

AMCoR

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

蛋白質・核酸・酵素 (1997) 42(3):418-423.

脳における情報伝達 細胞内シグナル伝達 プロテインキナーゼ CaMキナーゼカスケード

奥野幸子, 木谷隆子, 藤澤仁

CaMキナーゼカスケード

奥野幸子・木谷隆子・藤澤 仁

Ca²⁺を介する脳のシグナル伝達系で中心的な役割を担っていると考えられる3つの多機能性カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ I, II, IV) の活性制御機構について述べた。最近, CaM キナーゼ I と IV をリン酸化して活性化する新しい CaM 依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼキナーゼ) が発見され, 脳の Ca²⁺ シグナル伝達系に Ca²⁺/CaM/キナーゼ/キナーゼカスケードが存在することが明らかになった。本稿では現在進められつつあるこの CaM キナーゼカスケードの研究を中心に概説した。

Key words 【CaM キナーゼキナーゼ】【多機能性プロテインキナーゼ】
【CaM キナーゼIV】【CaM キナーゼ I】

はじめに 脳におけるシグナル伝達系で Ca²⁺ はセカンドメッセンジャーとして多種多様な制御に携わっているが, その多くが Ca²⁺/CaM 依存性多機能性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ) による蛋白質リン酸化反応を介している。この伝達系を構成する Ca²⁺ 応答性の CaM キナーゼとして CaM キナーゼ II が 1979 年に発見され, 以来現在までその活性制御機構や生理作用について多くの研究がなされており^{1,2)}, 本誌でも再三とりあげられてきた³⁻⁵⁾。その後 CaM キナーゼ IV⁶⁾ と CaM キナーゼ I⁷⁾ も CaM キナーゼ II と同様に脳に多い多機能性プロテインキナーゼであることが明らかにされ, 脳の Ca²⁺ シグナリングは CaM キナーゼ II だけでなく, CaM キナーゼ IV と CaM キナーゼ I を加えた少なくとも 3 つの CaM キナーゼの関与を考えねばならなくなっている。最近, CaM キナーゼ IV をリン酸化して活性化する CaM キナーゼ IV キナーゼ, CaM キナーゼ I をリン酸化して活性化する CaM キナーゼ I キナーゼが発見され, Ca²⁺ を介するシグナル伝達系に Ca²⁺/CaM/キナ

ーゼ/キナーゼカスケードが重要な役割を果たしている可能性が考えられ, このカスケードの研究が急展開しつつある。本稿では CaM キナーゼカスケードについて筆者らが行っている CaM キナーゼ IV の活性制御機構を中心に現在までに得られた知見を紹介したい。

I. CaM キナーゼ I, II, IV

CaM キナーゼ I, II, IV はいずれも脳に多く, また基質特異性が広いので, 脳内の種々の蛋白質をリン酸化してそれらの機能を調節し, 脳の Ca²⁺ を介するシグナル伝達を担っていると考えられるが, それぞれ表 1 のような特徴をもっている。

1. サブユニット構造

CaM キナーゼ II は分子量約 54~60 K のサブユニットから構成されるオリゴマー酵素であり, 対して CaM キナーゼ IV と CaM キナーゼ I はそれぞれ分子量約 53

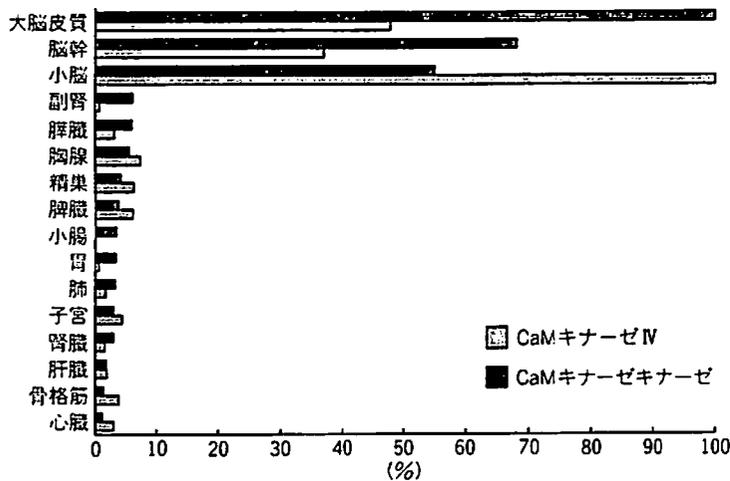


図3 CaMキナーゼIVおよびCaMキナーゼキナーゼの活性の組織分布¹³⁾

CaMキナーゼキナーゼで活性化されたCaMキナーゼIV自身によって自己リン酸化を受けるが、この自己リン酸化の生理的な意義は現在明らかでない。

2. 分布

CaMキナーゼIは脳に多く、最初はシナプシンのサイトIをリン酸化するキナーゼとして発見されたが、脳と同等に非神経組織にも広く分布していることがノーザンブロットやウェスタンブロットの結果から明らかになっている。細胞内では細胞質に分布している^{11,12)}。

CaMキナーゼIIは末梢組織にも広く分布するが、脳の含量が桁違いに高い。CaMキナーゼIIには異なった遺伝子からつくられる α , β , γ , δ アイソフォームが存在するが、脳では α と β アイソフォームがおもに発現している。神経細胞の細胞質と膜、とくにシナプス後膜肥厚部(PSD)に多く、神経終末部でのトランスミッターの合成と分泌の調節や後シナプス側の神経伝達に関与していると考えられている。

CaMキナーゼIVも脳に多い。図3にはラットの組織中のCaMキナーゼIVの活性の分布を示している¹³⁾。CaMキナーゼIVの活性は脳で高く、末梢では脳の数%ほどの活性しか認められない。脳の中でもとくに小脳の顆粒細胞に濃縮されているので、SahyounらはCaMキナーゼIVをCaMキナーゼGrとよんでいる¹⁴⁾。また小脳には酵素のN末端にさらに28アミノ酸が付加されたアイソフォーム(β アイソフォーム)も発現している¹⁵⁾。

一方、抗体を用いてCaMキナーゼIVの分布を調べると、胸腺に脳と同等の高含量のCaMキナーゼIV蛋白質が検出されるので、胸腺では多量のCaMキナーゼIVが不活性型で存在していると思われる。CaMキナーゼIVは神経細胞内の核に主として分布しており¹⁶⁾、また転写調節因子であるCREB(cAMP response element binding protein)をリン酸化することなどから遺伝子発現の調節に関与している可能性が考えられている¹⁷⁾。

3. 活性制御機構

オリゴマー酵素であるCaMキナーゼIIがThr 286の自己リン酸化によって活性化されるのに対し、モノマー酵素であるCaMキナーゼIとIVでは別のCaMキナーゼ

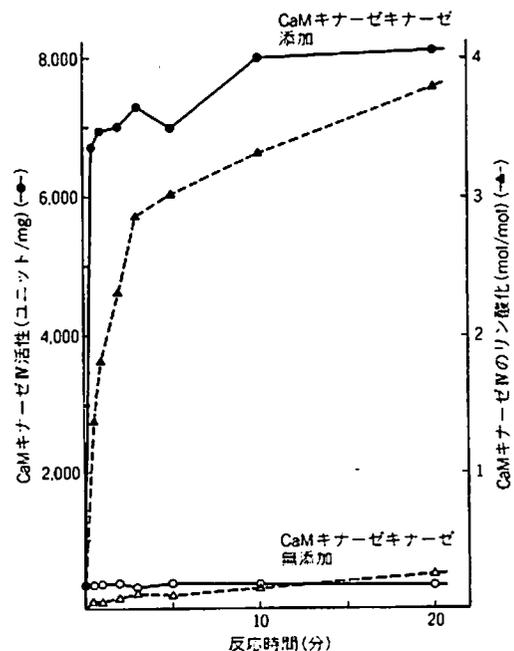


図4 CaMキナーゼIVキナーゼによるCaMキナーゼIVのリン酸化と活性化¹⁸⁾

ーゼである CaM キナーゼキナーゼによってリン酸化されて活性化されることが明らかになった。

II. CaM キナーゼ IV の活性制御機構

1. CaM キナーゼキナーゼによる活性化

筆者らは大腸菌に発現させた不活性な組換え型 CaM キナーゼ IV を $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性にリン酸化して活性化する CaM キナーゼ IV キナーゼが脳に存在することを見いだした(図 3)¹⁹⁾。図 4 はラット脳から精製した CaM キナーゼ IV に CaM キナーゼ IV キナーゼを加えてリン酸化したときの CaM キナーゼ IV へのリン酸の取り込み量と活性の経時変化を示している¹⁹⁾。CaM キナーゼ IV はもともと自己リン酸化活性はもたず、CaM キナーゼ IV キナーゼによってリン酸化されてはじめて高い活性をもち、強い自己リン酸化活性を示すことが明らかになった。この CaM キナーゼ IV キナーゼによってリン酸化される部位は CaM キナーゼ IV の N 末端側から 196 番目のスレオニン残基(Thr196)であることが Selbert らによって示された¹⁹⁾。Thr196 は CaM キナーゼ IV の触媒ドメイン内のサブドメイン VII と VIII の間に位置している²⁰⁾(図 2)。CaM キナーゼ IV とまったく同様に CaM キナーゼ I も CaM キナーゼ I キナーゼによってリン酸化されて活性化されるが、この活性化に関与する CaM キナーゼ I のリン酸化部位 Thr177 も^{21,22)} CaM キナーゼ IV の Thr196 と触媒ドメイン内の同じ部位にある。さらに A キナーゼ、C キナーゼ、MAP キナーゼ、サイクリン依存性キナーゼなどでもこの部位のリン酸化が活性発現に必要であることが明らかにされている。

化されて活性化されるが、この活性化に関与する CaM キナーゼ I のリン酸化部位 Thr177 も^{21,22)} CaM キナーゼ IV の Thr196 と触媒ドメイン内の同じ部位にある。さらに A キナーゼ、C キナーゼ、MAP キナーゼ、サイクリン依存性キナーゼなどでもこの部位のリン酸化が活性発現に必要であることが明らかにされている。

2. 自己リン酸化による不活性化

CaM キナーゼ IV キナーゼによって $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性にリン酸化され活性化された CaM キナーゼ IV は強い自己リン酸化活性をもち、自己リン酸化によって CaM キナーゼ IV にはさらに数個のリン酸が取り込まれるが、EGTA を加えて Ca^{2+} を除いた場合にも Ca^{2+} 非依存性に自己リン酸化される。この自己リン酸化によって CaM キナーゼ IV は $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性活性を完全に消失し、不活性化されることが明らかになった²³⁾(図 5)。この不活性化に関与する自己リン酸化部位が CaM キナーゼ IV の CaM 結合部位内の Ser332 であることも明らかになった(図 2)。CaM キナーゼ II にも同様な自己リン酸化が報告されており、 Ca^{2+} 濃度が低下したときに起こるこの不活性化機構が活性化機構の異なる CaM キナーゼ IV と II にも備わっているので Ca^{2+} によるシグナル伝達と密接に関係する生理的に重要な活性制御機構の可能性が考えられる。

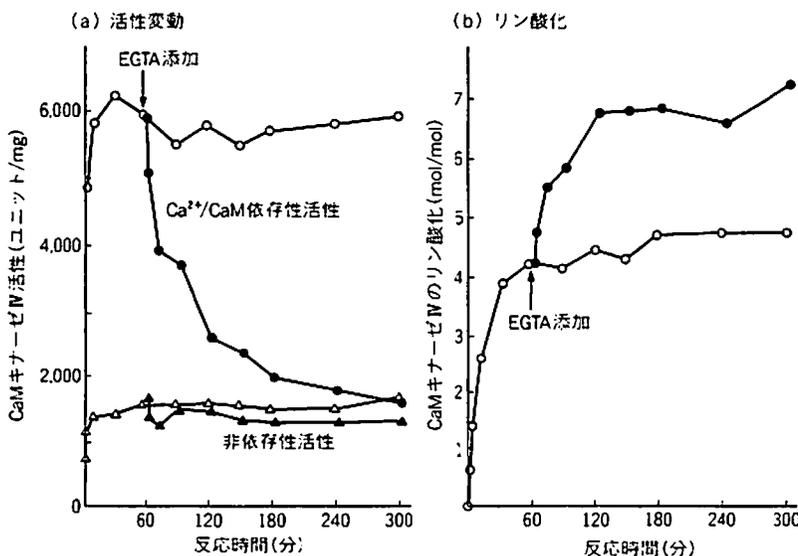


図 5 CaM キナーゼ IV の自己リン酸化による不活性化²³⁾

●, ▲: EGTA 添加後, ○, △: EGTA 無添加。

III. CaM キナーゼキナーゼ

1. CaM キナーゼ IV キナーゼ

筆者らは CaM キナーゼ IV をリン酸化して活性化する CaM キナーゼ IV キナーゼをラットの大脳皮質から純粋に精製した²⁴⁾。分子量は SDS-PAGE で 66 K のモノマーの $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼである。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性に CaM キナーゼ IV をリン酸化するが、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ は CaM キナーゼ IV キナーゼにも必要であることが報告されている²⁵⁾。cDNA クローニン

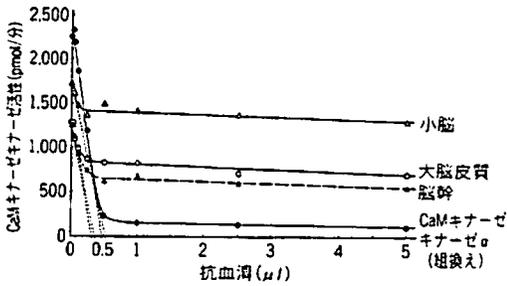


図6 CaMキナーゼキナーゼα抗血清による脳抽出液の免疫沈降²⁹⁾
 ラット脳抽出液に抗血清を加えてCaMキナーゼキナーゼを免疫沈降させ遠心によって除き、抗血清と反応せず上清に残ったCaMキナーゼキナーゼの活性を測定した。

グにより1次構造も明らかにされ、505アミノ酸よりなる分子量53Kの蛋白質である²⁶⁾。基質特異性は高いがCaMキナーゼIVのほかCaMキナーゼIもリン酸化して活性化する²⁶⁾。しかし免疫組織化学的に脳内分布が調べられた結果、この酵素は脳内各部位に広く分布し、神経細胞の核に存在することが明らかにされた²⁷⁾。したがって細胞質に存在するCaMキナーゼIのリン酸化には関与せず、核の中でCaMキナーゼIVをリン酸化して活性化するキナーゼであろうと推定される。

2. CaMキナーゼキナーゼアイソフォーム

図6はクローン化したCaMキナーゼIVキナーゼに対する抗体を用いてラットの脳内のCaMキナーゼIVキナーゼ

ーゼの免疫滴定を行なった結果である²⁸⁾。大脳皮質および脳幹の約1/2、小脳の約3/4のCaMキナーゼIVキナーゼはこの抗体と反応しないことが明らかになり、CaMキナーゼIVキナーゼは少なくとも2種類存在するものと思われた。筆者らは最近、ラットの脳からこの抗体とは反応しないCaMキナーゼIVキナーゼ(CaMキナーゼキナーゼβ)を精製したが、この酵素も前述のクローン化したCaMキナーゼIVキナーゼ(CaMキナーゼキナーゼα)と同様にCaMキナーゼIV、Iともに活性化することやCaMキナーゼキナーゼαによる活性化とβによる活性化が加算されないことなどから(図7)、CaMキナーゼキナーゼαとβは同じ部位をリン酸化してCaMキナーゼIVあるいはCaMキナーゼIを活性化すると考えられる。LeeらはCaMキナーゼIをリン酸化して活性化する分子量52KのCaMキナーゼIキナーゼをブタ脳から精製し²⁹⁾、この酵素がCaMキナーゼIのThr177とCaMキナーゼIVのThr196の双方をリン酸化して活性化することを報告したが^{19,21)}、最近彼らはラットの脳から精製するとCaMキナーゼIキナーゼの分子量は69Kと73Kであると報告した³⁰⁾。これらの結果を総合すると、おそらくCaMキナーゼIVとCaMキナーゼIを共通にリン酸化して活性化するCaMキナーゼキナーゼが脳に存在し、このCaMキナーゼキナーゼにいくつかのアイソフォームが存在していると推定される。このうち筆者らがラットの大脳皮質から精製し、クローン化したCaMキナーゼキナーゼαは神経細胞の核に分布しているのと同じ核内に分布する

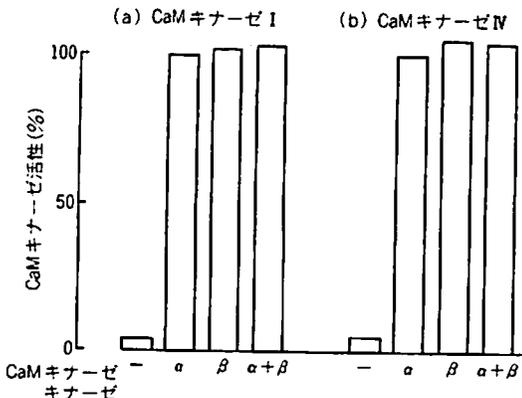


図7 CaMキナーゼキナーゼα, βによるCaMキナーゼI, IVの活性化
 組換え型CaMキナーゼIまたはIVにラット脳から精製したCaMキナーゼキナーゼαまたはβまたはα+βを加えて活性化した。

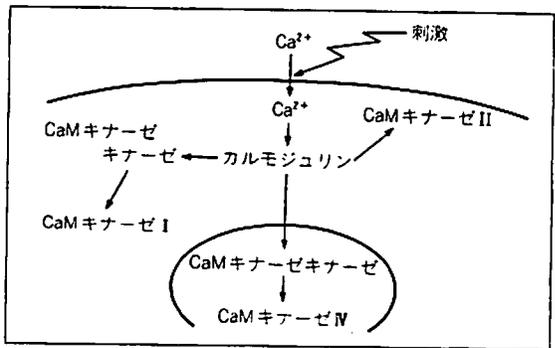


図8 CaMキナーゼカスケード
 刺激に反応して神経細胞内のCa²⁺濃度が上昇し、カルモジュリン(CaM)が活性化される。活性化されたCaMはCaMキナーゼIIを活性化するとともに、CaMキナーゼキナーゼの活性化を介してCaMキナーゼIとIVを活性化する。

CaM キナーゼIVの活性化にあずかっている酵素と推定される。一方、CaM キナーゼ I は細胞質に分布しているのでCaM キナーゼキナーゼアイソフォームが細胞質にも存在しCaM キナーゼ I をリン酸化し活性化すると考えられる (図8)。

おわりに 脳のCa²⁺ シグナリングに関与すると考えられるCaM キナーゼ I, II, IVについて述べた。これらはいずれも基質特異性が広く脳内の多くの種類の蛋白質をリン酸化するが、それぞれ細胞内分布も異なるので互いに役割分担しながらCa²⁺ による調節をまかっていると思われる。CaM キナーゼ I とIVをリン酸化して活性化するCaM キナーゼキナーゼの存在が明らかになり、Ca²⁺/CaM を介するシグナル伝達系ネットワークはさらに広がりがつつある。

文 献

- 藤澤 仁 : 生化学, 64, 14-25 (1992)
- Hanson, P. I., Schulman, H. : *Ann. Rev. Biochem.*, 61, 559-601 (1992)
- 石田敦彦・藤澤 仁 : 蛋白質 核酸 酵素, 37, 1577-1589 (1992)
- 山内 卓 : 蛋白質 核酸 酵素, 37, 1590-1599 (1992)
- 宮本英七・福永浩司・太田安隆・山本秀幸 : 蛋白質 核酸 酵素, 37, 1600-1613 (1992)
- Miyano, O., Kameshita, I., Fujisawa, H. : *J. Biol. Chem.*, 267, 1198-1203 (1992)
- Nairn, A. C., Picciotto, M. R. : *Semin. Cancer Biol.*, 5, 295-303 (1994)
- Ishida, A., Kitani, T., Fujisawa, H. : *Biochim. Biophys. Acta*, 1311, 211-217 (1996)
- Yokokura, H., Picciotto, M. R., Nairn, A. C., Hidaka, H. : *J. Biol. Chem.*, 270, 23851-23859 (1995)
- Tokumitsu, H., Brickley, D. A., Glod, J., Hidaka, H., Sikela, J., Soderling, T. R. : *J. Biol. Chem.*, 269, 28640-28647 (1994)
- Ito, T., Mochizuki, H., Kato, M., Nimura, Y., Hanai, T., Usuda, N., Hidaka, H. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 312, 273-284 (1994)
- Picciotto, M. R., Zoli, M., Bertuzzi, G., Nairn, A. C. : *Synapse*, 20, 75-84 (1995)
- Okuno, S., Fujisawa, H. : *J. Biochem.*, 114, 167-170 (1993)
- Ohmstede, C., Jensen, K. F., Sahyoun, N. E. : *J. Biol. Chem.*, 264, 5866-5875 (1989)
- Sakagami, H., Kondo, H. : *Mol. Brain Res.*, 19, 215-218 (1993)
- Jensen, K. F., Ohmstede, C., Fisher, R. S., Sahyoun, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2850-2853 (1991)
- Enslin, H., Tokumitsu, H., Soderling, T. R. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207, 1038-1043 (1995)
- Okuno, S., Kitani, T., Fujisawa, H. : *J. Biochem.*, 117, 686-690 (1995)
- Selbert, M. A., Anderson, K. A., Huang, Q., Goldstein, E. G., Means, A. R., Edelman, A. M. : *J. Biol. Chem.*, 270, 17616-17621 (1995)
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T. : *Science*, 241, 42-52 (1988)
- Sugita, R., Mochizuki, H., Ito, T., Yokokura, H., Kobayashi, R., Hidaka, H. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 694-701 (1994)
- Haribabu, B., Hook, S. S., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Tomhave, E. D., Edelman, A. M., Snyderman, R., Means, A. R. : *EMBO J.*, 14, 3679-3686 (1995)
- Watanabe, S., Okuno, S., Kitani, T., Fujisawa, H. : *J. Biol. Chem.*, 271, 6903-6910 (1996)
- Okuno, S., Kitani, T., Fujisawa, H. : *J. Biochem.*, 116, 923-930 (1994)
- Tokumitsu, H., Soderling, T. R. : *J. Biol. Chem.*, 271, 5617-5622 (1996)
- Tokumitsu, H., Enslin, H., Soderling, T. R. : *J. Biol. Chem.*, 270, 19320-19324 (1995)
- Nakamura, Y., Okuno, S., Kitani, T., Otake, K., Sato, F., Fujisawa, H. : *Neurosci. Lett.*, 204, 61-64 (1996)
- Okuno, S., Kitani, T., Fujisawa, H. : *J. Biochem.*, 119, 1176-1181 (1996)
- Lee, J. C., Edelman, A. M. : *J. Biol. Chem.*, 269, 2158-2164 (1994)
- Edelman, A. M., Mitchelhill, K. I., Selbert, M. A., Anderson, K. A., Hook, S. S., Stapleton, D., Goldstein, E. G., Means, A. R., Kemp, B. E. : *J. Biol. Chem.*, 271, 10806-10810 (1996)