

Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II によるシナプス機能調節の生化学的研究

藤代(土内) 瞳

Study on the Regulation of Synaptic Function by Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II

Hitomi FUJISHIRO (DONAI)

Department of Molecular Nutrition and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University, 180 Nishihamaboji, Yamashiro-cho, Tokushima City 770-8514, Japan

(Received February 20, 2006)

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is one of the most abundant protein kinases in the mammalian brain, especially in the hippocampus. Neuronal CaMKII is a multifunctional mediator of activity dependent on an increase in the Ca²⁺ level in excitable cells. It plays an important role in synaptic plasticity, including learning and memory, and is recognized as a “memory molecule.” The expression of the kinase increases most rapidly during the most active phase in the formation of synapses in the postnatal brain and remains at a high level after synaptic maturation, indicating that the kinase is carefully regulated in the space-temporal gene expression. It is accumulated in the postsynaptic density (PSD), which is central in synaptic transmission. This review presents the gene expression and alternative splicing of CaMKII during neural differentiation, molecular constituents of PSD, and regulation of CaMKII by activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) mainly developed in our study.

Key words—Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II; memory; postsynaptic density; plasticity; Arc

1. はじめに

脳研究は 21 世紀に残された科学研究の最後のフロンティアの 1 つである。近年の研究の進展により注目され、脳の様々な機構の中でも、記憶・学習は最も重要であり非常に興味深い。Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) は、脳に多く存在し、記憶の中核である海馬に特に多く存在するプロテインキナーゼである。CaMKII は、酵素活性の自己調節能を備えていること、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、脳の神経細胞が最も盛んにシナプス形成する時期に酵素タンパク質が発現することなどから、現在では『記憶分子』と考えられている。したがって、記憶・学習のような脳の高次機能の分子過程を明らかにするために本酵素が関与する研究は重要であり、事実、世界中で多くの研究が進められている。本総説では、CaMKII の遺伝子

発現と、CaMKII による突起伸展とシナプス機能調節に関する筆者の研究を中心に概説する。

2. CaMKII の遺伝子発現と選択的スプライシング

CaMKII の α と β アイソフォームは脳に特異的に存在し、生後の神経回路網形成の時期に一致して急速に誘導され、以降高濃度に維持される。^{5,11,14,22,23} この神経特異的遺伝子発現を調べるために、 α と β アイソフォームの遺伝子がクローニングされた。^{5,22} 両遺伝子ではエクソン構造はよく保存されていたが、イントロン構造には大きな違いがあった。また、プロモーター領域は共通性がほとんど見出されなかった。 α と β アイソフォームともに、転写開始部位の 5' 上流に神経特異的なプロモーター活性が存在することが明らかになった。^{5,20,21} β アイソフォームではプロモーターに結合する脳特異的なタンパク質が存在することが明らかとなった。⁵ これらのことから、CaMKII は脳特異的に、時間的空間的に遺伝子の発現が調節されることが明らかとなった。

2-1. 神経細胞特異的な選択的スプライシング
神経分化過程での CaMKII の発現を細胞レベルで

徳島文理大学薬学部衛生化学講座 (〒770-8514 徳島市山城町西浜傍 180)

e-mail: donai-do@ph.bunri-u.ac.jp

本総説は、平成 17 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

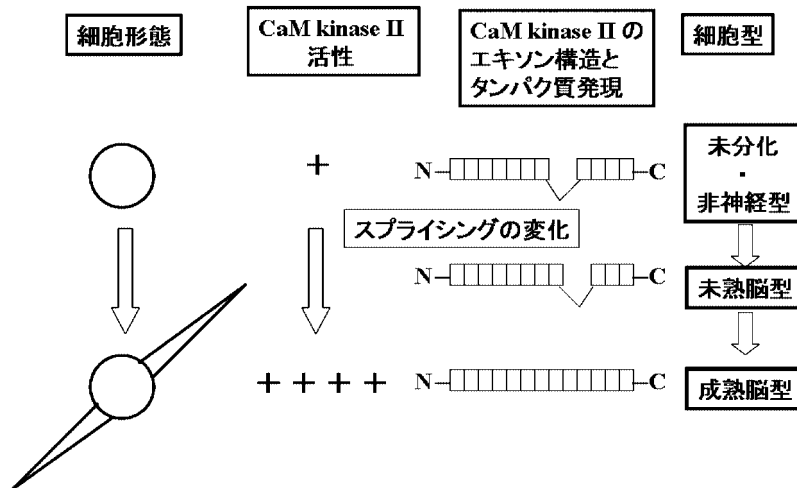


Fig. 1. Schematic Representation of Phenotypic Changes during Differentiation³⁰⁾
Changes in morphology, CaMKII activity, splicing pattern, and neuronal cell types are shown.

明らかにするために、神経分化のモデルとしてマウス胚性ガン細胞由来の P19 細胞を用いて発現解析した。⁴⁾ その結果、CaMKII の発現が神経分化過程で誘導され、分化した P19 細胞での酵素活性が、未分化細胞での約 8 倍まで増加することが明らかとなった。P19 細胞での CaMKII の主要なアイソフォームは δ であり、分化誘導の過程でスプライシングパターンが変化し、選択的スプライシング産物が多く存在した。⁴⁾ スプライシングは主に可変領域にみられ、 $\delta 1$ から $\delta 9$ まで 9 種類のアイソフォームが存在することが報告されている。神経細胞では、 $\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 4$ が知られているが、脳では $\delta 1$ が主である。生後間もない幼若ラットでは $\delta 4$ が多く、成熟すると $\delta 1$ に変化する。一方、培養細胞では、未分化では $\delta 2$ が主要であるが分化により $\delta 4$ が生成した。 δ アイソフォームのスプライシングは、神経細胞の分化過程で細胞の種類により異なる特異的な方法で調節されていると考えられる (Fig. 1)。分化した培養細胞では、未熟な中枢の性質を持っているようであった。このような選択的スプライシング産物の機能的役割は、現在のところ明らかになっていないが、神経分化や神経発生などの様々な神経機能調節と相互関係を示すものであると考えている。

3. PSD の構成成分の解析

PSD は中枢神経系 (CNS) のシナプス後膜の真下に存在し、無定形の構造をとり、シナプス伝達を中心となる部位であり、シナプス可塑性に重要な役割を果たしている。記憶・学習などの高次機能にお

ける活性依存的変化などの脳機能の最も興味深いメカニズムの手がかりが PSD にあると考えられているため、^{12,25,31)} PSD 構成成分を研究することは極めて重要である。CaMKII は大脳皮質や海馬の PSD の主要構成成分の 1 つである。^{7,10)} CaMKII は Ca^{2+} 、カルモデュリン存在下に自己リン酸化されると PSD に移行する。³²⁾ また、NMDA 受容体刺激によって生理的条件下で PSD に可逆的に移行することが示された。²⁶⁾ PSD に移行した CaMKII は、グルタミン酸受容体、膜タンパク質、細胞骨格タンパク質、アダプタータンパク質、酵素等の多くの PSD の機能タンパク質をリン酸化する。^{33,34)} したがって、CaMKII は後シナプスの Ca^{2+} レベルの上昇に応じてこれらのタンパク調節を通してシナプス伝達やシナプス可塑性を調節していると考えられる。

PSD の構成成分の研究は、多く行われているにも関わらず、Triton 可溶化 PSD 画分で約 100 種類のタンパク質が同定されたに過ぎず、^{6,9,12,13,23,29,30,35)} まだ同定されていない多くのタンパク質が存在すると思われる。PSD に存在する未知の構成成分を同定するため、液体クロマトグラフィー (LC) とマスマスペクトロメトリーを基礎としたタンパク同定



藤代 瞳

徳島文理大学薬学部助手 (2004 年より)。1976 年徳島県生まれ。神戸学院大学卒業。徳島大学大学院薬学研究科博士前期課程 (生化学研究室・山内卓教授) 修了。1 年間アース・バイオケミカル 勤務後、2 年間で徳島大学大学院博士後期課程修了 (2004 年)。

システムを用いて PSD 画分の構成タンパク質を詳細に解析した。PSD タンパク質をプロテオミクスの手法で MS/MS により分析し、5264 ペプチドが同定され、全体として 492 種類のタンパク質が同定された。この結果は、これまで明らかにされたほとんどのタンパク質を同定するとともに新たに 300 種類以上のタンパク質を同定し、PSD 構成タンパク質の全体像が明らかとなった。³³⁾ また、マスマスペクトロメトリーに基づくプロテオミクス分析により同様の結果が報告されている。²⁴⁾

これらのタンパク質を機能別に分類すると、シグナル伝達に関わるタンパク質が 137 種類、構造タンパク質が 129 種類、細胞代謝に関わるタンパク質が 117 種類、前シナプスのタンパク質が 17 種類、未知又は推測に基づくタンパク質が 72 種類、グリア細胞や血液等の神経以外の細胞由来のタンパク質が 20 種類であった (Fig. 2)。これらの結果から PSD の主要な構成要素はシグナル伝達分子と構造タンパク質であることが明らかとなった。本研究で同定されたタンパク質は、PSD 画分のタンパク質構成の全体像を理解する上で重要な知見を与える。

PSD では主としてグルタミン酸を介するシグナル伝達が目ざされているが、シグナル伝達に関わる分子が多数同定されたことから、シナプス後細胞の PSD から細胞内への未知のシグナル伝達経路やそれらのクロストークの経路が存在することが示唆される。これらのシグナル伝達経路の分子メカニズムを明らかにすることにより、記憶・学習を始め脳の高次機能調節が解明されると考えられる。

4. PSD における CaMKII に対する Arc の作用

4-1. PSD における CaMKII と Arc について
シナプス後細胞の樹状突起に mRNA が存在し、神経刺激に伴いタンパク質に翻訳されることがシナプス可塑性に関連することが報告されている。¹⁷⁻¹⁹⁾ CaMKII や Arc, MAP2 の mRNA は大脳皮質や海馬神経の樹状突起に存在することが知られている。^{1,2,16)} Arc は、前初期遺伝子群 (Immediated early genes: IEGs) の 1 つであり、発作発生時に急激に発現する物質として同定された。IEGs は、細胞増殖因子やホルモン、神経伝達物質などの刺激にตอบสนองして一過性に発現が誘導される転写因子などをコードしており、一般的に刺激後、細胞内で急速に発現し、直接発現誘導される。長期記憶には、

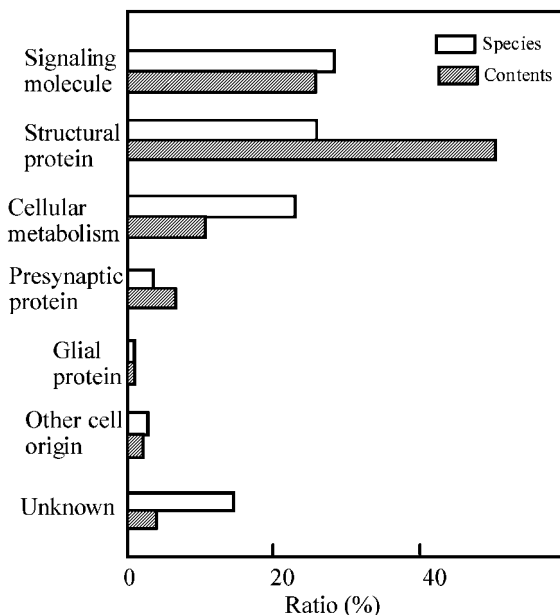


Fig. 2. Classification of Proteins in the PSD Fraction

Grouping of PSD proteins based on their contents calculated from the data of Yoshimura et al.³⁴⁾ Protein constituents of the PSD fraction were analysed using 2DLC-MS/MS system. The PSD fraction prepared from rat forebrain. PSD is particularly rich in cell signaling proteins and in structural proteins. white bar: species, striped bar: contents.

Long term potentiation (LTP) などのシナプス可塑性が関与しているとされており、その形成は mRNA の翻訳によるタンパク質の合成や神経の構造変化を必要としている。そのために IEGs の発現による活性依存的変化は、シナプス可塑性を引き起こす可能性がある。Arc は知られている IEGs 転写因子と異なり細胞質タンパク質であり、ラットの脳に電気刺激を与えるとその mRNA は海馬に多く発現し、細胞の樹状突起に急速に分布する。^{15,16)} また、Arc gene のノックアウトマウスでは空間学習の欠失が報告されている。⁸⁾ これらのことから Arc はシナプス可塑性発現に必要であると考えられているが、その役割や調節は明らかにされていない。Arc は CaMKII や PKC によってリン酸化される部位が存在することから、¹⁶⁾ Arc と CaMKII が相互作用する可能性が考えられる。

4-2. Arc の PSD における局在 Arc タンパク質は、シナプス接合部に最も高レベルに存在することが報告されているが、²⁷⁾ Arc が PSD に局在するかどうか明らかになっていなかった。ラット大脳をショ糖濃度勾配により細胞分画を行い、Arc の分布イムノブロットで解析した結果、PSD 画分に高度

に蓄積されており、 α CaMKII も PSD 画分で高度に濃縮されて存在することが明らかとなった (Fig. 3).⁶⁾ また、ラット脳に電気刺激を与えた結果、PSD での Arc タンパク質が増加した。Arc は刺激後 30 分以内に PSD 画分で約 2.5 倍に増加し、8 時間高レベルを維持した (Fig. 3)。シナプス刺激後 30 分以内に mRNA が翻訳され、Arc が誘導されて PSD に蓄積すると考えられる。このことは、新しく合成された Arc タンパク質が PSD に蓄積することを初めて示したものである。また、CaMKII のレベルは、PSD 画分で 30 分以内はかなり増加し、刺激後少なくとも 24 時間は高レベルを維持した (Fig. 3)。PSD における CaMKII の増加は、細胞質からの移行によると考えられる。^{28,32)} PSD の NMDA-受容体 2B サブユニットは刺激処理によって変化がなかった。これらの結果は、シナプスの活動に伴って CaMKII と Arc が相互作用する可能性を示している。

4-3. CaMKII による突起伸展 CaMKII が神経芽細胞 Nb2a において神経突起伸展を起こすことが既に分かっている。由来の異なる神経細胞 CAD でも同様の効果がみられた。CAD 細胞では分化に伴い CaMKII が誘導され、細胞の形態が変化し突起が著しく伸展した。³⁾ また CaMKII を細胞に導入した場合でも突起伸展が起こる。神経突起形成は様々な刺激に応じた Ca^{2+} の流入によって引き起こされ、CaMKII が細胞において突起伸展を起こす。神経細胞の運動性の研究モデルとして、CaMKII に対

する Arc の効果を調べるために細胞形態変化の指標として突起伸展を調べた。

4-4. CaMKII と Arc の相互作用 CaMKII と Arc の mRNA が樹状突起に存在すること、及び両者が神経刺激後 PSD に濃縮されることから、CaMKII と Arc の相互作用を調べるため GST プルダウン法を用いた。GST-Arc と CaMKII を作用させ、グルタチオンセファロースを用いて沈降させ、沈殿のイムノブロットにより CaMKII を検出した。ついで、CaMKII を発現する細胞に Arc を導入し、同様に免疫沈降法により調べた。その結果、Arc が神経芽細胞内で CaMKII と相互作用していることが明らかになった。⁶⁾

CaMKII が突起伸展作用を持つため、CaMKII を発現する神経芽細胞 Nb2a は親株の Nb2a 細胞に比べて少し突起伸展した。この細胞に GFP 融合 Arc を導入し、CaMKII の突起伸展に及ぼす効果を調べた。CaMKII と Arc の両方を発現している細胞は、Arc を発現していない細胞に比べてより長い神経突起を示した。またこの長い突起の形成は、CaMKII の阻害剤である KN62 により、完全に抑制された。Arc のみを導入したとき、細胞は形態変化せず突起を持たなかった。これらの結果は、Arc は CaMKII と相互作用し、神経突起伸展における CaMKII の作用を増強することを示している。Arc はアクチン繊維と相互作用すると報告されているが、¹⁶⁾ PSD の存在する樹状突起の運動性はアクチン繊維により制御されている。したがって、Arc が CaMKII の突

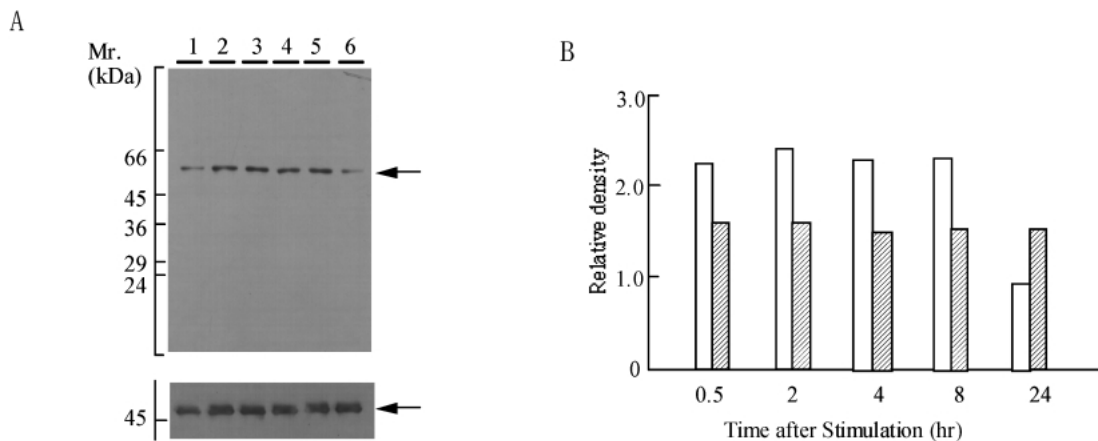


Fig. 3. Accumulation of Arc and CaMKII in PSD after Electroconvulsive Treatment⁶⁾

A: At appropriate intervals after the electrical stimulation, the brains were removed. Then the PSD fraction was purified and subjected to SDS-PAGE and immunoblotting. B: Bar graphs summarize the relative density of the bands.

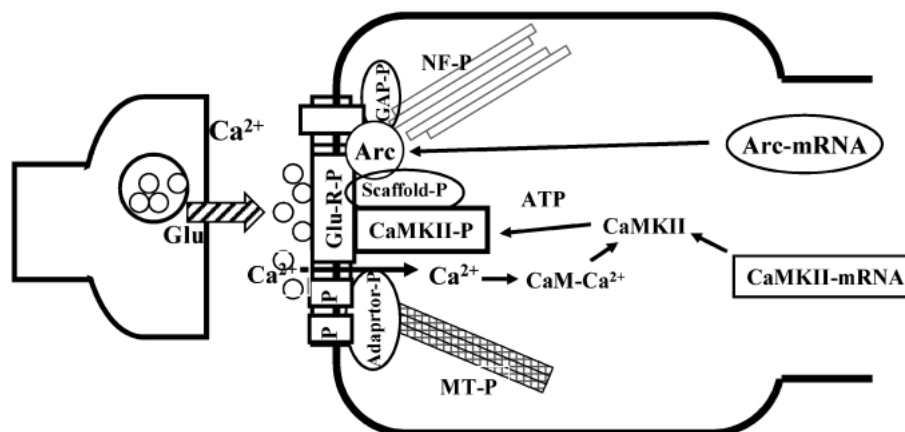


Fig. 4. Schematic Representation of the Regulation of PSD and Postsynaptic Signaling by CaMKII

When a nerve impulse reaches nerve terminals and local Ca^{2+} increases, glutamate is released into the synaptic cleft. Glutamate binds to the NMDA receptor, and Ca^{2+} enters postsynaptic cells. Ca^{2+} binds calmodulin and activates CaMKII. The activated CaMKII is autophosphorylated at Thr286 and translocated to the PSD, and then phosphorylates various proteins in postsynaptic cells. Arc potentiates CaMKII function. Phosphorylated proteins change their activity and regulate signaling pathways, and then new synapses are found, resulting in a change of synaptic activity. CaMKII: CaM kinase II, GAP: GTPase activating protein, MT: microtubule, NF: neurofilament.

起伸展作用を増強することは、樹状突起の運動性がアクチン繊維の機能制御を介して調節されることを考え合わせると、ArcとCaMKIIは細胞骨格の機能調節を行うことによりシナプス可塑性に重要な役割を担っている可能性が考えられる。

5. おわりに

記憶・学習のような高次神経機能を分子レベルで理解するために、筆者はCaMKIIを中心として解析した。CaMKIIは脳の発達過程で、神経特異的なプロモーターの働きにより誘導され、タンパク質は神経伝達の中心部位のPSDにも濃縮され、Arcにより作用が増強されることを明らかにした。このように、CaMKIIがPSDの機能調節において重要な役割を担うと考えられる (Fig. 4)。CaMKIIを中心としたシグナル伝達経路の分子メカニズムを明らかにすることにより、シナプス可塑性のメカニズムを解明することこそ、脳の謎に迫る一歩となると考えられる。

謝辞 本研究は徳島大学大学院薬学研究科において実施したものであり、研究の遂行にあたり始終、ご指導ご鞭撻賜りました山内 卓教授 (徳島大学大学院バイオヘルス研究部) に心より感謝致します。

REFERENCES

1) Bennett M. K., Erond N. E., Kennedy M. B.,

J. Biol. Chem., **258**, 12735–12744 (1983).

2) Bennett M. K., Kennedy M. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 1794–1798 (1987).

3) Donai H., Nakamura M., Sogawa Y., Wang J. K., Urushihara M., Yamauchi T., *Neurosci. Lett.*, **293**, 111–114 (2000).

4) Donai H., Murakami T., Amano T., Sogawa Y., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **85**, 189–199 (2000).

5) Donai H., Morinaga H., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **94**, 35–47 (2001).

6) Donai H., Sugiura H., Ara D., Yoshimura Y., Yamagata K., Yamauchi T., *Neurosci. Res.*, **47**(4), 399–408 (2003).

7) Goldenring J. R., McGuire Jr. J. S., DeLorenzo R. J., *J. Neurochem.*, **42**, 1077–1084 (1984).

8) Guzowski J. F., Lyford G. L., Stevenson G. D., Houston F. P., McLaugh J. L., Worley P. F., Barnes C. A., *J. Neurosci.*, **20**, 3993–4001 (2000).

9) Husi H., Ward M. A., Choudhary J. S., Blackstock W. P., Grant S. G. N., *Nature Neurosci.*, **3**, 661–669 (2000).

10) Kelly P. T., McGuinness T. L., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 945–949 (1984).

11) Kelly P. T., Shields S., Conway K., Yip R., Burgin K., *J. Neurochem.*, **49**, 1927–1940 (1987).

- 12) Kennedy M. B., *Brain Res. Rev.*, **26**, 243–257 (1998).
- 13) Langnaese K., Seidenbecher C., Wex H., Seidel B., Hartung K., Appeltauer U., Garner A., Voss B., Mueller B., Garner C. C., Gundelfinger E. D., *Mol. Brain Res.*, **42**, 118–122 (1996).
- 14) Lin C. R., Kapiloff M. S., Durgerian S., Tatemoto K., Russo A. F., Hanson P., Schulman H., Rosenfeld M. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5962–5966 (1987).
- 15) Link W., Konietzko U., Kauselmann G., Krug M., Schwanke B., Frey U., Kuhl D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5734–5738 (1995).
- 16) Lyford G. L., Yamagata K., Kaufmann W. E., Barnes C. A., Sanders L. K., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Lanahan A. A., Worley P. F., *Neuron*, **14**, 433–445 (1995).
- 17) Mayer P., Mohlig M., Schatz H., Pfeiffer A., *Biochem. J.*, **298**, 757–758 (1994).
- 18) Mazzucchelli C., Vantaggiato C., Ciamei A., Fasano S., Pakhotin P., Krezel W., Welzi H., Wolfer D. P., Pages G., Valverde O., Marowsky A., Porrazzo A., Orban P. C., Maldonado R., Ehrenguber M. U., Cestari V., Lipp H.-P., Chapman P. F., Pouyssegur J., Brambilla R., *Neuron*, **34**, 807–820 (2002).
- 19) McGuinness T. L., Lai Y., Greengard P., *J. Biol. Chem.*, **260**, 1696–1704 (1985).
- 20) Mima K., Deguchi S., Yamauchi T., *Neurosci. Lett.*, **307**, 117–121 (2001).
- 21) Mima K., Donai H., Yamauchi T., *Biol. Proced. Online*, **3**, 79–90 (2002).
- 22) Nishioka N., Shiojiri M., Kadota S., Morinaga H., Kuwahara J., Arakawa T., Yamamoto S., Yamauchi T., *FEBS Lett.*, **396**, 333–336 (1996).
- 23) Ochiishi T., Terashima T., Yamauchi T., *Brain Reseach*, **659**, 179–193 (1994).
- 24) Peng J., Kim M. J., Cheng D., Duong D. M., Gygi S. P., Sheng M., *J. Boil. Chem.*, **279**, 21003–21011 (2004).
- 25) Sheng M., Sala C., *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 1–29 (2001).
- 26) Sogawa Y., Yoshimura Y., Otaka A., Yamauchi T., *Brain Res.*, **881**, 165–175 (2000).
- 27) Strack S., Choi S., Lovinger D. M., Colbran R. J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 13467–13470 (1997).
- 28) Tobimatsu T., Fujisawa H., *J. Biol. Chem.*, **264**, 17907–17912 (1989).
- 29) Walsh M. J., Kuruc N., *J. Neurochem.*, **59**, 667–678 (1992).
- 30) Yamauchi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**(8), 1342–1354 (2005).
- 31) Yoshimura Y., Yamauchi T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 26354–26359 (1997).
- 32) Yoshimura Y., Aoi C., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **81**, 118–128 (2000).
- 33) Yoshimura Y., Nomura T., Yamauchi T., *J. Biochem.*, **119**, 268–273 (1996).
- 34) Yoshimura Y., Yamauchi Y., Shimkawa T., Taoka M., Donai H., Takahashi N., Isobe T., Yamauchi T., *J. Neurochem.*, **88**, 759–768 (2004).
- 35) Ziff E. B., *Neuron*, **19**, 1163–1174 (1997).