

シナプス可塑性に関与する CaM キナーゼ II の基質の同定と解析

Identification and analyses of substrates of CaM kinase II involved in synaptic plasticity

代表研究者 東京都神経科学総合研究所主任研究員 山形要人

Chief, Tokyo Metropolitan Institute for Neuroscience
Kanato YAMAGATA

Calcium-Calmodulin Kinase II (CaMKII) phosphorylates neuronal proteins, reflecting its involvement in the regulation of diverse functions such as synaptic plasticity (e.g. long-term potentiation). Recent progress in the studies of the relationship between gene expression and the modulation of learning and memory showed that the expression of immediate early genes (IEGs) is a necessary prerequisite for the formation of memory. I have identified several novel IEG cDNAs that are rapidly induced in neurons by activity in models of plasticity. To clarify the relationship between CaMKII and IEG proteins in terms of synaptic plasticity, first of all I tested whether IEG products I have analyzed could be substrates of CaMKII in vitro. Second, I tried to identify proteins interacting with CaMKII by using yeast two-hybrid system. Finally, I identified a new IEG protein which was phosphorylated by CaMKII and turned to be a novel synapse adhesion molecule. These results suggest that CaMKII phosphorylates a variety of neuronal proteins involved in synaptic plasticity and might modulate synaptic transmission and connection by regulating their physiological functions.

研究目的

Ca²⁺-カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaM キナーゼ II) は脳内のプロテインキナーゼの中では最も多量に発現しており、シナプス後肥厚の主要な構成蛋白質である。さらに自己リン酸化され、キナーゼ活性が長期に持続することな

どから、神経活動によるシナプス可塑性との関連が考えられている。実際、CaM キナーゼ II が空間記憶に関与することが、knock out mouse や 286D mutant (自己リン酸化され、Ca²⁺-カルモジュリンに非依存性に活性化される) の transgenic mouse を用いた学習実験から明らかになった。すなわち、 α CaM キナーゼ II の

遺伝子を破壊した変異マウスでは海馬におけるLTPが著しく減弱し、さらにこのマウスの学習能力を調べたところ空間記憶が著しく障害されていた。このようにCaMキナーゼIIそのもののシナプス可塑性における役割については詳しく解析されてきたが、可塑性に関与する基質についてはよくわかっておらず、今後はこれらの同定・解析がCaMキナーゼII研究の中心課題になると考えられる。我々は既にシナプス活動によって発現調節される可塑性遺伝子を幾つか単離同定しており、これらの遺伝子産物が神経活動によるシナプス伝達効率およびシナプスの形態変化を引き起こすと考えている。本研究では我々が同定した可塑性遺伝子産物がCaMキナーゼIIの基質となりうるかどうかを検討すると同時に、他の基質を見つけるためにyeastのtwo-hybrid systemを用いて海馬のライブラリーをスクリーニングする。

研究経過

我々が単離した海馬の神経活動によって発現調節される遺伝子(=可塑性遺伝子)産物には次のようなものがある。

- a) 新しいアクチン結合蛋白質 Arc
- b) 新しい低分子量GTP結合蛋白質 Rheb
- c) Zinc finger型DNA結合蛋白質 Egr3
- d) 誘導型プロスタグランジン合成酵素 Cox-2

これらの遺伝子産物のうちCaMキナーゼIIによるリン酸化配列が見出されたArc、Rhebに関して大腸菌でそれぞれ融合蛋白質を作らせ、それらを基質としてin vitroでCaMキナーゼIIによるリン酸化実験を行った。

次にこれら以外のCaMキナーゼII基質を同定・解析するために、yeastのtwo-hybrid systemを用いてCaMキナーゼ

IIの結合蛋白質の単離を試みた。

最後に、今年度新たに発見した可塑性遺伝子産物にもCaMキナーゼIIによるリン酸化配列が見出されたので、In vitroのリン酸化実験を行い、この遺伝子および遺伝子産物の解析を引き続き行った。

研究成果

まず、我々が単離した海馬の可塑性遺伝子産物のリン酸化を試みた。

Arc (Activity and developmentally regulated protein associated with cytoskeleton) は分子量約50 kDaの可溶性蛋白質で、一次構造上はSpectrinと相同性が認められ、融合蛋白質は細胞骨格と結合・共沈する。またCaMキナーゼIIと同様にmRNA、蛋白質ともに樹状突起に発現する特徴がある。またRheb (Ras-homologue enriched in brain) は、Ras familyに属する新しい低分子量G蛋白質である。この二つの可塑性遺伝子産物を大腸菌に発現させ、in vitroでCaMキナーゼIIによるリン酸化実験を行った。予想通り、この二種類の蛋白質はCaMキナーゼIIによってリン酸化され、可塑性に関与するCaMキナーゼII基質であることが示唆された。

次にその他のCaMキナーゼII基質を同定・解析するために、yeastのtwo-hybrid systemを用いてCaMキナーゼIIの結合蛋白質の単離を試みた。CaMキナーゼII cDNAをGal4 DNA結合ドメインの下流(PC97)につなぎ、transactivationドメインの下流(PC86)にラット海馬のcDNAライブラリーをつないだベクターと一緒にyeastにtransfectionし、Leu-/Trp-プレートで生育したコロニーのβ-ガラクトシダーゼ活性を指標に結合蛋白質をスクリーニン

グした。しかし、陽性クローンを単離することはできなかった。原因としては、ライブラリーの出来と言った技術的問題もあるが、この場合は別の要因も考えられる。すなわち、CaM キナーゼ II が活性化されて初めて別の蛋白質と結合するならば、Ca²⁺ を結合したカルモジュリンが必要であるが、Yeast 内の Ca²⁺ 濃度は低く、また Ca²⁺-カルモジュリンが存在しても yeast 由来であるため、CaM キナーゼ II を活性化出来なかった可能性がある。

最後に、今年度新たに発見した可塑性遺伝子産物にも CaM キナーゼ II によるリン酸化のコンセンサス配列が見出されたので、in vitro のリン酸化実験を行ったところ、この遺伝子産物もリン酸化されることが確認された(図 1)。そこでこの基質(=蛋白質)を明らかにするため、完全長の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定したところ、この遺伝子産物がカドヘリンファミリーに属する新しい細胞接着因子をコードすることがわかり、Arcadlin (Activity-regulated Cadherin-like protein) と名付けた。Arcadlin は六個のカドヘリンリピートからなる細胞外領域、一個の膜貫通領域、細胞内領域によって構成されており、CaM キナーゼ II によるリン酸化配列が細胞内に二カ所見出された(図 2)ことから、この部位がリン酸化されたと考えられる。この遺伝子を線維芽細胞に過剰発現させ、細胞接着実験を行ったところ、この蛋白質の細胞外領域がホモフィリックに結合することが明らかになった。つまり、Arcadlin は神経活動によって発現誘導され、シナプス前後膜でホモフィリックに結合することによって、神経活動後のシナプス結合強化に直接関与している分子と考えられた。

今後の課題と発展

細胞内 Ca²⁺ 濃度の問題、活性化にカルモジュリンが必要なことなどの理由で、Two-hybrid system を用いて CaM キナーゼ II の結合蛋白質を単離することはできなかった。これらの問題を解決するためには、Yeast に何らかの受容体の cDNA を発現させ、細胞外刺激することによって Yeast 内の Ca²⁺ 濃度を上昇させるか、或いはカルモジュリン cDNA を Yeast 内に過剰発現させる必要がある。

また神経活動によって発現調節される遺伝子産物 Arc、Rheb が CaM キナーゼ II によってリン酸化されることが明らかになったが、今後はリン酸化による可塑性遺伝子産物の機能制御を明らかにする必要がある。すなわち、それぞれの蛋白質のリン酸化部位を決定し、さらにその生理活性に及ぼす影響を検討する。また Arc、Rheb の結合蛋白質の cDNA もクローニングしているため、リン酸化による結合状態の変化を解析する。さらに、新たに見出した接着因子 Arcadlin も細胞内領域がリン酸化されることが確認されたので、リン酸化と細胞接着活性、あるいは他の蛋白質との相互作用を解析していく。

最後に CaM キナーゼ II が入力されたシナプス近傍の可塑性遺伝子産物だけをリン酸化することによって、そのシナプスの伝達効率増強および結合強化に関与している可能性も充分考えられるので、この仮説を検証していきたい。

謝辞

本研究は杉浦弘子博士(東京都神経科学総合研究所)および山内卓教授(徳島大学薬学部)のご協力を得て行われました。謹んでここに感謝致します。

発表論文リスト

1) Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin1- β : a possible role of prostaglandin synthesis responsible for fever. C. Cao, K. Matsumura, K. Yamagata and Y. Watanabe. Brain Res.733, 263-272, 1996.

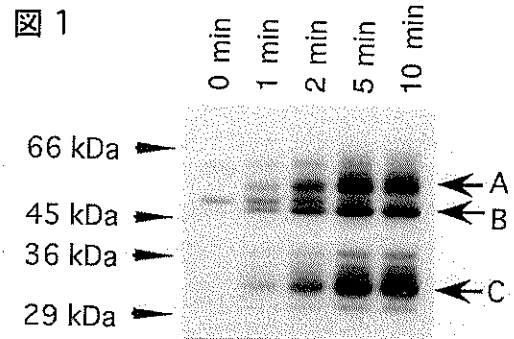
2) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA in gerbil hippocampal neurons after transient forebrain ischemia. T. Ohtsuki, K. Kitagawa, K. Yamagata, K. Mandai, T. Mabuchi, K. Matsushita, T. Yanagihara, and M. Matsumoto. Brain Res. 736, 353-356, 1996.

3) Involvement of cyclooxygenase-2 in LPS-induced fever and regulation of its mRNA by LPS in the rat brain. C. Cao, K. Matsumura, K. Yamagata and Y. Watanabe. Am. J. Physiol. 272, R1712-R1725, 1997.

4) Visinin, K. Yamagata and N. Miki, Guidebook to the calcium binding

proteins, M. R. Celio, ed. (Oxford press), p120-p122, 1996.

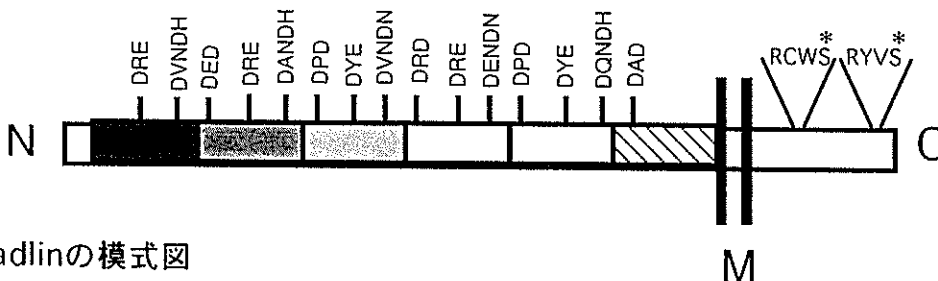
5) シナプス活動によって発現調節される新しい海馬遺伝子
入江康至 杉浦弘子 山形要人、
細胞 28, 78-83, 1996.



CaM キナーゼ II による Arcadlin 細胞内領域のリン酸化

Arcadlin 細胞内領域を GST との融合蛋白質として大腸菌に発現させ、それを基質として CaM キナーゼ II によるリン酸化実験を行った。[³²P]ATP を入れて反応を開始し、0、1、2、5、10 分後の反応産物を SDS-PAGE で解析した。A は自己リン酸化された CaM キナーゼ II、B は分解されていない Arcadlin 細胞内領域のリン酸化、C は分解産物のリン酸化を表す。

図 2



Arcadlin の模式図

六個のカドヘリンリピートからなる細胞外領域、膜 (M) 貫通領域、細胞内領域から構成されている。神経活動によって誘導され、シナプス部でホモフィリックに結合する。カドヘリンリピートのコンセンサス配列 (I) と CaM キナーゼ II によるリン酸化配列 (*) を示す。