

『カルシウムシグナリング研究の新潮流』

開催日：2004年11月18日（木）—19日（金）

場所：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター 中会議室

11月18日（木）

13:00- 開会挨拶 井本敬二（生理研）

第1部 EFハンドカルシウム結合蛋白質の新たな展開

司会：小林良二（香川大）、矢沢道生（北大）

13:15- カルモデュリンの構造と機能

○矢沢道生（北大）

13:50- カルモデュリン結合認識の多様性

○松原守（カルナバイオサイエンス株）

14:25- penta-EFハンドカルシウム蛋白質ALG-2の相互作用因子とメンブレントラフィック制御

○牧 正敏（名大院）

<休憩>

15:20- S100の新しい機能（シャペロン活性）

○小林良二（香川大・医）

15:55- トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム

○武田壮一（国立循環器病センター）

16:30- カルパインの新しいCa²⁺-結合モチーフと構造・機能相関

○反町洋之（東京都臨床医学総合研究所）

18:30- 懇親会

11月19日（金）

第2部 カルモデュリン依存性酵素の新たな展開

司会：山内 卓（徳島大）、渡邊泰男（香川大）

8:30- シナプス機能調節におけるCaM kinase IIの役割

○山内 卓（徳島大）

9:05- 不活性型CaM kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析

○山内葉子（生理研）

9:40- 神経系におけるCaM kinase Iの発現と機能

○阪上洋行、近藤尚武（東北大）

<休憩>

10:35- CaM kinaseカスケードのシグナル伝達と生理機能

○徳光 浩，小林良二（香川大）

11:10- CaM kinaseファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析

○亀下勇、末吉紀行（香川大）

<昼食休憩>

司会：徳田雅明（香川大）、徳光 浩（香川大）

12:45- NOS のリン酸化による調節

○渡邊泰男、徳田雅明（香川大）

13:20- 14-3-3によるCaM kinase kinaseの調節

○市村 徹（都立大）

13:55- シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節

○鈴木龍雄、田慶宝、宮沢昌子（信州大）

14:30- Homer-3 のCaM kinase II によるリン酸化

○水谷顕洋、御子柴克彦（JST・カルシウム振動）、古市貞一（理研・脳研）

14:55- タウのCaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与

○山本 秀幸（熊本大）

カルシウムシグナリング研究の新潮流

山内 卓（徳島大学大学院薬学部）yamauchi@ph.tokushima-u.ac.jp

徳田雅明（香川大学医学部）tokuda@med.kagawa-u.ac.jp

井本敬二（自然科学研究機構生理学研究所）keiji@nips.ac.jp

「概要」

ヒトゲノムの解読も終了し、遺伝子の構造も判明した今、細胞機能をタンパク質機能の総合的制御という観点から知ることが重要になっている。我々はこの試みを、カルシウムシグナリング研究において当てはめ展開する。

カルシウムシグナリングにおいては、カルシウム結合蛋白質がシグナルを受容し、それを次の蛋白質・酵素との相互作用により実現することが一般的である。1980年代から1990年代にかけては、シグナル伝達の大潮流として世界中で多くの研究がなされたが、1990年代後半からは研究者の数も減り、「カルシウムシグナリング」という名において体系的な整理が十分になされていない状態である。しかしながら現在においても、カルシウムシグナルは非常に多くの生理機能において重要な役割を果たしていることに変わりはない。そして研究課題の解析法・アプローチ法の一部として、カルシウム濃度を測定したり、カムキナーゼによるリン酸化による効果解析などを用いることは一般的であり、カルシウムシグナル系を扱っている研究者数は、潜在的には決して少なくない。

本セミナーでは、そのように重要な機能を有しているカルシウムシグナリングにおいて、ダイナミックな情報処理基礎過程を担う重要な分子の制御機構と働きに注目して、最新の知見の発表と議論を行う。そしてこのセミナー全体をとおして、再びカルシウムシグナリングを中心に据えた形での体系化を試みたい。こうしてかつてのブームから10余年経った今、我々の手で、カルシウムシグナリング研究の新しい潮流を築くことを目的としている。

第一部では『EFハンドカルシウム結合蛋白質の新たな展開』として、(1)～(6)課題で、カルモデュリンをはじめ最近注目されているEFハンドカルシウム結合蛋白質のカルシウム受容機構とその後のシグナル伝達様式および新しい機能を紹介する。それを受けて、第二部では『カルモデュリン依存性酵素の新しい展開』として、(7)～(15)の課題で、カムキナーゼを中心としたカルモデュリン依存性酵素の機能およびそのシグナリング機構を、神経組織ばかりでなく様々な組織において全容の解明に迫る。

カルモデュリンの構造と機能

矢沢道生、中富晶子（北海道大学大学院理学研究科化学専攻生命分子化学講座）

myazawa@sci.hokudai.ac.jp

カルシウムシグナリングの歴史を考えると、まずカルシウムイオンの細胞内シグナル伝達物質としての役割の生化学的な認識があり、それは江橋らの骨格筋筋肉収縮制御蛋白質トロポニンの発見に始まる。Kretsinger によるコイ筋肉パルブアルブミンの立体構造の解析結果は、この蛋白質がカルシウムイオンを結合していることを明らかにしたばかりではなく、カルシウムイオンを特異的に結合する構造モチーフ — E F ハンド構造 — を提唱し、それが広く受け入れられる結果となった。その後、トロポニン複合体のカルシウムイオン結合成分であるトロポニンCの一次構造中にもE F ハンドモチーフが4カ所で確認された。これと相前後して、筋収縮以外の細胞生理機能の調節にカルシウムイオンが鍵を握るという事実が生化学的に示され、トロポニンとは異なるカルシウムイオン結合蛋白質としてカルモデュリンが発見された。カルモデュリンの一次構造中にも4カ所でE F ハンドモチーフが確認された。トロポニンCは横紋筋の収縮制御に特化しているが、カルモデュリンは真核細胞の多様な生理機能のカルシウムシグナル制御因子として機能しており、E F ハンドカルシウム結合蛋白質の典型、またはプロトタイプとしてとらえることができる。この講演では、まず、カルモデュリンの分子構造の組み立てについて、カルシウムイオン結合構造、および生理機能発現に至る標的酵素の認識・活性化の構造的要因といった面から、我々の得た酵母カルモデュリンについての結果も紹介しながら復習する。後半では、カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼ カルシニューリンを例にとって他のシグナル伝達機構とのクロストークについて紹介し、細胞の生理機能の調節過程をより体系的に理解する流れについてふれる。T細胞の活性化過程で起きる転写因子 NF-AT の核内移行は、カルシウムシグナルによりカルシニューリンが活性化し NF-AT が脱リン酸化されることで進行する。一方で、NF-AT のリン酸化レベルを維持・増強して細胞質内に留めたり戻したりする過程は、カルシウムシグナルとは別の経路で制御されるという。このように、カルシウムシグナルは他のシグナル伝達過程と協調して調節過程を作りあげている。精子形成過程では、カルシニューリンは減数分裂直後に精細胞核内に顕著に観察できる。我々は、カルシニューリンの機能を明らかにしようとする過程で新規カルシニューリン結合蛋白質 (CaNBP75) を発見した。CaNBP75 はカルシニューリンと特異的に結合するばかりではなく、そのC末端ドメインで核内外輸送制御タンパクとして知られる低分子量G蛋白質 Ran とも結合し、さらに核膜孔複合体に見いだされる F X F G モチーフを3つもつことが明らかになった。この蛋白質の機能を解明する過程で、精子形成過程でのカルモデュリンを介したカルシウムシグナルと、これとクロストークする Ran を介するシグナル伝達過程の新たな協調が明らかになると考える。カルシウムシグナリング研究の新潮流の1例としてこれらの結果について紹介したい。

カルモデュリン結合認識の多様性

松原 守、カルナバイオサイエンス株式会社

mamoru.matsubara@carnabio.com

カルモデュリン (CaM) は、細胞内シグナル伝達に不可欠なカルシウム結合蛋白質で、100 種類以上にもおよぶ蛋白質と結合することにより様々な細胞機能を調節している。CaM がどのようにして標的蛋白質を認識するのかについては、CaM と標的蛋白質複合体の様々な立体構造から、非常に多様性のあることが明らかになっている。一般的には、ミオシン軽鎖キナーゼ、CaM キナーゼ II や CaM キナーゼキナーゼの CaM 結合ドメインペプチドで見られるように、 α ヘリックス構造をとって CaM と結合し、10 残基以上離れた特定の 2 箇所が存在する疎水性残基が、CaM の N 末端ドメインと C 末端ドメインに存在する疎水性ポケットにはまり込むようになっている。2 箇所の疎水性残基の位置から 1-10, 1-14, 1-16 モチーフと呼ばれており、似たようなモチーフをもつ領域は CaM 結合ドメインであると予想されている。一方、近年、このような結合認識とは異なった新しいタイプの CaM 結合蛋白質も見つかった。Ca²⁺-activated K⁺ channel、Edema factor、glutamate decarboxylase と CaM との複合体の構造は非常にユニークなものである。本発表では、更に新しい結合認識を持つ CaM 結合蛋白質として、我々がこれまで解析してきた MARCKS と CAP-23/NAP-22 を取り上げて議論する。

MARCKS は protein kinase C (PKC) の主要な基質の一つで、胎児期の中枢神経系の発達に不可欠な蛋白質である。分子のほぼ中央部に CaM 結合ドメインがあり、CaM 以外にも細胞膜やアクチンなどとも結合できる。これらの結合は PKC のリン酸化で抑制される。CaM 結合ドメインの機能構造を理解するために、このドメインと CaM 複合体の X 線結晶構造解析を行った。2 で解かれた構造から、一部に α ヘリックス構造は含むものの、大部分に 2 次構造が存在しなかった。これまでの CaM 結合ドメインが α ヘリックスを形成して結合するという認識機構と全く異なるものであった(1-3)。

CAP-23/NAP-22 も脳神経系で特異的に発現している PKC の基質蛋白質であり、CaM と結合する。CaM との結合には N 末端のミリスチル基が必須である(4)。どのようにして CAP-23/NAP-22 のミリスチル基が CaM を認識しているのかを明らかにするために、N 末端ミリスチル基を含む 9 残基のペプチドと CaM の複合体を 2.3 Å の分解能で構造決定した。その結果、ミリスチル基は CaM の N 末端ドメインと C 末端ドメインから形成される疎水性ポケットの真ん中を貫通するという全く新しい蛋白質間認識であった(5)。このように、今回得られた 2 つの複合体の構造から、CaM と標的蛋白質の認識機構は、従来考えられてきた以上に複雑であることが明らかとなった。

1. Matsubara, M. et al. (1998) FEBS Lett. 421, 203-207
2. Yamauchi, E. et al. (2003) Nature Struct. Biol. 10, 226-231
3. Matsubara, M. Et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 48898-48902
4. Takasaki, A. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 11848-11853
5. Matsubara, M. et al. (2004) EMBO J. 23, 712-718

penta-EFハンドカルシウム蛋白質ALG-2 の相互作用因子とメンブレントラフィック制御

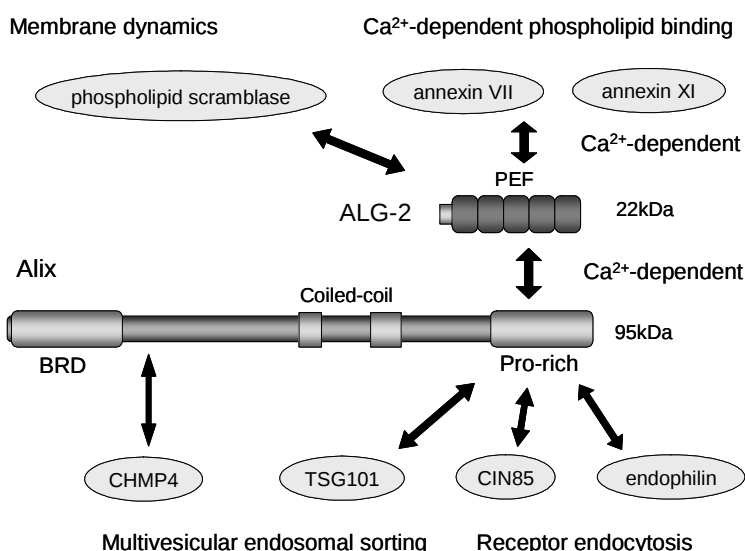
牧 正敏 (名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻)

mmaki@agr.nagoya-u.ac.jp

当初、カルパインは、C末端側にカルモジュリン様の連続した4つのEFハンドをもつと考えられていたが、そのすぐ上流にさらにもう一つのEFハンドが存在することが判明した。現在、このような5つの連続したEFハンドモチーフは、penta-EFハンド(以下、PEFと略す)と呼ばれている¹⁾。ALG-2はapoptosis-linked gene 2として発見されたが²⁾、演者らは、ALG-2もPEF蛋白質であることを見出し¹⁾、以来、この蛋白質の生理機能とその相互作用因子に注目して研究している。

PEF蛋白質は、構造的特徴によりグループI(ALG-2、peflin)とグループII(カルパイン大小サブユニット、sorcin、grancalcin)に分類され、ALG-2は進化的に最も古く真核生物に広く存在するPEF蛋白質である³⁾。ALG-2はホモダイマーおよびpeflinとのヘテロダイマーとして存在し⁴⁾、EF5がダイマー形成部位となっている^{5,6)}。ALG-2の生理機能は不明な点が多いが、カルシウム存在下で膜画分に移行することから、メンブレンを介した何らかの制御に関与していると思われる。

ALG-2のカルシウム依存的相互作用因子として、Alix(別名AIP1)、アネキシンVII、アネキシンXIが同定され、PPIIヘリックス構造が予想されるPxYの繰り返し配列がALG-2



の認識モチーフの一つとなっている⁷⁾。最近、このようなモチーフをもつリン脂質スクランブラーゼとも結合することが明らかになった⁸⁾。一方、Alixの相互作用因子として、エンドサイトーシスおよびエンドソームにおける選別輸送に関与する因子群が見つかった⁹⁾。また、細胞性粘菌は多細胞構築のモデル下等真核生物であ

るが、Alixホモログの遺伝子を破壊すると、低カルシウム環境下での分化・発生に異常が認められた¹⁰⁾。最近の知見も含め、ALG-2とその相互作用因子について話題を提供したい。

1) Maki et al. (1997) Biochem. J. 328, 718. 2) Vito et al. (1996) Science 271, 521. 3) Maki et al. (2002) Biochim. Biophys. Acta 1600, 51. 4) Kitaura et al. (2001) J. Biol. Chem. 276, 14053. 5) Jia et al. (2001) Structure 9, 267. 6) Kitaura et al. (2002) Arch. Biochem. Biophys. 399, 12. 7) Shibata et al. (2004) J. Biochem. 135, 117. 8) 柴田ら 2004年度日本生化学会大会. 9) Katoh et al. (2003) J. Biol. Chem. 278, 39104. 10) Ohkouchi et al. (2004) Gene 337, 131.

S100 の新しい機能 シャペロン活性-

小林 良二 (香川大学医学部生体分子医学講座生体情報分子学)

ryoji@med.kagawa-u.ac.jp

現在までに約 20 種の S100 タンパク質 (S100、低分子 EF-hand タンパク質) が同定されているが、S100 の細胞内シグナル伝達における役割については明確な答は得られていない。少なくとも 20-30 種の S100 の標的分子が想定されているが、S100 受容体 (RAGE) の発見および S100A1 による twitchin kinase の活性化が確度の高い研究として挙げられるのみである。私達は、(1) S100 の標的分子を同定し、S100 による機能調節の仕組みを解明する。(2) S100 の選択的拮抗薬 (S100 antagonist) を見だし、これを利用することにより S100 の生理的役割を明らかにすることを目的に研究を進めている。最近の研究(1)において、S100A1 が細胞内の分子シャペロン複合体の新たな構成分子であり、同時に S100A1 そのものが強力な分子シャペロン機能を有することを見いだしたので話題として提供したい。分子シャペロン複合体は、HSP70, HSP90 に加え、co-chaperone と呼ばれる一群のタンパク質 (Hop, FKBP52, Cyclophilin40, p23 など) によって構成され、細胞内タンパク質の folding, refolding, translocation などに関与している。S100A1 は Hsp70, FKBP52, Cyclophilin40 とカルシウム非依存的に複合体を形成し、Hsp90 とはカルシウム依存性に結合する。In vitro (GST-pull down, BIAcore) での結合のみならず、組織抽出物の IP によっても結合が認められ S100 A1 とシャペロン分子は生理的条件下でも複合体を形成するものと思われる。Citrate synthase または rhodanese を基質とするシャペロン活性測定系において、S100A1, S100A2, S100B は強いシャペロン活性を示す。Cos7 細胞への S100A1 と β -galactosidase または luciferase の共発現系においても S100A1 は強いシャペロン活性を示し、intact cell 内でも S100A1 が分子シャペロンとして作動している可能性が高い。また、S100A12 はその結合タンパク質である aldolase, GDPDH, isocitrate dehydrogenase などの熱安定性を制御している(2)などから、少なくとも数種の S100 は分子シャペロンとして機能している可能性が高い。Calmodulin や neuronal calcium sensor protein にはシャペロンとの結合性は認められず、シャペロン活性も無い。従って、S100 のシャペロン機能は、この family に特有なシグナル経路と考えられる。一方、Calmodulin などとは相互作用を持たず S100 family に選択性の高い拮抗薬の探索においては、抗アレルギー薬 (DSCG, amlexanox, olopatadine) が S100 antagonist である可能性を見いだした(3,4,5,6)。この中で、DSCG, amlexanox は Hsp90 や 14-3-3 との拮抗作用を持つ(7)ため、intact cell には応用しにくい、oloapatadine の選択性は高く、S100 antagonist のリード化合物となりうると思われる。

(1) Okada et al (2004) J Biol Chem 279, 4221 (2) Hatkeyma et al (2004) Eur J Biochem 271,3765 (3) Shishibori et al (1999) Biochem J 338,583 (4) Oyama et al (1997) Biochem Biophys Res Commun 240,341 (5) Okada et al (2002) Biochem Biophys Res Commun 292,1023 (6) Okada et al (2003) Biochem J 375,87 (7) Okada et al (2003) Biochem J 374,433

トロポニンの結晶構造と筋収縮調節メカニズム

武田壮一（国立循環器病センター研究所心臓生理部、理化学研究所播磨研究所）

stakeda@ri.ncvc.go.jp

【発表要旨】

1970年代に筋繊維のX線回折の結果を基に「立体障害仮説」が提案され、現在まで筋収縮制御機構の基本モデルとしてしばしば引用されている。この提案では、カルシウムイオンの結合に伴いトロポニン（Tn）が繊維状分子トロポミオシン（Tm）のアクチン上での位置を変化させモーター分子ミオシン頭部のアクチンへの相互作用を立体障害的に調節するとしているが、X線回折データの解釈にTn/Tmがアクチンらせん上に等しく質量分布することを仮定している点で矛盾を抱えている。筋収縮制御機構の本質的な理解のために制御分子Tn/Tmについての高分解能の立体構造情報が必須となっている。一方、若年者の突然死の主要原因の一つである肥大型心筋症（Hypertrophic cardiomyopathy, HCM）や心臓移植を必要とする拡張型心筋症（Dilated cardiomyopathy, DCM）における原因遺伝子の解析から筋節（サルコメア）を構成するタンパク質群の異常が見つかってきている。これらトロポニンを含む心筋タンパク質群の異常はいずれも心筋張力発生のカルシウム感受性の変化、即ちTnCの第二カルシウム結合部位の親和性の変化として表現されることがスキンドファイバーを用いた実験等で示され、心筋症の発症過程にカルシウム感受性の変化に応答した張力発生の異常が関与していることが示唆されている。したがってTm/Tnによるカルシウム調節機構の解明は、心筋症発症のメカニズムの理解や将来の創薬への応用展開という点でも重要な意味を持つ。

我々はTn/Tm複合体のX線結晶構造解析に取り組み、制御機構の要となるヒト心筋Tnコアドメインのカルシウム結合型の結晶構造を明らかにすることに成功した(Takeda et. al. Nature 424, 35-41 (2003))。その結果、Tnコアドメインはさらに複数のサブドメインから成ること、それぞれのサブドメインがフレキシブルなリンカー構造で結ばれていることが明らかになった。TnT/TnI間に形成されるcoiled-coil構造を核とした長い(-80)サブドメイン、IT-armはその長軸の両端部にTm結合部位を有し、調節頭部(RH、TnCのN末端ドメイン)を「細い繊維」に繋ぎ止めている。RHへのカルシウム結合はTnI/TnC間の相互作用を変え、TnIの調節領域(TnI_{reg})とアクチンとの結合をスイッチングすると考えられる。これらの結果からTnへのカルシウム結合はTnとアクチン及びTm間の結合を3点から2点結合へと変化させ、IT-armを介してTm分子の構造および性質(柔らかさ、あるいは動きやすさ)を変えてアクチン・ミオシン相互作用を調節している可能性が見出された。

本講演ではヒト心筋トロポニンコアドメインの結晶構造と考えられるカルシウム調節機構を中心に最近のトロポニン研究について紹介する予定である。

カルパインの新しいCa²⁺-結合モチーフと構造・機能相関

反町洋之、小野弥子、秦勝志、小山傑、尾嶋孝一（東京都臨床医学総合研究所）

sorimach@rinshoken.or.jp

【発表要旨】

カルパインは細胞質内に存在して、細胞機能を、そしてその集合体である生体機能を制御する「モジュレータ・プロテアーゼ」の代表である。即ち、カルパインはCa²⁺にレスポンスして、細胞骨格系、情報伝達系、膜輸送系などに関与する基質タンパク質の構造・機能・活性を調節・変換するために、極めて限定的な「切断（プロセッシング）」を行う。その機能の重要性は、カルパイン遺伝子の変異により胎性致死や筋ジストロフィーが生じることなどで明白であるにもかかわらず、カルパインの作用機序については現状ではほぼ不明である。カルパインはヒトで 14 種存在し、その中で組織普遍的に発現して量的にも多いものが μ -及びm-カルパインである。これらは、4つのドメイン（I～IV）からなる活性サブユニットと2つのドメイン（V及びVI）からなる調節サブユニットのヘテロダイマーで構成される。ドメインIV及びVIは、各々5つのEF-ハンドモチーフを有するCa²⁺-結合ドメイン（PEFドメイン）であり、カルパインのCa²⁺依存性を担うと考えられてきた。その後、m-カルパインのCa²⁺-非存在下の立体構造が解明され、(1)プロテアーゼ活性ドメイン（II）は、2つのサブドメイン（IIa及びIIb）に分割され、Ca²⁺-非存在下では活性中心が形成されていない、(2)一次構造上全く相同性の見いだせなかったドメインIIIがCa²⁺-結合型C2ドメインの立体構造に極めて類似していた、(3)ドメインIV及びVIはダイマー形成を担い、活性ドメインからは最も離れた位置に存在した、等が明らかとなった。

さらに、生化学実験によりドメインIIIがCa²⁺を結合することが示され、このドメインが、カルパインのCa²⁺依存的な膜移行を含め、Ca²⁺による制御の中心的役割をすることが強く示唆された。また、活性サブユニットのN末端のドメインIは、調節サブユニットの2つのEF-ハンドとの塩橋形成によりヘテロダイマー安定化に寄与し、かつ、Ca²⁺のEF-ハンドへの結合による塩橋破壊に起因するサブユニット解離に重要な役割を果たすことが示された。この事実は、カルパインのドメインIにおける自己消化の生理的意義を明確にし、自己消化がサブユニット解離や基質特異性の変化を引き起こすことを明らかにした。さらに、カルパインのプロテアーゼドメインを組換えタンパク質として発現させたものを解析した結果、予想に反してCa²⁺依存的な活性が観察された。その後、プロテアーゼドメインのCa²⁺結合型（活性型）の立体構造も報告され、実際にサブドメインIIa及びIIbに1分子ずつ結合していることが明らかとなった。このプロテアーゼドメインに見出されたCa²⁺結合モチーフは、今までに例のない構造であり、カルパインファミリーが進化的に新規に獲得したものと考えられた。

このように、カルパインは分子全体として10分子以上のCa²⁺を結合し、高度に調節を受けていることが明らかとなった。カルパインは、上述のように生理的に重要な機能を担っているため、その基質認識や活性制御の分子的なメカニズムの解明が大きく期待されている。その重要な因子であるCa²⁺を基にしてこれらの点も議論したい。

シナプス機能調節における CaM kinase II の役割

山内 卓(徳島大学大学院・薬学部)

E-mail: yamauchi@ph.tokushima-u.ac.jp

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM kinase II) は、大脳や海馬に多く存在し、記憶分子として注目されている。私達は CaM kinase II がシナプス伝達の中心部位であるシナプス後肥厚 (PSD) の主要構成分子であることに注目して、シナプス機能調節を解析した。

(1) PSD における CaM kinase II とシグナル伝達分子

CaM kinase II と PSD の関係を調べ、CaM kinase II は自己リン酸化に依存して PSD に移行すること、PSD に移行した酵素は多くの PSD タンパク質をリン酸化することを明らかにした。さらに、PSD における CaM kinase II の基質タンパク質 28 種類を同定した。一方、プロテオミクス解析により、PSD に存在するタンパク質 492 種類を同定した。PSD で報告されていたタンパク質の 75% 以上を同定するとともに、新たに約 350 種類のタンパク質を同定し、PSD の全体の構成成分の多くが明らかになった。PSD の主要な構成分子は、シグナル伝達に関わる分子と構造タンパク質であった。今後、シナプス可塑性における PSD の役割が解明に役立つと考えられる。

(2) 神経突起伸展の CaM kinase II の調節

CaM kinase II cDNA を導入した神経芽細胞をシナプス可塑性のモデルと考えて CaM kinase II の役割を解析した結果、CaM kinase II を過剰発現することにより突起伸展が促進されること、CaM kinase II の自己リン酸化型が関与することが明らかとなった。さらに、培地から血清を除去することにより突起伸展を起こす CAD 細胞では、血清除去により CaM kinase II も誘導され、内在性のリン酸化が増加した。しかし、内在性 CaM kinase II を siRNA によりノックダウンすると、突起伸展が阻害され、そこに CaM kinase II を導入することにより、突起伸展能が回復することが明らかになった。これらの結果から、CaM kinase II は突起伸展に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(3) PSD タンパク質による CaM kinase II 作用の調節

PSD タンパク質が CaM kinase II の作用に影響与えるか調べるために、前初期遺伝子産物 Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) に注目した。Arc は、mRNA が CaM kinase II と同様に樹状突起に存在すること、神経活動依存的に誘導されることから、CaM kinase II との相互作用があると考え解析した。その結果 Arc は PSD に局在すること、細胞内で CaM kinase II と相互作用し、CaM kinase II の突起伸展作用を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、CaM kinase II が、記憶・学習の一連の過程、すなわち、シナプス形成、シナプス後細胞における機能調節等、において中心的な役割を果たすと考えられる。

不活性型 CaM Kinase II α 遺伝子改変マウスを用いた脳機能の解析

山肩葉子、井本敬二、八木 健、小幡邦彦、柳川右千夫（自然科学研究機構生理学研究
所、総合研究大学院大学、CREST、大阪大学、理化学研究所、群馬大学）

yamagata@nips.ac.jp

【発表要旨】

Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、中枢神経系に豊富に存在するプロテインキナーゼとして、神経活動の制御やシナプス可塑性、特に、学習・記憶を始めとする高次脳機能に、また、てんかん発作の発現の抑制、脳虚血の際の脳障害の抑制に重要な働きをすると考えられている。CaMKII 蛋白には、大きく分けて、(1) 他の蛋白質をリン酸化するプロテインキナーゼとしての機能、(2) Ca²⁺ 結合蛋白であるカルモジュリンを結合する機能、(3) CaMKII サブユニット同士が結合して、あるいは他の蛋白質と結合して構造蛋白として働く機能、という三つの異なる作用機序が存在する。このうち特に重要と考えられるプロテインキナーゼとしての生体内での作用を解明し、脳機能への関与を明らかにするために、キナーゼ活性を失活させた機能的ロックアウトマウスの作成を行った。

具体的には、CaMKII の前脳での主要なサブユニットである α (アルファ) をターゲットとして、ATP 結合に必要な 42 番目のアミノ酸残基、リジン (Lys-42) をアルギニン (Arg-42) に置き換えた点変異型のノックインマウスを作成した。ホモ接合型の変異マウスの前脳ホモジネートにおける CaMKII 活性は、野生型に比べて約 60% 減少していたが、CaMKII α ならびに CaMKII β の蛋白レベルには、顕著な変化は認められなかった。CaMKII の残存活性は正常な CaMKII β によるものと考えられた。一方、 α に比べて β が優位である小脳ホモジネートにおいては、CaMKII 活性はほぼ正常に保たれていた。従って、作成したノックインマウスにおいては、CaMKII α の蛋白としての発現は保たれているものの、その活性のみが選択的に失活しているものと考えられた。現在このマウスを用いた様々な脳機能の解析を行っている。

神経系における CaM kinase I の発現と機能

阪上洋行 東北大学大学院医学系研究科細胞組織学分野

hsakagam@gonryo.med.tohoku.ac.jp

【発表要旨】CaM kinase I は、1980年代にシナプシン I に対するリン酸化能により脳から精製されたにも関わらず、その機能解析は、他の多機能型 CaM kinase II 及び IV に比べて驚く程遅れている。しかしながら、近年、CaM kinase I が、少なくとも4つの分子種(α , β , γ , δ)よりなる分子ファミリーを形成し、CaM kinase IV とともに CaM kinase による特異なリン酸化カスケードによる活性化調節機構が存在することが明らかとなり、その分子多様性と生理機能の解析がようやく始まった感がある。本発表では、これまで行ってきた神経系における発現解析のうち、CaM kinase I γ と δ 分子に関する最近の所見を中心に発表する。

CaM kinase I γ は、横倉らの部分的な cDNA が単離され、その存在が明らかになったものであるが、我々は、PCR クローニングにより、2つの alternative splicing variant を見だし、 γ 1、 γ 2分子と名付けた。 γ 1分子は、477アミノ酸残基よりなる推定分子量約53kDa よりなり、 α , β 1, β 2分子とそれぞれ63%、64%、61%の相同性を示したのに対して、 γ 2分子は、カルモデュリン結合部位を含むC末領域が欠損し、477アミノ酸残基、推定分子量43kDa よりなることが明らかになった。次に、成熟期ラット神経系における γ 分子の遺伝子発現局在を検討した結果、視床腹内側核と松果体に際立った強い発現が検出された。この γ 分子の遺伝子発現様式は、神経細胞に広く分布する α 分子や脳幹領域に比較的限局する β 2分子のそれと大きく異なるもので、特異な神経機能に関与する可能性が示唆された。

一方、CaM kinase I δ は、顆粒球に特異的に発現する CaM kinase I-like kinase (CKLiK)の splicing variant として、Hela 細胞から、石川らにより単離されたものである。遺伝子発現分布を検討した結果、CaM kinase I δ は、特に海馬錐体神経細胞に際立った強い発現を示した。初代海馬神経培養細胞に遺伝子導入した CaM kinase I δ は、大部分の神経細胞(80%)において、細胞質と神経突起に局在し、残りの20%の神経細胞では、核と細胞質に均一に分布した。次に、グルタミン酸及び脱分極によるカルシウム刺激を与え、その細胞内局在の変化を検討した結果、核に局在を示す神経細胞の割合が刺激前の20%から刺激1分後に40%と増加した。この核への局在は、刺激後30分以内にすみやかに basal level に戻った。また、CaM kinase I δ を過剰発現した PC12 細胞において、脱分極刺激により CRE luciferase 活性が増加すること、また、CREB のリン酸化が増強していることより、CaM kinase I δ は、神経活動依存性に核内に移行し、核に恒常的に局在している CaM kinase IV とともに、CREB などの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現の調節に関与している可能性が考えられた。

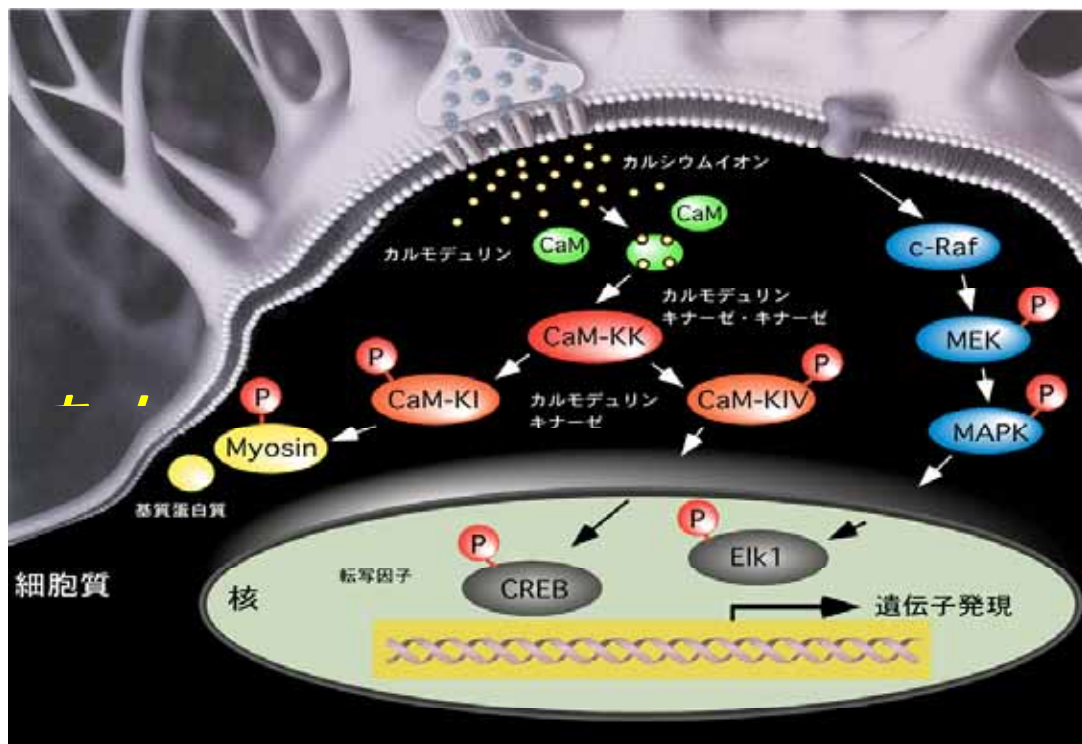
CaM kinase カスケードのシグナル伝達と生理機能

徳光 浩，小林良二（香川大学医学部生体情報分子学）

tokumit@med.kagawa-u.ac.jp

【発表要旨】

多様な細胞応答においてタンパク質リン酸化酵素によるカスケード反応は重要な細胞内情報伝達機構として機能する。本研究会のテーマである細胞内カルシウム情報伝達経路においてもCaM-KK/CaM-KI、CaM-KK/CaM-KIVの独立した2つのCaM キナーゼカスケードの存在が明らかとなっている。本発表では、これまでに得られている解析結果から導き出されたCaM キナーゼカスケードのシグナル伝達の分子メカニズムについて報告するとともに、その生理機能のひとつである遺伝子発現制御機構についても最近の知見を紹介する。また独自に開発したCaM-KK阻害剤（ST0-609）を用いたCaM キナーゼカスケードの生理機能解析法について、阻害剤研究の問題点である特異性評価や、その解析結果も含めて議論したい。



(CaM kinase カスケード)

CaM kinase ファミリーを中心としたプロテインキナーゼの網羅的検出と解析

亀下 勇、末吉 紀行 (香川大学・農学部)

kamesita@ag.kagawa-u.ac.jp

タンパク質リン酸化反応は様々な生命現象と深い関わりを持っており、その反応に関与するプロテインキナーゼ (PK) の数は数百種類以上も存在することが知られている。生命現象のメカニズムを明らかにするためには、様々な状況下の細胞内で発現している PK の全貌を知ることが重要である。そこで我々は、細胞内に存在する PK を広く検出するための網羅的解析法について検討してきた。本研究では細胞内に存在する多様な PK を同時に検出するための抗体を作製し、その利用法について検討した。

PK の触媒ドメインには、アミノ酸配列が保存された 12 ヶ所のサブドメインが存在し、その中でも特にサブドメイン VIB 配列が高度に保存されている。そこで CaMKII のサブドメイン VIB のアミノ酸配列 (図 1) に基づく様々なペプチドを抗原として合成し、マウスを用いて抗体の作製を試みた。得られた抗血清を用いてウエスタンブロットを行ったところ、長さが 10 個以下のアミノ酸からなるペプチドを抗原として免疫したマウスでは、抗体産生がみられなかったが、14 から 16 アミノ酸のペプチドを抗原として用いた場合に広い反応性を示す抗体が得られることがわかった。作製したモノクローナル抗体 (Multi-PK 抗体) は、ウエスタンブロットで CaMKI、II、IV、CaMKK、PKA、MAPK、MAPKK をはじめとして様々な PK を検出できるだけでなく、細胞抽出液中に含まれる種々の PK の免疫沈降にも利用できることが確認された。さらに様々な生物から調製した cDNA 発現ライブラリーを Multi-PK 抗体でスクリーニングしたところ、CaMK ファミリーを含む様々な既知の PK だけでなく、新規の PK の遺伝子を単離することができた (図 1)。

本研究会では、Multi-PK 抗体の性質について紹介するとともにその利用例についても併せて報告する予定である。

図 1. Multi-PK 抗体を用いて検出された既知ならびに新規 PK のサブドメイン VIB 配列

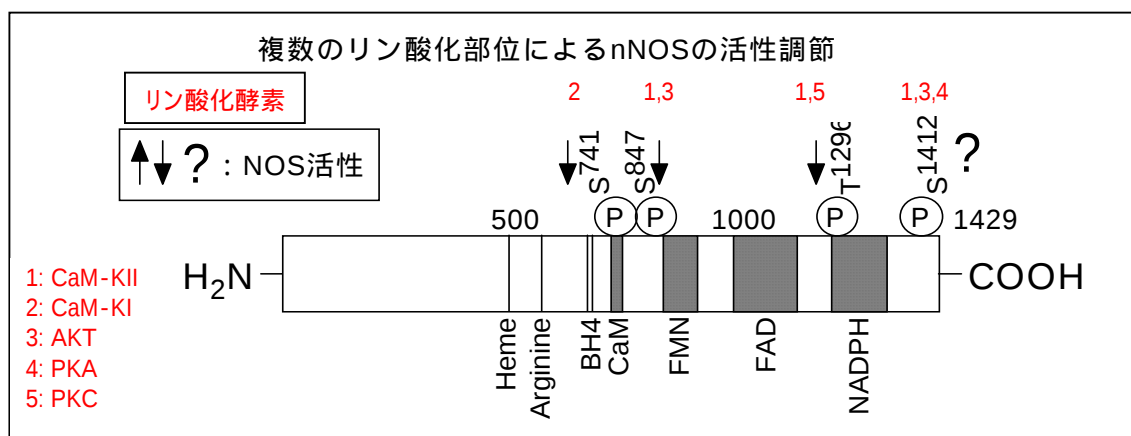
Peptide antigen	
16PEN	CVVHRDLKPENLLLAS
Protein kinase	Subdomain VIB
CaMKII α	VVHRDLKPENLLLAS
CaMKI & IV	IVHRDLKPENLLYAT
CaMKK	IVHRDLKPSNLLLG
MEK	IAHRDLKPENLLFKD
PKA	LIYRDLKPENLLIDH
DCLK	IVHRDVKPENLLVQR
Chk1	ITHRDIKPENLLIDE
LNZ001 (Ndr)	YIHRDLKPDNLLLD
LNZ003 (SnRK)	VVHRDLKPENLLLDA
LNZ020 (GSK-3)	VCHRDIKPQNLLVNP
LNZ021 (RLK)	ILHLDIKPQNILLDE
LNZ344 (Ark)	IAHRDLKAENLLLS

神経型 NO 合成酵素のリン酸化による調節

渡邊泰男、徳田雅明（香川大学・医学部・細胞情報生理）

yasuwata@med.kagawa-u.ac.jp

【発表要旨】 多彩な生理作用を有する一酸化窒素（NO）シグナルはNO産生を触媒するNO合成酵素（NOS）の活性制御はカルモデュリン（CaM）結合とリン酸化によって調節されている。これまでnNOSのSer741、Ser847がそれぞれCaMキナーゼI（CaM-KI）CaM-KIIによってリン酸化される部位として同定され、共にCaMとの親和性の低下によってNOS活性が阻害されることが判明している（1, 2, 3）。Thr1296もCaM-KIIによってリン酸化を受け、その結果活性が阻害された。リン酸化擬似体nNOS（Thr1296をAspに置換した変異型：Thr1296Asp）の酵素学的解析や、Thr1296リン酸化nNOSの生化学的性質より活性阻害は補酵素の1つであるNADPHに対する親和性の低下（ K_m 値が20倍）によるものであった。Ser1412もCaM-KIIによるリン酸化部位であったが、現時点で酵素学的意義は見いだせていない。脱リン酸化酵素による可逆的調節も観察され、少なくともprotein phosphatase 2Aの関与が示唆されている（4）。生理学的意義の解析では、ラット脳一過性虚血モデルを用いて、虚血シグナルで海馬神経の介在神経においてSer847リン酸化が一過性にCaM-KIIにより触媒されていた。この現象が皮質ではみられないことより海馬神経での虚血耐性におけるnNOSのSer847リン酸化の関与が示唆された（5）。神経細胞のカルシウムシグナルによるリン酸化応答現象をシナプスに存在するクラスタリング分子との相互作用に着目して解析した結果、中枢神経系では直接結合を介してnNOSのシナプス後膜での局在化機構の中心的役割を担っているpost synaptic density 95がSer847リン酸化の調節因子として細胞内で機能していることが判明した（6）。In vitroならびに分子薬理的な解析により、以上のリン酸化反応はカルシウムシグナル以外のキナーゼによっても部位選択的に触媒されていることが分かってきた。以上のように、nNOSは同じCaMを活性化因子として利用するCaM-Kのリン酸化によりその活性をダイナミックにコントロールされていることに加え、複数のキナーゼによってより複雑に制御されているものと考えられる。



1. Hayashi Y. et al. *J. Biol. Chem.* (1999) 274, 20597-20602
2. Komeima K. et al. *J. Biol. Chem.* (2000) 275, 28139-28143
3. Song T. et al. *FEBS Lett.* (2004) 570, 133-137
4. Komeima K. and Watanabe Y. *FEBS Lett.* (2001) 497, 65-66
5. Osuka, K. et al. *J. Cerebr. Blood F. Met.* (2002) 22, 1098-1106
6. Watanabe Y. et al. *Biochem. J.* (2003) 372, 465-472

14-3-3 によるCaMKKの調節

市村 徹、松永耕一、笹本 要、磯辺俊明（東京都立大）

ichimura@mail.comp.metro-u.ac.jp

CaM キナーゼキナーゼ (CaMKK) は、CaM キナーゼカスケードの最上流に位置する蛋白質キナーゼであり、カルシウムを2次メッセンジャーとする細胞内シグナル伝達、とりわけ神経細胞におけるカルシウムシグナリングに重要な役割を担っている。また、CaMKKはカルシウム以外のシグナリング（例えば cAMP シグナリング）の標的分子としても知られており、シグナル伝達のクロストーク、フィードバックといった観点からも注目されている。一方、14-3-3 蛋白質も特に神経細胞に豊富に存在する蛋白質であり、キナーゼが調節するリン酸化反応に依存して多彩な蛋白質と複合体を形成することで、細胞内シグナル伝達経路の反応に深く関わることが知られている。本講演では、14-3-3 を bait として用いた機能プロテオミクス解析によって新規に見出した “14-3-3-CaMKK α 複合体” の性質を検討したので報告する。

大腸菌で発現した CaMKK α とグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ (GST) との融合蛋白質として発現した 14-3-3 η を用いたプルダウン実験により、PKA でリン酸化した CaMKK α が 14-3-3 η と直接結合することが明らかとなった。一方、この相互作用はリン酸化しなかった CaMKK α や CaM を加えることで自己リン酸化した CaMKK α では起こらなかったことから、PKA によるリン酸化に特異的であることが示唆された。次に、CaMKK α と GST-14-3-3 η を発現するヒト腎臓由来の培養細胞を PKA の活性化剤で処理したところ、PKA の活性化に依存して GST- η -CaMKK α 複合体が細胞内でも形成されることが分かった。またこの相互作用は CaMKK β アイソフォームでも同様に検出された。

CaMKK α は CaMKI または CaMKIV を効率良くリン酸化し活性化することが知られている。一方、こうした CaMKK α の活性は PKA によるリン酸化で低下することが報告されている。そこで、14-3-3 η との複合体形成が CaMKK α のキナーゼ活性に影響を及ぼすのかを GST-CaMKI (1-293)K49E を基質として用いた *in vitro* リン酸化実験で検討した。その結果、14-3-3 η と複合体を形成した CaMKK α のキナーゼ活性は単体のものと比べてさらに低下することが分かった。さらに、この 14-3-3 による効果は、高濃度の CaM を反応系に加えることで抑制されたことから、CaM との競合阻害効果である可能性が示唆された。

以上の結果より、14-3-3-CaMKK α 複合体は PKA による CaMKK α のリン酸化に依存して形成されることが、さらに CaM の CaMKK α への結合を阻害することでそのキナーゼ活性を負に制御していると推測した。

シナプス後肥厚部におけるタンパク質相互作用のリン酸化による調節

鈴木龍雄，田 慶宝，宮沢昌子

（信州大学大学院医学研究科，加齢適応医科学系独立専攻，分子細胞学部門，神経可塑性学分野）

suzuki.t@sch.md.shinshu-u.ac.jp

著者らは5年以上前から，新規のシナプス後部タンパク質およびそれらをコードする遺伝子を発見・同定するプロジェクトを行っている．シナプス後部に存在するタンパク質種の全貌についてはまだ明らかになっておらず，未発見のものもかなりあると予想される．シナプス伝達の制御や可塑性，また，シナプス機能に起因する脳や精神の疾患の理解する上で，これら未知の分子を発見し，機能を明らかにすることが大きな役割を果たすと考えられる．本シンポジウムでは，このプロジェクトの中で新たに同定したシナプス後肥厚部（postsynaptic density, PSD）タンパク質について，タンパク質-タンパク質相互作用の観点から現在までの知見を総括する．

本講演では以下のタンパク質について述べる．1）p55 protein，2）TANC (protein containing TPR domain, ankyrin repeat and coiled-coil region)，3）LRP4 (LDL receptor-related protein 4)，4）synArfGEF (synaptic GEF for Arf)，5）NIDD (nNOS-interacting DHHC-containing protein with dendritic mRNA) 5) BAALC 1-6-8 (brain and acute leukemia, cytoplasmic)．

p55 protein は Membrane-associated guanylate kinase (MAGuK) family の一員である．このタンパク質は赤血球においては membrane と細胞骨格-膜裏打ちタンパク質をクロスリンクする役割を果たしていることがよく知られているが，シナプス後部においても同様の機能を果たしていることが示唆された．TANC は新規 protein で，p55 protein とともに PSD において scaffold protein (足場タンパク質)の役割を果たしていることが示唆された．LRP4, synArfGEF および NIDD は，C 末端部分に PDZ domain 結合配列を有することが特徴である．これらタンパク質のうち，LRP4, synArfGEF はその C 末配列を介して PSD-95，SAP97 などと結合したが，NIDD protein はこれらとは結合せず，nNOS に特異的に結合した．また，LRP4 については，カルモジュリンキナーゼ II によってリン酸化を受け，C 末 PDZ domain-binding motif 近傍の Ser 残基のリン酸化により，PSD-95 や SAP97 との相互作用が制御される可能性が示された．BAALC 1-6-8 protein はある種の急性白血病と正常では脳に特異的に発現されているタンパク質であるが，カルモジュリンキナーゼ II と特異的に結合することが明らかになった．

以上の新規のシナプス後部タンパク質の PSD protein との相互作用とその制御について述べる．

Homer-3 の CaM kinase II によるリン酸化

水谷顕洋、御子柴克彦（JST・カルシウム振動） 古市貞一（理研・脳研）

amizutan@ims.u-tokyo.ac.jp

[発表要旨]

Homer 蛋白質ファミリーは3種類の遺伝子からコードされ、いずれも中枢神経系（神経細胞）に高度に発現し、主に、興奮性シナプスのポストシナプスに局在している。N-末の EVH1 domain には、種々の分子（mGluRs, IP3Rs, RyRs, TRPC, drebrin, SHANK）が結合し、C-末部分で multimer を形成することで、ポストシナプス領域に於いて上記結合分子群を物理的にカップルさせていると考えられている。

我々は、小脳 Purkinje 細胞の spine に極めて豊富に発現・局在する Homer-3 蛋白質の、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間のシナプス可塑性における機能について研究を進めているが、最近、Homer-3 にはリン酸化フォームが存在し、このリン酸化フォームは、非リン酸化フォームに比して、可溶性画分に回収されやすいことを見出した。*in vitro* リン酸化実験によって CaM kinase II が Homer-3 の3ヶ所の Ser 残基をリン酸化し、これによって結合分子との親和性を低下させることを発見した。また、リン酸化部位特異的抗体を用いることで、これらのリン酸化が Purkinje 細胞内で神経活動依存的に起きることを見出した。これらの事実は、Homer-3 のリン酸化によって、spine 内の分子間相互作用が調節され、顆粒細胞平行繊維-Purkinje 細胞間シナプスの構造的可塑性を調節している可能性を示唆している。

タウの CaM キナーゼ II によるリン酸化反応のアルツハイマー病への関与

山本 秀幸、熊本大学大学院医学薬学研究部細胞情報薬理学分野

hideyuki@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Ca²⁺/カルモデュリン依存性蛋白質リン酸化酵素II(CaMキナーゼII)は、脳の神経細胞に多量に存在し、神経細胞の活性化によって引き起こされる様々な神経細胞機能に関与している(1, 2)。本酵素の異常が、種々の精神神経疾患の病態生理に関与している例も報告されてきた。我々は、本酵素が微小管附随蛋白質の中のタウをリン酸化してその機能を阻害することを見い出した。最近、質量分析法によりリン酸化部位を同定した。その結果、チューブリン結合部位にある 262 番目と 356 番目のセリンがリン酸化されることが明らかになった(3)。さらにタウのリン酸化によりチューブリンとの結合が阻害された。また、416 番目のセリン(S416)もCaMキナーゼIIによりリン酸化されることが報告されている。我々の検討から、本部位を含む合成ペプチドは調べた酵素の中ではCaMキナーゼIIによってのみリン酸化されることが明らかになった。そこで、S416 がリン酸化されたペプチドを合成し、家兎に免疫して、リン酸化特異抗体を作製し精製した。蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含まない条件でラット脳から調製した粗抽出液を用いた免疫ブロットでは、*in vitro*でCaMキナーゼIIでリン酸化した時にのみ、タウが抗体と反応した。これに対し、蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤を含む条件では、粗抽出液中のタウが抗体と反応した。すなわち、*in vivo*でS416 がリン酸化されていることが確認された。本部位のリン酸化は、生後 10 日以内の脳で著明に認められた。また、出生前のラット脳から培養した神経細胞での免疫染色により、タウが細胞体でリン酸化されていることが明らかになった。なお、アルツハイマー病脳では、過剰にリン酸化されたタウがpaired helical filaments (PHF)を形成して神経細胞体と神経突起内に蓄積していることが知られている。リン酸化特異抗体を用いた検討から、アルツハイマー病脳から調製したPHFタウではS262 とS356 に加えてS416 もリン酸化されていることが明らかになった。さらにアルツハイマー病脳の免疫組織学的検討により、細胞体に存在するPHFタウでS416 のリン酸化が認められた。これに対し、神経突起内のPHFタウではリン酸化は認められなかった。これらの結果から、胎児期及び出生直後の脳では、神経細胞体でタウがCaMキナーゼIIによりリン酸化されていることが示唆された。また、アルツハイマー病脳では、神経細胞体でのCaMキナーゼIIによるタウのリン酸化が過剰に起こっている可能性が示唆された。現在、培養神経細胞を用いてCaMキナーゼIIによるタウのリン酸化反応の調節機構と生理的意義を検討している。

1. Matsumoto, K. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 2053-2059
2. Takeuchi, Y. et al. (2000) J. Neurochem. 74, 1913-1922
3. Yamamoto, H. et al. (2002) Arch. Biochem. Biophys. 408, 255-262