

AMCoR

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

皮膚病診療 (1993.12) 15巻12号:1034～1038.

表皮細胞の増殖制御
—カルモジュリンとその展開—

飯塚 一

表皮細胞の増殖制御

——カルモジュリンとその展開——

飯塚 一*

カルモジュリン (CaM) はカルシウムシグナルを認識する多機能制御蛋白である^{1,2)}。各種組織に普遍的に分布し、数多くのCaM結合蛋白と相互作用して、その働きを示す(表)。すなわちCaMの生理作用はCaMと相互作用する蛋白を介して現

われる。実際の仕事をするのは各種CaM結合蛋白であり、CaMはちょうどカルシウムに対するスイッチ部分として働く。

CaM系の活性化機構は、通常はカルシウム動員系として表現され、代表的なものとしてイノシト

表 カルモジュリンと相互作用する蛋白

I. CaM 依存性酵素

cyclic nucleotides phosphodiesterase
glycogen phosphorylase kinase
glycogen synthetase
myosin light chain kinase
calmodulin kinase (I, II, IV)
elongation-factor-2 kinase (CaM-kinase III)
calcineurin (calmodulin-dependent phosphatase)
adenylate cyclase (I, III)
guanylate cyclase (テトラヒメナ)
phospholipase A₂ (血小板)
Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-ATPase
NAD kinase (植物)

II. サイトキャルビン (cytochalbin)

caldesmon	結合する細胞骨格
fodrin/calspectin	actin
α-spectrin (赤血球膜)	actin
MAP (microtubule-associated protein) 2	actin
τ factor	tubulin
desmocalmin/keratocalmin	tubulin
MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate)	intermediate filament
	actin

CaMと相互作用する蛋白はCaM-依存性酵素群とサイトキャルビンに大きく分けられる。cytochalbin(cytoskeleton-related calmodulin-binding protein)は細胞骨格と結合し、かつその機能制御を行う蛋白である³⁾。おのおの結合する細胞骨格を横に示す。myosine light chain kinaseはcytochalbinとしての機能ももつ。desmosome構成蛋白であるdesmocalmin(ヒトではkeratocalmin)は中間径線維と結合し、MARCKSはアクチン線維と結合するため、これらは広い意味のcytochalbinとみなされる。

*Iizuka, Hajime (教授) 旭川医科大学皮膚科学教室 (〒078 旭川市西神楽4線5-3-11)

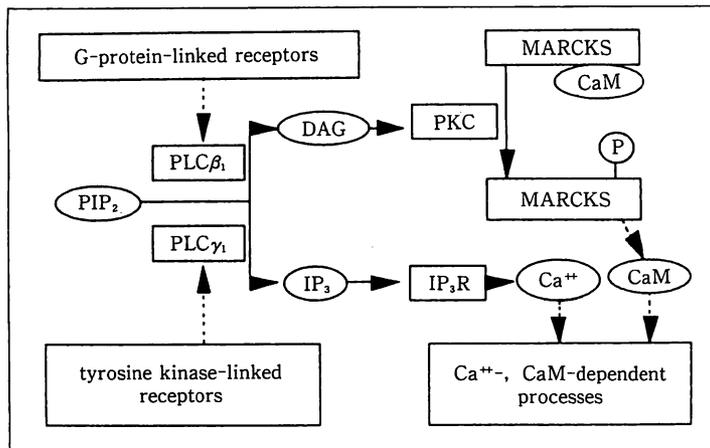


図1 イノシトールリン脂質を起点とするシグナル伝達系

PIP₂はPLCによりDAGとIP₃に分解される。PLCには多数の分子種があり、G-protein-linked receptorはPLCβを、tyrosine kinase-linked receptorはPLCγ₁を活性化する。G-protein-linked receptorの例としてacetylcholin, histamine, PAF, bradykinin, substance P, thrombin, bombesinなどの受容体が、tyrosine kinase-linked receptorの例としてEGF, PDGFなどの受容体があげられる。DAGはprotein kinase Cを活性化し、IP₃はIP₃受容体を介してCa²⁺を動員する。MARCKSによる制御機構については本文参照。

CaM : calmodulin ; PIP₂ : phosphatidylinositol bisphosphate ; PLC : phospholipase C ; DAG : diacylglycerol ; PKC : protein kinase C ; IP₃ : inositol trisphosphate ; IP₃R : IP₃ receptor ; MARCKS : myristoylated alanine-rich C kinase substrate.

ールリン脂質を起点とするシグナル伝達系があげられる(図1)。ただしカルシウムシグナルはこのほかにも多くの機構で発動されており⁴⁾、表皮におけるCaMの活性化経路は数多くあるものと推定される。このほか、後述するCaM量そのものの増減もカルシウム-CaM系においては、重要な生理的意味をもつ。

1. カルモジュリンの一般的な性質

CaMは分子量16,700, 148個のアミノ酸からなる小型の蛋白である。比較的、熱安定性で特殊なアミノ酸 trimethyllysine をもつ。現時点で遺伝子は3つ異なるクロモゾーム上に同定されており、これらは塩基配列に差異はあるもののアミノ酸配列上は同一蛋白をコードする^{2,5)}。CaMは種間の変異も極めて小さく、いい換えると分子進化の極めて遅い蛋白である。このことは生体におけるCaMの重要性を示唆するものであり、3種類の遺

伝子の存在は、fail safe機構としてみることもできる。ちなみにCaM遺伝子が1つしかないイーストではCaMの変異は致命的となる²⁾。

3つの遺伝子の存在は、同時に、CaMの発現が最低3つの独立した機構からなっていることを推定させる。表皮において3種類のCaMはすべてメッセージレベルで発現しているが、このうちCaM IとIIが主なものである。乾癬表皮においてはCaM IIが特異的に上昇しているという²⁾。

CaMは等電点が3.9にあり、かなり強い酸性蛋白である。CaMは、したがってCaM結合蛋白の塩基性部分と相互作用する。現在までCaM結合蛋白は多数知られているが、CaMとの結合配列は厳密なものではなく、塩基性のhelix構造なら、ある程度、幅広く認識されるようである。このような配列を総称してBaa helical motif

(Baa : basic amphiphilic alpha helix) と呼ぶ⁶⁾。カルシウムの基本的な働きはCaMと結合して、このBaa helical motifに対する結合部位をむき出しにすることにある。

Baa helical motifの自由度のゆえにCaMは数多くの蛋白と相互作用することが可能である。CaM結合蛋白のこのような多様性は、逆にCaM側の構造に強い制約を加えざるをえない。なぜならCaMの変異は、数多くの(Baa helical motifを有する)CaM結合蛋白との相互作用においてさまざまな障害をもたらす可能性を生じるからである。

カルシウム結合蛋白は、大きくEF hand型とannexin型とに分けられる⁷⁾。CaMはS-100やtroponin Cと並ぶEF hand型の代表的な例であ

注1) EF handのEとFは最初に構造解析のなされたparvalbuminのE hand, F handの名前に由来している。annexinはlipocortin, calpactinなど種々の名称と呼ばれ、膜のリン脂質とカルシウム依存性に相互作用する一群の蛋白である⁷⁾。

る。CaMはEF handにより1分子あたり4個のカルシウムを結合する。EF handは2個ずつCaM分子の両端に位置しており、結晶においては特徴的なダンベル構造を示す。しかしながら水溶液中では中央のヘリックス部分にかなりの自由度があるため、ダンベルの両端は実際にはかなり近接してBaa helical motifと相互作用するらしい⁶⁾。

2. CaM kinase II

CaMは多くの蛋白とCa²⁺依存性に相互作用する(表)。CaMは歴史的にはホスホジエステラーゼの活性化因子として発見されており、表皮においてもそのような形で存在証明がなされている^{1,8)}。しかしながら表皮のホスホジエステラーゼ分画においてCaM依存性部分は実は多くない¹⁾。

近年、CaM依存性の蛋白質リン酸化酵素がカルシウムを介する制御において注目されている^{9,10)}。現在まで知られているCaM依存性キナーゼは、ミオシン軽鎖キナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、およびCaM kinase I, II, III, IVの6種類である。前2者は基質名を冠しているように基質特異性が狭く、その役割についてもよく研究されている。他の4種類は最近10年間で登場してきた新しい酵素群でCaM kinase IはシナプシンN末端の10kdフラグメントを、CaM kinase IIIは伸展因子EF2をリン酸化する。CaM kinase IIとIVは基質特異性が比較的広い。とくにCaM kinase IIは組織分布も広く、CaM作用のかなりの部分がCaM kinase IIを介するものと考えられている。その意味でCaM kinase IIは多機能リン酸化酵素であり、cyclic AMP依存性protein kinaseやprotein kinase Cと並ぶ重要な制御蛋白と考えられる。

CaM kinase IIは自己リン酸化によりカルシウム-CaM依存性が消失し、非依存性となる。これは一種の活性化機構とみなされ、本キナーゼの重要な制御系と考えられる。自己リン酸化の開始には、無論、カルシウム-CaMが関与するが、一度、進行しはじめるとカルシウム-CaMなしでも反応は進む。

3. 表皮細胞増殖とカルモジュリン

CaMは表皮細胞増殖が亢進すると増加する。た

とえば尋常性乾癬表皮ではCaM量の有意の増加が認められ、皮疹の改善とともにCaM量も低下する¹¹⁾。

われわれは最近、紫外線照射後、表皮のCaM量が有意に増加することを見出した¹²⁾。CaMの上昇は、表皮細胞増殖に先立って出現し、増殖亢進と一致して認められる。増殖低下時にはCaMは動いていない。Wollinaらも乾癬皮疹の形成に先立つCaM量の上昇を報告しており¹³⁾、CaMの増加は細胞増殖のシグナルになっているようにみえる。

細胞増殖亢進とCaM量に正の相関が認められる一方、CaM阻害剤には表皮細胞増殖を抑制する働きがあり注目される^{14,15)}。アンソラリンなどいくつかの乾癬治療剤にもCaM阻害作用が認められる¹⁶⁾。

以上の結果は、CaMが表皮細胞増殖に強くかかわっていることを示唆するものである。しかしながらCaM作用の具体的な機構は表皮においては、ほとんどわかっていない。

他の細胞系においてはCaMは細胞周期のG1/SおよびG2/Mの両方に働いて増殖に関与するとされる。ラット肝細胞ではDNA複製に先立ってCaM量が上昇し、ついで核内への移行がみられる¹⁷⁾。また分裂に際しての核膜の消失にはCaM kinase IIが必須である¹⁸⁾。DNA複製に際しても、岡崎フラグメント側の複製に関与するDNA polymerase α は、CaM阻害剤処理により活性が低下する^{19,22)}。さらに遺伝子操作により、実験的にCaMを強制発現させると、G1期の短縮がひきおこされ、逆にanti-sense CaM mRNAを注入すると、細胞増殖の抑制が認められるという²¹⁾。

4. CaM reservoirとしてのMARCKS

細胞内CaMレベルの上昇は必ずしもCaMの誘導を介しているとは限らない。MARCKS(myristoylated alanine-rich C kinase substrate)は

注2)DNA複製はDNA polymeraseによりなされるが、本酵素は常に5'→3'の方向にDNA鎖を伸長させる。このため、DNA鎖の片方は複製に際しpolymerase反応と逆方向になり、短いフラグメント(岡崎フラグメント)を中間体とする不連続複製様式になっている。真核生物では5種類のDNA polymerase(α , β , γ , δ , ϵ)が知られているが、 α と ϵ はこの岡崎フラグメント側の複製に関与する²⁰⁾。

表皮を含め普遍的に分布する protein kinase C の基質蛋白である。これは生理的な状態で CaM と結合しており、protein kinase C によるリン酸化によって CaM を遊離する。すなわち、MARCKS を介した protein kinase C 依存性の CaM 制御機構が存在している²²⁾。したがって protein kinase C の活性化はカルシウム-CaM 系の増強につながる (図 1)。protein kinase C シグナルは細胞増殖の trigger と考えられており²³⁾、MARCKS を介する制御機構はその意味からも重要である。

5. 表皮における CaM の染色パターン

表皮における CaM の分布に関しては、いくつかのグループから相異なる報告がなされており、統一した見解は得られていない^{24,25)}。たとえば正常表皮では全層、基底細胞層のみ、逆に (基底細胞層は染まらず) 表皮上層のみ染まるという 3 種類の報告がある。乾癬では Wollina らによると、表皮中層で染色性が認められ、基底細胞層のみが染色される正常表皮や無疹部表皮と比べ、際立ったコントラストをなすという。

CaM はあらゆる細胞に必須の制御蛋白と推定され、たとえ染色が陰性でも CaM が存在しないとは考えにくい。したがって、染色パターンの変動も相対的な差異を示すにすぎないものと推定される。また細胞骨格との相互作用による CaM の染色性の修飾が報告されており²⁵⁾、免疫染色パターンの変動は必ずしも CaM 量の増減を反映していない可能性もある。

6. RB とカルモジュリン

癌抑制遺伝子として同定された RB は、近年、細胞増殖制御において注目されている^{26,27)} (図 2)。RB 蛋白は通常は転写因子 E2F と結合して、その活性を抑えている²⁸⁾。E2F はプロモーター上の特定配列に結合しているが、RB と結合した E2F は不活性型である。G1 後期に RB のリン酸化

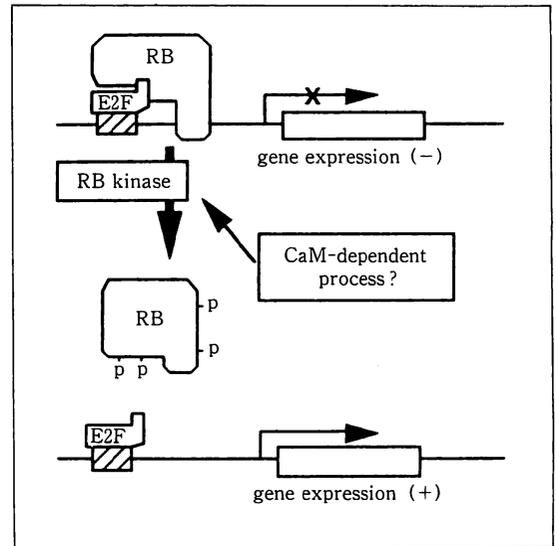


図 2 RB キナーゼを介する制御機構

リン酸化されていない RB は E2F と結合し、その働きを抑える。RB キナーゼによりリン酸化された RB は E2F から解離する。E2F は活性型としていろいろな遺伝子の転写をひきおこす。RB キナーゼは CaM 阻害剤である W-7 により抑制を受ける。RB をリン酸化するキナーゼとして cdc2 キナーゼとサイクリン A, E の複合体が考えられており、とくにサイクリン E の関与が推定されている²⁸⁾。本文中にも触れたように、cdc 2 のプロモーターにも E2F 結合配列がある。

化がおこると、RB は E2F からはずれ、E2F は活性型として遺伝子発現を誘導する。E2F 結合配列は前述した DNA polymerase α や thymidine kinase など DNA 複製に関与する酵素群の遺伝子のプロモーター、あるいは cdc2, myc といった増殖関連遺伝子のプロモーターに存在している。

表皮細胞においても myc は S 期への移行に必須であるが、これにも RB が関与する。TGF- β 1 は myc の発現を抑えることにより表皮細胞の増殖抑制をひきおこすとされるが、この作用も RB を介するものであるという²⁹⁾。

興味深いことに、CaM 阻害剤は RB のリン酸化を阻害することが知られている。たとえば CaM 阻害剤の W-7 は RB のリン酸化を阻害し、同時に細胞増殖も抑制する³⁰⁾。この結果を素直に解釈すれば、CaM は RB のリン酸化因子ということになり、カルシウム-CaM シグナルはその意味で、細胞増殖のシグナルとみなされる。前述した

注 3) 転写因子 E2F は、前述した伸展因子 EF2 とはまったく異なる制御因子であることに注意。なおウイルス由来の癌遺伝子であるアデノウイルス E1A は、RB と結合することにより RB と E2F の結合を抑制し、ちょうど RB リン酸化のシグナルのようにふるまう。すなわち E1A は E2F 活性化のシグナルとみなされる。

DNA polymerase α のCaM阻害剤による活性低下も、RBリン酸化阻害に伴うE2Fの不活性化として無理なく説明される。ただし、たとえばCaM kinase IIとRBないしRBキナーゼとの直接の相互作用は現時点で知られていない。また、いわゆるCaM阻害剤には多かれ少なかれ、他のキナーゼ、とくにprotein kinase Cに対する阻害作用があり³¹⁾、解釈にあたっては慎重を要する。

おわりに

細胞増殖を中心にCaMの作用についてまとめた。表皮細胞増殖に伴いCaMの上昇がみられることや、いわゆるCaM阻害剤が増殖抑制をひき起こすことは、増殖におけるCaMの重要性を示唆している。しかしながら、そのメカニズムはまったくといってよいほどわかっていない。近年、注目を集めているRBを介する制御機構も有力な候補ではあるものの、CaMのかかわりについていえば、その論拠はCaM阻害剤がRBのリン酸化を抑制するという一点に立った、たいへん危ういものであることがわかる。

最近、CaM kinase II (およびI) によるCREB (cyclic AMP response element binding protein) のリン酸化を介する活性化機構が報告された³²⁾。このことはCaM系がcyclic AMP依存性の転写制御にも影響を及ぼしていることを示すものである。

シグナルとしてみたとき、カルシウムは細胞内

外に存在する濃度勾配のゆえに極めて効率のよいシステムになっている³³⁾。カルシウムシグナルを認識すべく高度に分化したCaMは、表皮においても重要な役割を果たしていると推定されるが、その作用に関しては今後さらなる検討を要しよう³⁴⁾。

<文献>

- 1) Iizuka, H. et al. : J Invest Dermatol 78 : 230, 1982
- 2) Fairley, J. A., Arrindell, S. G. : The Biology of the Epidermis, ed. by Ohkawara, A. and McGuire, J. Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, p.67, 1992
- 3) 祖父江憲治 : 生化学 57 : 560, 1985
- 4) Koizumi, H. et al. : J Invest Dermatol 96 : 234, 1991
- 5) Fischer, et al. : J Biol Chem 263 : 17055, 1988
- 6) O'Neil, K. T., DeGrado, W. F. : TIBS 15 : 59, 1990
- 7) 飯塚 一 : 日皮会誌 101 : 1702, 1991
- 8) Peterson, L. L., Wuepper, K. D. : J Invest Dermatol 81 : 68, 1983
- 9) Hanson, P. I., Schulman, H. : Ann Rev Biochem 61 : 559, 1992
- 10) Redpath, N. T., Proud, C. G. : Eur J Biochem 212 : 511, 1993
- 11) Mizumoto, T. et al. : J Invest Dermatol 85 : 450, 1985
- 12) Takagi, A., Iizuka, H. : manuscript in preparation
- 13) Wollina, U. et al. : Arch Dermatol Res 281 : 73, 1989
- 14) Iizuka, H. et al. : Arch Dermatol Res 278 : 133, 1985
- 15) Hirokawa, M. et al. : J Dermatol 17 : 403, 1990
- 16) Tucker, W. F. G. : J Invest Dermatol 87 : 232, 1986
- 17) Pujol, M. J. et al. : J Biol Chem 264 : 18863, 1989
- 18) Baitinger, G. : J Cell Biol 111 : 1763, 1990
- 19) Lopez-Girona, A. et al. : Biochem Biophys Res Commun 184 : 1517, 1992
- 20) 松影昭夫 : 科学 62 : 711, 1992
- 21) Rasmussen, C. D., Means, A. R. : EMBO J 8 : 73, 1989
- 22) McIlroy, B. K. et al. : J Biol Chem 266 : 4959, 1991
- 23) Iizuka, H., Takahashi, H. : Int J Dermatol 32 : 333, 1993
- 24) Kanamori, M., Shimizu, M. : Arch Dermatol Res 284 : 309, 1992
- 25) Wollina, U. : Arch Dermatol Res 285 : 310, 1993
- 26) Chellappan, S. P. : Cell 65 : 1053, 1991
- 27) Goodrich, D. W. : Cell 67 : 293, 1991
- 28) Hinds, et al. : Cell 70 : 993, 1992
- 29) Pietenpol, J. A. et al. : Cell 61 : 777, 1990
- 30) Takuwa, N. et al. : FEBS Lett 306 : 173, 1992
- 31) Hegeman, L. et al. : Arch Dermatol Res 283 : 456, 1991
- 32) Sheng, M. et al. : Science 252 : 1427, 1991
- 33) 飯塚 一 : 西日皮膚 46 : 681, 1984

注4)本総説においては培養系における低Ca、高Ca制御系については触れていない。表皮細胞培養系においては0.09mM以下の低Ca系では細胞増殖がおこり、1.2mM以上の高Ca系では分化(角化)がおこる(細胞外カルシウム濃度が0.01mM以下では細胞は死滅する²⁾)。この系はCaを介する制御としては非常に明解なものであるが、このような(0.09mM以下といった)低カルシウム状態が、*in vivo*で果たして存在するかどうかという点について(少なくとも筆者の眼からは)疑問が残る。