

後シナプス肥厚部に存在する蛋白質
リン酸化酵素の動態解析

(研究課題番号：03680160)

平成4年度科学研究費補助金
(一般研究C) 研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 亀下 勇
(旭川医科大学医学部助教授)

は し が き

平成3年度から文部省科学研究費補助金（一般研究C）の助成のもとに行われた「後シナプス肥厚部に存在する蛋白質リン酸化酵素の動態解析」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果をまとめることになった。

本研究は、神経細胞間の情報伝達において重要な位置を占めるシナプス接合部で蛋白質リン酸化酵素がどのような役割を果たしているのかを明かにする目的でスタートした。特に後シナプス側の後シナプス肥厚部（PSD）は神経情報伝達における鍵をにぎる構造体と考えられてきたが、その解析のむずかしさからこれまで生化学レベルでの研究はほとんど進んでいない。そこで本研究では、まずこのPSD中に存在する蛋白質リン酸化酵素を解析する新しいアプローチとしてゲル内リン酸化法を開発し、予想していた以上に多くの新しい知見を得ることができた。特にこれまでに報告されていない数種類の蛋白質リン酸化酵素の検出、ならびに解析を行うことができたことから概ね初期の目的は達成できたと考えている。

さらに本研究を遂行する過程で、ゲル内リン酸化法により小脳に特に豊富に存在するカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV（CaMキナーゼIV）が検出された。この脳に特異的なCaMキナーゼIVをラット小脳から精製し、その性質を詳しく調べた。従来CaM依存性プロテインキナーゼの中ではCaMキナーゼIIが唯一の多機能性プロテインキナーゼと考えられてきたが、今回の研究によりCaMキナーゼIVもCaMキナーゼIIと同様に多機能性プロテインキナーゼであることが明らかにされた。さらに本研究では、CaMキナーゼIVの分子的性質を明らかにしただけでなく、酵素活性調節機構に関しても多くの興味ある知見を得ることができた。今後はCaMキナーゼIVと、これまで多くの研究がなされているCaMキナーゼIIを対比させながら、両酵素の生理的機能やそれぞれの役割分担等に関する研究をさらに発展させてゆきたいと考えている。

<研究組織>

研究代表者： 亀下 勇 （旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者： 藤澤 仁 （旭川医科大学医学部教授）

< 研究経費 >

平成3年度	100万円
平成4年度	90万円

計	190万円
---	-------

< 研究発表 >

(1) 学会誌等

1. 亀下 勇、藤澤 仁：ラット大脳CaM依存性プロテインキナーゼIVの自己リン酸化反応
神経化学 30 (1991)
2. Isamu Kameshita and Hitoshi Fujisawa: Phosphorylation and Functional Modification of CaM-dependent Protein Kinase IV by cAMP-dependent Protein Kinase
Biochem. Biophys. Res. Commun. 180 (1991)
3. 亀下 勇、藤澤 仁：ラット大脳CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによるリン酸化と活性調節
神経化学 31 (1992)
4. Osamu Miyano, Isamu Kameshita, and Hitoshi Fujisawa: Purification and Characterization of a Brain-specific Multifunctional CaM-dependent Protein Kinase from Rat Cerebellum
J. Biol. Chem. 267 (1992)
5. Isamu Kameshita and Hitoshi Fujisawa: Autophosphorylation of Calmodulin-dependent Protein Kinase IV from Rat Cerebral Cortex
J. Biochem. 印刷中 (1993)

(2) 口頭発表

1. 宮野 修、亀下 勇、藤澤 仁：脳特異的多機能性カルモデュリン依存性
プロテインキナーゼ（CaMキナーゼIV）の性質
日本生化学会 1991年10月（東京）
2. 亀下 勇、藤澤 仁：ラット大脳CaM依存性プロテインキナーゼIVの自
己リン酸化反応
日本神経化学会 1991年10月（東京）
3. Isamu Kameshita and Hitoshi Fujisawa: Regulation of
Multifunctional Calmodulin-dependent Protein Kinase IV
by Phosphorylation
8th International Conference on Second Messenger and
Phosphoproteins August 1992 (Glasgow, Scotland)
4. 亀下 勇、藤澤 仁：カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIVの自己
リン酸化による活性調節
日本生化学会 1992年10月（福岡）
5. 亀下 勇、藤澤 仁：ラット大脳CaM-キナーゼIVのA-キナーゼによる
リン酸化と活性調節
日本神経化学会 1992年10月（名古屋）

(3) 出版物

1. 亀下 勇、藤澤 仁：カルシウム依存性プロテインキナーゼ
Clinical Calcium 3 (1993)

<研究成果>

(1) 後シナプス肥厚部 (PSD) のプロテインキナーゼの解析

中枢神経シナプス接合部における情報伝達において重要な役割を果していると考えられている PSD に注目し、この部位に存在するプロテインキナーゼの解析を行った。PSD にはカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMキナーゼ II) が豊富に存在することが知られているが、その存在意義や可溶性画分に存在する CaMキナーゼ II との関係は明らかにされていない。そこでまず強力な変性剤であるグアニジン塩酸で PSD から CaMキナーゼ II を可溶化し、再生処理をした後、従来の方法をもちいて酵素を精製した。得られた標品の性質を調べたところ、自己リン酸化反応等の性質は PSD に組み込まれた状態の CaMキナーゼ II とは異なり、可溶型 CaMキナーゼ II の性質を示すことがわかった。この結果は、PSD 中の CaMキナーゼ II と可溶型酵素が同一の酵素であり、なんらかの原因で酵素の存在状態が変化することを示しているが、どのような機構で酵素が PSD に組み込まれるかについては今後に残された課題である。さらに PSD 中に含まれるプロテインキナーゼをゲル内リン酸化法で解析したところ約 10 種類のプロテインキナーゼを検出することができた。これらのプロテインキナーゼの分子量は 116 kDa、95 kDa、78 kDa、70 kDa、64 kDa、60 kDa、50 kDa、41 kDa、37 kDa、32 kDa であり、等電点は二次元電気泳動法によりそれぞれ 6.7 から 7.4 の範囲に分布していることがわかった。このうち 50 kDa と 60 kDa は、その性質から CaMキナーゼ II の α 、 β 各サブユニットに相当する蛋白であることが示された。41 kDa と 37 kDa の酵素は様々な基質蛋白質をリン酸化する基質特異性の広い酵素であることが明らかになった。また、95 kDa、78 kDa、70 kDa、64 kDa のプロテインキナーゼは特に PSD 中に豊富に見られる酵素であり、これまでに報告されていない新しい酵素と考えられた。これらの酵素は自己リン酸化活性は見られるものの、これまでに調べた種々の蛋白質を基質としてリン酸化しないことから、その生理的な基質は未だ同定されておらず、現在さらに詳しい解析を行っているところである。

(2) 脳特異的カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIVの解析

PSDのプロテインキナーゼ解析のために開発したゲル内リン酸化法を用いることにより、小脳細胞質画分に豊富に存在するCaMキナーゼIVが見いだされた。まず、ラット小脳から本酵素を精製し、その性質を詳細に調べた。精製酵素はSDS電気泳動上63kDaと66kDaの2本のバンドとして観察されたが、蔗糖密度勾配遠心法とゲル濾過法によりモノマー酵素であることが明かにされた。本酵素の基質特異性は広く、シナプシンI、ミエリン塩基性蛋白質、微小管結合蛋白質2、チロシン水酸化酵素、ミオシン軽鎖など様々な蛋白質をリン酸化することがわかった。つづいて本酵素のリン酸化による活性制御について解析を行った。本酵素はカルシウム/CaM依存的な自己リン酸化により酵素1モルあたり約1モルのリン酸化が取り込まれ、それに伴い10倍以上の活性増大がみられた。この時、CaM非依存性活性も顕著に増大していた。³²P-ATPでリン酸化した酵素の解析を行ったところ、本酵素の活性化に関与するリン酸化部位が、C末端近くのSer⁴³⁷であることが明らかになった。また、別のプロテインキナーゼによるCaMキナーゼIVのリン酸化を調べたところ、cAMP依存性プロテインキナーゼ(A-キナーゼ)によりリン酸化を受けることがわかった。A-キナーゼによるリン酸化では自己リン酸化とは逆に顕著な活性抑制が観察された。A-キナーゼによりリン酸化される部位はCaMキナーゼIVのCaM結合部位のごく近傍であることが、リン酸化酵素のアミノ酸配列分析より明かにされた。A-キナーゼによりリン酸化された酵素はCaMに対する親和性が低下していたが、この原因はCaM結合部位近傍へのリン酸基の導入によるためと考えられた。以上の結果から、CaMキナーゼIVが2種類の異なるセカンドメッセンジャーにより逆方向の活性調節を受けるという興味深い活性制御機構を備えた酵素であることが明らかになった。