

AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2000) 創刊号:26.

細胞内カルシウムシグナル伝達 (Ca²⁺-Signaling)

藤澤 仁

依頼論文 A (総説)

細胞内カルシウムシグナル伝達 (Ca²⁺-Signaling)

藤澤 仁*

【要 旨】

カルシウムイオンは細胞間情報伝達のシグナル伝達経路における細胞内伝達物質として重要な働きをしている。CaMキナーゼII、IV、Iなどの多機能性カルシウム/カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素は細胞内カルシウムシグナル伝達に中心的な役割を演じている。これらの酵素の活性制御機構について当研究室で行われた研究を中心に要約した。

キーワード カルシウムイオン、シグナル伝達、カルモデュリン、カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素、タンパク質脱リン酸化酵素

1 はじめに

私達の身体を構成している細胞は互いに情報を交換しあいながらよくオーガナイズされた複雑な個体を形

成している。細胞は他の細胞（標的細胞）に向けてホルモンや神経伝達物質などのシグナル（一次伝達物質、first messengerと呼ばれる）を発信する一方、他の細胞からのシグナルを受信して互いにコミュニケー

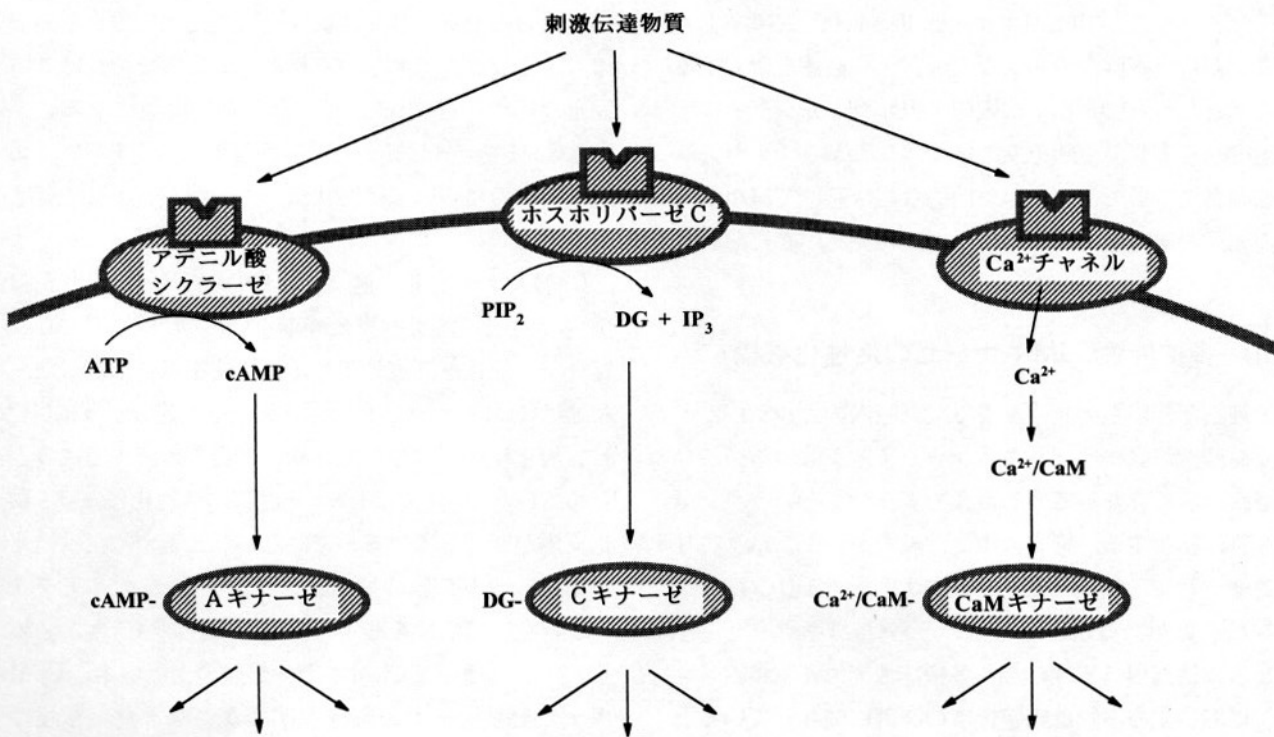


図1 細胞内シグナル伝達

* 旭川医科大学 生化学第一講座

ションしあっている。多くのシグナルは水溶性であるため油性の細胞膜を通り抜けられないので、標的細胞が細胞の外側に突き出している特異的な受容体に結合し、そのとき細胞の中で二次的なシグナル（二次伝達物質、second messengerと呼ばれる）が生じて一次伝達物質の持つ情報（指令）が細胞の中に導入され細胞が応答する。図1に示すように、代表的な二次伝達物質としてサイクリックAMP（cAMP）、ジアシルグリセロール（DG）、カルシウムイオンなどがよく知られているが、これらはいずれも基質特異性が広く幾つもの種類のタンパク質をリン酸化できる多機能性タンパク質リン酸化酵素を、つまりサイクリックAMPはサイクリックAMP依存性プロテインキナーゼ（Aキナーゼ）を、ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼC（Cキナーゼ）を、カルシウムイオンはカルモデュリン（CaM）を介してカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaMキナーゼ）を活性化して細胞をシグナルに応答させる。

私達はセロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素やドーパミン合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素の活性制御の機構を調べていたときに、これらの酵素をリン酸化して活性化するCaMキナーゼを脳に見出し、分子量が2番目に大きなCaMキナーゼということでCaMキナーゼIIと名付けて報告したことから、細胞内カルシウムシグナル伝達を研究することとなった。本稿では細胞内カルシウムシグナル伝達機構で重要な役割を果たしているCaMキナーゼの活性制御について、細かい専門的な話は避けて旭川医大の私達の研究室で明らかになった知見を中心に解説する。

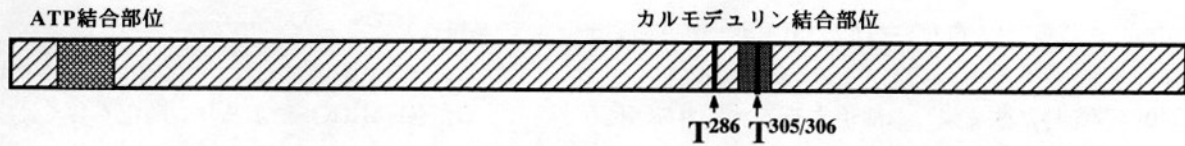
II 多機能性CaMキナーゼの活性化機構

細胞が外からの刺激を受けて細胞内のカルシウムイオン濃度が高まると、カルシウムイオンはいろいろな細胞に広く存在しているカルモデュリンというタンパク質に結合する。細胞の中には幾つかのタンパク質リン酸化酵素を含む多数のCa²⁺/カルモデュリン結合タンパク質があるが、それらのうちCaMキナーゼI、II、IVは基質特異性が広く多機能性でカルシウムイオンに応答する多彩な細胞機能の制御に関与していると考えられている。これらのCaMキナーゼはいずれもカルシウムイオンが存在しないと殆ど活性がなく、活性化にはCa²⁺/カルモデュリンが必須である。

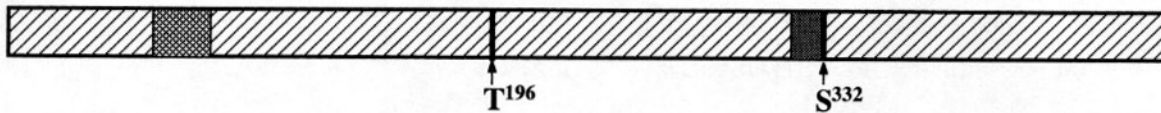
CaMキナーゼIIはCa²⁺/カルモデュリン存在下で活性を測定すると最初から高い活性を示すので、Ca²⁺/カルモデュリンが酵素に結合することによって活性化されると誤解されていることが多い。しかし実際はCa²⁺/カルモデュリンが酵素に結合するだけでは顕著な活性化は起こらず、Ca²⁺/カルモデュリンが酵素に結合すると酵素は自分の特定のスレオニン残基（CaMキナーゼII α の場合はN末端から286番目のスレオニン、Thr-286）（図2）をリン酸化（自己リン酸化）して初めて著明に活性化する。この自己リン酸化反応は温度を下げたり、ATPの代わりにATP γ Sを用いるなどの工夫をしない限り極めて速やかに殆ど瞬時に起こるので誤解されてしまったのである。このように、細胞内のカルシウムイオン濃度が上昇してカルモデュリンがCaMキナーゼIIのカルモデュリン結合部位に結合すると、CaMキナーゼIIはThr-286を自分でリン酸化して活性化するが、その後細胞内のカルシウムイオン濃度が低下すると、カルモデュリンは酵素のカルモデュリン結合部位から離れその結果カルモデュリン結合部位にあるThr-305/306（図2）が露出しこれを酵素は自己リン酸化する。こうなると酵素のカルモデュリン結合部位はカルモデュリンを結合できなくなり、CaMキナーゼIIはカルモデュリン依存性の活性を完全に失いカルモデュリン非依存性活性だけを残した、つまりカルシウムイオンの有無によって影響を受けない完全なCa²⁺/カルモデュリン非依存性酵素になる。見事なCaMキナーゼIIの自己活性制御機構であり、その生理的意義については興味深いものがあるがここでは考察しない。

CaMキナーゼIIと違って、CaMキナーゼIVは大腸菌中で発現した組み換え酵素をCa²⁺/カルモデュリン存在下で活性を測定しても殆ど活性を示さなかった。私達はCaMキナーゼIIの活性化には上述のように自己リン酸化反応が関与していることをこの時すでにつきとめていたので、CaMキナーゼIVの活性化にもリン酸化反応が関与しているのではないかと考え、組み換え酵素にラットの脳の抽出液を加えてCa²⁺/カルモデュリン存在下で活性を測定したところ、高い活性が認められた。こうしてCaMキナーゼIVの上流酵素、CaMキナーゼキナーゼの存在が明らかになった。私達はCaMキナーゼキナーゼを精製し α 、 β の2種類があることを示しそれぞれクローニングしてこれまでに報告のない新しい酵素であることを確認した。その後CaM

CaMキナーゼ II :



CaMキナーゼ IV :



CaMキナーゼ I :

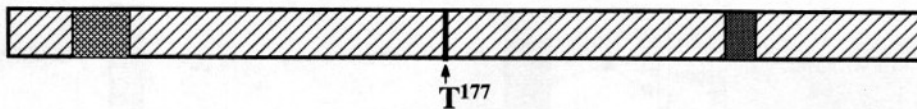


図2 多機能性CaMキナーゼの構造と活性の変動に関するリン酸化部位

キナーゼ I もCaMキナーゼIVと同様に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。興味深いことにこれらのCaMキナーゼキナーゼも下流のCaMキナーゼIVやIと同様にCa²⁺/カルモデュリン依存性のタンパク質リン酸化酵素である。ただCaMキナーゼIIやIVやIとは異なりCaMキナーゼキナーゼはCa²⁺/カルモデュリンが酵素に結合するだけで著明に活性化される。このようにCaMキナーゼIV、IはCa²⁺/カルモデュリン存在下にCaMキナーゼキナーゼによってそれぞれThr-196、Thr-177 (図2) をリン酸化されて著明に活性化されることが明らかになった。CaMキナーゼIVも、CaMキナーゼIIで観察されたように、Ca²⁺/カルモデュリン存在下でCaMキナーゼキナーゼによってThr-196をリン酸化されて活性化された後、カルシウムイオン濃度が低下すると、カルモデュリン結合部位中に存在するSer-332 (N末端から332番目のセリン残基) (図2) を自己リン酸化してカルシウムイオンの有無によって活性が影響を受けないCa²⁺/カルモデュリン非依存性酵素になる。CaMキナーゼIについてはこのようなカルモデュリン結合部位の自己リン酸化反応は観察されなかった。

III 多機能性CaMキナーゼの脱活性化機構

Ca²⁺/カルモデュリン存在下にCaMキナーゼIIは

Thr-286を自己リン酸化して活性化し、CaMキナーゼIVとIはそれぞれThr-196、Thr-177が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のであるから、細胞の中のカルシウムイオン濃度が低下すると、それらのリン酸化スレオニンがタンパク質脱リン酸化酵素によって脱リン酸化されて、これらの多機能性CaMキナーゼは脱活性化されて元の殆ど活性のない状態に復することが考えられる。

事実CaMキナーゼIIのリン酸化されたThr-286が、細胞に広く分布する多機能性タンパク質脱リン酸化酵素であるprotein phosphatase 1 (PP1)、2A (PP2A)、2C (PP2C) などによって脱リン酸化されること、CaMキナーゼキナーゼによって活性化されたCaMキナーゼIVやIもPP2Aによって脱活性化されることなどが幾つものグループによって報告され、細胞内はタンパク質脱リン酸化優位の状態にあって、タンパク質リン酸化/脱リン酸化による制御は主としてリン酸化によって制御され、通常は脱リン酸化状態にあるという一般的なモードが多機能性CaMキナーゼのタンパク質リン酸化脱リン酸化による活性制御にも当てはまると考えられた。

果たして多機能性CaMキナーゼの活性化を引き起こすリン酸化部位を特異的に脱リン酸化して酵素を元の活性のない状態に戻すようなタンパク質脱リン酸化酵素はないものだろうか。私達はリン酸化したCaMキナ

ーゼIIのThr-286を脱リン酸化するタンパク質脱リン酸化酵素をラットの脳に見出し、精製してその性質を調べたところ、リン酸化されたCaMキナーゼIIのThr-286、CaMキナーゼIVのThr-196、CaMキナーゼIのThr-177を特に強く脱リン酸化することが明らかになったので、CaMキナーゼホスファターゼ (CaM-kinase phosphatase) と呼んで報告した。活性の強さはCaMキナーゼI、CaMキナーゼIV、CaMキナーゼIIの順序で、CaMキナーゼIIに対する活性は比較的弱い

ように思われる。CaMキナーゼI、IV、II以外のタンパク質は調べた限りではCaMキナーゼホスファターゼの基質に殆どならなかった。

図3にCaMキナーゼIV、I、IIがCaMキナーゼキナーゼ (CaMKK) によるリン酸化もしくは自己リン酸化によって著明に活性化し、CaMキナーゼホスファターゼ (CaMKPase) による脱リン酸化によって脱活性化され元の活性に戻ることを示したin vitroの実験結果を示した。

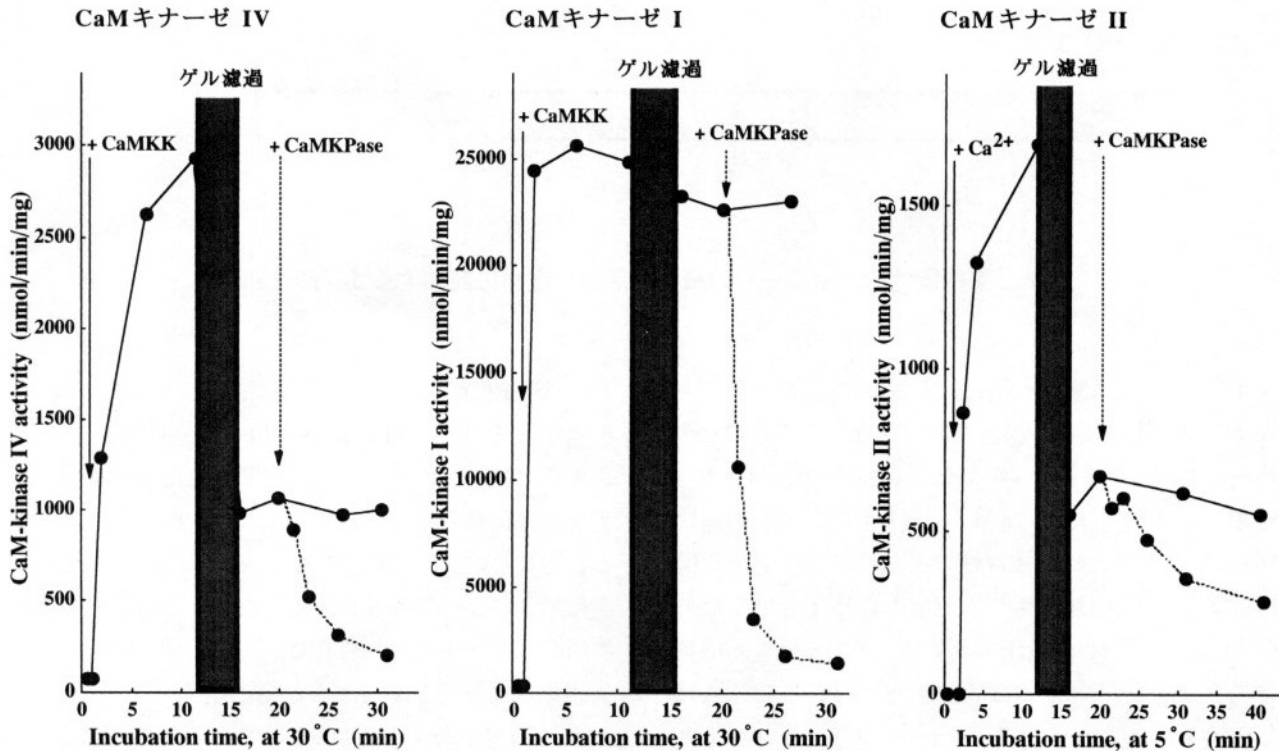


図3 多機能性CaMキナーゼのリン酸化/脱リン酸化による活性変動

IV 多機能性CaMキナーゼの分布

私達はCaMキナーゼIIが4つの異なる遺伝子によってコードされる α 、 β 、 γ 、 δ の4種類のアイソザイムから選択的スプライシング (alternative splicing) によって多数の変種 (variant) が作られ存在していることを明らかにしたが、そのうちCaMキナーゼII α と β は中枢神経系に特に高い含有量で存在しており、最近教室の奥野らがラットの大脳皮質で調べたところCaMキナーゼII α は組織1g中に実に2mg程もあるという結果が得られた (未公表)。CaMキナーゼII α は脳ではシナプス後膜肥厚部に濃縮されて存在していてシナプスでの神経伝達に重要な働きをしていると考え

られている。CaMキナーゼII γ 、 δ は中枢神経系以外にも広く分布しているが、量的には中枢神経系に存在する α や β の量に比べると微量である。CaMキナーゼIIの細胞内分布についてはシナプス後膜肥厚部に高含量で存在することは多くの研究者の認めるところであるが、脳の抽出液の1% Triton X-100不溶性画分に回収される多量のCaMキナーゼII α や β の全てをシナプス後膜肥厚部に分布する酵素量だけでは説明できないと思われる。脳の抽出液の可溶性画分に回収されるCaMキナーゼIIの大部分は細胞質に、一部分は核内に存在する。選択的スプライシングによって核局在化シグナル (nuclear localization signal) であるリジン-リジン-アルギニン-リジン (KKRK) のアミノ酸配

列が酵素上に作られたCaMキナーゼIIは核内に存在することが明らかにされている。

CaMキナーゼIVは中枢神経系と胸腺や培養T細胞に高い含有量で存在し、脾臓、精巣、網膜などには多少あるもののそれ以外の組織には殆ど存在しない。主として細胞の核内に分布しており遺伝子発現の制御など核の機能に関与していると考えられる。他方、CaMキナーゼIは殆ど全ての組織に広く存在し、主として細胞質に分布していることが報告されている。このようにCaMキナーゼIVとIの組織分布、細胞内分布が全く異なっているのでこれらをリン酸化して活性化するCaMキナーゼキナーゼや脱リン酸化して脱活性化するCaMキナーゼホスファターゼが何処にあるかはたいへん興味深い。CaMキナーゼキナーゼαの組織分布をウェスタンブロットで調べると大脳皮質と脳幹に強いバンドが、小脳と網膜に弱いバンドが認められ、胸腺も含め他の組織にはバンドが認められなかった。他方、CaMキナーゼキナーゼβは大脳皮質、小脳、脳幹にバンドが認められ他の組織には殆どバンドが認められなかった。細胞内分布については免疫組織化学的に調べ

た結果、CaMキナーゼキナーゼαは細胞の核に局在し、CaMキナーゼキナーゼβは核にも多少あるが主として細胞質に存在していることが明らかになった。ウェスタンブロットでは微量の酵素の検出は難しいので組織分布についてはまだ検討すべき点が多く残されているが、細胞内分布の結果はCaMキナーゼIVとCaMキナーゼキナーゼαが核に、CaMキナーゼIとCaMキナーゼキナーゼβが主として細胞質に分布していることを示しており、CaMキナーゼIVはCaMキナーゼキナーゼαによるリン酸化で活性化され、CaMキナーゼIはCaMキナーゼキナーゼβによって活性化されることが考えられる(図4)。CaMキナーゼホスファターゼは調べた全ての組織に広く存在しており、細胞の核にはなく細胞質に分布しているので、主としてCaMキナーゼキナーゼβによって活性化されたCaMキナーゼIの不活性化に関与している可能性が考えられる(図4)。最近教室の竹内らはCaMキナーゼホスファターゼと高いホモロジーを示す新しいタンパク質脱リン酸化酵素が核に局在することを見出し(未公表)、研究を進めているが、これはCaMキナーゼキナーゼαによる

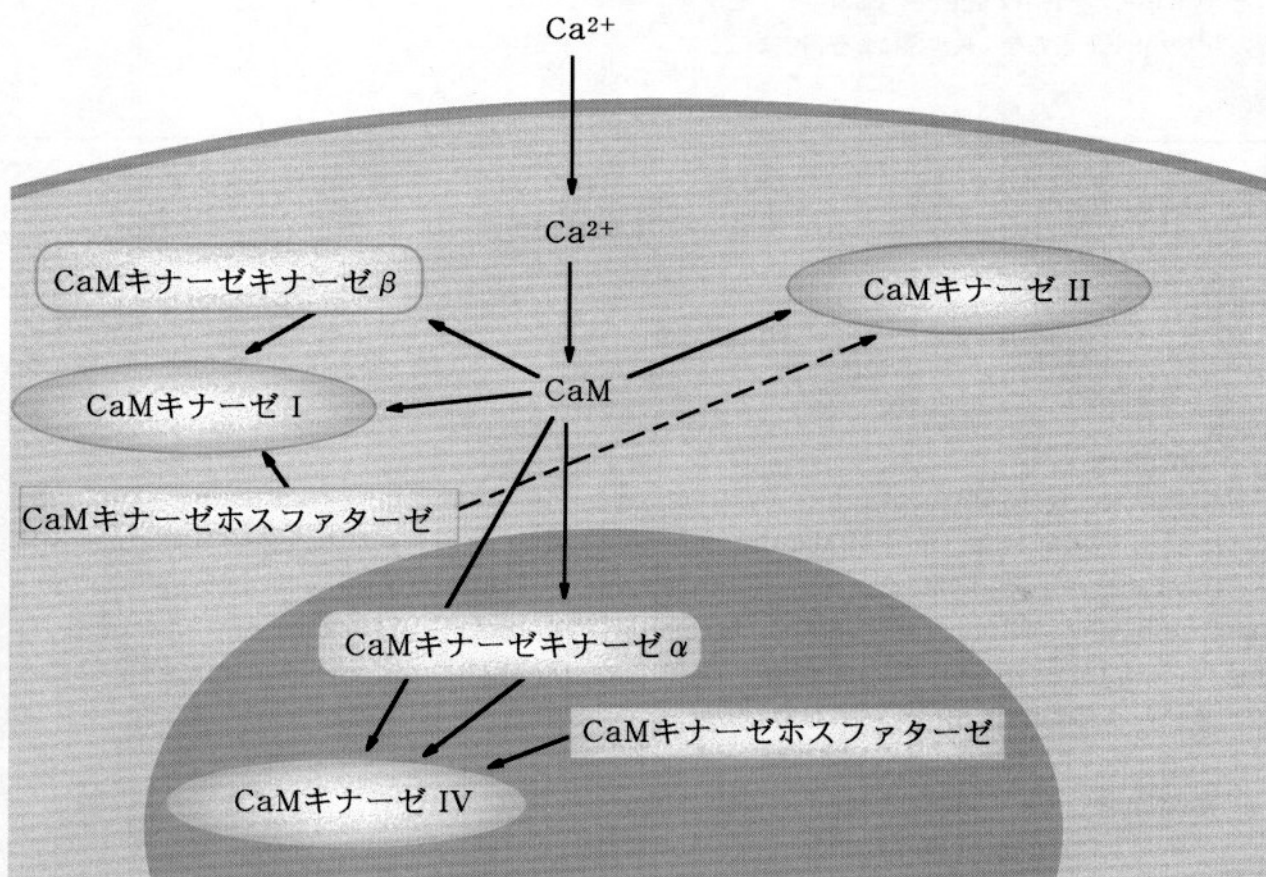


図4 CaMキナーゼカスケード

リン酸化を受けて活性化されたCaMキナーゼIVを脱活性化する酵素ではないかと期待される(図4)。

V 多機能性CaMキナーゼの生理作用

CaMキナーゼIIの生理作用については私達がこの酵素を見出すきっかけとなったトリプトファン水酸化酵素の活性化、チロシン水酸化酵素の活性化に始まって、以後多数の生理的に重要な基質タンパク質が報告されている。CaMキナーゼII α のノックアウトマウスの実験からはCaMキナーゼIIが空間認知の機能に関与していることが示唆されている。

CaMキナーゼIVの生理的な基質タンパク質としては、幾つかの遺伝子の転写活性を制御しているCREB (cAMP response element-binding protein) をリン酸化して活性化することが知られている。

VI おわりに

20年以上も前、セロトニンやドーパミンなどのモノアミン生合成の調節機構を研究するうちに偶然見出したCaMキナーゼIIは、今や細胞内カルシウムシグナル伝達の主役として多くの教科書で紹介されるようになった。CaMキナーゼII → CaMキナーゼIV、Iのカスケードもまもなく教科書にも登場することに

なるであろう。ここに紹介した研究は当教室に在籍され日夜研究を楽しまれた山内卓(現在徳島大学教授)、山口睦夫(米国Scripps Research Institute)、中田裕康(東京都神経研副参事)、亀下勇(香川大学教授)、飛松孝(岡山大学助教授)、木谷隆子(RIセンター教務職員)、白田克美(富良野協会病院)、今井嘉紀(国立精神神経センター室長)、佐藤広和(札幌鉄道病院)、池田篤(網走中央病院)、蒔田芳男(公衆衛生学講座助手)、船越洋(大阪大学助手)、宮野修(多摩済生会病院)、渡邊真司(米国NIH)、須貝理香(紋別病院)、教室員の加藤剛志(助教授)、石田敦彦(助手)、竹内昌之(助手)、奥野幸子(技術専門職員)の諸氏、そして中村泰尚教授(東京医科歯科大学)、その他、多くの方々とともに行ったものである。研究の遂行に当たって、文部省、厚生省、北海道、三菱財団、上原記念科学財団、病態代謝研究会、内藤記念科学振興財団、喫煙科学財団、朝日新聞社、日本証券奨学財団、武田科学振興財団、千代田生命、日本脳神経財団、大和ヘルス財団、三井生命、秋山記念財団、稲盛財団、ブレインサイエンス振興財団、栗林育英学術財団、三島海雲記念財団、その他多数の方々からの研究費の助成を受けた。

Ca²⁺-Signaling

Hitoshi FUJISAWA*

Summary

Calcium ion is an intracellular messenger in many eukaryotic signal-transducing pathways. Multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases, such as CaM-kinases II, IV, and I, play crucial roles in controlling a variety of cellular functions in response to an increase in intracellular Ca²⁺, and hence regulation of their activities is very important. In this review, I have focused particular attention on the regulatory mechanisms of the activities of the three multifunctional CaM-kinases.

key words Ca²⁺, signal transduction, calmodulin, calmodulin-dependent protein kinase, protein phosphatase

*Asahikawa Medical College Biochemistry I