

カムキナーゼ II から記憶・学習の分子的基盤へ

山内 卓

**Molecular Mechanism of Learning and Memory Based on the Research for
Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II**

Takashi YAMAUCHI

*Institute of Health Biosciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokushima,
1 Shomachi, Tokushima City 770-8505, Japan*

(Received March 30, 2007)

In the central nervous system (CNS), the synapse is a specialized junctional complex by which axons and dendrites emerging from different neuron intercommunicates. Changes in the efficiency of synaptic transmission are important for a number of aspects of neural function. Much has been learned about the activity-dependent synaptic modifications that are thought to underlie memory storage, but the mechanism by which these modifications are stored remains unclear. Thus, it is important to find and characterize “memory molecules,” and “memory apparatus or memory forming apparatus.” A good candidate for the storage mechanism is Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II). CaM kinase II is one of the most prominent protein kinases, present in essentially every tissue but most concentrated in the brain. Neuronal CaM kinase II regulates important neuronal functions, including neurotransmitter synthesis, neurotransmitter release, modulation of ion channel activity, cellular transport, cell morphology and neurite extension, synaptic plasticity, learning and memory, and gene expression. Studies concerning this kinase open a door of the molecular basis of nerve function, especially learning and memory, and indicate one direction for the studies in the field of neuroscience. This review presents molecular structure, properties and functions of CaM kinase II, as a major component of neuron, which are mainly developed in our laboratory.

Key words—learning・memory; protein phosphorylation; synapse; Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II); Ca²⁺ signaling; postsynaptic density

1. はじめに

ヒトの学習、記憶、思考、情動行動に対する脳の働きほど興味をそそられるものはない。これらの神経活動は神経細胞と神経細胞の間で形成される神経回路網（神経ネットワーク, Neural network）によって営まれると考えられている。21世紀は脳の世紀と位置付けられ、記憶・学習に関する多くの研究が推進されている。記憶・学習等の高次脳機能を分子の働きとして理解するために、「記憶分子」、「記憶装置」、「記憶形成装置」、あるいは、「可塑性装置」の本体と分子構成及びその調節機構を明らかにすることが重要である。中枢神経では、神経の情報は基

本的には神経細胞から神経細胞へシナプスにおいて伝達物質により伝達される。シナプスは、軸索の終末と樹状突起の間に形成される特殊な伝達装置である（Fig. 1）。実際は中枢神経では1つの神経細胞は約1000個のシナプスを形成しており、複雑なネットワークを形成し、多くの情報伝達を行うことができるが、個々のシナプス伝達や活動電位の伝達は共通のメカニズムが存在する。神経細胞の働きは、刺激に応じてシナプス伝達効率を変化させることにより全身の機能調節に係わっている。シナプスの一時的な変化は短期記憶と関連し、長期間の変化は長期記憶と関連する。学習過程で現れる神経可塑性において樹状突起のスパインが増加しシナプス後肥厚が増加し、新しいシナプスが形成される（Fig. 2 (A)）。¹⁾ 神経細胞は生後、普通の条件では細胞数を増加させないで突起を伸ばし、急速にシナプスを形成する。シナプス形成により神経細胞同士の連絡が

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・薬学部（〒770-8505 徳島市庄町1丁目）

e-mail: yamauchi@tmin.ac.jp

本総説は、平成18年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

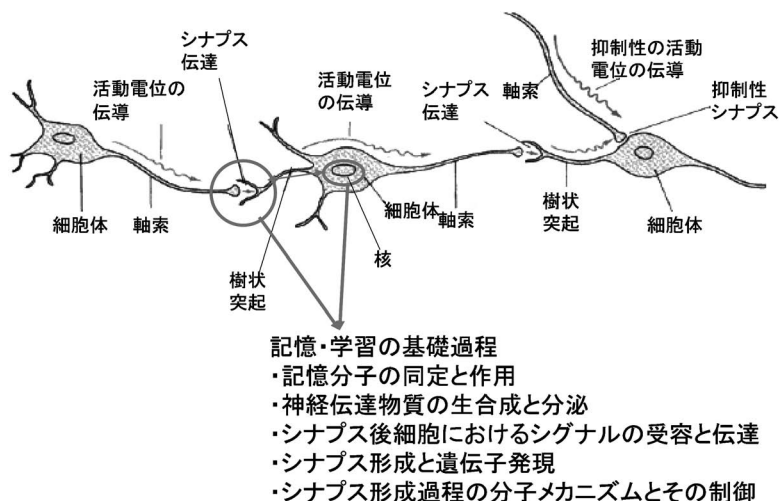


Fig. 1. Schematic Presentation of Neural Transmission of Neural Network and Research Objective of Learning and Memory

Nerve impulse transmits in axon of the neuron shown in the left, through the neuron shown in center, and then reaches to the neuron shown in the right. Each neuron is connected with synapse, and nerve impulse is transmitted to one-way by neurotransmitter. When the neuron shown in the right receives inhibitory signal, nerve impulse is not transmitted. In the brain, one neuron has about 1000 synapses, and forms complex neural network. There are common molecular mechanisms in transmission of nerve impulse and in synaptic transmission of various neurons. Synaptic transmission, signal transduction from synapse to nuclei, gene expression of signaling molecules, and the formation of new synapse are the major objective for studying on the molecular basis of learning and memory.

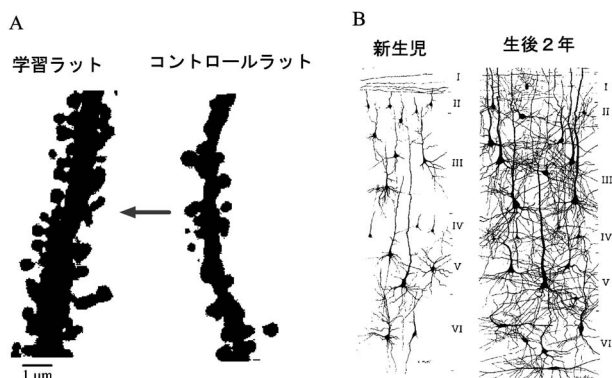


Fig. 2. Increase in Dendrite Spine by Learning and Formation of Neural Network during Brain Development

A: Increase in dendrite spine by learning (1). Spatial training in Morris water maze task of adult rats is associated with an increasing spine density on CA1 pyramidal cells. Increasing in spine number means increase in the synapse with presynaptic terminals (not shown in the photograph). The trained animals also show increasing learning ability. Data shows a photograph on laser-scanning confocal microscopy of cells injected with Lucifer yellow. B: formation of neural network during human brain development (2). Golgi staining of the brain at newborn (left) and 2 year old (right) is shown. Increasing in the staining indicates the increase in neural network, because the number of neuron does not change after birth in general, I to VI, layer in forebrain.

密になり、神経ネットワークを形成する。神経ネットワークの形成により脳の働きが活発となり全身の機能が発達する (Fig. 2(B)).²⁾ このようなシナプス可塑性 (synaptic plasticity) は、シナプスの伝達効率あるいはシナプスの形状が、シナプスの活動によって持続的に変化することである。伝達効率の変

化は、一定のシグナルが通ったあとに、持続的に増大する長期増強 (LTP, long-term potentiation) と、減弱する長期抑圧 (LTD, long-term depression) の現象として実験的に観察される。シナプス可塑性の機能的意義は、1) 記憶・学習の基礎過程、2) 生後の環境への脳機能の適応変化、3) 脳の部分損傷のちに起こる神経回路機能の変化、などである。

筆者は、この脳の機能を分子レベルで明らかにしようと考え、神経伝達物質であるカテコールアミンやセロトニンの生合成の調節機構を解析することから研究を開始した。カテコールアミンやセロトニンの生合成はその律速酵素がリン酸化により活性調節されることにより行われることを見出した。さらにこの研究の過程で、新しい分子 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (カムキナーゼ II) を発見をしたことから研究が発展した。カムキナーゼ II は脳では現在知られているプロテインキナー



山内 卓

1941 年生まれ。京都府出身。1965 年京都大学薬学部卒業、1970 年同大学院薬学研究科博士課程修了。1970 年京都大学医学部研究員、1973 年旭川医科大学医学部講師、1975 年同助教授、1987 年東京都神経科学総合研究所副参事研究員。1993 年徳島大学薬学部教授、2004 年同徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授。2007 年東京都神経科学総合研究所客員研究員。

ぜの中で最も多量に存在し、基質特異性が広く脳の多くのタンパク質をリン酸化することから、その作用は広く、神経伝達物質の生合成と分泌、物質輸送、イオンチャンネル機能、細胞の形態形成、シナプス可塑性、記憶・学習、遺伝子発現、等に関与する。現在では、本酵素が「記憶分子」そのものであることが証明され、記憶・学習のような高次神経活動が分子の働きとして理解できる足掛かりが得られたと考えられる。したがって、その他多くの記憶分子を明らかにするとともに、「記憶装置」、「記憶形成装置」、あるいは、「可塑性装置」の本体と分子構成及びその調節機構を明らかにすることが重要である。本総説では、カムキナーゼ II の発見から 4 半世紀以上に亘る本酵素に関する研究を通して記憶・学習の一連の分子過程の理解に向けた筆者の研究を中心として紹介する。本研究の一部は最近の筆者の総説でも紹介した。^{3,4)}

2. カムキナーゼ II の発見

2-1. 脳におけるカルモデュリン依存性リン酸化
神経伝達物質であるカテコールアミンとセロトニンはそれぞれアミノ酸のチロシンとトリプトファンから Fig. 3 に示す経路で生合成される。この生合成

の最初の段階を触媒するチロシン水酸化酵素及びトリプトファン水酸化酵素が生合成の律速酵素であり、複雑な活性調節を受ける。両酵素は芳香族アミノ酸を基質とし、プテリジンを補酵素とする一原子酸素添加酵素であり類似した性質を持つ。この律速酵素の活性調節によりカテコールアミンとセロトニンの合成量が調節される。チロシン水酸化酵素が ATP 存在下に cAMP 依存性プロテインキナーゼによるリン酸化により活性化される可能性が 1974 年に初めて報告された。⁵⁾ この研究を契機として、神経組織におけるタンパク質リン酸化の重要性が認識された。タンパク質リン酸化・脱リン酸化はシグナル伝達調節における主要なメカニズムであり、すべての細胞に備わっている調節機構である (Fig. 4 (A))。神経組織においても、多くの組織と同様に細胞外の刺激に応答してタンパク質リン酸化反応が誘導される。

筆者は脳と副腎髄質のチロシン水酸化酵素及び脳のトリプトファン水酸化酵素の活性調節を調べ、cAMP と Ca²⁺ による活性化を比較すると、2 つの酵素で活性化の様式が異なることを見出した (Table 1)。副腎髄質はアドレナリンを分泌する内分泌

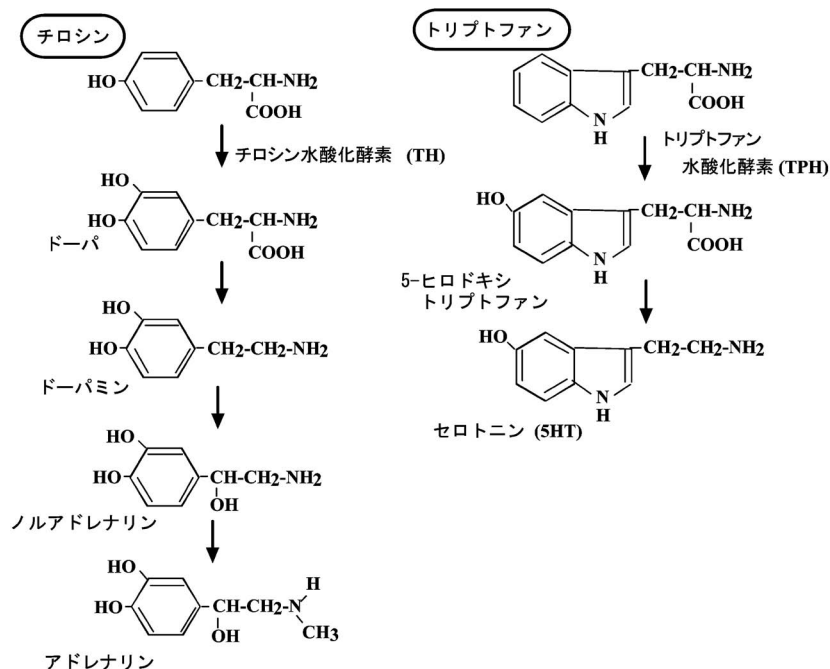


Fig. 3. Biosynthesis of Catecholamine and Serotonin

Catecholamine (dopamine, noradrenalin, and adrenalin) is synthesized from amino acid tyrosine, and serotonin (5HT) is synthesized from amino acid tryptophan. Tyrosine hydroxylase (TH) and tryptophan hydroxylase (TPH) are rate limiting enzymes of biosynthesis of these monoamines and are regulated by complex regulatory mechanisms. TH and TPH are a family of monooxygenase required pteridine coenzyme, and have similar enzymatic properties.

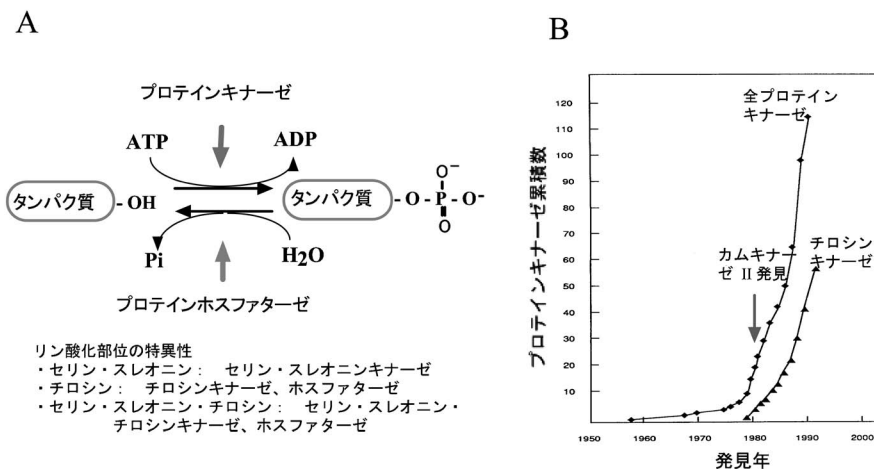


Fig. 4. Protein Phosphorylation Cycle and Cumulative Total of Mammalian of Protein Kinases

A: Protein phosphorylation cycle. γ -Phosphate group of ATP is transferred and produced phosphoester bond to proteins at their serine, threonine and/or tyrosine residues by protein kinases. Phosphoester bonds of phosphoprotein are hydrolyzed by protein phosphatase resulted in the dephosphorylation of phosphoprotein. B: The cumulative total of mammalian protein kinases reported since 1959.¹⁵⁾ The line labeled "Total protein kinases" represents the sum of protein serine/threonine and protein tyrosine kinases. Phosphorylase kinase is identified as protein kinase for the first time in the 1950's, and Src kinase is found as tyrosine kinase for the first time in the letter 1970's. CaM kinase II is reported in 1980.

Table 1. Effect of cAMP and Ca^{2+} on the Activation of Tyrosine Hydroxylase and Tryptophan Hydroxylase in the Presence of ATP

Tissue	Enzyme	cAMP ^{a)}	Ca^{2+} ^{a)}
Brainstem	Tyrosine hydroxylase	Activation	Activation
	Tryptophan hydroxylase	No activation	Activation
Adrenal medulla activation	Tyrosine hydroxylase	Activation	No activation

^{a)} Activation of enzyme by cAMP is required with ATP and Mg^{2+} as well as cAMP, and activation of enzyme by Ca^{2+} is required with calmodulin, ATP and Mg^{2+} as well as Ca^{2+} .

組織であるが、交感神経のアドレナリンやノルアドレナリン作動性神経の終末のモデル系としてよく使用されている。筆者はチロシン水酸化酵素のcAMPによる活性化はcAMP依存性プロテインキナーゼによるリン酸化によることを初めて証明した。⁶⁻⁸⁾一方、 Ca^{2+} による活性化にはATPとカルモデュリンが必要であり、 Ca^{2+} とカルモデュリン依存性のプロテインキナーゼが関与する可能性を見出した。⁹⁻¹¹⁾さらに、脳では内在性のタンパク質リン酸化活性は他の組織に比べて著しく高いこと、 Ca^{2+} 依存性リン酸化活性の大部分が Ca^{2+} 結合タンパク質のカルモデュリンに依存することを見出した。^{9,12)}当時は、 Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼとしては基質特異性の厳密なホスホリラーゼキナーゼとミオシン軽鎖キナーゼの2種類しか知られていなかったことから、新しい Ca^{2+} とカルモデュリン依存性のプロテインキナーゼが存在することが考えられた。

2-2. カムキナーゼ II の同定 脳のトリプトファン水酸化酵素の活性化を指標として、 Ca^{2+} とカルモデュリン依存性のプロテインキナーゼの探索を行い、1980年に新しい Ca^{2+} /カルモデュリン依存性のプロテインキナーゼとしてカムキナーゼ II が発見された。¹³⁾ラット大脳の抽出液からカルモデュリンのアフィニティークロマトグラフィーでカルモデュリン結合タンパク質を分離し、ゲルろ過により酵素を分画し、種々の基質タンパク質を用いて活性測定すると、分子量の異なる3種類の Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼが分離された (Fig. 5 (Left)). 溶出順に番号を付け、第2番目のピークとして分子量約500 kDaの Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼがトリプトファン水酸化酵素を活性化する新しいキナーゼであり、これがカムキナーゼ II である。ピーク I はホスホリラーゼキナーゼで分子量約1000 kDaであり、ピーク III はミオシン軽鎖やカゼインをリン酸化する活

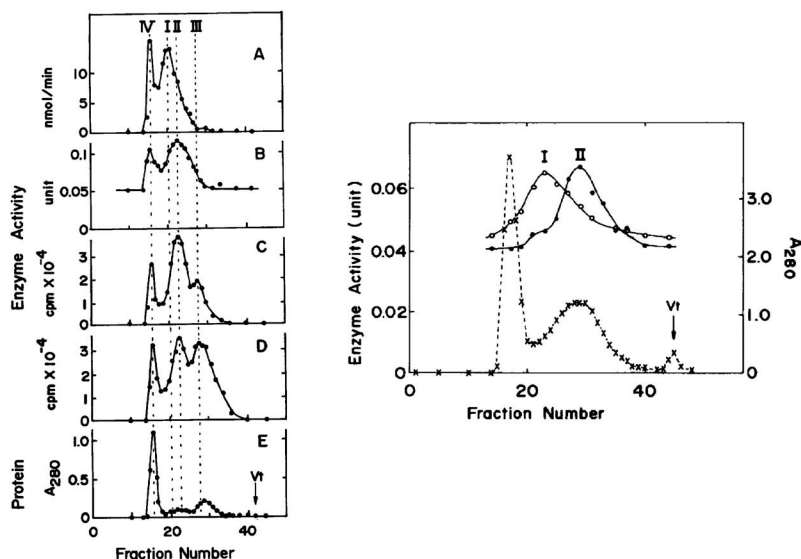


Fig. 5. Identification of CaM Kinase II and New Activator Protein

Left: Identification of CaM kinase II by gel filtration on Sepharose CL-6B column.¹³⁾ Calmodulin binding proteins from rat forebrain are fractionated by gel filtration, and protein kinase activity is assayed using various proteins as a substrate. A: phosphorylase kinase activity, B: CaM kinase II activity, C: casein kinase activity, D: myosin light chain kinase activity, E: protein, vt, column volume. Right: Resolution of activating activity of tryptophan hydroxylase into two components on Sepharose CL-6B.¹⁶⁾ o: each fraction is assayed in the presence of fraction II, ●: each fraction is assayed in the presence of fraction I, x: A280. Fraction I: CaM kinase II; Fraction II: activator protein, vt: column volume.

性を持つ分子量約 100 kDa の Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼであり、従来知られている基質特異性の厳密なミオシン軽鎖キナーゼとは異なる新しい酵素である。ピーク IV は素通り画分に溶出されるキナーゼの混合物である。

カムキナーゼ II は活性に Ca^{2+} とカルモデュリンを必須とする代表的なセリン・スレオニンプロテインキナーゼであり、脳に特異的に多量に存在する。¹⁴⁾ ゲノムプロジェクトの成果により、遺伝子配列から現在では約 520 種類のプロテインキナーゼが存在することが明らかとなったが、カムキナーゼ II はプロテインキナーゼとしては比較的早く発見された酵素である (Fig. 4B)。¹⁵⁾

Ca^{2+} は神経機能調節に重要であり、細胞内の濃度は低く保持され、神経刺激により急激に上昇することによりシグナルが伝達される。 Ca^{2+} はカルモデュリンに結合し様々な分子を活性化するが、カルモデュリンの主要な標的タンパク質はカムキナーゼ II である。

3. 新しい二段階の酵素活性調節機構

3-1. 新しい活性化タンパク質 カムキナーゼ II の機能は、ATP, Mg^{2+} , Ca^{2+} 及びカルモデュリン存在下でトリプトファン水酸化酵素を活性化することで初めて明らかになった。⁹⁾ この活性化には 2

つのタンパク質が関与することが分かり、ゲルろ過クロマトで 2 つのピークとして分離された。分子量の大きな先に溶出されるピークはカムキナーゼ II であり、あとに溶出されるピークは、熱に不安定な新しい活性化タンパク質であった (Fig. 5 (Right)).^{17,18)} この新しい活性化タンパク質をラット脳からカルモデュリンアフィニティークロマト、ゲルろ過クロマト、フェニルセファロスクロマトにより均一に精製し、その性質を明らかにした。活性化タンパク質は分子量約 35 kDa のサブユニットからなる 2 量体で、酸性アミノ酸を多く持つ酸性タンパク質であり、ほとんどすべての組織に比較的高濃度に存在し広く分布する。このことから、活性化タンパク質はチロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の活性化以外の役割を果たすことが考えられた。

3-2. カムキナーゼ II によるリン酸化に続く活性化タンパク質による活性化 カムキナーゼ II によるチロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の活性化を調べると、最初に、これらの水酸化酵素がカムキナーゼ II によりリン酸化されることが必要であるが、リン酸化されただけでは活性化されない。ついで、リン酸化された酵素がもう 1 つの新しい活性化タンパク質に結合することにより活性化

されるという、全く新しい酵素の調節機構、すなわち「二段階の酵素活性調節機構」により活性化することが明らかとなった (Fig. 6).^{16,17)} 従来は、リン酸化による活性調節は、チロシン水酸化酵素の活性化のように、PKA によるリン酸化と同時に活性化することが一般的であった。その後、別の研究室で脳から 14-3-3 タンパク質が精製され、そのアミノ酸組成が活性化タンパク質と類似することが分かり、トリプトファン水酸化酵素の活性化を指標に調べた結果、活性化タンパク質と 14-3-3 タンパク質とは同じタンパク質であることが明らかとなった。¹⁸⁾ 14-3-3 タンパク質は様々なタンパク質のリン酸化部位に結合して機能調節する重要な分子である。

4. カムキナーゼ II の性質

カムキナーゼ II は次のような際立った特徴を持ち、神経組織でシナプス伝達や可塑性に係わるほとんどすべての神経機能に重要な役割を果たしている (Fig. 7)。1) 脳において現在知られているプロテインキナーゼの中で最も多量に存在し、記憶・学習の中枢である海馬には特に多く、海馬の全タンパク質の約 2% も占める。2) 脳に特異的に存在し、生後の発達過程で時間的・空間的に発現が制御され、シナプス形成が最も活発な時期に部位特異的に発現が調節されている。3) 神経伝達の中心部位であるシナプス後肥厚の主要構成分子として機能しており、シナプス伝達や可塑性に重要な役割を担っている。4) 基質特異性が広く脳の多種類のタンパク質をリ

ン酸化することから、現在では記憶分子の 1 つと考えられており、多くの研究者により注目されている。5) 神経活動に伴い細胞内で上昇する Ca^{2+} により活性化されると、自分自身をリン酸化(自己リン酸化)し、 Ca^{2+} がなくても活性を持つ酵素 (Ca^{2+} 非依存性酵素、活性型酵素) に変換されるという Ca^{2+} による独特の活性調節機構を持ち、 Ca^{2+} シグナルの持続機構としての役割を持つ。カムキナーゼ II の特徴を Table 2 にまとめた。

4-1. カムキナーゼ II の精製 カムキナーゼ II

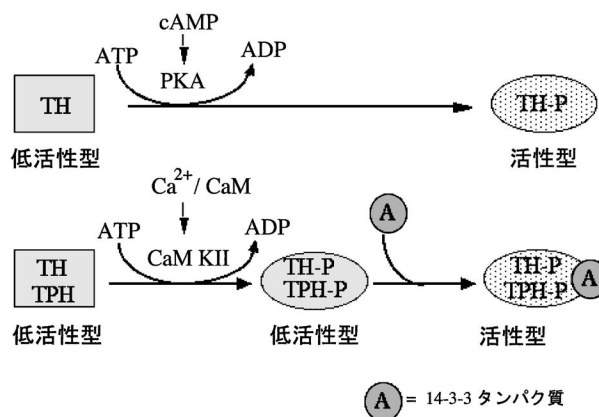


Fig. 6. Two Mechanisms of Activation of the Enzyme through Phosphorylation

Upper: one-step mechanism. Tyrosine hydroxylase (TH) is phosphorylated and simultaneously activated by PKA. Lower: two-step mechanism. First, TH and Tryptophan hydroxylase (TPH) are phosphorylated by CaM kinase II, and second, phosphorylated TH and TPH are activated by interaction with the activator protein. TH-P and TPH-P, phosphorylated forms of TH and TPH, respectively. A: activator/14-3-3 protein.

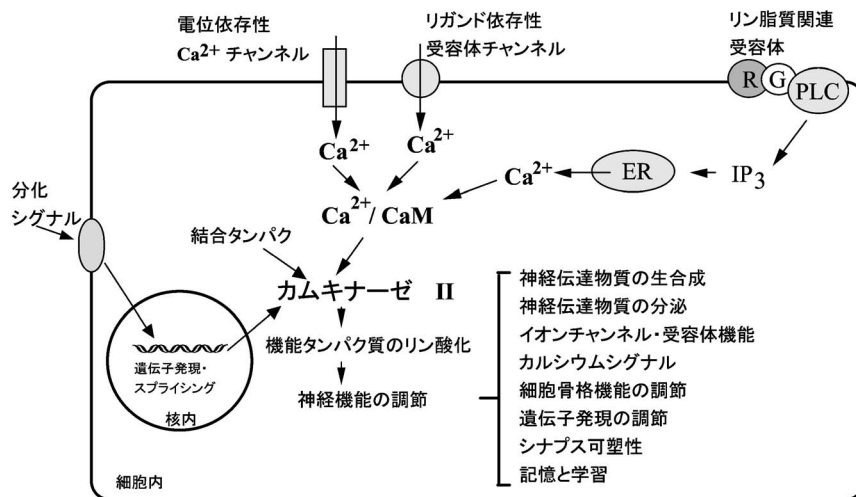


Fig. 7. Schematic Representation of Activation and Role of CaM Kinase II in Neuronal Cells³⁾

Intracellular Ca^{2+} is increased by extracellular stimuli, binds to calmodulin, and then activates CaM kinase II. CaM kinase II phosphorylates various kinds of proteins and regulates physiological processes. CaM kinase II protein is induced by the stimuli of differentiation.

Table 2. Characteristics of CaM Kinase II Molecule

- CaM kinase II is the protein kinase that is activated with Ca^{2+} and calmodulin.
- CaM kinase II is one of the most abundant protein kinases in the mammalian brain.
- CaM kinase II constitutes up to 2% of total protein in hippocampus, a memory center.
- CaM kinase II has been widely recognized as a memory molecule and plays the most important role in synaptic plasticity.
- CaM kinase II 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.
- CaM kinase II has broad substrate specificity and phosphorylates broad array of brain proteins.
- CaM kinase II is the major protein of the postsynaptic density (PSD), where it plays a key role in synaptic signaling.
- CaM kinase II is activated in the presence of Ca^{2+} and calmodulin, and then it has the ability to autophosphorylate, a process that confers Ca^{2+} -independent activity upon the kinase and greatly increases its affinity for calmodulin.
- The Ca^{2+} -independent activity of CaM kinase II prolonging the Ca^{2+} action transiently increased in response to nerve stimuli, involved in LTP, a basic process of learning and memory.
- CaM kinase II has a shape resembling that of a flower with 8 or 10 petals.
- CaM kinase II has four isoforms (α , β , γ , and δ), and α and β the two major isoforms expressed almost exclusively in the nervous system.
- CaM kinase II holoenzyme exists as a multimeric structure consisting of 8–10 subunits, with molecular mass 500–600 kDa.
- CaM kinase II phosphorylates Ser or Thr of the major consensus sequence RXXS/T, and also phosphorylates Ser or Thr of the sequence S/TXD, a completely different sequence from the major consensus site: S: serine, T: threonine, D: aspartic acid, X: any amino acid.

はラット大脳から硫酸分画，ゲルろ過クロマト，カルモデュリンアフィニティークロマト，P-セルロースイオン交換クロマトにより均一に精製され，性質が明らかにされた。¹⁹⁾

筆者らが発見したカムキナーゼ II と類似の酵素が，シナプシン，微小管タンパク質，グリコーゲン合成酵素キナーゼ等のリン酸化酵素として，脳や脳以外の組織から多数報告された。これらの酵素は分子量や基質特異性の点で解析が不十分のことから，しばらくは様々な名称で呼ばれていたが，それらはすべてカムキナーゼ II と同じ酵素やアイソフォームであることが明らかとなった。^{20–24)}

4-2. カムキナーゼ II cDNA クローニングと構造 カムキナーゼ II の cDNA はラット脳から α と β アイソフォームが最初にクローニングされた。 α は 5.1 kb mRNA にコードされ，478 アミノ酸から構成され分子量は 54 kDa である。²⁵⁾ β は 4.8 kb mRNA にコードされ，542 アミノ酸から構成され，分子量は 60 kDa である。²⁶⁾ 両アイソフォームは，触媒 (catalytic domain)，調節 (regulatory domain)，会合 (association domain) の 3 つの機能ドメインから構成される (Fig. 8(A)).²⁷⁾ ラットからは， γ と δ アイソフォームがクローニングされ，4 種類の異なる遺伝子産物が存在する。触媒ドメインには ATP 結合部位が存在し，調節ドメインには

カルモデュリン結合部位と自己リン酸化部位が存在する。自己リン酸化部位は触媒ドメインと相互作用することにより活性を抑制する自己阻害部位である。会合ドメインはサブユニットの会合に係わり多量体形成する。これらの各ドメインはアイソフォーム間で高度に保存され高い相同性を持つ。 α と β アイソフォームは脳に特異的に存在する。カムキナーゼ II のアイソフォームはそれぞれ選択的スプライシングにより異なるスプライス産物が存在する。筆者は， α と β アイソフォームの cDNA を培養細胞に導入することにより酵素活性が発現することを初めて見出した。²⁸⁾ また，大腸菌において触媒ドメインのみからなる活性型酵素の発現に成功し，²⁹⁾ さらに，酵素のいくつかの欠失変異体を用いた解析からカルモデュリン結合部位を明らかにした。³⁰⁾ 電子顕微鏡による解析から，分子は中央に 1 つの大きな中心顆粒を持ち，周囲に小さな周辺顆粒を 8–10 個持つ花のような特徴的な分子形態であることが明らかとなった。個々の周辺顆粒は触媒ドメインと調節ドメインを持ち，会合ドメインを介して重合する。 α は分子量約 50 kDa， β は約 60 kDa のサブユニットがそれぞれ 10 又は 8 個重合したオリゴマー構造を取る (Fig. 8(B)).³¹⁾

ショウジョウバエでは 1 個の遺伝子からスプライシングの異なるアイソフォームが生成する。^{32,33)} そ

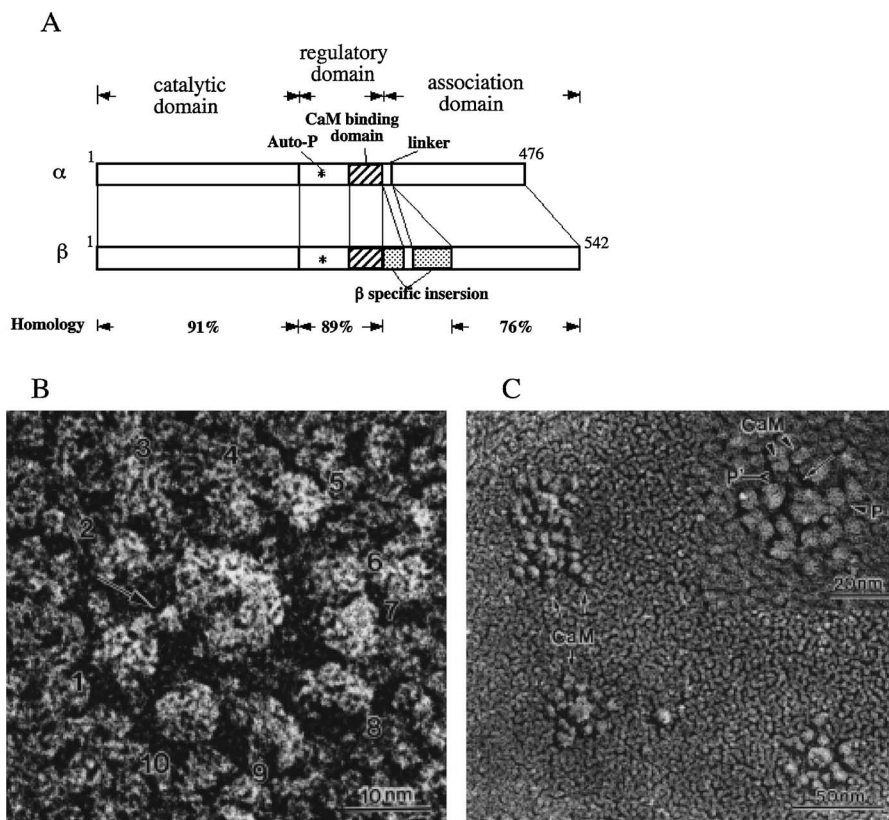


Fig. 8. Structure of CaM Kinase II

A: domain structure of α and β CaM kinase II. CaM kinase II is composed of three distinct functional domains, catalytic, regulatory, and association domains. α and β isoforms are highly conserved. B: a high magnification electron micrograph of α CaM kinase II having 10 peripheral particles.³¹⁾ An arrow indicates a thin projection linking peripheral and central particles. C: binding of α CaM kinase II with calmodulin.³¹⁾ Calmodulin molecules (CaM) associated with the peripheral particles (P) from the outside. (inset) Two molecules of calmodulin are observed covering a peripheral particle (P').

それぞれのアイソフォームは会合ドメインで結合しオリゴマー構造を取る。カムキナーゼ II は、脊椎動物以外にも、海綿動物、線虫、ウニ、アメフラシ、電気ウナギ、イカ、ショウジョウバエ、カエル等ほとんどすべての生物の神経組織にも見出され、相同性が高く進化の過程で高度に保存された1つのファミリーを形成する。³⁴⁾

4-3. カムキナーゼ II の触媒活性 カムキナーゼ II は活性に Ca^{2+} とカルモデュリンを必要とする。カルモデュリンは分子の外側に結合することが電子顕微鏡による解析から明らかとなった (Fig. 8C)。³¹⁾ カムキナーゼ II の基質は多数知られており、チロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素をはじめ種々の酵素、受容体、膜タンパク質、アダプタータンパク質、スキャホールドタンパク質、細胞骨格タンパク質、構造タンパク質、リボゾームタンパク質、転写因子、等ほとんどすべての種類のタンパク質をリン酸化する。³⁵⁻³⁹⁾ また、シンチド 2 やオートカムチド 2 等の合成ペプチドは特異的な基

質としてよく使用される。主要なリン酸化サイトは RXXS/T 配列のセリン (S) 及びスレオニン (T) である。⁴⁰⁾ 加えて S/TXD のセリン及びスレオニンもリン酸化される (Table 2)。⁴¹⁾ このことは、リン酸化アミノ酸の N 末端側に塩基性アミノ酸がある場合と、C 末端側に酸性アミノ酸がある場合のどちらでもリン酸化することができることを示しており、カムキナーゼ II が極めて広い基質特異性を持ち、生理的機能を多岐に渡って調節するという特徴が現れる。

阻害剤は、イソキノリン誘導体の KN62 や KN93 が特異性の高い阻害剤として使用されている。また、オートカムチド 2 のリン酸化サイトのスレオニンをアラニンに置換したペプチド (AIP) はカムキナーゼ II を特異的で強く阻害する。

アイソフォーム間では、 α と β アイソフォームの触媒活性を大脳と小脳の酵素と比較すると、基質特異性においては大きな違いがみられなかったが、カルモデュリンに対する親和性は β の方が α に比べ

て高く、両アイソフォームによる違いが見出された。⁴²⁾ カルモデュリン結合部位のアミノ酸配列は α と β アイソフォームの間で違いが認められないことから、この親和性の違いがカルモデュリン結合部位以外の領域に存在すると考えられる。 β 特異的挿入部の欠失変異酵素を用いた解析から、 β 特異的挿入部はカルモデュリンの親和性に影響を与えない。⁴³⁾ したがって、親和性の違いが α と β アイソフォーム分子のどの領域に由来するかを α と β のキメラ酵素を作成して調べた結果、主に自己リン酸化部位を含む領域がカルモデュリンに対する親和性を決定し、ATP結合部位を含むN末端領域がその作用を修飾することが明らかとなった(未発表)。

4-4. 自己リン酸化による活性調節 カムキナーゼ II は、自己リン酸化により自分自身の活性を調節する自己調節能を持つが、自己リン酸化により、活性化される場合と不活性化される場合がある。自己リン酸化反応は分子内反応であり、反応開始には Ca^{2+} とカルモデュリンが必須である。

4-4-1. 活性化 カムキナーゼ II は、自己リン酸化により Ca^{2+} 非依存性活性が現れることが見出された。⁴⁴⁻⁴⁶⁾ Ca^{2+} 非依存性活性の発現には最初に Ca^{2+} とカルモデュリンが必須である。 Ca^{2+} /カルモデュリンの結合により、触媒部位は自己阻害部位から開放され、酵素は阻害状態から解除され活性化される。自己阻害部位は、キーとなるスレオニン残基(α は286番目、 β は287番目)のリン酸化により完全に開放される。一度自己リン酸化されると、酵素は Ca^{2+} 非依存性活性酵素に変換され、活性型酵素となる。 Ca^{2+} 非依存性活性は、 Ca^{2+} /カルモデュリン存在下の活性に比べて低い。しかし、自己リン酸化によりカルモデュリンに対する親和性が著しく高くなることにより、⁴⁷⁾ 低い Ca^{2+} 濃度でも活性を保持することができる。このような特徴によりカムキナーゼ II は神経刺激に伴い Ca^{2+} 作用の持続時間を調節することができ、記憶・学習等シナプス可塑性に重要な役割を担う。

4-4-2. 不活性化 自己リン酸化により、活性型酵素に変換されるとともに、自己リン酸化が進むと酵素活性が不活性化される。⁴⁸⁾ 自己リン酸化により Ca^{2+} 非依存性酵素になり、カルモデュリン結合部位に存在するスレオニン残基のリン酸化により、酵素はカルモデュリンに結合しなくなるととも

に不活性化される。この不活性化の生理的役割はよく理解されていないが、この不活性化の不調と精神神経疾患と関連が報告されている。⁴⁹⁾ このことは、カムキナーゼ II の適切な活性化状態の持続時間が脳の正常な機能を果たす上で必要であることを示唆している。

4-5. カムキナーゼ II の時間的・空間的な発現 カムキナーゼ II は脳内の神経細胞に広く存在する。しかし脳の部位や発達過程で、酵素含量、 α と β アイソフォームの存在比、細胞内の局在が変化する。カムキナーゼ II のアイソフォームの発現は脳の領域により非常に異なっている。

ラットでは、 α と β アイソフォームの特異的抗体を用いて、免疫組織化学的手法により、ラットの脳、小脳、脳幹、網膜、脊髄等、脳内の分布が詳細に調べられた。⁵⁰⁻⁵⁶⁾ 海馬と小脳における α と β アイソフォームの免疫組織染色を Fig. 9 に示す。海馬では α と β カムキナーゼ II は CA1 から CA3 領域及び歯状回で強く染色されるが分布に差がみられない。主に細胞質で染色されるが、錐体細胞では、 α は核も弱く染色されるのに対し β は核で染色されない。小脳では α と β カムキナーゼ II は分布が異なり、 α は分子層(m)、プルキンエ細胞(p)に強く発現するが、顆粒細胞層(g)には発現しない。 β は分子層、顆粒細胞、プルキンエ細胞に発現する。⁵⁰⁾

一方、 α と β アイソフォームのタンパク質含量は部位により大きく異なる。 α アイソフォームタンパク質は脳や海馬に非常に多く存在する。特に海馬では全タンパク質の2%に達する。ついで、新線条体、嗅脳、視床下部、視床、小脳、脳幹の順である。 β アイソフォームタンパク質は、小脳に多く α の3倍も存在するが、脳や海馬では α に比べて少ない。^{57,58)}

細胞内では細胞質と顆粒・膜画分の両方に存在するが、 α は細胞質に多く存在し、 β は主に顆粒・膜画分に存在する。⁵⁹⁾ β アイソフォームの顆粒・膜画分へのターゲティングには、欠失変異酵素を用いた解析から、 β 特異的挿入部が重要であることが明らかとなった。⁴³⁾ また、 α は神経伝達の中心部位となるシナプス後肥厚(postsynaptic density, PSD)の主要構成成分として存在する。^{35,60)}

カムキナーゼ II の発現は出生直後は低い神経

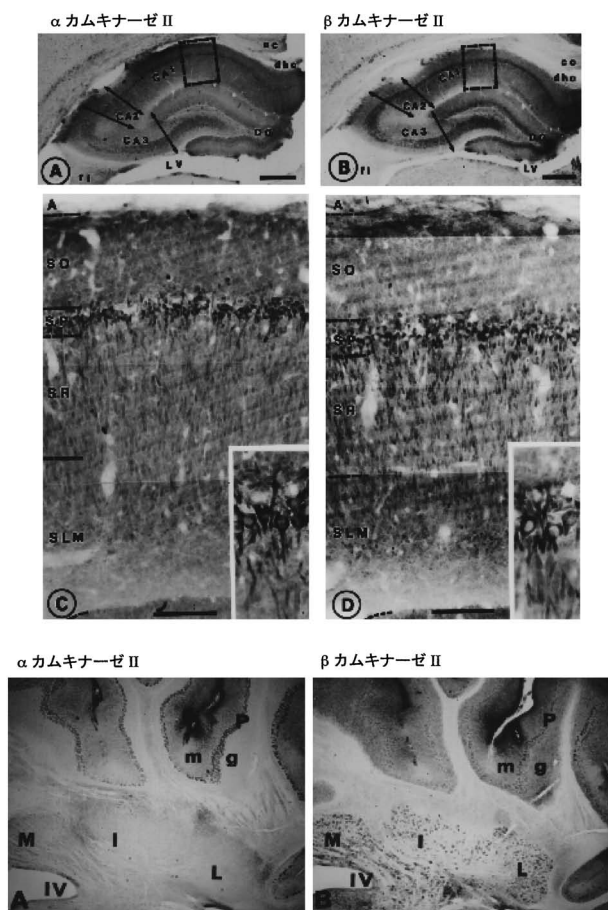


Fig. 9. Differential Localization of α (A) and β (B) Isoforms of CaM Kinase II in Rat Hippocampus and Cerebellum

Upper panel: distribution in hippocampus.⁵⁴ A and C: immunoreactivity of α CaM kinase II. B and D: immunoreactivity of β CaM kinase II. C and D: high-power photograph, enlarged from the area as enclosed by the dotted rectangles in A and B, respectively. Insets in C and D, high-power photograph in pyramidal cells. α and β CaM kinase II are strongly stained in CA1-CA3 and dentate gyrus with the anti- α and anti- β antibodies, respectively. The nuclei of α -immunoreactive pyramidal cells are faintly stained with the α antibody (inset in C), but those of β -immunoreactive pyramidal cells are completely devoid of the β immunoreactivity (inset in D). Abbreviations; A: alveus hippocampi, cc: corpus callosum, DG: dentate gyrus, dhc: dorsal hippocampal commissure, fi: fimbria hippocampi, LV: lateral ventricle, SLM: stratum lacunosum-molecular, SO: stratum pyramidale, SR: stratum radiatum. Bar: 500 μ m (A, B), 100 μ m (C, D). Lower panel, distribution in cerebellum.⁵⁰ A: α immunoreactivity is present in the molecular layer (m) and Purkinje cell layers (p), and fibers between the medial (M) and interposed (I) cerebellar nuclei and beneath the medial cerebellar nucleus. Note the absence of immunoreactivity in the granular cell layer (g). B: β immunoreactivity is present in the molecular, Purkinje cell and granule cell layers and all cerebellar nuclei. IV: 4th ventricle, L: lateral cerebellar nucleus. α and β CaM kinase II are differently distributed in the cerebellum. Bar: 500 μ m (A, B), 100 μ m (C, D).

ネットワーク形成の時期に一致して著しく増加する。 α と β アイソフォームに特異的なモノクローナル抗体を用いて脳の発達過程におけるそれぞれのタンパク質量を測定した。出生直後は少なく、生後10-14日に急速に増加し、20-30日で最大に達する。増加率は脳の部位により異なり、大脳では出生直後に比

べ30-50倍、小脳では10-20倍、脳幹では約10倍に増加した。その後、酵素タンパク質の発現は高い状態で維持され、1年半後でも60-70%が残る。これらの結果は、脳の部位によって酵素タンパク質の発現の調節が異なることを示しており、カムキナーゼIIは神経発達過程で、時間的・空間的に発現が厳密に調節されている。^{57,58,61}さらに、カムキナーゼIIの基質タンパク質の発達過程で調節されており、カムキナーゼIIの発現と同様に成熟に伴い増加する。^{62,63}

また、 α カムキナーゼIIのmRNAは細胞質ばかりでなく樹状突起にも存在する。一般にmRNAは細胞体に存在するが、いくつかのmRNAは樹状突起にも存在し、神経刺激に伴い樹状突起内で翻訳され、新たなタンパク質が合成されることから、シナプス可塑性に関与すると考えられている。⁶⁵カムキナーゼII mRNAの樹状突起への輸送にはこのmRNAの3'-非翻訳領域が重要である。⁶⁴

学習過程においては、樹状突起のスパインが増加しシナプス後肥厚が増加し、新しいシナプスが形成されている神経可塑性がみられる (Fig. 2(A)). この新しいスパインが形成する場合にも、カムキナーゼIIは活性化されることが必要である。神経細胞は生後、急速にシナプスを形成し神経細胞同士の連絡が密になる。このようなカムキナーゼIIの神経活動に依存した発現誘導や、神経ネットワーク形成時期の発現誘導について遺伝子レベルではほとんど解析されていない。

4-6. カムキナーゼII遺伝子の構造 α と β アイソフォームの遺伝子は、ラット遺伝子ライブラリーをスクリーニングし遺伝子クローンを単離し構造解析した。 α 遺伝子は、全長50 kbp以上であり、18個のエキソンから構成されている。⁶⁶ β 遺伝子は、全長80 kbp以上であり、21個のエキソンから構成されている。⁶⁷カムキナーゼIIタンパク質は、触媒ドメイン、調節ドメイン、会合ドメインの3つの機能ドメインから構成されている。これらのドメインはそれぞれのエキソンと対応しており、高度に保存されている。触媒ドメインはN末端側にあり、ATP結合部位はエキソン2と3の境界領域にある。調節ドメインは中央にあり、Ca²⁺非依存性活性に必要な自己リン酸化部位はエキソン11であり、カルモデュリン結合部位はエキソン12であ

る。リンク結合は α ではエクソン 13 で β ではエクソン 14 である。 β の 3 個のエクソン (エクソン 13, 15, 16) が β に特異的である以外は, α と β でエクソン構造及びプライスサイトは保存されている。このようなエクソン構造はラットばかりでなくショウジョウバエにおいても高度に保存されている。転写開始部位は α では -147 塩基であり, β では -78 塩基である。エクソン構造は高度に保存されているが, 遺伝子の全体の大きさ, エキシソンの分布, イントロンの大きさ, 5' 非翻訳領域の構造等はアイソフォームの間で非常に異なっており特異的である (Fig. 10).

4-7. カムキナーゼ II 遺伝子の神経特異的プロモーター カムキナーゼ II 遺伝子の転写調節を明らかにすることは, 本酵素の脳特異的発現と生理的役割を明らかにするために極めて重要である。カムキナーゼ II 遺伝子の構造が明らかになり, 転写開始部位上流構造を比較すると, α と β アイソフォームで塩基配列の相同性はなく, 脳特異的な既知の転写因子も見出されなかった。⁶⁷⁻⁶⁹ 5' 上流領域を含むルシフェラーゼレポーター遺伝子を構築し, 神経芽細胞に導入しプロモーター活性を測定すると, α と β アイソフォームのどちらも, 転写開始部位上

流に神経細胞に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。さらに上流には, 強いサイレンサーが存在し, 培養細胞系では, これらの遺伝子発現が強く抑制されており, カムキナーゼ II の発現は強い負の調節を受けていることが明らかとなった (Fig. 11)。⁶⁷⁻⁶⁹

α と β アイソフォーム遺伝子のプロモーター活性を促進する因子を解析した。 α アイソフォームではプロモーター領域の DNA 配列に結合するタンパク質をイースト・ワンハイブリッド法によりスクリーニングし, Zic2 が見出された。⁷⁰ Zic2 cDNA を発現ベクターに構築し神経培養神経に導入すると α カムキナーゼ II プロモーターを活性化することが明らかとなり, Zic2 がプロモーター活性化因子の 1 つとして同定された。 Zic2 は 55 kDa の Zn フィンガーファミリーの転写因子で, 脳の発達過程で重要な役割を果たしているが, Zic2 のターゲットとなる遺伝子は明らかにされていなかった。⁷¹ Zic2 はヒトの全前脳症 (脳の発達障害) の原因遺伝子として知られており, Zic2 の異常による α カムキナーゼ II の発現異常が病気と関係するとすれば筆者らの研究は重要な情報を与える。

β アイソフォームではプロモーター領域の DNA

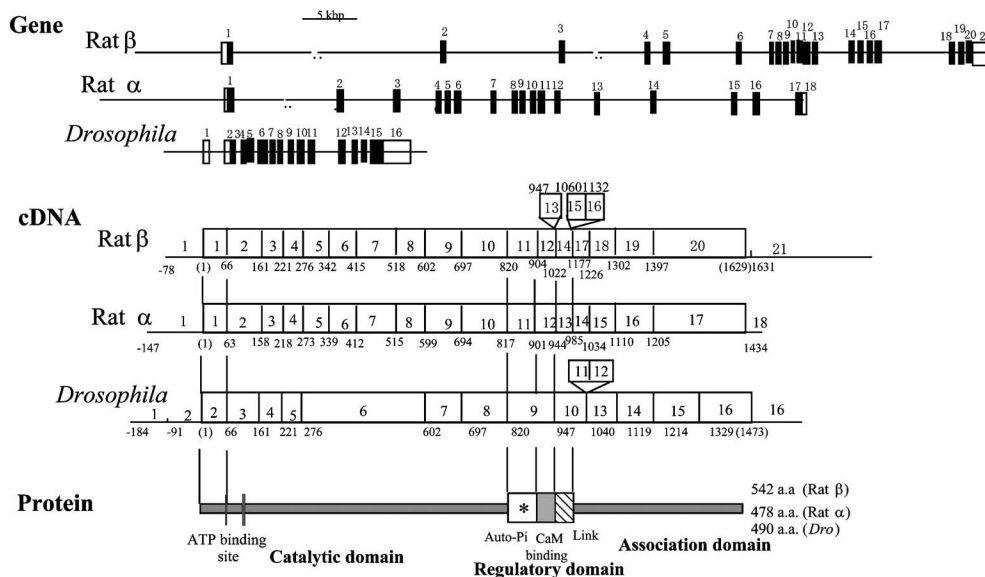


Fig. 10. Organization of Gene, cDNA, and Protein of α and β CaM Kinase II from Rat Brain and *Drosophila* CaM Kinase II⁶⁷⁾

Top: gene structure. Exons are indicated by black bars, and their numbers are shown in the middle panel. Gene of α CaM kinase II has 18 exons spanning more than 50 kbp, and that of β CaM kinase II has 21 exons spanning more than 80 kbp. The *Drosophila* CaM kinase II gene is consisted of at least 16 exons spanning 20 kbp. Middle: cDNA. The numbers below the boxes of cDNA show the position of the first nucleotide of each exon, with the first ATG of cDNA assigned as +1. The structure of the exon/intron junction is completely conserved between three genes, although gene structure and size of introns are very different between the three genes. Bottom: protein. Three functional domains and functional units are shown.

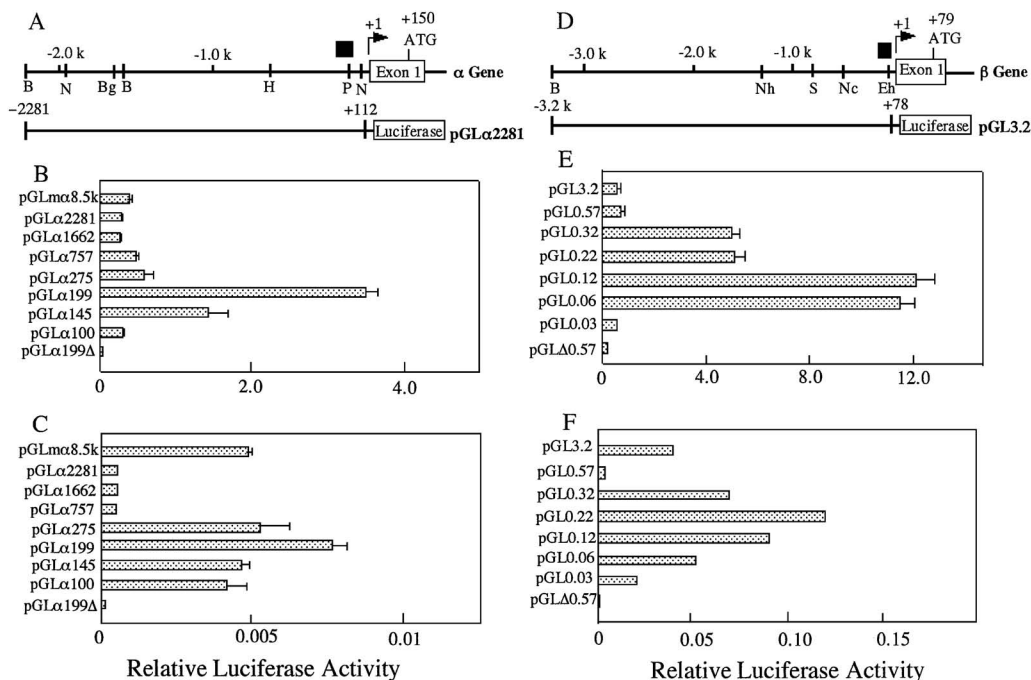


Fig. 11. Promoter-luciferase Reporter and Deletion Analysis of CaM Kinase II Promoter Activity⁶⁹⁾

A: A schematic representation of the 5' flanking region of the α CaM kinase II gene (Upper) and one of the α CaM kinase II promoter-luciferase reporters (Lower). The sequence is numbered with respect to the transcription initiation site (indicated as +1) shown by an arrow. The box represents exon I and the translation initiation site is shown by ATG and +150. A black box shows the neuronal cell type-specific promoter region. Restriction enzyme sites and their positions are shown, B: *Bam*HI, Bg: *Bg*II, H: *Hind*III, N: *Nco*I, P: *Pst*I. B and C: Deletion analysis of α CaM kinase II promoter activity in transiently transfected neuronal and non-neuronal cells. Neuronal cells, NG108-15 (B), non-neuronal cells, BALB/c3T3 (C). D: A schematic representation of the 5' flanking region of the β CaM kinase II gene (Upper) and one of the β CaM kinase II promoter-luciferase reporters (Lower). The sequence is numbered as in A. A black box shows the neuronal cell type-specific promoter region. Restriction enzyme sites and their positions are shown, B: *Bam*HI, Eh: *Ehe*I, Nc: *Nco*I, Nh: *Nhe*I, S: *Sac*I sites. E and F: Deletion analysis of β CaM kinase II promoter activity in transiently transfected cells. Neuronal cells NG108-15 (E), and non-neuronal cells BALB/c3T3 (F).

配列に結合するタンパク質をゲルシフト法によりアッセイし、ラット小脳からプロモーター結合タンパク質を精製し、マスマスペクトロメトリーにより解析し、rLRP157が見出された。rLRP157 cDNAを調製し、発現ベクターに構築し培養神経に導入すると β カムキナーゼ IIプロモーターを活性化することが明らかとなりrLRP156がプロモーター活性因子の1つであることが見出された。⁷²⁾ rLRP157は157kDaのタンパク質で、ヒトのロイシンリッチタンパク質(hLRP130)のラットホモログであり、脳、肝臓、心臓に多く発現する。hLRP130は、French-Canadian Leigh Syndrome (FCLS)の原因遺伝子であることが明らかにされた。⁷³⁾ FCLSは小脳で激しい神経変性を伴う疾患であることから、rLRP157の発現低下に伴う β カムキナーゼの発現異常がFCLSに関係するとすれば筆者らの研究は重要な情報を与える。Zic2やrLRP157の分子によりカムキナーゼ IIの遺伝子の発現が調節されることが明らかとなったが、カムキナーゼ IIの脳特異

的発現及び発達における時間的空間的特異的発現は多くの因子により複雑な調節を受けていると考えられ、今後さらに、発現調節に関与するすべての因子を同定し、それらの分子の相互作用による調節のメカニズムを明らかにすることが必要である。

4-8. カムキナーゼ IIの発現誘導と神経分化

脳ではカムキナーゼ IIは脳の発達過程で誘導されることは先に述べたが、培養細胞系においてもカムキナーゼ IIが神経分化に伴い発現誘導されることが明らかとなった。胚性がん細胞由来P19細胞は多分化能を有する細胞であるが、レチノイン酸により神経細胞へ分化誘導することから神経分化のモデルとしてよく使用される細胞である。P19細胞をレチノイン酸で神経細胞に分化誘導すると2-8日でカムキナーゼ II活性は約8倍上昇した。この活性上昇においてmRNAが増加し、酵素が誘導されることが明らかとなった。⁷⁴⁾ また、中枢カテコールアミン由来マウス神経芽細胞CADは、通常培養条件では丸い形態をしている。培養液から血清を除去する

こと、あるいは培養液に cAMP を添加することにより、細胞は分化誘導され神経突起が伸展し、神経細胞の形態に変化する。分化誘導 1 日でカムキナーゼ II が誘導され、活性が高くなり、以降ほぼ同じ高い活性を維持する。突起は分化 1 日から伸展を開始し、5 日まで時間とともに伸長する。この突起伸展はカムキナーゼ阻害剤 KN62 により阻害されることから、突起伸展にカムキナーゼ II が関与することが明らかとなった。⁷⁵⁾

4-9. カムキナーゼ II の神経細胞特異的スプライシング カムキナーゼ II の誘導過程で神経細胞特異的なスプライシング産物の生成が見出された。^{74,75)} CAD 細胞ではカムキナーゼ II は δ アイソフォームが主として発現している。CAD 細胞の神経誘導に伴い δ アイソフォームのスプライシングが変化する。スプライシングの変化は、いくつかの培養神経芽細胞の分化誘導や胚性がん細胞 P19 の神経分化過程、及びラットの大脳や小脳の成長過程でも観察された。ラット脳では、幼少の未熟な中枢神経と成熟ラットの中枢神経の間で異なる。このように分化や発達過程でのカムキナーゼ II のスプライシングの変化は神経細胞に共通することが明らかとなった。また、スプライシングパターンの違いにより神経細胞が、成熟度や分化状態の違いで分類できること、すなわち、成熟中枢神経型、未熟中枢神経型・分化培養神経細胞型、未分化培養神経・非神経細胞型、の 3 つの型に分類されることが明らかになった (Fig. 12)。^{74,75)} このようなスプライシング

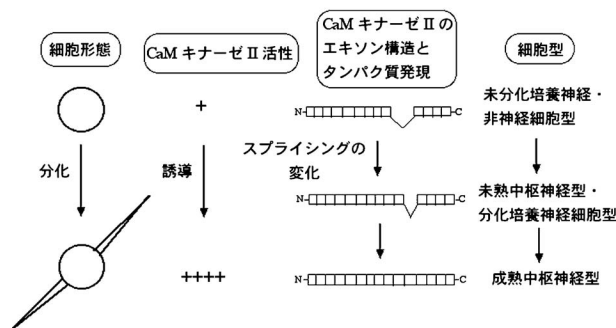


Fig. 12. Schematic Representation of Phenotypic and Splicing Changes of δ CaM Kinase II during Differentiation³⁾

Changes in cell morphology, δ CaM kinase II activity, splicing pattern, and neuronal cell types are shown. Undifferentiated cells are round and have low CaM kinase II activity and the smallest splice variant. During differentiation, cells form processes, and have increased CaM kinase II activity and large splice variants. + to ++++, increased CaM kinase II activity. The longest splice variant is the major splice variant in mature brain.

産物の違いにより神経細胞の特徴が現われると考えられる。

5. カムキナーゼ II のプレシナプスにおける役割

カムキナーゼ II は神経伝達物質の生合成と分泌、及び微小管、微小管とマイクロフィラメントの相互作用の調節に関与する。

5-1. 神経伝達物質の分泌装置 シナプス伝達は、プレシナプス（前シナプス）とポストシナプス（後シナプス）の構成因子により一方向性に維持される。プレシナプスには、伝達物質を含む数 100 から数 1000 個のシナプス小胞、及び、小胞が融合する細胞膜の活性領域（active zone）から構成される「分泌装置」が存在する。⁷⁶⁾ シナプス小胞には伝達物質であるモノアミン、アミノ酸、ペプチド、アセチルコリン等が貯蔵されておりいつでも分泌できるよう準備されている。神経刺激が活動電位として軸索終末まで伝達されると、終末に Ca^{2+} が流入し、その濃度上昇により、細胞膜とシナプス小胞膜の融合が起こり、シナプス小胞内の伝達物質や ATP、タンパク質等が開口放出機構により一挙にシナプス間隙に放出される。このように神経伝達物質の開口放出の分子メカニズムは比較的良好に理解されている。

5-2. 神経伝達物質の生合成の調節 カムキナーゼ II はモノアミン神経において、伝達物質であるカテコールアミンやセロトニンの生合成の調節に関与する。^{13,16)} 神経伝達物質であるカテコールアミンやセロトニンは、その生合成の律速酵素であるチロシン水酸化酵素とトリプトファン水酸化酵素が cAMP 依存性プロテインキナーゼ及びカムキナーゼ II によるリン酸化により活性化されることは、2 項のカムキナーゼ II 発見で述べた。それらの結果に基づき、筆者はドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン作動性神経、及びセロトニン作動性神経終末において、神経刺激により終末に流入した Ca^{2+} が開口放出により伝達物質を分泌させると同時に、伝達物質の生合成を高め分泌された伝達物質を補充する役割を持つという考えを提唱した (Fig. 13)。⁷⁷⁾

5-3. 微小管とマイクロフィラメントの調節 脳の微小管やマイクロフィラメントは細胞骨格を形成し、神経細胞の細胞内物質輸送、形態形成、伝達物質の放出、刺激の伝達などの神経細胞のダイナミッ

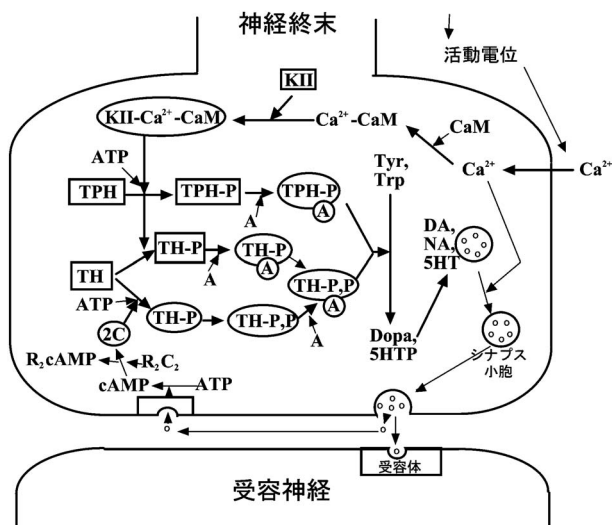


Fig. 13. Schematic Diagram of Regulation of Biosynthesis of Catecholamines and Serotonin by Protein Phosphorylation in the Nerve Terminal of Brain⁷⁷⁾

The depolarization of dopaminergic, noradrenergic or serotonergic neuronal terminal results in an influx of Ca^{2+} into the nerve terminal, which induces the release of dopamine, noradrenalin or serotonin from the storage sites into the synaptic space. The released transmitter molecules bind to a specific receptor on the postsynaptic membrane, triggering a series of reactions on the receiving neuron. The Ca^{2+} which has entered the nerve terminals binds to calmodulin (CaM) and subsequently results in the activation of CaM kinase II (KII- Ca^{2+} -CaM). Tyrosine hydroxylase (TH) or tryptophan hydroxylase (TPH) are phosphorylated by the activated CaM kinase II, and phosphorylated enzymes are then activated by the activator protein (A). Thus, the biosynthesis of catecholamine and serotonin is enhanced within a short time in the terminals of stimulated neurons. On the other hand, ATP is released together with transmitters, since synaptic vesicles contain ATP in addition to transmitters. Released ATP is hydrolyzed to AMP and AMP activates presynaptic adenosine receptor to stimulate the synthesis of cAMP. Increased cAMP activates cAMP dependent protein kinase (PKA, R_2C_2), and activated kinase (2C) then phosphorylates TH, converting to activated form. The inactive or less active form of the enzyme is expressed as box, and the active form of the enzyme is expressed as circle.

クな過程に参与する。微小管は α と β チューブリンが管状に重合しているが、その重合は微小管結合タンパク質 (MAPs) により促進される。チューブリン、高分子微小管結合タンパク質の MAP2、低分子微小管結合タンパク質のタウはカムキナーゼ II のよい基質である。^{36,37)} チューブリンは MAP2 存在下で速やかに重合する。しかし、カムキナーゼ II によりリン酸化した MAP2 はチューブリンを重合させることができない。⁷⁸⁾ また、MAP2 で重合した微小管をカムキナーゼ II と反応させると、MAP2 のリン酸化が起こり、微小管が脱重合する。この条件でチューブリンもリン酸化されるが、チューブリンのリン酸化は微小管の脱重合に直接関係しない。したがって、MAP2 のリン酸化の状態により微小管の重合・脱重合が制御される。

マイクロフィラメントは、アクチン繊維より形成されているが、微小管と相互作用することによりシナプ可塑性と関連すると考えられている。MAP2 はマイクロフィラメントと相互作用し、マイクロフィラメント束を形成する。MAP2 がカムキナーゼ II でリン酸化されるとマイクロフィラメントとの相互作用が阻害されマイクロフィラメント束の形成能が失われることが見出された。⁷⁹⁾

脳の微小管やマイクロフィラメントは細胞内の物質輸送、細胞の形態形成、膜の相互作用、神経細胞の突起形成や分化に重要な役割を担っている。カムキナーゼ II は微小管やマイクロフィラメントの機能を調節することにより神経細胞のダイナミックな過程を調節すると考えられる。

5-4. 神経伝達物質の分泌の調節 カムキナーゼ II は、シナプス小胞特異的タンパク質であるシナプシンのリン酸化を介して分泌過程の調節にも関与する。シナプシンはシナプス小胞とアクチン細胞骨格をクロスリンクして分泌を抑制する。シナプシンがカムキナーゼ II によりリン酸化されると、シナプス小胞とマイクロフィラメントとの相互作用が低下し、小胞の運動性が高まり、結果として分泌が促進される。⁸⁰⁾ カムキナーゼ II によるシナプシンのリン酸化は LTP 誘導により増加することから、神経活動に依存してプレシナプスからの伝達物質の分泌効率が高くなると考えられる。⁸⁰⁾

一方、最近、カムキナーゼ II が、細胞膜に存在するタンパク質であるシタキシンと相互作用することにより分泌が調節されることが明らかとなった。⁸¹⁾ シタキシンは開口放出のキーとなる分子であり、 Ca^{2+} の上昇によりシナプス小胞のタンパク質と相互作用することにより開口放出が起こる。シタキシンは、 Ca^{2+} と ATP 依存性のカムキナーゼ II と相互作用し、カムキナーゼ II・シタキシン複合体を形成する。シタキシンのカムキナーゼ II 結合ドメインの配列のペプチドを神経終末に導入することにより、両者の相互作用が阻害され伝達物質の放出が抑制されたことから、カムキナーゼ II・シタキシン複合体の形成が開口放出の制御に重要であることが明らかとなった。

このように、カムキナーゼ II はプレシナプスにおいて神経伝達物質の生合成、シナプス小胞の輸送、開口放出において Ca^{2+} の関与する多くの過程

の調節に重要な役割を果たしているキーとなる分子であるといえる。

6. カムキナーゼ II のポストシナプスにおける役割

カムキナーゼ II は、神経細胞内では神経伝達の中心部位であるシナプス後肥厚 (PSD) の主要構成分子として存在すること、細胞内で広く分布し細胞体ばかりでなく樹状突起にも高濃度存在すること等から、カムキナーゼ II はプレシナプスばかりでなくポストシナプスにおいて重要な役割を持つと考えられる。

6-1. 神経伝達の中心部位：シナプス後肥厚 (PSD) 中枢神経のシナプスは神経細胞が相互

作用するために特殊化した構造を持つ。シナプス後細胞では、ポストシナプ膜の細胞質に面した部位が厚くなって、電子顕微鏡的に特異な構造体として観察される部位が存在する。この部位はシナプス後肥厚 (PSD, postsynaptic density) と呼ばれる。⁸²⁾ PSD はシナプス後細胞膜の直下であり、厚く、無定形の円盤状の形をしており、厚さは約 50 nm で、直径は約 100 nm である。最も顕著な PSD は、興奮性シナプスにみられる I 型シナプスと呼ばれる部位に存在する (Fig. 14).⁸³⁾ I 型シナプスは伝達物質として主としてグルタミン酸が使用されるグルタミン酸シナプスである。また、II 型シナプスに存在する PSD は厚さも薄く幅も小さい。II 型シ

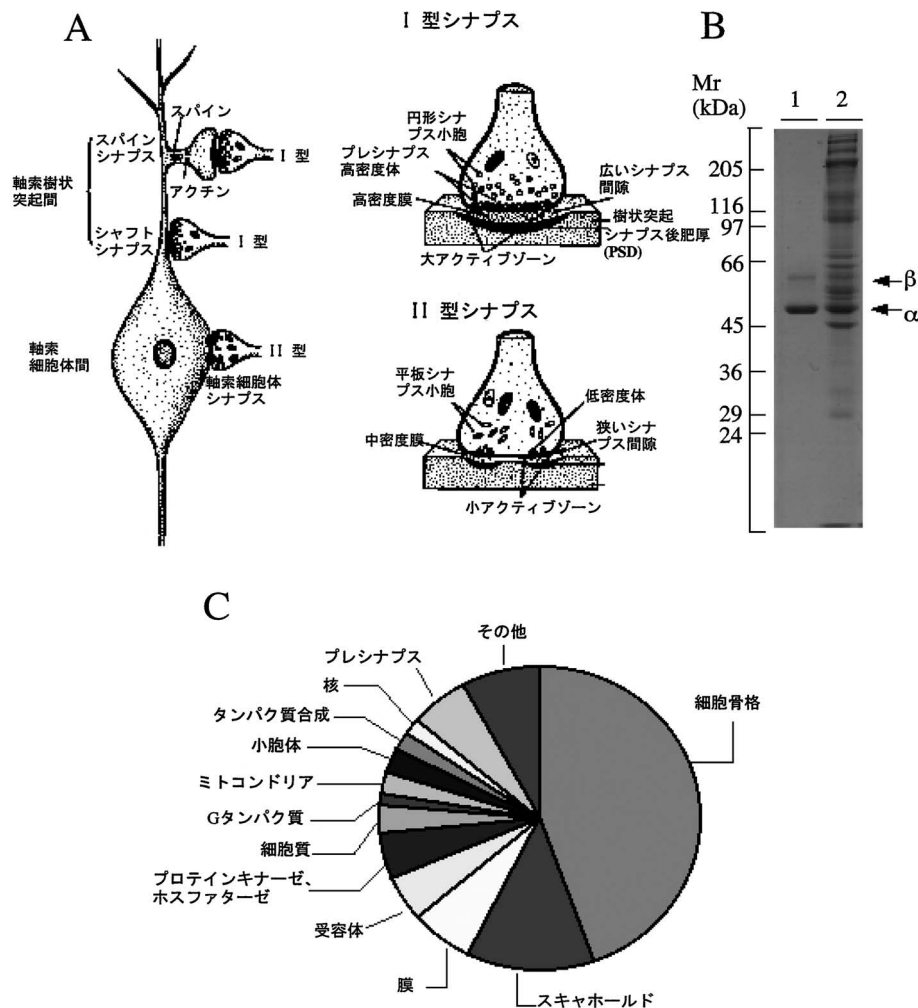


Fig. 14. Characterization of PSD³⁾

A: The two most common types of synapses in the central nervous system. Type I synapses are usually excitatory, as exemplified by glutamatergic synapses. Type II synapses are usually inhibitory, as exemplified by GABAergic synapses. B: SDS-PAGE of CaM kinase II (lane 1) and PSD proteins (lane 2). Lower and upper arrows indicate α and β isoforms of CaM kinase II, respectively. One of the major PSD proteins is α CaM kinase II. C: grouping of PSD proteins. PSD proteins are analyzed by proteomic analysis and total 492 proteins are identified. PSD proteins are divided into functional groups and data are shown based on their contents calculated from the data of Yoshimura et al.⁸⁵⁾

ナプスは抑制性シナプスであり、伝達物質として GABA が使用される GABA シナプスである。PSD で起こるシナプス機能調節が、シナプス可塑性に重要であることは現在ではよく理解されている。⁸²⁻⁸⁴⁾しかし、精製した PSD は水に不溶性であることから PSD の生化学的解析及び機能調節のメカニズムの解析が非常に遅れており、現在、神経科学分野における重要な研究課題の 1 つになっている。

6-2. PSD の分子構成 PSD には種々の特異的な受容体、イオンチャンネルや、それらの結合タンパク質、スキャホールドタンパク質、及び、種々の酵素タンパク質やシグナル伝達に係わるタンパク質等が多く含まれ、一連のシグナル伝達カスケードを形成すると考えられている。^{83,84)} PSD の構成分子を明らかにするために多くの試みがなされていたが、約 100 種類のタンパク質しか報告されておらず、全体像はなかなか明らかにされなかった。最近、筆者はプロテオミクス手法により PSD の分子構成因子を解析し、約 500 種類のタンパク質を同定した。この中には既知のタンパク質がほとんど含まれており、PSD の構成因子の全体像が明らかになった (Fig. 14(C)).⁸⁵⁾ PSD の主要構成因子は、シグナル伝達に係わる分子と細胞骨格タンパク質である。シグナル伝達に係わる分子の中では、受容体、

イオンチャンネル、プロテインキナーゼ、プロテインホスファターゼ、G タンパク質とその関連タンパク質、スキャホールドタンパク質やアダプタータンパク質等がある (Fig. 15)。この中で、グルタミン酸受容体とカムキナーゼ II が最も多く存在する分子であり、PSD の主要な構成因子である。また、プロテインキナーゼやホスファターゼ、G タンパク質やその関連タンパク質は極めて多くの種類が存在していることが明らかになった。その後、同様の結果が他の研究室からも報告された。⁸⁶⁾これらの結果から、まだ明らかにされていないものも含め多くのシグナル伝達カスケードの存在が予想される。

6-3. カムキナーゼ II の PSD への移行と PSD タンパク質のリン酸化 カムキナーゼ II の多くは細胞質に存在しているが、PSD の主要構成分子であることが明らかにされて以来、PSD と細胞質のカムキナーゼ II の違いに興味をもたれた。PSD のカムキナーゼ II は自己リン酸化により Ca^{2+} 非依存性活性が細胞質酵素より長時間持続すること、⁸⁷⁾自己リン酸化した後キモトリプシン消化すると、分子量約 30 kDa の活性断片が PSD から可溶化されることが見出された。この活性断片を均一に精製し性質が調べられ、細胞質の酵素と触媒活性に違いがないことが示された。⁸⁸⁾

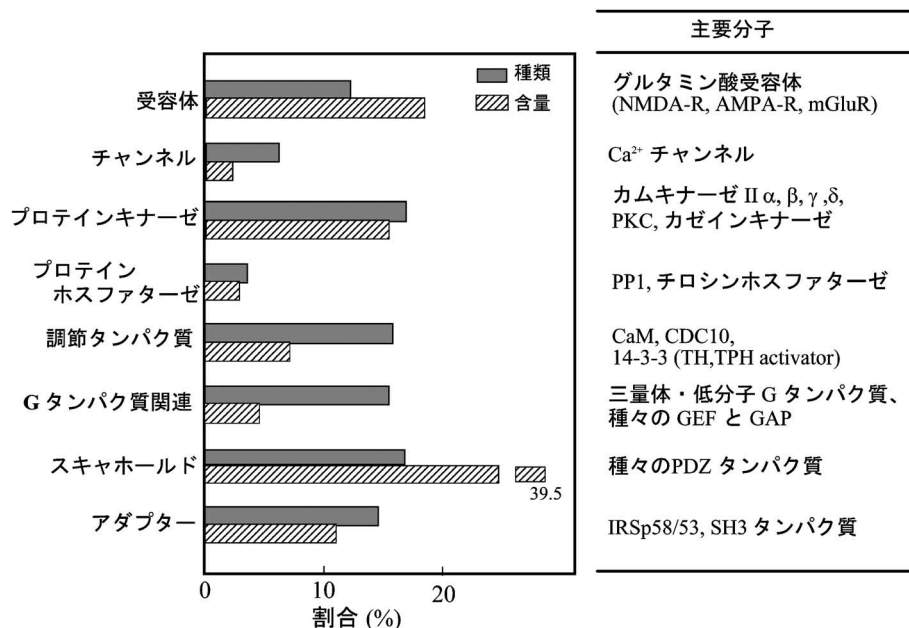


Fig. 15. PSD Protein Involved in Signal Transduction⁸⁵⁾

left: species and content of molecules involved in signal transduction. 137 molecules are identified and divided into groups. right: major molecules in each group.

細胞質と PSD のカムキナーゼ II の活性化状態を調べると、細胞質のカムキナーゼ II は Ca^{2+} とカルモデュリン存在下に自己リン酸化することにより、可逆的に細胞質から PSD に移行することが明らかとなった。^{89,90} このとき、酵素は Ca^{2+} 非依存性の活性型に変換されたまま PSD に移行する。PSD に移行したカムキナーゼ II は Ca^{2+} が存在しない条件で PSD の多くのタンパク質をリン酸化する (Fig. 16)。PSD におけるカムキナーゼ II の基質は、プロテオミクス分析により 25 種類以上同定された。^{38,91} これらは、イオンチャンネル、受容体、スキャホールドタンパク質、酵素、細胞骨格タンパク質等多種多様である。カムキナーゼ II はこの広い基質特異性から、PSD の多くの機能調節に係わることが示唆される。

6-4. PSD におけるカムキナーゼ II の結合部位

カムキナーゼ II は PSD に移行すると、主として NMDA 受容体に結合するが、⁹² その他の結合タンパク質も報告されている。⁴ 例えば、F-アクチン、サイクリン依存性キナーゼ 5 (CDK5)、シナプス特異的 GTPase 活性化タンパク質 (synGAP)、 α -アクチニン、デンシン -180 等にも結合する。これらのタンパク質とカムキナーゼ II の相互作用は、カムキナーゼ II のリン酸化状態によって変化する。⁹³ PSD に移行したカムキナーゼ II はプロテインホスファターゼ 1 (PP1) により脱リン酸化され、細胞質に戻る。⁹² PSD には種々のプロテインホスファ

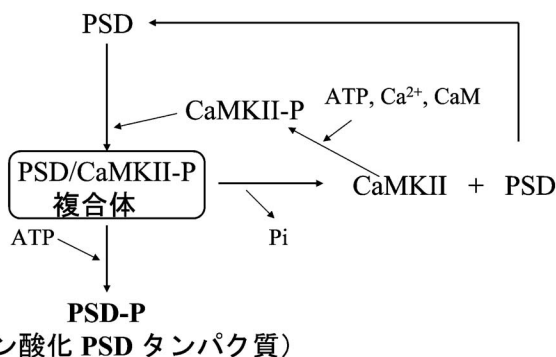


Fig. 16. Formation of PSD/CaM Kinase II Complex and Phosphorylation of PSD Proteins

CaM kinase II (CaMKII) is autophosphorylated with ATP in the presence of Ca^{2+} and calmodulin (CaM), and the phosphorylated kinase (CaMKII-P) translocates to PSD resulted in the formation of PSD/CaM kinase II complex (PSD/CaMKII-P). CaM kinase II in the complex has Ca^{2+} -independent activity and phosphorylates various PSD proteins even in the absence of Ca^{2+} . CaM kinase II in the complex is dephosphorylated by protein phosphatase, and then return to cytosol.

ターゼが存在するが PP1 が最も活性が高い。このように、神経細胞が刺激を受け Ca^{2+} が上昇すると、カムキナーゼ II は可逆的に PSD に移行し、PSD タンパク質のリン酸化を介して PSD の機能を調節することから、カムキナーゼ II はシナプス可塑性のキープレーヤーとして機能する。

6-5. 樹状突起におけるカムキナーゼ II mRNA

の分布と翻訳 神経細胞では、タンパク質は細胞体で合成され、細胞内輸送システムにより樹状突起や軸索に輸送されると一般に考えられている。一方、樹状突起にポリリボソームが存在しタンパク質が合成される可能性が報告され、高分子微小管結合タンパク質 MAP2 や α カムキナーゼ II の mRNA が樹状突起に存在することが 1990 年頃から注目された。⁶⁵ これらの mRNA に加えて、NMDA 受容体など脳に特異的に存在する PSD の主要構成分子、カルモデュリン、前初期遺伝子産物 Arc 等の mRNA も見出されている。最近、樹状突起の mRNA が神経刺激に依存して翻訳されタンパク質合成促進され、これが記憶・学習に重要であることが報告された。⁶⁵ カムキナーゼ II についても、後述のように、遺伝子改変マウスを用いた研究から、mRNA の樹状突起における翻訳が記憶形成に必要であることが明らかとなった。⁶⁴

6-6. PSD と可塑性

PSD はシナプス後細胞のシグナル伝達装置として組織化されており、調節分子とリンクし、発達過程や神経活動依存性の変化に対応する。したがって、PSD はシナプス伝達とシナプス可塑性・記憶・学習の中心部位として働いており、PSD の中に、脳で最も興味深い機能、すなわち活性依存性のシナプスの強化や記憶・学習のメカニズムの糸口が存在すると考えられる。これらの高次機能の基礎過程として知られる LTP や LTD は PSD に基礎を置いていると考えられ、PSD は「記憶装置」あるいは「記憶形成装置」として機能する可能性がある。PSD のシグナル伝達に係わるタンパク質の多くは種々のプロテインキナーゼやプロテインホスファターゼによりリン酸化・脱リン酸化され機能が調節される (Fig. 17)。³ シグナルは、受容体で受容されるとイオンチャンネルや膜タンパク質の変化を引き起こし、スキャホールドタンパク質や会合タンパク質、アダプタータンパク質に伝達され、酵素、細胞骨格タンパク質や機能タンパク質

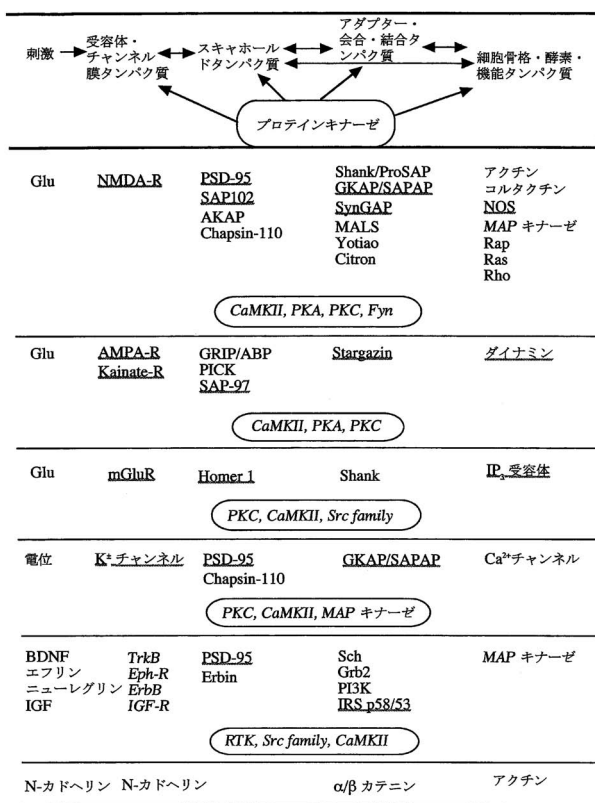


Fig. 17. Signaling and Regulatory Molecules in the PSD⁸³⁾

There are various stimuli and signaling systems in the PSD. Signal is transduced by protein-protein interactions, and regulated by phosphorylation-dephosphorylation through the actions of various protein kinases. Major protein kinases in the PSD are CaM kinase II (CaMKII), cAMP-dependent protein kinase (PKA), protein kinase C (PKC), MAP kinase, src family tyrosine kinases including fyn, and receptor tyrosine kinase (RTK). *Italic letter*: protein kinase, *underlined letter*: substrate of protein kinase. *Abbreviations*: AKAP: PKA-anchoring protein, AMPA-R: AMPA receptor, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, Eph-R: ephrin receptor, GKAP/SAPAP: guanylate kinase-associated protein/PSD-95-SAP-90-associated protein, Glu: glutamic acid, GRIP/ABP: glutamate receptor interacting protein/AMPA receptor-binding protein, IGF(-R): insulin-like growth factor (-receptor), IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate, IRSp58/53: insulin-receptor tyrosine kinase 58/53 kDa substrate, Kinase-R: kinase receptor, MALS: mammalian LIN-7 protein, mGluR: metabotropic glutamate receptor, NMDA-R: NMDA receptor, NOS: nitric oxide synthase, PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase, PICK: protein interacting with PKC, SynGAP: synaptic ras GTPase-activating protein.

の働きに影響を与える。LTP の誘導においてカムキナーゼ II の自己リン酸化と Ca²⁺ 非依存性活性の増加が起こり、カムキナーゼ II によってこれらの多くのタンパク質がリン酸化され調節される。このようにカムキナーゼ II は PSD のほとんどすべての機能の調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

グルタミン酸受容体の AMPA 受容体は、いくつかのプロテインキナーゼによりリン酸化され調節されているが、カムキナーゼ II によってもリン酸化される。^{38,94)} このリン酸化は LTP 誘導に必要であ

る。すなわち、LTP 誘導条件により AMPA 受容体より一過性に Ca²⁺ が細胞内に流入しカムキナーゼ II が活性化されると、細胞内に不活性型として存在する AMPA 受容体の GluR1 がリン酸化され、PSD に輸送され細胞表面に現れることにより受容体チャンネル量が増加し、グルタミン酸に対する PSD の感受性が高まり、LTP が誘導されると考えられている。⁹⁴⁾ また、グルタミン酸受容体の NMDA 受容体 2A (NR2A) 及び 2B (NR2B) サブユニットは、カムキナーゼ II に結合し複合体を形成する。カムキナーゼ II-NR2B 複合体は、カムキナーゼ II を活性状態に維持することにより LTP の維持に係わる。⁹⁵⁾ また、これらのタンパク質のリン酸化に関与するプロテインキナーゼとしては、PKC, PKA, MAP キナーゼ, Src ファミリーチロシンキナーゼもよく調べられている。³⁾ このように、PSD の構成分子のリン酸化による調節により、記憶の基礎過程となるシナプス可塑性が現れると考えられる。

7. カムキナーゼ II の神経突起伸展作用

7-1. 培養神経芽細胞を用いた解析

シナプス可塑性には樹状突起、スパイン、神経終末等の運動性が関与することから、そのモデルとして培養神経芽細胞の突起の運動性に注目した研究が行われている。筆者は、カムキナーゼ II の cDNA を培養細胞で発現することを見出したことから、²⁸⁾ 神経芽細胞である Neuro2a (Nb2a) や CAD 細胞に導入し酵素を過剰発現した細胞を作成した。これらのカムキナーゼ II 発現細胞では突起伸展が著しく促進されることが見出された。^{75,96,97)} この発現により、βカムキナーゼ II は α に比べて突起伸展作用が強くなり、アイソフォームによる作用の違いが初めて明らかとなった。このカムキナーゼ II の突起伸展作用はカムキナーゼの阻害剤により阻害されたことから、カムキナーゼ II が突起伸展に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、カムキナーゼ II の作用が PKC 阻害剤により増強され、細胞の増殖抑制と神経分化促進が相関することが示唆された (Fig. 18).^{97,98)} カムキナーゼ II の自己リン酸化部位のスレオニンをアスパラギン酸に変異したリン酸化に類似した常に活性型の酵素 (T286D 酵素) を神経芽細胞に発現させると、突起伸展が長期に渡り持続し長い突起を形成した。しかし、自己リン酸化部位の

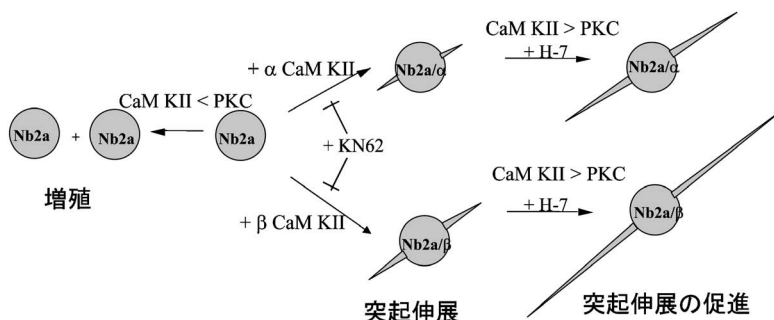


Fig. 18. Schematic Representation of Changes in Cell Morphology of Nb2a Cells

Wild-type Nb2a cells have relatively strong PKC activity than CaM kinase II activity, and proliferate. By the expression of α or β CaM kinase II, Nb2a cells form neurites. Formation of neurites is inhibited by KN62, a CaM kinase inhibitor. H-7, selective PKC inhibitor stimulate neurite extension induced by CaM kinase II. β CaM kinase II has a greater effect on neurite extension than α .

スレオニンを変異し Ca^{2+} 非依存性活性が現れない酵素 (T286A 酵素) では, 突起伸展が起こらなかった. したがって, 長期に渡る持続的な突起伸展作用には, カムキナーゼ II の自己リン酸化型の Ca^{2+} 非依存性活性が重要な役割を担っていることが明らかとなった.^{96,99,100)}

7-2. カムキナーゼ II の作用増強因子: Arc

Arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) は脳において電撃刺激のような強い神経刺激により速やかに誘導される前初期遺伝子産物として同定された約 45 kDa の機能未知のタンパク質であるが,¹⁰¹⁾ Arc ノックアウトマウスでは記憶が障害されることから注目されている. Arc mRNA はカムキナーゼ II mRNA と同様に神経細胞の樹状突起に存在する. 樹状突起の mRNA は, 刺激依存的に翻訳されタンパク質が合成されることが知られている. また, 樹状突起に mRNA が存在するタンパク質はカムキナーゼ II の基質やカムキナーゼ II と相互作用する場合が多い.⁶⁵⁾ これらの点から筆者は Arc に注目して, Arc のカムキナーゼ II に対する作用を解析した. ラット大脳において電撃刺激により誘導された Arc タンパク質は PSD に分布すること, Arc cDNA を培養神経芽細胞に導入し Arc タンパク質を発現させると Arc とカムキナーゼ II が相互作用すること, カムキナーゼ II の突起伸展作用は Arc により増強されること等が見出された.¹⁰²⁾ これらの結果から, PSD において Arc とカムキナーゼ II が相互作用することにより PSD における神経活動依存性のシナプス可塑性が調節される可能性が見出された.

8. カムキナーゼ II 遺伝子改変マウスの記憶・学習

カムキナーゼ II の役割を *in vivo* で解析するために, 遺伝子改変マウスが作製され, α カムキナーゼ II のノックアウトマウスは海馬の LTP が障害され, モリス水迷路学習テストによる空間学習が著しく低下することが初めて報告された.¹⁰³⁾ この研究は, LTP が学習・記憶の基礎過程であること, カムキナーゼ II が空間学習に必要であること, という画期的な結果を示しており, 記憶・学習という脳の高次機能が分子レベルで解明できる足掛かりを与えて, 神経科学の領域の研究に大きなインパクトと新しい視点を提供した. 現在では, α カムキナーゼ II の様々な遺伝子改変マウスが作製され機能解析されている.¹⁰⁴⁾

α カムキナーゼ II の 286 番目のスレオニンを変異した T286A 酵素は, 野生型と同じ Ca^{2+} 依存性活性を示すが, 自己リン酸化による Ca^{2+} 非依存性活性が生じない不活性な酵素である. この T286A 酵素をマウスに導入すると, LTP が低下し, 空間学習が著しく障害されることから, 記憶・学習に α カムキナーゼ II の自己リン酸化と Ca^{2+} 非依存性活性が重要であることが明らかとなった.¹⁰⁵⁾ α カムキナーゼ II の 286 番目のスレオニンを変異した T286D 酵素は, Ca^{2+} 非依存性活性を持ち, 自己リン酸化型酵素に類似した活性型酵素の性質を有する. この T286D 酵素をマウスに導入したトランスジェニックマウス Tg(T286D) は, 予想に反して記憶・学習能力が低下した. このことは, 刺激が長く持続することは反って神経機能の調節に混乱を引き起こし, 学習能力

を低下させることを示している。¹⁰⁶⁾ α カムキナーゼ II のスレオニン 305 と 306 は、自己リン酸化により酵素活性の低下を起こし、酵素は不活性化される。このスレオニン残基をそれぞれバリンとアラニンに変異した TT305/306VA 酵素はリン酸化されず不活性化されない。この遺伝子を導入したマウスは PSD のカムキナーゼ II レベルが高くなり、LTP は正常である。しかし、空間学習において初期の学習能力が障害されている。¹⁰⁷⁾ スレオニン 305 をアスパラギン酸に変異した T305D 酵素は、カルモデュリンによる酵素の活性化が起こらない不活性化型酵素であり、PSD への移行が阻害される。この遺伝子を導入したマウスは、LTP が誘導されず、学習能力が著しく障害される。¹⁰⁷⁾ これらの結果から、記憶・学習にはカムキナーゼ II の活性化が必要であることが明らかとなった。

前述のように α カムキナーゼ II mRNA は細胞体ばかりでなく樹状突起にも分布するが、3'非翻訳領域にある樹状突起移行シグナル配列を変異させたマウスは、樹状突起で α カムキナーゼ II タンパク質の合成が阻害され、樹状突起の酵素タンパク質レベルが低下する。このマウスは初期 LTP は正常で、短期記憶はできるが、後期 LTP が低下し、長期記憶が障害されることが見出され、 α カムキナーゼ II mRNA の樹状突起における翻訳が記憶形成に必要であることが明らかとなった。⁶⁴⁾

このような遺伝子導入マウスによる研究は、 α カムキナーゼ II の活性が高すぎても低すぎても、また、活性化が短時間でも長時間でも、記憶障害が起こり、 α カムキナーゼ II の適切なオン・オフの調節が記憶・学習に極めて重要であることを示している。したがって、神経活動依存性の α カムキナーゼ II の調節機構、及び α カムキナーゼ II によって調節される他のシグナル伝達経路との相互作用を明らかにすることが記憶・学習の分子過程解明に役立つと考えられる。

9. カムキナーゼ II と神経疾患

カムキナーゼ II は記憶・学習のキーとなる分子であるが、神経疾患との関連も注目されている。カムキナーゼ II のリン酸化の異常による活性調節の不調と精神疾患の関係が、重篤な認知障害と痙攣を伴う精神障害である Angelman's 精神遅滞症候群の病態マウスの研究により、初めて明らかにされ

た。⁴⁹⁾ 筆者はアルツハイマー病との関係に注目し細胞系を用いて研究を進めている。

9-1. アルツハイマー病タウのカムキナーゼ II によるリン酸化 アルツハイマー病は進行性神経変性疾患であり、神経細胞外に蓄積する老人斑と神経細胞内に蓄積する神経原繊維変性 (NFTs) により特徴付けられる。^{108,109)} 老人斑はアミロイド A β タンパク質が重合したものが主成分である。NFTs は、低分子微小管結合タンパク質であるタウが主成分であり、タウが異常に多くリン酸化され不溶性になる。NFTs が蓄積する結果神経細胞のアポトーシス経路が活性化され細胞死が起こる。NFTs の産生には多くのプロテインキナーゼによるタウのリン酸化が関わっている。タウのアルツハイマー病に特異的なリン酸化サイトは多数知られており、GSK3 や CDK5 等のプロリン指向性キナーゼと PKA や PKC 等の非プロリン指向性キナーゼの関与が推定されている。しかし、特定のキナーゼがアルツハイマー病タウの特定のリン酸化部位をリン酸化することの証拠はいまだ得られていない。ヒトのタウは選択的スプライシングによりいくつかのアイソフォームが存在するが、筆者は最も大きなスプライス産物であるタウ 441 を用いて、カムキナーゼ II でリン酸化し、マススペクトロメトリーによりリン酸化サイトを決定した。その結果、カムキナーゼ II はタウのアルツハイマー病に特異的なリン酸化サイトを 4 ヶ所リン酸化することが明らかとなった (Fig. 19)。¹¹⁰⁾ このことは、カムキナーゼ II は脳で最も多量に存在するキナーゼであることから、その活性化の調節において少し異常が継続することがアルツハイマー病の原因になる可能性を示している。

9-2. タウ過剰発現によるアポトーシス 神経細胞死におけるタウの役割を解析するために、タウ過剰発現細胞やタウノックダウン細胞を作製し調べた。アルツハイマー病におけるタウの効果調べるため動物を用いた研究が多く行われているが、正常なタウを過剰に発現させた場合には表現型の変化は観察されない。タウに変異を導入して初めてタウの過剰発現による細胞死が観察されるが、アルツハイマー病の多くはタウに異常がみられない。したがって、正常なタウを用いてアポトーシスを誘導する細胞や動物モデルを作製することが必要であると考えられる。筆者はこの点を解析の容易な細胞系を用い

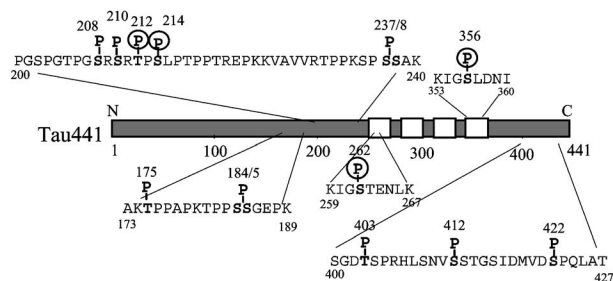


Fig. 19. Schematic Representation of AD Specific Phosphorylation Sites of Human Tau-441 in AD-tau

AD specific phosphorylation sites of AD-tau without the same sites of fetal type phosphorylation are indicated, although AD-tau is also phosphorylated at the same sites of fetal type phosphorylation. P: AD-tau specific phosphorylation site, P in circle; AD-tau specific phosphorylation site of CaM kinase II, □: tubulin binding site, numbers shows amino acid number from N-terminal amino acid as +1, amino acid sequences around AD-tau specific phosphorylation sites are also shown.

て検討した.¹¹¹⁻¹¹³⁾ 神経芽細胞にタウを過剰に発現した tau 細胞を作製し比較すると, tau 細胞は無処理の細胞 (wt 細胞) と, 通常の培養では表現型に違いがみられない。しかし, cAMP による分化誘導により, tau 細胞と wt 細胞に形態的な変化がみられ, 同時に, tau 細胞ではタウのリン酸化が亢進し, アポトーシス実行因子であるカスパーゼ 3 の活性も上昇する。しかし, リン酸化の過剰のみではカスパーゼ 3 の活性上昇が小さいために急速なアポトーシスが誘導されない。¹¹¹⁾ 一方, 別の細胞系においてタウを過剰発現させた場合でも, 正常細胞と表現型における変化は観察されないが, 神経分化誘導するためにレチノイン酸を添加することにより, tau 細胞では特異的に激しいアポトーシスが誘導された。^{112,113)} レチノイン酸は生理活性物質として様々な生理機能を調節することが知られている。過剰に発現したタウは細胞質の微小管から離れて核に移行した。このことから核におけるレチノイン酸・レチノイン酸受容体のシグナル伝達系がタウにより阻害され, 神経分化過程における著しいアポトーシスが誘導されると考えられた。¹¹²⁾ したがって, 神経細胞死を引き起こすためには, タウのリン酸化に加えて別の刺激が必要であることを示しており, 細胞系における解析からアルツハイマー病の病因に対する新しい可能性が提出された。

9.3. アポトーシスにおけるカムキナーゼ II の関与 タウ過剰発現細胞のレチノイン酸による神経分化過程で, タウ細胞特異的に著しいアポトーシス

が誘導されるが, このアポトーシスはカムキナーゼ II 阻害剤の添加で阻止され, 細胞の生存率が高くなる (未発表)。このアポトーシス阻止作用は, カルモデュリン阻害剤でも観察されることから, Ca^{2+} /カルモデュリンとカムキナーゼ II の経路の活性化によるタウのリン酸化とそれに続く核移行, 核移行したタウのレチノイン酸シグナル伝達の阻害によりアポトーシスする可能性が考えられ, アルツハイマー病へのカムキナーゼ II の関与が考えられる。

10. 記憶分子・記憶装置

記憶・学習は神経細胞と神経細胞のネットワークにより形成され保持されると考えられる。ヒトの脳ではおよそ 1000 億の神経細胞があり, 中枢神経の 1 つの神経細胞は, 約 1000 個のシナプスを持つといわれており, 多くの信号を受容すると同時に多くの神経細胞へ信号を発信している。このような神経細胞のネットワーク形成や記憶形成の機構の全容を明らかにすることは極めて困難であるが, 1 つ 1 つの神経細胞には, 記憶の素子となる記憶分子, 記憶装置が存在することが想定される。カムキナーゼ II は, 上述のように「記憶分子」として働くことが明らかとなった。1 つのタンパク質分子でこれ程多様な研究が推進されている分子は, カムキナーゼ II 以外にほとんどみられない興味深い分子である。また, 多くの酵素やタンパク質のノックアウトマウスやノックインマウスが記憶・学習能力の亢進や障害を引き起こすという報告も蓄積しており, これらの分子も記憶分子として働く可能性があり, カムキナーゼ II との相互作用やシグナル伝達経路の調節が記憶装置の中で起こっていると考えられる。また, 神経細胞には種々の記憶分子から形成される特徴的な「記憶装置」が存在すると考えられるが, 装置の実体は, 一部はカムキナーゼ II と共存する細胞内部位に存在すると考えられる。PSD の分子構成やカムキナーゼ II の役割に対する多くの研究から, PSD が記憶装置としての基本的性質を備えていると考えられる。

記憶・学習は, 多くの分子が共同して働く過程として次のように考えられる。すなわち, 脳の興奮性神経の活動により神経伝達物質のグルタミン酸が分泌される。分泌されたグルタミン酸は, ポストシナプス細胞の PSD に作用し, 細胞内で Ca^{2+} が上昇し, カムキナーゼ II が活性化され, 一連のシグナ

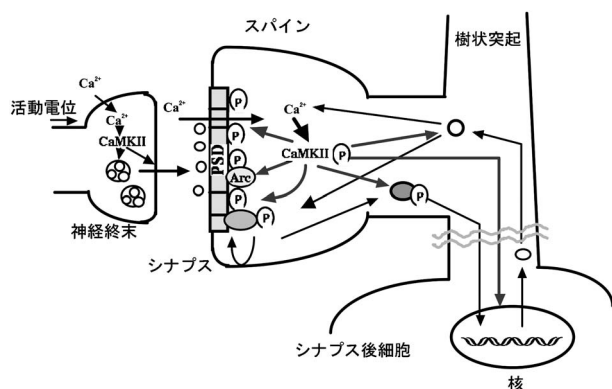


Fig. 20. Schematic Representation of the Regulation of PSD and Postsynaptic Signaling by CaM Kinase II³⁾

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 in the PSD of postsynaptic cells, and Ca^{2+} enters into postsynaptic cells. Ca^{2+} binds calmodulin and activates CaM kinase II. The activated CaM kinase II is autophosphorylated at Thr286 and translocated to the PSD, and then phosphorylates various PSD proteins. At the same time, the activated CaM kinase II also phosphorylates various proteins in postsynaptic cells. Phosphorylated proteins change their activity resulted in the activation of the signal pathway. Arc is also induced by strong stimuli, and potentiates CaM kinase II function. When the signaling reaches to the nuclei, gene expression and synthesis of synaptic proteins are activated, new synapses are formed and stabilized resulting in a change of synaptic activity, and then memory is formed and stabilized.

ル伝達系が活性化されることにより伝達される。刺激を受けた初期には、PSD やその近傍のタンパク質のリン酸化が起こり、その後、樹状突起に存在する mRNA の翻訳や、細胞体からの物質輸送により新しいシナプスが形成され、記憶が固定されると考えられる (Fig. 20).³⁾ このように、プレシナプス細胞の軸索終末の分泌装置と PSD の記憶装置が神経活動依存的に相互作用し、動的に変化することにより、神経細胞と神経細胞の相互作用の効率が変化し、シナプスを組換え、可塑性が現れると考えられる。

11. おわりに

シナプス可塑性と記憶・学習について、分子レベルで徐々に明らかになってきた。そのきっかけとなったのがカムキナーゼ II の神経細胞での役割の解析である。筆者はカムキナーゼ II を発見してから研究が進展し、4 半世紀に渡り一貫して本酵素が関与する過程の研究が続けられたことは非常に幸運であった。カムキナーゼ II は特有の性質を持ち、記憶・学習等神経機能調節に中心的な役割を果たすことから、世界的に注目されている分子であり、現在でも精力的に研究が推進されている。カムキナーゼ II に関する多くの研究から、本酵素は Fig. 1 に示

すようなシナプス機能からシナプス可塑性に結びつく一連の反応のほとんどすべての局面に関与することが明らかとなった。本酵素について詳細に研究することにより、神経機能調節の基本的な過程が 1 つの流れとして理解できると考えられる。すなわち、神経伝達物質が合成され貯蔵される過程、刺激により分泌される過程、伝達物質が受容体に結合し細胞内に情報が伝達される過程、神経突起やスパインの運動性の亢進、樹状突起でのタンパク質の翻訳と PSD への局在化、遺伝子発現の変化等の一連の流れとして理解できる。神経細胞にはこのような情報伝達経路が多数存在することから、それぞれの経路のオン・オフや経路間での相互作用による調節が働き、新しいシナプスが形成され、シナプス伝達効率が変化し可塑性が現れる。したがって、脳のどの部位で、どのようなタイミングでそれぞれの分子や経路が作動するかを解析することにより、これらの経路の全体像が明らかとなり、その上で神経細胞と神経細胞のネットワークが形成され記憶が形成される過程が理解できると考えられる。

謝辞 筆者のカムキナーゼ II を中心とした研究は、旭川医科大学、東京都神経科学総合研究所、徳島大学薬学部において、恩師、先輩、同輩、後輩、研究協力者、大学院学生、研究室配属学生等、多くの人達とともに行われたものであり、皆様に深謝致します。本総説をこの 4 月に急逝された藤澤仁教授に捧げます。

REFERENCES

- 1) Moser M.-B., Trommald M., Andersen P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 12673–12675 (1994).
- 2) Brodal P., “The Central Nervous System: Structure and Function, 2nd ed.,” ed., by Brodal P., Oxford University Press, 1998, p. 145.
- 3) Yamauchi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1342–1354 (2005).
- 4) Yamauchi T., *Seikagaku*, **78**, 840–852 (2006).
- 5) Harris J. E., Morgenroth III V. H., Roth R. H., Baldessarini R. J., *Nature*, **252**, 156–158 (1974).
- 6) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.*, **82**, 514–517 (1978).
- 7) Yamauchi T., Fujisawa H., *J. Biol. Chem.*, **254**, 503–507 (1979).
- 8) Yamauchi T., Fujisawa H., *J. Biol. Chem.*, **254**, 6408–6413 (1979).
- 9) Yamauchi T., Fujisawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 219–226 (1979).
- 10) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 28–35 (1979).
- 11) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Int.*, **1**, 98–104 (1980).
- 12) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **90**, 1172–1178 (1979).
- 13) Yamauchi T., Fujisawa H., *FEBS Lett.*, **116**, 141–144 (1980).
- 14) Yamauchi T., Fujisawa H., *FEBS Lett.*, **129**, 117–119 (1981).
- 15) Hunter T., *Cell*, **50**, 823–829 (1987).
- 16) Yamauchi T., Nakata H., Fujisawa H., *J. Biol. Chem.*, **256**, 5404–5409 (1981).
- 17) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 807–813 (1981).
- 18) Ichimura T., Isobe T., Okuyama T., Yamauchi T., Fujisawa H., *FEBS Lett.*, **219**, 79–82 (1987).
- 19) Yamauchi T., Fujisawa H., *Eur. J. Biochem.*, **132**, 15–21 (1983).
- 20) Bennett M. K., Erondy N. E., Kennedy M. B., *J. Biol. Chem.*, **258**, 12735–12744 (1983).
- 21) Goldenring J. R., Gonzalez B., McGuire Jr. J. S., DeLorenzo R. J., *J. Biol. Chem.*, **258**, 12632–12640 (1983).
- 22) McGuinness T. L., Lai Y., Greengard P., Woodgett J. R., Cohen P., *FEBS Lett.*, **163**, 329–334 (1983).
- 23) Woodgett J. R., Cohen P., Yamauchi T., Fujisawa H., *FEBS Lett.*, **170**, 49–54 (1984).
- 24) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **886**, 57–63 (1986).
- 25) 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).
- 26) Bennett M. K., Kennedy M. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 1794–1798 (1987).
- 27) Hanson P. I., Schulman H., *Ann. Rev. Biochem.*, **61**, 559–601 (1992).
- 28) Yamauchi T., Ohsako S., Deguchi T., *J. Biol. Chem.*, **264**, 19108–19116 (1989).
- 29) Ohsako S., Watanabe A., Sekihara S., Ikai A., Yamauchi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 705–712 (1990).
- 30) Hagiwara T., Ohsako S., Yamauchi T., *J. Biol. Chem.*, **266**, 16401–16408 (1991).
- 31) Kanaseki T., Ikeuchi Y., Sugiura H., Yamauchi T., *J. Cell Biol.*, **115**, 1049–1060 (1991).
- 32) Ohsako S., Nishida Y., Ryo H., Yamauchi T., *J. Biol. Chem.*, **268**, 2052–2062 (1993).
- 33) Takamatsu Y., Ohsako S., Nishida Y., Yamauchi T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1220**, 188–192 (1994).
- 34) Tombes R. M., Faison M. O., Turbeville J. M., *Gene*, **322**, 17–31 (2003).
- 35) Braun A. P., Schulman H., *Annu. Rev. Physiol.*, **57**, 417–445 (1995).
- 36) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 975–981 (1982).
- 37) Yamauchi T., Fujisawa H., *Arch. Biochem. Biophys.*, **234**, 89–96 (1984).
- 38) Yoshimura Y., Shinkawa T., Taoka M., Kobayashi K., Isobe T., Yamauchi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 948–954 (2002).
- 39) Yano T., Tokui T., Nishi Y., Nishizawa K., Shibata M., Kikuchi K., Tuiki K., Yamauchi T., Inagaki M., *Eur. J. Biochem.*, **197**, 281–290 (1991).
- 40) Kennelly P. J., Krebs E. G., *J. Biol. Chem.*, **266**, 15555–15558 (1991).
- 41) Ando S., Tokui T., Yamauchi T., Sugiura H., Tanabe K., Inagaki M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 955–962 (1991).
- 42) Yamauchi T., Sekihara S., Ohsako S., *Brain Res.*, **541**, 198–205 (1991).
- 43) Urushihara M., Yamauchi T., *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4802–4808 (2001).
- 44) Lai Y., Nairn A. C., Greengard P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4253–4257 (1986).
- 45) Miller S. G., Kennedy M. B., *Cell*, **44**, 861–870 (1986).
- 46) Ohsako S., Nakazawa H., Sekihara S., Ikai A., Yamauchi T., *J. Biochem.*, **109**, 137–143 (1991).

- 47) Meyer T., Hanson P. I., Stryer L., Schulman H., *Science*, **256**, 1199–1202 (1992).
- 48) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 213–219 (1985).
- 49) Weeber E. J., Jiang Y. H., Elgersma Y., Varga A. W., Carraquillo Y., Brown S. E., Christian J. M., Mirnikjoo B., Silva A., Beaudet A. L., Sweatt J. D., *J. Neurosci.*, **23**, 2634–2644 (2003).
- 50) Ichikawa T., Sekihara S., Ohsako S., Hirata Y., Yamauchi T., *J. Chem. Neuroanat.*, **5**, 383–390 (1992).
- 51) Terashima T., Ochiishi T., Yamauchi T., *J. Comp. Neurol.*, **340**, 469–479 (1994).
- 52) Ochiishi T., Terashima T., Yamauchi T., *Brain Res.*, **634**, 257–265 (1994).
- 53) Terashima T., Ochiishi T., Yamauchi T., *Brain Res.*, **650**, 133–139 (1994).
- 54) Ochiishi T., Terashima T., Yamauchi T., *Brain Res.*, **659**, 179–173 (1994).
- 55) Terashima T., Ochiishi T., Yamauchi T., *Anat. Embryol.*, **192**, 123–136 (1995).
- 56) Ochiishi T., Yamauchi T., Terashima T., *Brain Res.*, **790**, 129–140 (1998).
- 57) McGuinness T. L., Lai Y., Greengard P., *J. Biol. Chem.*, **260**, 1696–1704 (1985).
- 58) Miller S. G., Kennedy M. B., *J. Biol. Chem.*, **260**, 9039–9046 (1985).
- 59) Yamauchi T., Sekihara S., Ohsako S., *FEBS Lett.*, **266**, 55–58 (1990).
- 60) Lisman J., Schulman H., Cline H., *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 175–190 (2002).
- 61) Sugiura H., Yamauchi T., *Brain Res.*, **593**, 97–104 (1992).
- 62) Sugiura H., Yamauchi T., *Brain Res.*, **659**, 42–54 (1994).
- 63) Yamauchi T., Sugiura H., Hirabayashi T., “Neurosci. Protocols, Module 6, 95–030–03,” ed. by Gouterlood F. G., Elsevier Science, Amsterdam, 1995, pp. 1–15.
- 64) Miller S., Yasuda M., Coats J. K., Jones Y., Martone M. E., Mayford M., *Neuron*, **36**, 507–519 (2002).
- 65) Steward O., Schuman E. M., *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 299–325 (2001).
- 66) Nishioka N., Shiojiri M., Kadota S., Morinaga H., Kuwahara J., Arakawa T., Yamamoto S., Yamauchi T., *FEBS Lett.*, **396**, 333–336 (1996).
- 67) Donai H., Morinaga H., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **94**, 35–47 (2001).
- 68) Mima K., Deguchi S., Yamauchi T., *Neurosci. Lett.*, **307**, 117–121 (2001).
- 69) Mima K., Donai H., Yamauchi T., *Biol. Proced. Online*, **3**, 79–90 (2002).
- 70) Sakurada T., Mima K., Kurisaki A., Sugino H., Yamauchi T., *Neurosci. Res.*, **53**, 323–330 (2005).
- 71) Aruga J., Inoue T., Hoshino J., Mikoshiba K., *J. Neurosci.*, **22**, 218–225 (2002).
- 72) Ochiai N., Masumoto S., Yoshimura Y., Yamauchi T., *Neurosci. Res.* **58**, 67–76 (2007).
- 73) Liu L., McKeehan W. L., *Genomics*, **79**, 124–136 (2002).
- 74) Donai H., Murakami T., Amano T., Sogawa Y., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **85**, 189–199 (2000).
- 75) Donai H., Nakamura M., Sogawa Y., Wang J. K. T., Urushihara M., Yamauchi T., *Neurosci. Lett.*, **293**, 111–114 (2000).
- 76) Ziv N. E., Garner C. C., *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 385–400 (2004).
- 77) Yamauchi T., Fujisawa H., “Calmodulin and Intracellular Ca²⁺ Receptors,” eds. by Kakiuchi S., Hidaka H., Means A. R., Plenum Press, New York, 1982, pp. 267–280.
- 78) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 287–291 (1983).
- 79) Yamauchi T., Fujisawa H., *Biochim. Biophys. Acta*, **968**, 77–85 (1988).
- 80) Benfenati F., Valtorta F., Rubenstein J. L., Gorelick F. S., Greengard P., Czernik A. J., *Nature*, **359**, 417–420 (1992).
- 81) Ohyama A., Hosaka K., Komiya Y., Akagawa K., Yamauchi E., Taniguchi H., Sasagawa N., Kumakura K., Mochida S., Yamauchi T., Igarashi M., *J. Neurosci.*, **22**, 3342–3351 (2002).
- 82) Kennedy M. B., *Trends Neurosci.*, **20**, 264–268 (1997).
- 83) Yamauchi T., *Mass Spectrom. Rev.*, **21**, 266–286 (2002).
- 84) Sheng M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 7058–7061 (2001).
- 85) Yoshimura Y., Yamauchi Y., Shinkawa T.,

- Taoka M., Donai T., Takahashi N., Isobe T., Yamauchi T., *J. Neurochem.*, **88**, 759–768 (2004).
- 86) Peng J., Kim M. J., Cheng D., Duong D. M., Gyi S. P., Sheng M., *J. Boil. Chem.*, **279**, 21003–21011 (2004).
- 87) Ochiishi T., Sugiura H., Yamauchi T., *Brain Res.*, **610**, 97–107 (1993).
- 88) Yoshimura Y., Nomura T., Yamauchi T., *J. Biochem.*, **119**, 268–273 (1996).
- 89) Yoshimura Y., Yamauchi T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 26354–26359 (1997).
- 90) Yamauchi T., Yoshimura Y., *Life Sci.*, **62**, 1617–1621 (1998).
- 91) Yoshimura Y., Aoi C., Yamauchi T., *Mol. Brain Res.*, **81**, 118–128 (2000).
- 92) Yoshimura Y., Sogawa Y., Yamauchi T., *FEBS Lett.*, **446**, 239–242 (1999).
- 93) Robison A. J., Bartlett R. K., Bass M. A., Colbran R. J., *J. Biol. Chem.*, **280**, 39316–39323 (2005).
- 94) Barria A., Derkach V., Soderling T., *J. Boil. Chem.*, **272**, 32727–32730 (1997).
- 95) Gardoni F., Schrama L. H., Kamal A., Gispen W. H., Cattabeni F., Luca M. D., *J. Neurosci.*, **21**, 1501–1509 (2001).
- 96) Goshima Y., Ohsako S., Yamauchi T., *J. Neurosci.*, **13**, 559–567 (1993).
- 97) Nomura T., Kumatoriya K., Yoshimura Y., Yamauchi T., *Brain Res.*, **766**, 129–144 (1997).
- 98) Yamauchi T., Yoshimura Y., Nomura T., Fujii M., Sugiura H., *Brain Res. Protocols*, **2**, 250–258 (1998).
- 99) Sogawa Y., Yoshimura Y., Otaka A., Yamauchi T., *Brain Res.*, **881**, 165–175 (2000).
- 100) Sogawa Y., Yoshimura Y., Yamauchi T., *Brain Res. Protocols*, **8**, 159–169 (2001).
- 101) 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).
- 102) Donai H., Sugiura H., Ara D., Yoshimura Y., Yamagata K., Yamauchi T., *Neurosci. Res.*, **47**, 399–408 (2003).
- 103) Silva A. J., Paylor R., Wehner J. M., Tonegawa S., *Science*, **257**, 206–211 (1992).
- 104) Elgersma Y., Sweatt J. D., Giese K. P., *J. Neurosci.*, **24**, 8410–8415 (2004).
- 105) Giese K. P., Fedorov N. B., Filipkowski R. K., Silva A. J., *Science*, **279**, 870–873 (1998).
- 106) Mayford M., Wang J., Kandel E. R., O'Dell T. J., *Cell*, **81**, 891–904 (1995).
- 107) Elgersma Y., Fedorov N. B., Ikonen S., Choi E. S., Elgersma M., Carvalho O. M., Giese K. P., Silva A. J., *Neuron*, **36**, 493–505 (2002).
- 108) Spillantini M. G., Goedert M., *Trends Neurosci.*, **21**, 428–433 (1998).
- 109) Selkoe D. J., *Physiol. Rev.*, **81**, 741–766 (2001).
- 110) Yoshimura Y., Ichinose T., Yamauchi T., *Neurosci. Lett.*, **353**, 185–188 (2003).
- 111) Yoshizaki C., Tsukane M., Yamauchi T., *Neurosci. Res.*, **49**, 363–371 (2004).
- 112) Tsukane M., Yamauchi T., *Neurochem. Int.*, **48**, 243–254 (2006).
- 113) Tsukane M., Yoshizaki C., Yamauchi T., *Anal. Biochem.*, **360**, 114–122 (2007).