41,42)}。表 2 に示すように多くの基質が報告されているが、生理的にも重要であると考えられている基質は現在のところそれほど多くはない。CaM キナーゼ II の細胞内における真の生理的基質は何であるかを探ることも今後の重要な課題であろう。CaM キナーゼ II はとくに脳に豊富に存在するので、中枢神経系の情報伝達に何か重要な役割を果たしている

であろうことは容易に想像できる。これまでの研究から、CaM キナーゼ II が中枢神経系のプレシナプス側で神経伝達物質の合成や放出に深くかかわっているらしいことが知られている。よく知られているのは、(1) トリプトファンヒドロキシラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼのリン酸化による活性調節、(2) シナプシン I のリン酸化による神経伝達物質の放出の 2 点である⁴⁰⁾。また最近、CaM キナーゼ II が記憶のモデルと考えられている海馬における長期増強に深くかかわっている可能性が示され^{43,44)}、ポストシナプス側における CaM キナーゼ II の役割が注目されている^{45,46)}。ここでは紙数の関係上、チロシンヒドロキシラーゼの活性調節について最近の知見を簡単に紹介するにとどめる。

2. CaM キナーゼ II によるチロシンヒドロキシラーゼの活性調節

チロシンヒドロキシラーゼはカテコールアミン生合成系の律速酵素であり、ドーパミンなどの神経伝達物質の生合成の調節に重要な役割を担っているものと考えられている^{11,12)}。本酵素は還元型テトラヒドロピリドンを電子供与体とする 1 原子酸素添加酵素であり、分子量 59 K のサブユニット 4 個から構成されている¹²⁾。

チロシンヒドロキシラーゼは A キナーゼ、CaM キナーゼ II、C キナーゼのいずれによってもリン酸化されるが、活性に及ぼす影響はそれぞれ異なっている¹¹⁾。図 2 に各キナーゼでチロシンヒドロキシラーゼをリン酸化した際の活性変化の様子を示した。本酵素を A キナーゼでリン酸化すると図のように中性ではほとんど検出されなかった酵素活性が著明に上昇し、生理的 pH である中性領域に至る pH を示す酵素に変化した。この劇的な変化は不活性型酵素から活性型酵素への転換反応であると考えられ、生体内において A キナーゼが本酵素の活性調節、ひいてはカテコールアミン生合成の調節に重要な役割を果たしていることを示唆している^{11,12)}。シナプス前膜のアデノシン A_2 レセプターを介した調節系によって、このような調節が行なわれている可能性が考えられている^{12,47)}。

チロシンヒドロキシラーゼは CaM キナーゼ II によっても活性化されるが、この反応は A キナーゼの場合とは異なり、リン酸化されただけでは活性化されず、リン酸化された酵素に“活性化蛋白質”が作用してはじめて活性化されるという 2 段階の活性化様式をとる^{11,12)}。この活性化蛋白質は従来、14-3-3 蛋白質とよばれてきた、脳神経系に高濃度に存在する蛋白質と同じものである¹¹⁾。

表 2. CaM キナーゼIIのおもな基質^{a)}

蛋白質	サブユニット分子量 (×1000)	機 能	リン酸化の効果
トリプトファンヒドロキシラーゼ	59	セロトニン合成	活性化
ホスホランパン	11	SR における Ca ²⁺ 取り込み	取り込み促進
アセチル CoA カルボキシラーゼ	260	脂肪酸合成	—
ATP クエン酸リアーゼ	110	脂肪酸合成	—
BCII	21	アミフラシ後放電	—
リゾ-PAF-アセチルトランスフェラーゼ	—	血小板因子合成	活性化
ミエリン塩基性蛋白質	14, 18	主要ミエリン蛋白質	—
リボソーム蛋白質 S6	29	蛋白質合成	促 進
GABA-モジュリン	16.5	GABA-レセプターの調節	—
エストロゲンレセプター	65	遺伝子発現	エストロゲン結合の増加
C 蛋白質	155	筋肉・太いフィラメント	—
中間径フィラメント；			
ニューロフィラメント蛋白質	68, 145, 200	細胞骨格	—
ビメンチン	51	細胞骨格	—
グリコ繊維性酸性蛋白質	51	細胞骨格	—
プレクチン	300	中間径フィラメント付随蛋白質	—
平滑筋ミオシン軽鎖	20	筋肉収縮	ATPase 活性化
現状スクレオチドホスホジエステラーゼ (CaM 依存性)	59 63	現状スクレオチド代謝	活性化(最小) CaM 親和性減少 ⁸³⁾
微小管付随蛋白質；			
MAP2	280	微小管重合	阻 害
タウ	55~70	微小管重合	阻 害
STOP	50~70	低温安定性	阻 害
シナプシン I	60, 86	神経伝達物質の放出	促 進
ビルビン酸キナーゼ	61	炭水化物の代謝	阻 害
フェニルアラニンヒドロキシラーゼ	51	チロシン合成	活性化
グリコゲンシンターゼ	85~90	炭水化物の代謝	阻 害
チロシンヒドロキシラーゼ	56	神経伝達物質の合成	活性化
カルシニューリン ⁷⁵⁾	61	蛋白質脱リン酸化	K _m 増加
ミオシン軽鎖キナーゼ ^{76, 77)}	77~150	ミオシン軽鎖のリン酸化	CaM 親和性減少
IP ₃ レセプター ⁷⁸⁾	260	IP ₃ による ER からの Ca ²⁺ 放出	—
DHP レセプター ⁷⁹⁾	165	電位依存性 Ca ²⁺ チャンネル	—
リアノジンレセプター ^{80, 81)}	563~565	SR からの Ca ²⁺ 放出	Ca ²⁺ チャンネル活性化
CREB (CREB B) ⁸²⁾	43, (38)	転写調節	転写促進
NO シンターゼ ⁸³⁾	160	NO 合成	阻 害
平滑筋カルデスモン ⁸⁴⁾	120~150	ミオシン ATPase の阻害	阻害の解除
HMG-CoA レダクターゼ ⁸⁵⁾	97	インプロノイド生合成	阻 害
ホスホフルクトキナーゼ ⁸⁶⁾	80~95	解糖系	K _m 増大, ATP に対する K _i 減少
コネキシン ^{32 87)}	32	ギャップ結合蛋白質	—

文献 6 の Table 4 を改変・追加。

a) 肩付き番号を付したものを以外の文献は文献 6 の Table 4 を参照のこと。

図 2 のように、活性化蛋白質の存在下でチロシンヒドロキシラーゼを CaM キナーゼ II でリン酸化すると、pH 5.5 では 2 倍程度の活性化がみられた。A キナーゼの場合と異なり、チロシンヒドロキシラーゼの活性化型への転換に対する CaM キナーゼ II によるリン酸化の寄与はあまり大きくはないとも考えられるが、スライスなどを用いた *in situ* の実験系では CaM キナーゼ II によるチロシンヒドロキシラーゼの活性化が報告されているので、後述のように A キナーゼに比べると、より複雑な調節系

を介して関与しているのかもしれない^{11, 112)}。

一方、C キナーゼはチロシンヒドロキシラーゼをリン酸化するが、この場合は活性化蛋白質の有無にかかわらず、有意な活性上昇は認められなかった^{11, 113)}。

最近、筆者らの研究室では本酵素の A キナーゼ、C キナーゼ、CaM キナーゼ II の 3 つのプロテインキナーゼによるリン酸化の影響をリン酸化部位の同定も含めて詳細に検討した¹⁴⁸⁾。その結果、チロシンヒドロキシラーゼは A キナーゼおよび C キナーゼによって Ser¹⁰ がリン

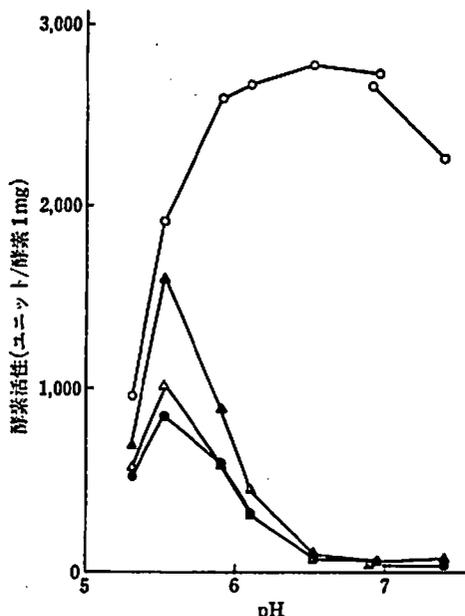


図2. 各種プロテインキナーゼでリン酸化したラット
 クロミンヒドロキシラーゼの活性のpH依存性¹¹⁾
 ●: もとの粗酵素, ○: Aキナーゼでリン酸化した酵素,
 ▲: 活性化蛋白質を加えてCaMキナーゼIIでリン酸化した
 酵素, △: Cキナーゼでリン酸化した酵素。

酸化され、CaMキナーゼIIによってSer⁴⁰とSer¹⁹がリン酸化されるということが判明した。また、各部位におけるリン酸化量と活性化の関係調べた結果、クロミンヒドロキシラーゼはホロ酵素の4個のサブユニットのうち、2個までがSer⁴⁰をリン酸化されても活性化されない(Cキナーゼによるリン酸化)が、3~4個のサブユニットのSer⁴⁰がリン酸化を受けると顕著に活性化される(Aキナーゼによるリン酸化)ということ、また、Ser¹⁹のリン酸化が活性化蛋白質による活性化に関与しているらしいことなどが示唆された。ホロ酵素の4個のサブユニットのうち、1個がリン酸化されると他のサブユニットがリン酸化されやすくなり、3~4個のサブユニットがリン酸化されてはじめて活性化されるというサブユニット間の協同作用を考えに入れたモデルが、Aキナーゼによるリン酸化量と酵素の活性化の程度との関係を矛盾なく説明できることも示された。このようなサブユニット間の協同作用があるとすれば、CキナーゼやCaMキナーゼIIによるSer⁴⁰のリン酸化は直接酵素を活性化するものでなくてもAキナーゼによる活性化を促進することで、間接的に酵素の活性化に関与している可能性も考えられる¹¹⁾。

最近、複数のリン酸化部位をもつ蛋白質基質に対して

複数のプロテインキナーゼが協同的に作用してリン酸化が進行する例がいくつか報告され、このような反応に対して“hierarchical protein phosphorylation”という概念が提唱されている¹⁰⁾。もし、上記の仮説が正しければ、クロミンヒドロキシラーゼのリン酸化も一種の“hierarchical protein phosphorylation”であるといえるかもしれない。神経伝達物質の生合成の調節という重要な役割を担う酵素であるので、さまざまな因子による微妙かつ複雑な制御が必要とされるのであろう。

IV. 自己リン酸化による自己活性制御機構

1. 自己リン酸化によるCa²⁺/CaM非依存性活性の出現

CaMキナーゼIIの際立った特徴のひとつに自己リン酸化による複雑な自己活性制御機構の存在を指摘することができる¹⁻⁶⁾。CaMキナーゼIIを自己リン酸化条件下でインキュベートしたときの酵素活性の変化を図3に示す。自己リン酸化条件下、30°Cでインキュベートすると図の破線で示すように自己リン酸化が進行し、ホロ酵素1 molあたり、最大約60 molのリン酸が取り込まれる¹¹⁾。このような自己リン酸化の進行に伴ってまず初めにCa²⁺/CaM非依存性の活性が突如として出現し、そののち緩やかにCa²⁺/CaM非依存性活性、全活性(Ca²⁺/CaM存在下で測定した活性)ともに減少していく。CaMキナーゼIIの自己リン酸化反応は反応開始時にはCa²⁺/CaMが必須であるが、いったん反応を開始してしまうと、もはやCa²⁺/CaMを必要とせず、むしろ

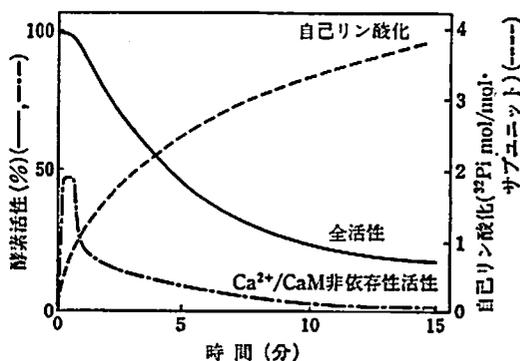


図3. CaMキナーゼIIの自己リン酸化と活性の
 経時変化

縦軸に示す時間、自己リン酸化条件下でCaMキナーゼIIをインキュベートしたのち、残存酵素活性を遊離Ca²⁺存在下(—)と非存在下(---)で測定した。点線(· · ·)は同一条件下での酵素蛋白質へのリン酸の取り込みを示す。

EGTA の添加によって Ca^{2+} をキレートしたときのほうが自己リン酸化は促進される^{1,2,4,17}。このような最初に出現する $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性の活性は生理的にも重要な意義をもつものと考えられている。すなわち、この機構はホルモン刺激などによる一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって酵素が活性化され、その後、細胞内 Ca^{2+} 濃度が速やかに低下した後も酵素活性が持続するための仕組みであるというのである¹。これまでの研究により、この $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現には、 α サブユニットでは Thr²⁸⁶、 β サブユニットでは Thr²⁸⁷ (以下、Thr^{286/287} と略記。その他の部位についても以下同様) の自己リン酸化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった¹⁻⁹。このことは酵素を [γ -³²P] ATP で自己リン酸化したのちプロテアーゼで分解し、放射能で標識されたペプチド断片を HPLC で精製してそのアミノ酸配列を決定するという方法や、部位特異的突然変異によって α サブユニットの Thr²⁸⁶ を種々の残基で置換した酵素の cDNA を発現させてその活性を調べるという方法などで、多くの研究室で確認されている結論であるが、筆者らの研究室では ATP の代わりに ATP γ S を用いて自己リン酸化した酵素の性質を調べることに、上記の結論を確認するとともに、このような酵素の反応速度論的な性質をも明らかにした⁵⁰。その結果、ATP の代わりに ATP γ S を用いて自己リン酸化反応を低温で行なうと、Thr^{286/287} のみが選択的に自己チオリン酸化され、このような酵素は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 存在下では基質に対する親和性が高いが、遊離 Ca^{2+} がなくなると基質に対する親和性が低下すること、また、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の有無にかかわらず、 V_{max} には変化がないことなどが示された。

2. 自己リン酸化による自己活性化機構

以上のように、Thr^{286/287} の自己リン酸化が $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現に必須であるということはもはや確立した知見であると思われるが、最近筆者らの研究室で得られたデータによれば、この Thr^{286/287} の自己リン酸化が $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現のみならず、全酵素活性 ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 存在下で測定した活性) の“full activation”にも重要な役割を果たしていることが示唆されている⁵¹。この“autoactivation hypothesis”の最初の手がかりは Kwiatkowski らによって得られた。彼女らは低濃度の ATP 存在下、合成ペプチド基質である syn-

tide2 を基質として酵素反応を行なわせると反応の経時変化の初期にラグが出現し、その後、直線的な定常状態に移行すること (いわゆる hysteresis) を見だし、この hysteresis が自己リン酸化によって消失することを報告した⁵²。当教室の Katoh (現:北海道大学) は ATP 濃度を $2\ \mu\text{M}$ に下げ、syntide2 を高濃度に存在させ、 5°C で酵素反応を行なわせることにより、この現象をさらに詳細に解析した⁵¹。本条件下で自己リン酸化酵素と自己リン酸化しない酵素で syntide2 の濃度依存性を調べてみると、図4に示すように、自己リン酸化しない酵素では見かけ上、強い基質阻害がみられるが、前もって酵素を自己リン酸化しておくと、このような基質阻害はみられなくなった。このデータは次のように解釈できる⁵¹。すなわち、高濃度の syntide2 は CaM キナーゼIIの自己リン酸化を強く抑制することがわかっている⁵¹が、本条件下では自己リン酸化していない酵素に対しては syntide2 が酵素の自己リン酸化を抑制するために、高濃度の基質が見かけ上の基質阻害を引き起こす。これに対してすでに前もって自己リン酸化しておいた酵素は、このような作用を受けることはない、見かけ上の基質阻害もかからなくなるのである。また、従来行なわれている通常のアッセイ条件 (高濃度 ATP, 30°C) では非自己リン酸化酵素を用いた場合、きわめて速やかに Thr^{286/287} の自己リン酸化が進行するために、自己リン酸化の進行に伴う全活性の“立ち上がり”を観測することは困難であるが、このような限定された条件下ではアッセイ中に起こる自己リン酸化がかなり抑えられ、自己リン酸化、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現、全活性の

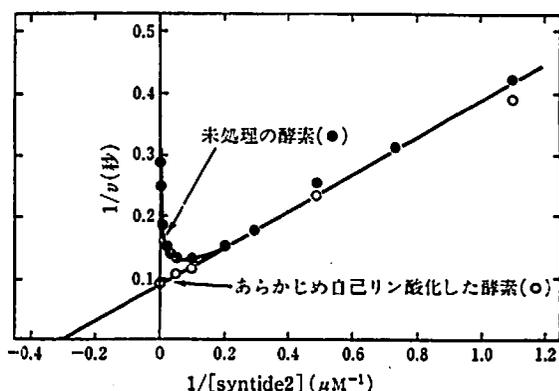


図4. 過剰基質による CaM キナーゼIIの活性の抑制⁵¹。あらかじめ自己リン酸化 (30°C , 1分間) した酵素 (○) と、していない酵素 (●) を用いて、さまざまな濃度の syntide2 を基質にして 30°C で活性を測定し、その2重逆数プロットをとった。アッセイは ATP 濃度を $2\ \mu\text{M}$ に下げた限定条件下で行なっている。

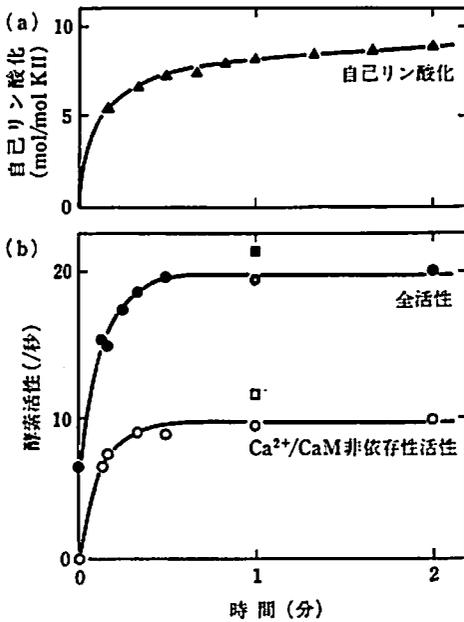


図 5. 過剰基質, 低 ATP 濃度条件下 ($200\mu\text{M}$ syntide 2, $2\mu\text{M}$ ATP) でみられる自己リン酸化の進行に伴う全酵素活性の活性化⁵¹⁾

$20\mu\text{M}$ ATP 存在下, 0°C で自己リン酸化を行ない, 活性の経時変化を $200\mu\text{M}$ syntide 2, $2\mu\text{M}$ ATP の限定条件下 30°C でアッセイした。(a) は自己リン酸化, (b) はそれに伴う全活性 ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 存在下の活性) および $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性 (EGTA 存在下の活性) の経時変化を示す。

出現の 3 者の経時変化がよく一致することが示されている (図 5)⁵¹⁾。これらの結果は Thr^{286/287} の自己リン酸化が全活性の出現それ自体にも深く関与している可能性を考えさせる^{1, 51, 52)}。部位特異的突然変異を用いて, Thr²⁸⁶ を Ala などリン酸化を受けない残基に変換した変異酵素の比活性は, 野生型酵素のそれと大差ないので, このような自己活性化機構の存在を否定する考えもある⁵³⁻⁵⁵⁾が, これらの組換え型酵素の比活性は native のもの比べてかなり低く, フォールディングやサブユニットの会合などが native のもの比べてかなり異なっている可能性もあり, したがって native の酵素もつ微妙な活性制御機構を十分に再現できていない恐れもある。また, Thr²⁸⁶ を他のアミノ酸残基に置き換えたことにより, 自己阻害ドメイン (後述) の 2 次構造などに変化を与え, このドメインと酵素の活性部位との相互作用に影響を及ぼして, 結果として自己リン酸化と同等の効果を表わしているという可能性も否定できない^{54, 55)}。いずれにしても, この問題に決着をつけるためには, 比活性の高い組換え型酵素を用いた, より詳細な反応速度論的解析が必要となろう。

3. その他の自己リン酸化部位と自己活性制御

本酵素は Thr^{286/287} 以外にも多くの自己リン酸化部位をもつが, これらについてはその機能的な意義をも含めて詳細はまだ不明なものが多い。これまでに Thr^{286/287} 以外に Ser^{270/280}, β -Ser³⁴³ (β サブユニットの Ser³⁴³ の意。以下, 同様に略記), β -Ser³⁷¹, β -Thr^{382/381}, Ser^{314/315}, Thr^{305/306/37, 58)}, などが自己リン酸化部位として同定されている。これらのうち β -Thr³⁸² は Thr^{286/287} と同様, 自己リン酸化の非常に早い段階でリン酸化される部位であるが, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現には関与していないらしい⁵⁶⁾。Ser^{270/280}, β -Ser³⁴³, β -Ser³⁷¹, は自己リン酸化反応の比較的遅い段階でリン酸化される部位である⁵⁶⁾が, これらの機能についてはまったく不明である。

Ser^{314/315}, Thr^{305/306} は最初に $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 存在下で Thr^{286/287} を自己リン酸化させて $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性を出現させておいてから, 速やかに EGTA で Ca^{2+} をキレートさせたときに自己リン酸化される部位として同定されたものであり^{57, 58)}, 恐らく細胞内において一過性に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇したのち, 速やかに低下する際にリン酸化される部位であろうと考えられる。これらの部位はいずれも CaM 結合部位の中にあり, Ca^{2+} 濃度が低下すると, CaM が CaM キナーゼ II からはずれ, その結果 CaM によってブロックされていた部位が露出して自己リン酸化されるものと考えられる。これらの部位がリン酸化されると, もはや CaM は酵素に結合することができなくなり, CaM キナーゼ II は完全に Ca^{2+} 非依存性の酵素に転換される。この際, Thr^{305/306} の自己リン酸化のほうが, より重要な働きをしており, Ser^{314/315} の自己リン酸化の寄与は比較的小さいという^{57, 58)}。CaM キナーゼ II の自己リン酸化部位は多く, このほかにも未同定の部位もあるものと考えられるが, これらの部位での自己リン酸化がどのような順序で起こるのか, またそれに対応して活性がどのように変化するのか, また, その後の脱リン酸化の順序はどうかということとは本酵素の活性調節機構を明らかにするうえでできわめて興味深い問題であり, 今後の大きな課題である。とりわけ, 自己リン酸化の進行に伴う全酵素活性の抑制に関しては, 単にリン酸が多く取り込まれることによって酵素の熱安定性が減少したことによるものなのか⁵⁹⁾, それとも生理的意義のある自己調節機構であるのか^{5, 47, 60)}, いまだにはっきりした結論はえられていない。もし, 後者であるならば, これに関与する自己リン酸化部位の同定も重要な課題となろう。

4. 自己阻害ドメインの構造と機能

一般にAキナーゼなどエフェクターに依存性のプロテインキナーゼでは自己阻害ドメインとよばれるドメインが活性調節に重要な役割を果たしていることが知られている⁶¹⁾。すなわち、エフェクター存在下では自己阻害ドメインが酵素の触媒ドメインと相互作用することにより、酵素活性を抑制しているが、エフェクターの結合により、この相互作用が妨害されるようなコンフォメーション変化（またはサブユニットの解離）が起こり、エフェクターに依存した活性が出現するのである。CaM キナーゼIIにも $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ の結合によって酵素活性を調節するような自己阻害ドメインが存在するはずである。CaM キナーゼIIの自己阻害ドメインに関しては、Soderling 一派によって、多くのペプチドアナログを用いた詳細な研究が行なわれている²⁾。cDNA クローニングの結果、他の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性酵素との一次構造の比較により、Ala²⁹⁵-Gly³¹⁵（番号はCaM キナーゼII α サブユニットのアミノ酸番号に対応する。以下同様）の領域がCaM 結合領域と推定された。彼らはこの部分を含む種々のペプチドアナログを合成し、ペプチド 290~309、ペプチド 296~309、ペプチド 294~319 が強いCaM 結合能をもつこと、また、ペプチド 290~309、ペプチド 290~302、ペプチド 296~309 などが合成ペプチド基質 syntide 2 に対して部分的に競争阻害を示すことなどを明らかにした⁶²⁾（図 1b を参照）。彼らはさらに、Thr^{286/287} の自己リン酸化と自己阻害ドメインの機能の関係の関係を明らかにするためにペプチド 281~309 を合成し、このものと自己阻害ドメインをプロテアーゼ処理で取り除くことによって完全に $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性になったCaM キナーゼIIとの相互作用を調べた^{63,64)}。それによると、このペプチドはCaM キナーゼIIの強い阻害剤 ($K_i=0.2 \mu\text{M}$) であり、ATP に対して競争阻害、合成ペプチド基質 syntide 2 に対して非競争阻害を示した⁶⁴⁾。また、この阻害が $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ によって解除されること⁶²⁾、フェニルグリオキサールがCaM キナーゼIIのATP 結合部位を化学修飾することによる失活をこのペプチドが保護すること⁶⁴⁾、このペプチドをリン酸化すると阻害効果が低下すること⁶⁴⁾などが示された。以上のことから、ペプチド 281~309 に相当する自己阻害ドメインは $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非存在下ではCaM キナーゼIIのATP 結合部位をブロックしているが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ がこの領域のC末端側にあるCaM 結合部位に結合したり、Thr^{286/287} が自己リン酸化されたりするとATP 結合部位との相互作用が弱められ、活性が発現するものと考えられ

た^{2,63-65)}。彼らはさらにこのペプチドのどの領域、どの残基が阻害作用に重要な効果をもたらしているかを種々の残基を置換したペプチドアナログを合成して詳細に調べた⁶⁵⁾。その結果、Arg²⁸³、Lys²⁹¹、Arg²⁹⁷、Lys²⁹⁸ が重要な働きをしていること、His²⁸² が自己阻害ドメインとATP 結合部位との相互作用に重要であることなどが示唆された。彼らはまた、自己阻害ドメインの α ヘリックス構造が機能発現に重要な役割を果たしているとの仮説を提唱している^{59,65)}。

部位特異的突然変異など遺伝子工学を用いた変異酵素の解析も構造と機能の研究には有用であろう²⁾。変異酵素の多くは α サブユニットのThr²⁸⁶ に関するものであり、Thr²⁸⁶ をAla、Leu、Proなどに置換した変異酵素では自己リン酸化条件にしても $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性の出現が抑制されること⁵⁸⁻⁵⁹⁾、Asp（酸性アミノ酸であるので負電荷を持ち込んでリン酸化と同等の効果を表わすものと考えられる）に置換した変異酵素では自己リン酸化しなくても比較的高いレベルの $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性をもつこと^{52,66)}などが示され、N-1 でも述べたようにThr^{288/287} の $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性出現における重要性が明らかとなった。Arg²⁸³ はThr^{286/287} の自己リン酸化における自己リン酸化部位の認識に関与すると考えられ、Arg²⁸³ をGluやGlnに置換した変異酵素ではThr²⁸⁶ の自己リン酸化速度が顕著に低下することが報告されている^{67,68)}。また、His²⁸² をAspに、Arg²⁸³ をGlyに、Gln²⁸⁴ をGluに、それぞれ変異させた三重変異酵素では、自己リン酸化しなくても高いレベルの $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 非依存性活性をもつという報告⁶⁹⁾もあるが、これなどは自己阻害ドメインと触媒ドメインとの相互作用に重要なArg²⁸³ 周辺に正電荷に代わって負電荷が持ち込まれたために相互作用が弱められた結果であろう。このほか、Thr²³²→Ala、Thr²⁶¹→Gly、Thr²⁷⁶→Ala、Ser²⁷⁹/Thr²⁸⁶→Ala/Leuなどの部位特異的変異酵素の性質が調べられている⁵⁴⁾が、もしSoderlingらの提唱する“ α ヘリックス仮説”が正しいのならば、以上の結果は単に静電的效果のみならず立体的効果をも含めて論じなければならないのかもしれない。また、CaM キナーゼIIの種々の領域を遺伝子工学的に欠失させた、いわゆる deletion mutant を用いた解析も行なわれている^{69,70)}（詳細は本号 pp. 1590~1599を参照のこと）。

最近、CaM キナーゼIIのプロテアーゼによる限定分解に関し、興味深い報告がなされた⁷¹⁾。すなわち、あらかじめ自己リン酸化したCaM キナーゼIIをキモトリプシンで限定分解すると native のCaM キナーゼIIと比

べて V_{max} で 10 倍以上も活性化された分子量 30 K の Ca^{2+}/CaM に完全に非依存性の活性化フラグメントを生じるが、あらかじめ自己リン酸化していなければ分子量 32 K のまったく活性をもたないフラグメントが得られるという。アミノ酸配列分析の結果から、30 K フラグメントは α サブユニットの 1~271, 32 K フラグメントは 1~293 または 1~299 の配列に対応するということが明らかとなった。これらの結果は自己リン酸化によってキモトリプシンによる切断部位に影響を及ぼすようなコンフォメーション変化が誘起されること、272~293, または 272~299 の配列が CaM キナーゼ II の活性制御に深くかかわっていることを示唆している。

以上述べたような研究により、 CaM キナーゼ II の自己阻害ドメインの構造と機能に関する知見が蓄積されつつあるが、 CaM キナーゼ II の自己阻害ドメインは ATP 結合部位と蛋白質・ペプチド基質結合部位の双方と相互作用するという点で A キナーゼ、C キナーゼ、G キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼなどにみられるような、いわゆる pseudosubstrate 型のものに比べてより複雑な構造と機能を有しているように思われる¹⁾。図 1 b に自己阻害ドメインの構造と機能に関するこれまでの知見をまとめてみたが、今後は一次構造のみならず、高次構造とのかかわりも視野に入れたより詳細な研究が必要となる

う。新たな方法論の開発がまたれる所以である。

5. 活性調節モデル

これまでに報告されたデータを総合すると、本酵素の自己活性制御機構については次のようなモデルを考えることができる(図 6)。

① Ca^{2+}/CaM 非存在下では ATP 結合部位が酵素分子内の自己阻害ドメイン(図 1 参照)にブロックされているため、酵素は不活性型となっている²⁾。このとき His²⁸² が ATP 結合部位と自己阻害ドメインとの相互作用に重要な役割を果たしているらしい⁶⁵⁾。

② Ca^{2+}/CaM が酵素に結合すると ATP 結合部位が露出し、酵素の自己リン酸化が可能となる²⁾が、この段階ではまだ十分に活性化されておらず低い活性(基礎活性)をもった状態である³¹⁾。しかし、この状態は酵素反応のごく初期に過渡的に出現するにすぎず、通常の反応条件では Thr^{286/287} が速やかに自己リン酸化されて③の状態に移行する。

③ Thr^{286/287} が自己リン酸化されることにより、酵素はフルに活性化された状態になる(autoactivation)³¹⁾。同時にこの自己リン酸化によって自己阻害ドメインと ATP 結合ドメインとの相互作用が妨害され、 Ca^{2+}/CaM 非依存性の活性が出現するようになる²⁾。自己リン酸化

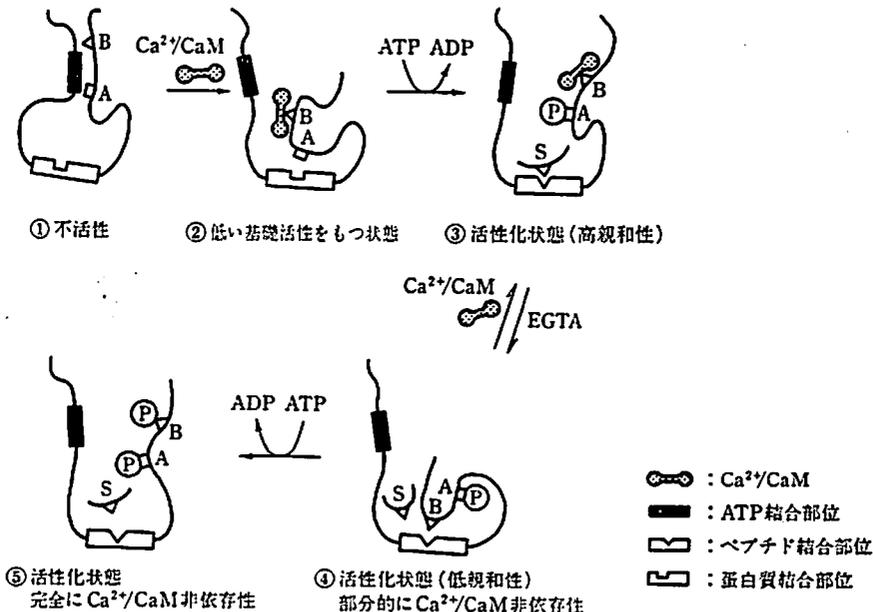


図 6. CaM キナーゼ II の活性調節モデル

P はリン酸基を示す。A は Thr^{286/287} に、B は Ser^{314/315} または Thr^{285/286} に対応する。また、S は基質蛋白質である。説明は本文 IV-5 を参照のこと。

によって Thr^{290/297} に導入された負電荷がこの相互作用を弱めるのに働いているらしい^{38,60}。

④ *in vitro* において EGTA で遊離 Ca²⁺ をキレートしたり, *in vivo* で細胞内 Ca²⁺ 濃度が一過性に上昇したのち, 速やかに低下したりすると, CaM が酵素から解離する。③の自己リン酸化により酵素活性は部分的に Ca²⁺/CaM 非依存性になっているが, この状態では③の状態に比べて基質に対する親和性の低下がみられる⁵⁰。

⑤ Ca²⁺/CaM の結合によってブロックされていた Thr^{205/208} および Ser^{314/315} が露出し, 自己リン酸化を受ける^{57,58}。この状態ではもはや自己阻害ドメインは Ca²⁺/CaM が存在しなくても ATP 結合部位と相互作用することはなくなり, 完全な Ca²⁺ 非依存型の酵素に転換される。

おわりに 以上述べてきたように, CaM キナーゼII は自己リン酸化による自己活性制御を初めとして, いくつかのユニークな特徴を備え, 酵素的にも興味深いものであるばかりでなく, 生理的にもたいへん重要な酵素である。これまでの研究では自己活性調節機構など, 主として酵素そのものの性質を把握することに力点が置かれてきたが, 実際の細胞内では CaM キナーゼII は自己活性調節に加えてプロテインホスファターゼやプロテアーゼをはじめ, さまざまな活性調節因子の作用を受けてさらに複雑な活性制御を行なっていることであろう。また, 他の情報伝達系, たとえばアラキドン酸カスケードなどとのクロストークも存在するかもしれない^{72,73}。CaM キナーゼII の生理的役割を知るためには, 今後このような点を明らかにすることも重要になってくることであろう。

21 世紀は脳の時代といわれるが, 記憶をはじめとする脳の高次機能を解明するためには, それらの分子メカニズムを明らかにすることがきわめて重要な意義をもつものと考えられる。そのような研究のためには脳神経系を構成する重要な分子一つ一つの性質を明らかにしていくという地道な研究の積み重ね以外に道はない。そのような意味において CaM キナーゼII の生化学は複雑な脳の高次機能を解き明かす第一歩となるかもしれず, それだけにまた興味も尽きない。今後の研究の進展に期待したい。

文 献

(文献番号を太字にしたものは特に重要であることを示す)

- 1) 藤澤 仁: 生化学, 64, 14-25 (1992)
- 2) Colbran, R. J., Soderling, T. R.: *Curr. Topics Cell. Reg.*, 31, 181-221 (1990)
- 3) 山内 卓・大迫俊二: 生化学, 62, 38-44 (1990)
- 4) Schulman, H., Lou, L. L.: *Trends Biochem. Sci.*, 14, 62-66 (1989)
- 5) 福永浩司・山本秀幸・斎藤義樹・太田安隆・宮本英七: 本誌, 33, 2102-2115 (1988)
- 6) Schulman, H.: *in Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research* (eds. Greengard, P., Robinson, G. A.), vol. 22, pp. 39-112, Raven Press, New York (1988)
- 7) Kameshita, I., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 191-196 (1991)
- 8) Miyano, O., Kameshita, I., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 267, 1198-1203 (1992)
- 9) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *FEBS Lett.*, 116, 141-144 (1980)
- 10) 亀下 勇・藤澤 仁: 細胞内情報と細胞応答, 新化学実験講座第8巻 (日本生化学会編), pp. 157-166, 東京化学同人 (1990)
- 11) 奥野幸子・藤澤 仁: 本誌, 35, 630-637 (1990)
- 12) 奥野幸子・藤澤 仁: 本誌, 31, 1841-1850 (1986)
- 13) 石田敦彦・木谷隆子・藤澤 仁: 実験医学, 9, 1479-1484 (1991)
- 14) Bennett, M. K., Erondy, N. E., Kennedy, M. B.: *J. Biol. Chem.*, 258, 12735-12744 (1983)
- 15) McGuinness, T. L., Lai, Y., Greengard, P.: *J. Biol. Chem.*, 260, 1696-1704 (1985)
- 16) Miller, S. G., Kennedy, M. B.: *J. Biol. Chem.*, 260, 9039-9046 (1985)
- 17) Kelly, P. T., Shields, S., Conway, K., Yip, R., Burgin, K.: *J. Neurochem.*, 49, 1927-1940 (1987)
- 18) Yamauchi, T., Sekihara, S., Ohsako, S.: *Brain Res.*, 541, 198-205 (1991)
- 19) Kanaseki, T., Ikeuchi, Y., Sugiura, H., Yamauchi, T.: *J. Cell Biol.*, 115, 1049-1060 (1991)
- 20) Lin, C. R., Kapiloff, M. S., Durgerian, S., Tatemoto, K., Russo, A. F., Hanson, P., Schulman, H., Rosenfeld, M. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 5962-5966 (1987)
- 21) Bennett, M. K., Kennedy, M. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 1794-1798 (1987)
- 22) Bulleit, R. F., Bennett, M. K., Molfoy, S. S., Hurley, J. B., Kennedy, M. B.: *Neuron*, 1, 63-72 (1988)
- 23) Tobimatsu, T., Kameshita, I., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 263, 16082-16086 (1988)
- 24) Tobimatsu, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 264, 17907-17912 (1989)
- 25) Erondy, N. E., Kennedy, M. B.: *J. Neurosci.*

- 5, 3270-3277 (1985)
- 26) Fukunaga, K., Goto, S., Miyamoto, E.: *J. Neurochem.*, 51, 1070-1078 (1988)
- 27) Ouimet, C. C., McGuinness, T. L., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 5604-5608 (1984)
- 28) Lisman, J. E., Goldring, M. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5320-5324 (1988)
- 29) DeRiemer, S. A., Kaczmarek, L. K., Lai, Y., McGuinness, T. L., Greengard, P.: *J. Neurosci.*, 4, 1618-1625 (1984)
- 30) Schulman, H., Kuret, J., Jefferson, A. B., Nose, P. S., Spitzer, K. H.: *Biochemistry*, 24, 5320-5327 (1985)
- 31) Chou, Y.-H., Rebhun, L. I.: *J. Biol. Chem.*, 261, 5389-5395 (1986)
- 32) Bass, M., Pant, H. C., Gainer, H., Soderling, T. R.: *J. Neurochem.*, 49, 1116-1123 (1987)
- 33) Willmund, R., Mitschulat, H., Schneider, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9789-9793 (1986)
- 34) Londesborough, J., Nuutinen, M.: *FEBS Lett.*, 219, 249-253 (1987)
- 35) Bartelt, D. C., Fidel, S., Farber, L. H., Wolf, D. J., Hammell, R. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3279-3283 (1988)
- 36) Cho, K.-O., Wall, J. B., Pugh, P. C., Ito, M., Mueller, S. A., Kennedy, M. B.: *Neuron*, 7, 439-450 (1991)
- 37) Ohya, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., Londesborough, J., Anraku, Y.: *J. Biol. Chem.*, 266, 12784-12794 (1991)
- 38) Pausch, M. H., Kaim, D., Kunisawa, R., Admon, A., Thorner, J.: *EMBO J.*, 10, 1511-1522 (1991)
- 39) Hanley, R. M., Means, A. R., Ono, T., Kemp, B. E., Burgin, K. E., Waxham, N., Kelly, P. T.: *Science*, 237, 293-297 (1987)
- 40) 加藤剛志・藤澤 仁: 実験医学, 7, 1085-1090 (1989)
- 41) Pearson, R. B., Woodgett, J. R., Cohen, P., Kemp, B. E.: *J. Biol. Chem.*, 260, 14471-14476 (1985)
- 42) Soderling, T. R., Schworer, C. M., Payne, M. E., Jett, M. F., Porter, D. K., Atkinson, J. L., Richtand, N. M.: in *Hormones and Cell Regulation* (eds. Nunez, J., Dumont, J. E., King, R. J. B.), vol. 139, pp. 141-157, Colloq. INSERM/John Libbey Eurotext, London (1986)
- 43) Malinaw, R., Schulman, H., Tsien, R. W.: *Science*, 245, 862-866 (1989)
- 44) Malenka, R. C., Kauer, J. A., Perkel, D. J., Mauk, M. D., Kelly, P. T., Nicoll, R. A., Waxham, M. N.: *Nature*, 340, 554-557 (1989)
- 45) 工藤佳久: 実験医学, 8, 1525-1531 (1990)
- 46) 津本忠治: 代謝 vol. 28, シグナル伝達とそのクオ
 ストーク (臨時増刊号), pp. 247-252, 中山書店 (1991)
- 47) 藤澤 仁: 本誌, 33, 2237-2247 (1988)
- 48) Funakoshi, H., Okuno, S., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 266, 15614-15620 (1991)
- 49) Roach, P. J.: *J. Biol. Chem.*, 266, 14139-14142 (1991)
- 50) Ikeda, A., Okuno, S., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 266, 11582-11588 (1991)
- 51] Kotoh, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 266, 3039-3044 (1991)
- 52) Kwiatkowski, A. P., Shell, D. J., King, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 263, 6484-6486 (1988)
- 53] Fong, Y.-L., Taylor, W. L., Means, A. R., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 264, 16759-16763 (1989)
- 54) Hanson, P. I., Kapiloff, M. S., Lou, L. L., Rosenfeld, M. G., Schulman, H.: *Neuron*, 3, 59-70 (1989)
- 55) Ohsako, S., Nakazawa, H., Sekihara, S., Ikai, A., Yamauchi, T.: *J. Biochem.*, 109, 137-143 (1991)
- 56] Miller, S. G., Patton, B. L., Kennedy, M. B.: *Neuron*, 1, 593-604 (1988)
- 57] Patton, B. L., Miller, S. G., Kennedy, M. B.: *J. Biol. Chem.*, 265, 11204-11212 (1990)
- 58) Colbran, R. J., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 265, 11213-11219 (1990)
- 59) Lai, Y., Nairn, A. C., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4253-4257 (1986)
- 60) Lou, L. L., Lloyd, S. J., Schulman, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9497-9501 (1986)
- 61) 山内 卓・大迫俊二・荻原民雄: 文献 46, pp. 181-187 (1991)
- 62) Payne, M. E., Fong, Y.-L., Ono, T., Colbran, R. J., Kemp, B. E., Soderling, T. R., Means, A. R.: *J. Biol. Chem.*, 263, 7190-7195 (1988)
- 63) Colbran, R. J., Fong, Y.-L., Schworer, C. M., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 263, 18145-18151 (1988)
- 64] Colbran, R. J., Smith, M. K., Schworer, C. M., Fong, Y.-L., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 264, 4800-4804 (1989)
- 65) Smith, M. K., Colbran, R. J., Brickey, D. A., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 267, 1761-1768 (1992)
- 66) Waldmann, R., Hanson, P. I., Schulman, H.: *Biochemistry*, 29, 1679-1684 (1990)
- 67) Fong, Y.-L., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 265, 11091-11097 (1990)
- 68) Waxham, M. N., Aronowski, J., Westgate, S. A., Kelly, P. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1273-1277 (1990)
- 69) Yamauchi, T., Ohsako, S., Deguchi, T.: *J. Biol. Chem.*, 264, 19108-19116 (1989)
- 70) Hagiwara, T., Ohsako, S., Yamauchi, T.: *J. Biol. Chem.*, 266, 16401-16408 (1991)

- 71) Yamagata, Y., Czernik, A. J., Greengard, P.: *J. Biol. Chem.*, 266, 15391-15397 (1991)
- 72) Piomelli, D., Wang, J. K. T., Sihra, T. S., Nairn, A. C., Czernik, A. J., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 8550-8554 (1989)
- 73) Piomelli, D., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6770-6774 (1991)
- 74) Sato, H., Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *J. Biochem.*, 107, 802-809 (1990)
- 75) Hashimoto, Y., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 264, 16524-16529 (1989)
- 76) Hashimoto, Y., Soderling, T. R.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 278, 41-45 (1990)
- 77) Ikebe, M., Reardon, S.: *J. Biol. Chem.*, 265, 8975-8978 (1990)
- 78) Ferris, C. D., Haganir, R. L., Bredt, D. S., Cameron, A. M., Snyder, S. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2232-2235 (1991)
- 79) Chang, C. F., Gutierrez, L. M., Mundina-Weilenmann, C., Hosey, M. M.: *J. Biol. Chem.*, 266, 16395-16400 (1991)
- 80) Witcher, D. R., Kovacs, R. J., Schulman, H., Cefali, D. C., Jones, L. R.: *J. Biol. Chem.*, 266, 11144-11152 (1991)
- 81) Witcher, D. R., Striffler, B. A., Jones, L. R.: *J. Biol. Chem.*, 267, 4963-4967 (1992)
- 82) Sheng, M., Thompson, M. A., Greenberg, M. E.: *Science*, 252, 1427-1430 (1991)
- 83) Nakane, M., Mitchell, J., Förstermann, U., Murad, F.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 1396-1402 (1991)
- 84) Ikebe, M., Reardon, S.: *J. Biol. Chem.*, 265, 17607-17612 (1990)
- 85) Clarke, P. R., Hardie, D. G.: *FEBS Lett.*, 269, 213-217 (1990)
- 86) Mahrenholz, A. M., Lan, L., Mansour, T. E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 1255-1259 (1991)
- 87) Sáez, J. C., Nairn, A. C., Czernik, A. J., Spray, D. C., Hertzberg, E. L., Greengard, P., Bennett, M. V. L.: *Eur. J. Biochem.*, 192, 263-273 (1990)
- 88) Hashimoto, Y., Sharma, R. K., Soderling, T. R.: *J. Biol. Chem.*, 264, 10884-10887 (1989)

● 公 募 ●

東京都立大学理学部化学科 助教授 1名

所属講座：有機化学第一講座（教授 甲斐荘正恒、助手 三宅洋子）

研究分野：生体高分子物質（核酸・蛋白質）の構造化学的研究。RNA/DNA 合成，蛋白質工学的研究など関連領域も含む

応募資格：博士号取得者であり，関連分野の研究に現在たずさわっているもの

着任時期：平成5年4月1日（予定）

提出書類：① 履歴書，② 業績リスト（論文・総説・主要な講演），③ 主要論文・総説の別刷（10冊以内），④ 今後の研究教育に関する抱負（2000字以内），⑤ 本人について所見を求めうる方2名の名前と連絡先

応募締切：平成4年9月末日

書類送付先：〒192-03 八王子市南大沢 1-1
東京都立大学理学部化学科
有機化学第一講座助教授
人事選考委員長 甲斐荘正恒

● お 知 ら せ ●

第6回千里止血血栓シンポジウム
抗リン脂質抗体の新展開

日時：平成4年12月12日（土）13：00～

場所：千里ライフサイエンスセンタービル（地下鉄御堂筋線 千里中央駅下車）

世話人：加藤久雄・松尾 理・鈴木宏治

ループスアンチコアグラント —— その診断と生物学的意義

池田康夫（慶応大・医・内科）

抗リン脂質抗体の分子構造

井上圭三・梅田真郷（東大・薬）

β2 グリコプロテイン I：スズ構造とリン脂質リポソームとの相互反応

加藤久雄（国立循環器病センター），後藤祐児（阪大・理），吉村哲郎（徳島大・薬学研）

自己免疫疾患と抗カルジオリピン抗体

小池隆夫（千葉大・医・第二内科）

ループスアンチコアグラントの臨床

末廣 暁・榎下策三（兵庫医大・第二内科）

抗リン脂質抗体と血栓形成 —— 特に SLE を中心として

伊藤要子（愛知医大・放射線科），山本ゆかり・小栗 隆（愛知医大・第二内科）

<入場無料，来場歓迎>

問合せ先：〒565 吹田市藤白台 5-7-1 国立循環器病センター研究所 加藤久雄
Tel. 06-833-5012 ext. 2512