

多機能性Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの活性を 制御するプロテインホスファターゼ

末吉紀行, 石田敦彦*, 茂里 康+, 亀下 勇

Protein phosphatases that regulate multifunctional calmodulin-dependent protein kinases

Noriyuki SUEYOSHI, Atsuhiko ISHIDA, Yasushi SHIGERI, Isamu KAMESHITA

はじめに

細胞内の全タンパク質のおよそ3分の1がリン酸化を受けていると言われているが、これらのリン酸化・脱リン酸化を触媒する酵素がプロテインキナーゼ及びプロテインホスファターゼと呼ばれる酵素群である。プロテインキナーゼ・プロテインホスファターゼは細胞内情報伝達における鍵酵素として細胞増殖制御や細胞死など様々な細胞応答に重要な役割を担っており、これらの酵素の異常は癌をはじめとする各種疾病に深く関わっていると考えられることから、最近では創薬の新たなターゲットとしても注目を集めている。プロテインキナーゼは基質タンパク質をリン酸化するだけでなく、しばしばそれ自身が他のプロテインキナーゼの基質となったり、自分自身を基質にしたりしてリン酸化を受けるが、このようなプロテインキナーゼ自身のリン酸化反応はそのプロテインキナーゼの活性制御に重要なステップとなっている場合が多い⁽¹⁾。従ってこれらリン酸化型プロテインキナーゼの脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼもプロテインキナーゼの活性制御に重要な役割を担っている。逆にプロテインホスファターゼもプロテインキナーゼによるリン酸化によって活性が制御されている例が多数見受けられる。このように細胞内の情報伝達はプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの織りなすリン酸化・脱リン酸化の微妙なバランスの上に成り立っている訳であるが、そのような例の一つとして本稿では多機能性Ca²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) を取り上げ、これらのプロテインキナーゼがどのようなプロテインホスファターゼによってどのように制御されているのかについて詳述したい。

一般にホルモンなどの刺激によって細胞内の遊離Ca²⁺濃度が上昇すると細胞内のCa²⁺受容体であるカルモデュリン (CaM) にCa²⁺が結合してCa²⁺/CaM複合体を形成す

る。このCa²⁺/CaMが種々のCa²⁺/CaM依存性酵素を活性化して多種多様なCa²⁺依存性応答を引き起こすと考えられるが、中でも重要であると考えられるのがCa²⁺/CaMによって活性化される一群のセリン・スレオニンプロテインキナーゼ、CaMKである^(2,5)。CaMKは基質特異性が厳密なCaMKと基質特異性の広い多機能性CaMKとに大別される。前者にはミオシン軽鎖キナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、CaMKIIIなどが含まれるが、これらはいずれも基質特異性が高く、特定の基質 (ミオシン軽鎖キナーゼ; ミオシン軽鎖, ホスホリラーゼキナーゼ; グリコーゲンホスホリラーゼ, CaMKIII; EF-2) のリン酸化を通じてCa²⁺依存性の生理作用の発現に関わっている。これに対し、多機能性CaMKは基質特異性が広く、様々なタンパク質のリン酸化を通じてより多彩な生理作用の発現に関与しているものと考えられている。本稿では後者の多機能性CaMKとそれらのプロテインホスファターゼによる制御に論点を絞って解説することとしたい。

1. 多機能性CaMKについて

表1に多機能性CaMKの生化学的諸性質と生理的意義を簡単にまとめた。中でもCaMKIIは極めて幅広い基質特異性を持ち、実に多くのタンパク質が基質になることが報告されている⁽⁶⁻⁹⁾。本酵素は脳に豊富に存在し、神経伝達物質の合成や分泌、神経伝達物質受容体の制御などを介して、記憶をはじめとする高次神経機能の制御に重要な役割を担っており、最近ではCaMKIIのノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いてCaMKIIの脳における機能が個体レベルで次々に明らかになってきている⁽¹⁰⁾。脳の海馬の興奮性入力繊維束に高頻度電気刺激を与えると、その経路のシナプス伝達効率がその後長期に渡って著しく亢進する現象を長期増強 (LTP) と呼び、記憶の素過程としてその分子メカニズムが盛んに研究されているが、CaMKIIは、LTPの発現機構において必須の役割を担っていることが広く受け入

* 旭川医大・医・一生化

+ 産総研

表1 多機能性CaMKsの諸性質

	CaMKII	CaMKIV	CaMKI
構造	オリゴマー (~550 kDa) (サブユニット=50~60 kDa)	モノマー (~60 kDa)	モノマー (~40 kDa)
分布	組織細胞内 普遍的 (脳に豊富) シナプス後肥厚, 細胞質	脳と胸腺核	普遍的細胞質
基質	チロシンヒドロキシラーゼ, トリプトファンヒドロキシラーゼ, シナプシンI, GluR1, グリコーゲンシンターゼ, MAP2, ホスホランパン等	シナプシンI, MAP2, ミエリン塩基性タンパク質, Rap-1b, CREB, SRF, MFE2D 等	シナプシンI, CFTR, CRE等
生理的役割	炭水化物代謝, 転写, 細胞骨格形成, 心機能, 高次神経機能などの制御	転写, 高次神経機能などの制御, 精子形成, ミトコンドリア形成, 心肥大などへの関与	転写制御?
特異的阻害剤	CaMKII (281-309), CaMKII (273-302), KN-62, KN-93, AIP, CaMKIIN, PEP-19	KN-62	KN-62, CaMKI (294-321)
活性化機構	自己阻害ドメインのThr286が自己リン酸化されて活性化	活性化ループのThr196がCaMKキナーゼでリン酸化されて活性化	活性化ループのThr196がCaMKキナーゼでリン酸化されて活性化
作用するプロテインホスファターゼ	PP1, PP2A, PP2C, CaMKP	PP1, PP2A, PP2B, PP2C, CaMKP	PP2A, CaMKP

られている。またCaMKIIは脳以外にも多くの組織に分布しており、炭水化物の代謝制御、各種イオンチャネルの調節、転写制御、細胞骨格の制御、細胞内Ca²⁺動態の調節など、実に多彩な生理作用に関わっていることが示されている。

一方CaMKIVはCaMKIIと同様、多くのタンパク質を基質にするが、脳と胸腺に多く存在し、CREBやATF-1などの種々の転写因子のリン酸化を介してCa²⁺依存性の遺伝子発現の調節に関わっているとされる⁽²⁾。特にCREBを介した転写調節は記憶の形成や神経可塑性の制御に重要な役割を果たしているものと考えられている^(11,12)。精巣でも発現が認められ、精子形成に関与していることが示されている⁽¹³⁾。また、活性型CaMKIVを発現させたトランスジェニックマウスを用いた実験から心肥大⁽¹⁴⁾や筋肉におけるミトコンドリア生合成への関与⁽¹⁵⁾も示唆されている。

CaMKIは脳をはじめとする各種組織に幅広く分布しており、CaMKIVと似た基質特異性を示すが、その生理的役割については現在のところあまりよく分かっていない^(2,16)。

これら多機能性CaMKの活性発現には活性化因子であるCa²⁺/CaMのみならず、それぞれの酵素のリン酸化が極めて重要な役割を担っている。このリン酸化による活性化の機構は多機能性CaMKのスイッチオンのメカニズムとして詳細な研究が積み重ねられて来たので、次にその要点について簡単に解説する。

CaMKIIの活性は自己リン酸化によって複雑に制御されている。多くの自己リン酸化部位が同定されているが、

中でも重要とされているのは自己阻害ドメインに存在するThr286である。本酵素の活性発現には他のCaMKと同様、Ca²⁺/CaMが必須であるが、一旦活性化されると、このスレオニン残基が速やかに自己リン酸化を受けCa²⁺/CaMに依存しない活性の出現やCa²⁺/CaMに対する親和性の劇的な上昇など様々な酵素学的性状の変化が引き起こされる。これらの性質はCaMKIIがシナプスにおいてLTPを引き起こすのに極めて重要であると言われている。その他にも自己リン酸化による複雑な制御機構が存在するが詳細は他稿に譲る^(3,7,9)。

これに対し、CaMKIとCaMKIVはキナーゼドメインの活性化ループと呼ばれる領域に存在するスレオニン残基(CaMKIではThr177, CaMKIVではThr196)が上流の活性化酵素であるCaMKキナーゼによってリン酸化されることで強く活性化される^(2,3,5)。興味深いことにCaMKキナーゼもまたCa²⁺/CaM依存性のプロテインキナーゼであるが、このキナーゼの基質特異性はかなり厳密で⁽¹⁷⁾CaMKIとCaMKIVがよい基質になると報告されているが、AMPキナーゼ⁽¹⁸⁾やPKB^(19,20)も基質になるという報告もある。このCaMKキナーゼ→CaMKI/IVという活性化の様式はCaMKカスケードと呼ばれている。なお、CaMKIについては三次元構造がX線結晶解析により決定されており、その活性制御機構の詳細が立体構造のレベルで明らかにされている⁽²¹⁾。

2. プロテインホスファターゼによるCaMKのネガティブレギュレーション

このように、CaMKのスイッチオンの機構にあたるリ

ン酸化・自己リン酸化による活性化の機構については詳細な研究がなされてきたが、一方でスイッチオフの機構にあたる脱リン酸化による負の制御機構については従来あまり研究されて来なかった。しかし最近になってCaMKを脱リン酸化するプロテインホスファターゼの重要性が認識されるようになり、いくつかの報告がなされるようになった。以下に各々のCaMKの負の制御に関わるプロテインホスファターゼとその制御の生理的意義についてまとめた。

(1) プロテインホスファターゼによるCaMKIIのネガティブレギュレーション

前項で述べたようにCaMKIIは自己阻害ドメインのThr286を含むいくつかの部位の自己リン酸化によってその活性が複雑に制御されている。現在までに*in vitro*でCaMKIIを脱リン酸化して活性を制御することが示されているプロテインホスファターゼはPP1, PP2A, PP2C, CaMKPの4種である。表2に各プロテインホスファターゼの主な性質を簡単にまとめた。(詳細は総説参照⁽²²⁻²⁵⁾)

PP1は多機能性のセリン・スレオニン残基特異のプロテインホスファターゼのひとつで触媒サブユニットPP1cと調節サブユニットから構成されている。PP1cには数種のアイソフォームが知られているが、調節サブユニットには多くの分子が報告されており、PP1の活性調節や局在化、基質特異性の決定など極めて多彩な機能に参与している。

PP2Aは幅広い組織分布を示し、触媒サブユニット(C)と調節サブユニット(AまたはB/B"/PR72)との2量体または3量体の形で存在している。特に第3のサブユニットと呼ばれる調節サブユニット(B'/B"/PR72)には

著しい多様性が見られる。各サブユニットの翻訳後修飾や特異的な活性化物質・阻害物質による制御とあいまって複雑な活性・基質特異性・細胞内局在の制御が行われているものと考えられている。

一方PP2CはPP1, PP2A, PP2Bなどが属するPPPファミリーなどとは全く別の遺伝子ファミリー(PPMファミリー)に属するセリン・スレオニン残基特異のプロテインホスファターゼで、オカダ酸に非感受性で活性にMg²⁺またはMn²⁺を要求すること、調節サブユニットを持たない単量体として存在することなど、多くの点でPP1, PP2Aとは異なった生化学的性質を示す(表2参照)。

CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)の生化学的性質並びにその作用については3節にて詳述する。

PP1とPP2Aは早くから*in vitro*でCaMKIIを脱リン酸化して活性を負に制御することが知られていたが⁽²⁶⁻²⁸⁾、ラット前脳における自己リン酸化CaMKIIの脱リン酸化については、CaMKIIの存在様式によって作用するホスファターゼが異なるらしい。すなわち、可溶性のCaMKIIに関してはPP2Aが、シナプス後肥厚(PSD)に会合したCaMKIIについてはPP1が脱リン酸化に際してそれぞれ主要な役割を占めているとの報告がある⁽²⁹⁾。最近、シナプスレベルでの記憶のモデルとして注目を集めているLTPにおいて、PP1がCaMKIIの脱リン酸化による制御を介してその発現に必須の役割を担っているとする説が提唱されている⁽³⁰⁾。CaMKIIは自己リン酸化されるとPSDへ移行することが知られているが^(31,32)、PSDに存在するCaMKIIの濃度は100-200μMとかなりの高濃度に達すると考えられている。このCaMKIIは脱リン酸化されるとPSDから解離するが、PSDにおける自己リン酸化CaMKIIの脱リン酸化は主としてscaffolding proteinに

表2 多機能性CaMKsを脱リン酸化するプロテインホスファターゼの諸性質

	PP1	PP2A	PP2B/calcineurin	PP2C (α)	CaMKP
サブユニット構造	オリゴマー	オリゴマー	オリゴマー	モノマー	モノマー
触媒サブユニット	C (~37 kDa)	C (36 kDa)	A (58~64 kDa)	(42 kDa)	(54 kDa)
制御/標的タンパク質	DARPP-32 family (23-32 kDa), Spinophilin family (90-120 kDa), Yotiao (200 kDa) 等	A (65 kDa) B/PR55 (55 kDa) B'/B" (52-74 kDa) PR72 (59-130 kDa) 等	B (19 kDa) AKAP79 (79 kDa) FKBP12 (12 kDa) CAIN (240 kDa) 等		
ポリカチオンによる活性化	-	+	-	-	+
金属要求性	-	-	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
各種阻害剤への感受性					
Heparin	+	-	-	-	+
Inhibitor 2	+	-	-	-	-
Okadaic acid	+	+	-	-	-
Calyculin A	+	+	-	-	-
NaF	+	+	+	-	+
Orthovanadate	+	+	-	+	-
その他阻害剤	Microcystin, Tautomycin, Nodularin, Cantharidin, Fostriecin, Inhibitor 1	Microcystin, Tautomycin, Nodularin, Cantharidin, Fostriecin	Cyclosporin, FK506, Cycpermethrin, Deltamethrin		
基質特異性					
CaMKII	+	+	-	+	+
Phosphorylase a	+	+	-	-	-

よってPSDにつなぎ止められているPP1が担っているらしい^(29,33)。LismanとZhabotinskyによれば、このような環境下で自己リン酸化/脱リン酸化を行うCaMKII/PP1はシナプス伝達を担うAMPA型グルタミン酸受容体のリン酸化を介してシナプスの伝達効率を調節するための分子スイッチとして理想的な振る舞いをすると言う⁽³⁰⁾。

一方、ラット海馬抽出液中のプロテインホスファターゼ活性を自己リン酸化CaMKIIを基質にして調べたところ、脱リン酸化活性全体の90%をPP2AとPP2Cが占め、PP1は全体の10%にすぎないことが示されている⁽³⁴⁾。またラット脳スライス系の系において各種プロテインホスファターゼ阻害剤を用いた実験でも細胞質のCaMKIIの脱リン酸化は主にPP2Aが担っていると結論付けられている⁽³⁵⁾。

興味深いことにラット海馬CA1においてLTPを誘発すると、それに従ってPP2Aの活性が低下することが報告されている⁽³⁴⁾。このPP2Aの活性低下はPP2Aの調節サブユニットBがCaMKIIによって直接リン酸化されることによるものであるらしい。LTPに伴うこのPP2Aの活性低下はLTP誘発時におけるCaMKIIを含む多くの分子のリン酸化状態に影響を及ぼしている可能性がある。

ラット脳顆粒細胞における検討からCaMKIIの脱リン酸化にはオカダ酸感受性のプロテインホスファターゼに加え、オカダ酸非感受性のプロテインホスファターゼも関与していることが示唆されていたが⁽³⁶⁾、福永らは実際に*in vitro*でPP2Cが自己リン酸化CaMKIIを脱リン酸化してCaMKII活性を制御し得ることを示した⁽³⁷⁾。既述のようにラット海馬抽出液を用いた実験ではPP2Aと並んでPP2Cが可溶性自己リン酸化CaMKIIの脱リン酸化に重要であることが示唆されているが、PP1, PP2A, PP2Bと異なり、PP2Cには有効な特異的阻害剤が見出されていないこともあり、細胞レベルでの検討は不十分である。

CaMKIIは脳以外の組織でも重要な生理的役割を果たしている。例えば膵臓β細胞ではグルコース刺激に応答したインシュリンの分泌にCaMKIIが重要であることが報告されているが⁽³⁸⁾、プロテインホスファターゼ阻害剤を用いた解析から自己リン酸化CaMKIIの脱リン酸化にはβ細胞ではPP1及びMg²⁺依存性プロテインホスファターゼが⁽³⁹⁾、Acinar cellではPP1が主要な役割を担っていることが示されている⁽⁴⁰⁾。このように組織・細胞によって、また可溶性画分か顆粒画分かによって、CaMKIIの脱リン酸化に関わるプロテインホスファターゼは異なっているが、これは各種プロテインホスファターゼの組織分布や細胞内局在性の違いが大きく影響しているものと思われる。

なお、PP1, PP2A, PP2Cと並んで代表的な多機能性

プロテインホスファターゼとして知られるPP2B (カルシニューリン, 表2)はCa²⁺/CaM依存性プロテインホスファターゼであるが、CaMKIIを直接脱リン酸化することはないと考えられている。しかしながらPP1の特異的阻害タンパク質であるI-1はAキナーゼでリン酸化されるとPP1を阻害するようになり、PP2Bによる脱リン酸化でこの阻害が解除されることから、I-1/PP1を介したAキナーゼ/PP2Bによる間接的なCaMKIIの活性制御機構の存在が想定されている。上述のLTPにおいて、シナプスの刺激頻度(周波数)に応じて刺激頻度が高いとLTPを引き起こし、刺激頻度が低いと逆にシナプス伝達効率が低下する長期抑圧(LTD)が引き起こされることがよく知られているが、このような刺激頻度に応答したLTP/LTDの切り替えのメカニズムに、このAキナーゼとPP2Bによる間接的なCaMKIIの活性制御が関与している可能性が指摘されている^(25,41)。

またADPを過剰に加えると自己リン酸化CaMKIIがプロテインホスファターゼの作用によらず、キナーゼ自身の逆反応によってThr286の自己脱リン酸化が進行して脱活性化することも報告されている⁽⁴²⁾。

(2) プロテインホスファターゼによるCaMKI/CaMKIVのネガティブレギュレーション

CaMKI/CaMKIVは既に述べたようにCaMキナーゼカスケードの上流酵素CaMKキナーゼによって活性化ループに存在するスレオニン残基がリン酸化されることで強く活性化される。CaMKIVは当初、CaMK-Grと呼ばれていたが、当時はCaMKキナーゼの存在が知られていなかったため、精製標品に微量に含まれるCaMKキナーゼによるリン酸化を自己リン酸化によるものと見誤り、“自己リン酸化”により活性化されるものと考えられていた。Frangakisらはラット小脳抽出液から分画したMg²⁺依存性の未同定のプロテインホスファターゼがこの“自己リン酸化”されたCaMKIV (CaMK-Gr)を脱リン酸化して脱活性化することを見出した⁽⁴³⁾。その後、CaMKキナーゼの存在が明らかになり、*in vitro*及び*in vivo*でCaMKキナーゼにより活性化されたCaMKIVを用いて検討がなされ、PP2A処理によって顕著な脱活性化が引き起こされることが示された^(44,45)。このときPP1c処理では脱活性化が起こらないとされているが⁽⁴⁵⁾、笠原らは*in vitro*でリン酸化/活性化されたCaMKIVがPP1によって顕著に脱リン酸化/脱活性化されると報告している⁽⁴⁶⁾。彼らはPP1のみならずPP2A, PP2B, PP2Cによっても同様にCaMKIVの脱リン酸化/脱活性化が起こることを示した。興味深いことに海馬ニューロンをグルタミン酸刺激した時のCaMKIVのリン酸化の亢進がPP2B特異的阻

害剤であるシクロスポリンAの添加によって更に促進されるという⁽⁴⁶⁾。PP2BもCaMKIVの脱リン酸化による負の制御に関与しているのかもしれない。

一方、CaMKIVは細胞内でPP2Aと複合体を形成しており、このような相互作用にはCaMKIVの触媒ドメインが必須であることが示された。PP2A阻害タンパク質であるSV40 small T antigenの共発現によりCaMKIVによるCREB依存的な転写が活性化されたことから、このようなPP2A-CaMKIV複合体は細胞内で刺激後のCaMKIVの迅速な脱活性化に重要な役割を果たしていることが示唆された⁽⁴⁷⁾。このようなプロテインキナーゼ-PP2Aの組み合わせによる"Signaling complex"はS6 kinase, Casein kinase, PAK1, Raf-1, JAK2などの他のプロテインキナーゼにおいても観察されると言う^(24,48)。更に最近、心筋において発現しているCaMKIIの δ アイソフォームがやはりPP2Aと複合体を形成していることが報告された⁽⁴⁹⁾。

CaMKIの脱リン酸化による負の制御についての報告は少ないが、初期の研究においてラット脳より精製されたCaMKIがPP2A処理によって*in vitro*で脱活性化されることが示されている⁽⁵⁰⁾。

3. 多機能性CaMKに作用して負に制御する新規のプロテインホスファターゼ

以上で述べて来たようにCaMKを脱リン酸化して制御するプロテインホスファターゼはいずれもこれまでよく知られている基質特異性の広い多機能性プロテインホスファターゼである。しかしCaMKを制御しているプロテインホスファターゼは本当にこれらだけなのであるか？そこで他にもCaMKの活性制御に関わるプロテインホスファターゼが存在するかどうかを調べるため、まず従来法で検出できなかったプロテインホスファターゼを検出するための新たな手法を開発することにした。これらの手法は他のプロテインホスファターゼの同定・解析にも広く応用可能であるのでまずその手法について紹介することとしたい。

(1) 新規プロテインホスファターゼを検出するための方法

我々はこれまでの研究の過程でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) のゲル内でプロテインキナーゼ活性をオートラジオグラフィーのバンドとして検出することのできるインゲルプロテインキナーゼアッセイ法を開発してきた⁽⁵¹⁾。この方法は適当な基質ペプチド・タンパク質さえあればクルードな試料に精製操作を加えることなしに、その中に含まれるプロテインキナーゼの活性と分子量が同時に解析できる利点があり、多く

のプロテインキナーゼ研究に応用されて来た。我々は新規プロテインホスファターゼを探索する目的でこのインゲルアッセイ法をプロテインホスファターゼのアッセイに応用したインゲルプロテインホスファターゼアッセイ法を開発しようと考えた。CaMKIIの自己リン酸化部位Thr286を脱リン酸化するプロテインホスファターゼの解析を目的に、この部位周辺を模した合成ペプチドをポリリシンにコンジュゲートさせ、更にCaMKIIの活性フラグメントでリン酸化することによりプロテインホスファターゼ基質を調製した。これを固め込んだゲルを用いてSDS-PAGEを行い、SDSを除去した後、再生処理を施すと変性していたプロテインホスファターゼが再生され、ゲル内で脱リン酸化反応が進行してその酵素タンパク質が存在する位置に白く抜けたバンドが検出できる (図1)。上記の様にCaMKIIのThr286周辺の合成ペプチドを用いると、 Mn^{2+} 存在下に図1Bのような3つのプロテインホスファターゼのバンドが検出出来た。ラットの発生過程に伴ってそのプロテインホスファターゼ活性が変動していることが分かる。本法は再生が困難な酵素は検出ができないこと、単一のサブユニットで活性を示す酵素にしか適用できないこと、或いは精製画分の活性検定のように短時間で大量のサンプルを処理するには不向きであることなど種々の欠点もあるが、クルードな試料のままでもその中に含まれる目的のプロテインホスファターゼの活性と分子量を調べるのに極めて有効な手段を提供する。なお、グルタミン酸-チロシンのランダムコポリマーを用いたチロシンホスファターゼに関するインゲルプロテインホスファターゼアッセイも報告されている⁽⁵²⁾。

次にインゲルプロテインホスファターゼアッセイ法で検出されたプロテインホスファターゼを精製するため、各画分の活性検定に適した、より簡便で迅速なプロテインホスファターゼアッセイ法を開発した。従来、プロテインホスファターゼの活性測定にはホスホリラーゼやヒストンあるいはカゼインなど大量に入手できるタンパク質を適当なプロテインキナーゼと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPを用いてリン酸化したものを基質に用いるのが一般的であったが⁽⁵³⁾、基質調製が煩雑であることに加えて、これらのリン酸化タンパク質を基質にしないプロテインホスファターゼは検出できないという欠点がある。またp-nitrophenylphosphate (pNPP) を用いた活性測定⁽⁵³⁾もよく行われるが、この方法は簡便ではあるもののpNPPを脱リン酸化する一部の酵素にしか適用できない。そこでこれら従来法では検出できないようなプロテインホスファターゼにも応用可能なプロテインホスファターゼアッセイ法として基質タンパク質の代わりに合成ペプチドを磁気粒子に結合させたペプチドコンジュゲートを利

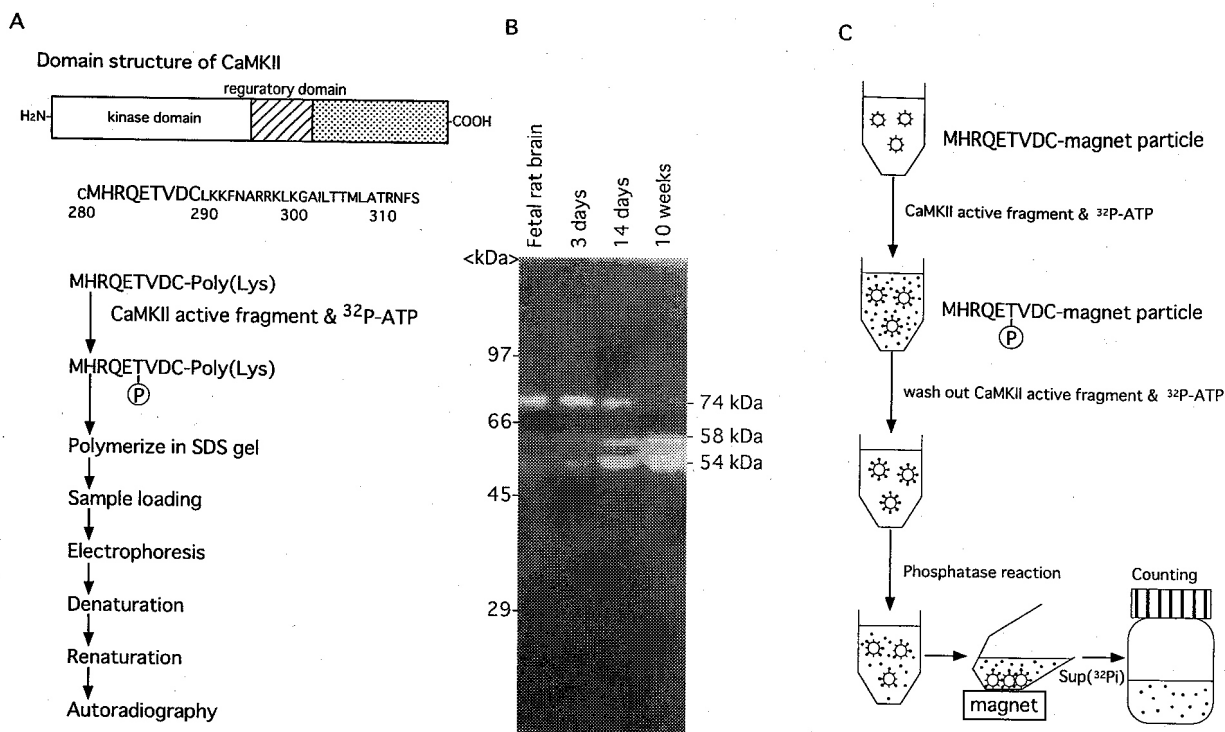


図1 プロテインホスファターゼを検出するために開発された新しい方法
 A, CaMKIIのThr286付近を模した合成ペプチドを用いたインゲルプロテインホスファターゼアッセイ法。
 B, インゲルプロテインホスファターゼアッセイ法で検出した, 発生段階で発現量が変化するプロテインホスファターゼ。
 C, 基質ペプチドを固定した磁気粒子を用いたプロテインホスファターゼアッセイ法。

用した新しいプロテインホスファターゼ活性測定法

(Immobilized phosphopeptide protein phosphatase assay 法)を開発した(図1C)⁽⁵⁴⁾。前述のインゲルアッセイに用いたのと同じCaMKIIのThr286周辺の合成ペプチドと磁気粒子のペプチドコンジュゲートを作製し,これをCaMKII活性フラグメントでリン酸化してリン酸化基質を調製した。これを用いてラット脳幹抽出液をDEAE-5PWで分画した各画分のプロテインホスファターゼ活性を調べてみたところ, Mn^{2+} とポリリシン存在下で, pNPP脱リン酸化活性とは異なる位置に本法でのみ検出できる活性ピークが検出できた。本法は1)基質が磁気粒子となっているため,過剰のATPやプロテインキナーゼとの分離が容易であること,2)アッセイの操作性がよいこと,3)様々な合成ペプチドとプロテインキナーゼの組み合わせで適当な基質を容易に調製できること,などの利点を持つ有用な方法である。コンジュゲートに使う合成ペプチド/プロテインキナーゼの組み合わせのみならずプロテインホスファターゼの反応系に加える活性化剤/阻害剤など反応の条件を変えることで更に多様なプロテインホスファターゼ活性を検出できる可能性もあり,そのプロテインホスファターゼ研究における応用範囲は広いものと思われる。

(2) CaMKホスファターゼ (CaMKP)

上に述べた独自の解析手法を用いてCaMKIIのThr286周辺のリン酸化ペプチドを脱リン酸化する新規プロテインホスファターゼをラット脳幹より精製することに成功した⁽⁵⁵⁾。すなわち,既述の固定化ホスホペプチドアッセイ法を用いて検出されたCaMKII/Thr286周辺のリン酸化ペプチドに対する脱リン酸化活性を指標に,活性ピークのひとつを種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせることで単一バンドにまで精製したところ,精製酵素はインゲルアッセイで認められる3本のバンドのうち分子量54,000のバンドに相当するプロテインホスファターゼであることが判明した。本酵素は Mn^{2+} 依存性,オキサゲ/カリクリンAに非感受性のセリン・スレオニン残基特異的プロテインホスファターゼで,PP1やPP2Aなどと異なり,単量体として存在する。また,PP2Aと同じくポリリシンやプロタミンなどのポリカチオンによって強く活性化される。本酵素は図2に示すように,自己リン酸化CaMKIIが完全に脱リン酸化を受ける条件でカゼイン,ヒストンなどの一般的なリン酸化タンパク質はほとんど基質にならなかった。さらに,CaMKキナーゼでリン酸化されたCaMKIV/CaMKI,並びに自己リン酸化CaMKIIなどの多機能性CaMKに特異性が高く,プロテインキナーゼC,MAPキナーゼ,AキナーゼやCaMKキナーゼ

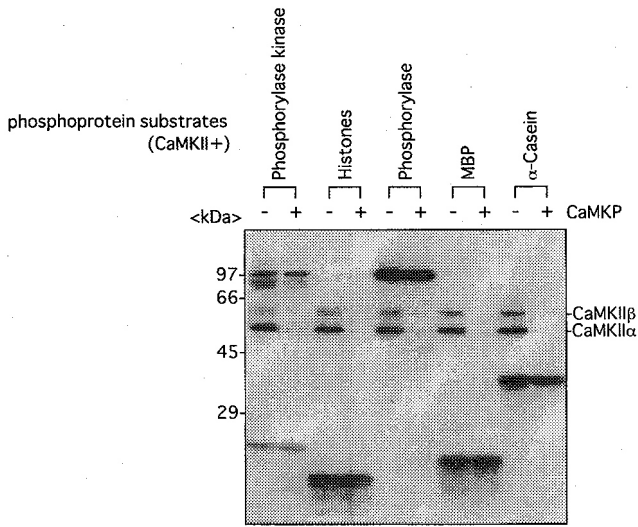


図2 CaMKPの基質特異性

[γ - 32 P] ATPでリン酸化した各種タンパク質とCaMKIIにCaMKPを作用させ、SDS-PAGEで分離後、オートラジオグラフィでリン酸化タンパク質のバンドを検出した。

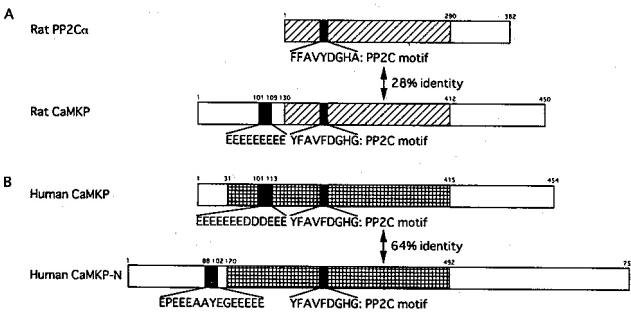


図3 CaMKPとCaMKP-Nのドメイン構造

A, ラットPP2C α とラットCaMKPの一次構造の比較。ホスファターゼドメイン(斜線部)での相同性は28%。ラットCaMKPにはホスファターゼドメインよりもN末側にグルタミン酸クラスターが存在する。B, ヒトCaMKPとヒトCaMKP-Nの一次構造の比較。触媒領域(網掛け部)での相同性は64%で、どちらもN末側に酸性アミノ酸のクラスターを有する。

などのプロテインキナーゼはこれらに比べて極めて脱リン酸化されにくいことがわかっている。従って本酵素をCaMKホスファターゼ(CaMKP)と命名した⁽⁵⁶⁾。

CaMKPの生化学的諸性質はこれまでに報告されているプロテインホスファターゼとはかなり異なるものである(表2参照)。本酵素は新規酵素であることが強く示唆されたが、cDNAクローニングの結果判明した一次構造からもそのことが裏付けられた⁽⁵⁷⁾。CaMKPはPPMファミリーに属するプロテインホスファターゼで、PP2Cとは弱い相同性が見られるものの、PP2C α との相同性は図3Aに斜線で示したホスファターゼドメインでも28%とかなり低く、N末側にはPP2Cでは見られない大きなドメインが存在する。このN末ドメインには特徴的なグルタミン酸のクラスター配列が存在するが、変異体

を用いた解析により、このグルタミン酸クラスターがポリカチオンとの結合やポリカチオンによる酵素の活性化に重要な役割を果たしていることが判明している⁽⁵⁸⁾。またC末付近の一次構造もPP2Cとはほとんど相同性が見られず、酵素の触媒活性自体には必須ではない。

CaMKPは多機能性CaMKに基質特異性が高いが、本酵素の基質特異性を化学合成した多数のホスホペプチド基質を用いて更に詳細に調べたところ、ペプチド基質に対しては意外に基質特異性が広く、脱リン酸化に関するコンセンサス配列は認められなかったが、脱リン酸化される残基についてはホスホスレオニンにかなり特異性が高いことが判明した。また基質になり得る最小単位は脱リン酸化されるホスホスレオニン残基の前後1残基の3残基程度であることも明らかとなった。従ってCaMKPのタンパク質に対する基質特異性の決定には脱リン酸化部位周辺の一次構造上の特徴よりもむしろ基質タンパク質の高次構造が重要であることが示唆された⁽⁵⁹⁾。

CaMKPはまた、基質であるCaMKIIによってポリカチオン存在下にリン酸化され活性化を受ける。この活性化反応の生理的意義は不明であるが、基質であるCaMKIIによって活性化され、CaMKIIの脱リン酸化が亢進することからフィードバック制御の一環である可能性も考えられる⁽⁶⁰⁾。

本酵素に対する特異的抗体を取得し、組織分布や細胞内局在を調べたところ、CaMKPは調べた全ての臓器で発現が認められ、副腎、肺、胸腺、脳、脾臓、子宮、膵臓などで比較的高い発現が認められた。またPC12細胞やラット脳組織における細胞内局在を調べたところ、核にはほとんど存在せず、細胞質に局在することが判明した⁽⁵⁷⁾。またラット脳を用いた免疫組織化学的検討からCaMKPは中枢神経組織の様々な細胞で発現が認められ、その分布は様々な領域でCaMKの分布と重なっていることが示された⁽⁶¹⁾。なお、PSD画分におけるCaMKPの含量は通常極めて少ないが、細胞によっては明らかにPSDが抗CaMKP抗体で染色されている場合もあり⁽⁶¹⁾、またPSDにはCaMKP結合タンパク質も存在すること(亀下ら、未発表データ)から、何らかの条件下においてはCaMKPがPSDに会合してPSDにおけるCaMKIIの脱リン酸化に関わる可能性も考えられる。

(3) CaMKP-N

ラットCaMKPの一次構造に基づいたヒトcDNAデータベースのBLASTサーチにより、ラット酵素とアミノ酸レベルで78%の相同性を示すタンパク質のcDNAが見出された。このcDNAを取得し、大腸菌で発現させてその性質を調べたところ、ラット酵素と同様の酵素学的性質

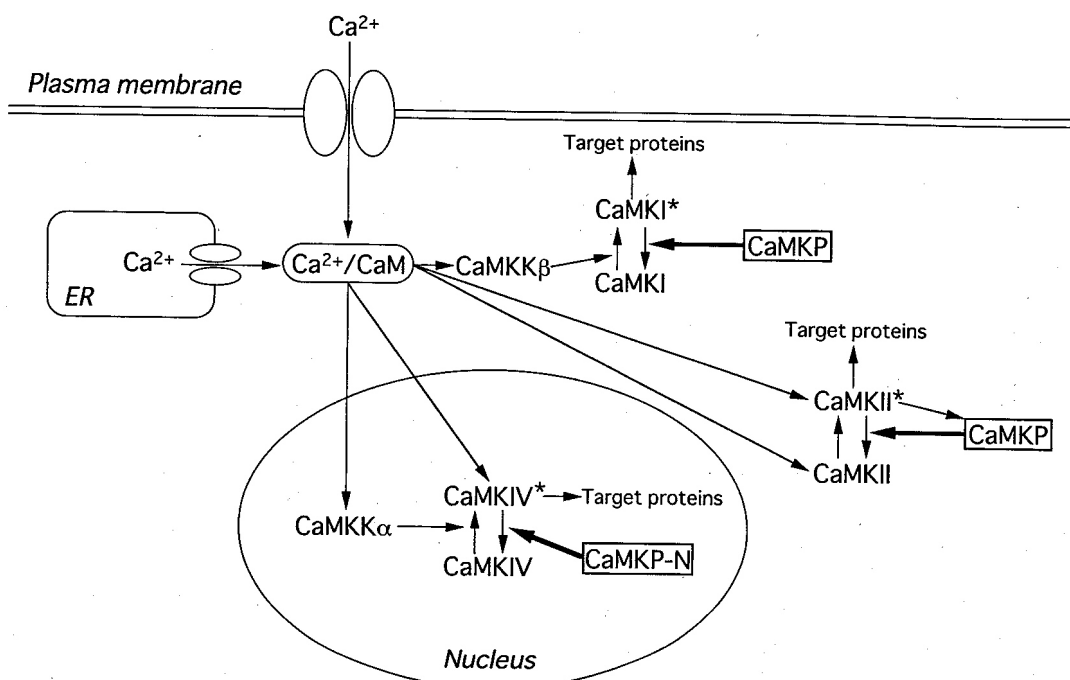


図4 CaMKPとCaMKP-NによるCaMKカスケードの制御
図中の*はリン酸化型酵素を示す。

を示した。またRT-PCRでヒトの各組織におけるmRNAの発現を調べたところ、これもラットにおける結果とほぼ一致した。以上の結果からこのホモログはヒトCaMKPであると考えられた⁽⁶²⁾。また、これとは別のホモログもデータベース中に存在することが判明したので、これも詳しく解析してみることにした。このホモログはN末とC末にCaMKPにはない長大な領域を持っているが、図3に網目模様で示したホスファターゼドメインを中心にヒトCaMKPと64%のホモロジーを持つ領域が存在する⁽⁶³⁾。このcDNAに対応するmRNAはCaMKPとは異なり、脳に特異的に発現していた。またCOS細胞に発現させて細胞内局在を調べると、CaMKPとは対照的に核に局在していることが明らかとなった。cDNAをSf9細胞に発現させ、部分精製標品を得てその酵素学的性質を調べたところ、この酵素はリン酸化型CaMKIVを基質にするなど、CaMKPと同様の酵素学的性質を示すことが明らかとなったので、本酵素を核に局在するCaMKPという意味でCaMKP-Nと命名した。酵素を核に局在させるための核移行シグナルはCaMKPやPP2Cには存在しない574番以降のC末領域に存在することも判明している。組織分布や細胞内局在の違いなどから考えて、CaMKPとCaMKP-Nは何らかの相補的役割を果たしている可能性が推察される(図4)。

(4) CaMKPの生理的役割

CaMKPやCaMKP-Nが実際に *in vivo* でCaMKの活性制御に関わっているのかどうかは今後の重要な検討課題である。CaMKP、CaMKP-Nの生理的役割については現在のところよく分かっていないが、最近、CaMKPの細胞レベルでの機能解析についての報告が見られるようになった。Tanらは線虫の性決定に関わる遺伝子産物FEM-2のヒトホモログとしてCaMKPを同定した。そこでFEM-2、ヒトCaMKP、ラットCaMKPなどをHeLa細胞に一過性に発現させるとアポトーシスを引き起こしたが、同じPPMファミリーのプロテインホスファターゼであるPP2Cではアポトーシスは認められなかったと言う。これらのデータからCaMKPが細胞のアポトーシスに関与する可能性が示唆された。アポトーシスの促進とCaMKの活性動態がどのように関わっているのか明らかではないが、CaMKIIやCaMKIVがアポトーシスに関わるという報告は多いので、CaMKPが例えばCaMKキナーゼの作用をantagonizeすることでアポトーシスを誘導する可能性があると考えられる⁽⁶⁴⁾。

またKohらはRho-GTPaseの下流で働くp21-activated protein kinase (PAK)の制御にCaMKPが関与していることを報告している⁽⁶⁵⁾。彼らはPAKと相互作用しているguanine nucleotide exchange factor PIXに相互作用するタンパク質としてPOPX1とPOPX2を同定したが、これらはそれぞれヒトCaMKP-N、ヒトCaMKPと同じもので

あった。これらはいずれも *in vitro* でリン酸化型PAKを脱リン酸化して脱活性化することができ、HeLa細胞に発現させるとPAKの活性化因子であるcdc42によって引き起こされるアクチンストレスファイバーの崩壊や細胞の個々の形態変化を阻害した。これらのデータから彼らはCaMKP (POPX2) やCaMKP-N (POPX1) がPAKのダウンレギュレーションに関与していると述べている。

4. プロテインホスファターゼ阻害剤

CaMKIIをノックアウトしたマウスでは空間記憶の能力が有意に低下していることはよく知られている⁽⁶⁶⁾。CaMKIIの自己リン酸化部位Thr286をリン酸化されないアラニンに変えたトランスジェニックマウスではLTPや空間記憶が低下していたことから、CaMKIIのThr286が記憶の形成に重要な役割を果たしていることが強く示唆される⁽⁶⁶⁾。従っても、このThr286の自己リン酸化レベルを上げることができれば、それは記憶力の向上に繋がる可能性がある。Thr286の自己リン酸化レベルを上げるひとつの方法は、この部位の脱リン酸化に関わるプロテインホスファターゼを阻害することである。現在のところ、記憶とその分子的基礎であるLTPの発現にはPSDに存在するCaMKIIが必須の役割を担っていると考えられており⁽³⁰⁾、そのPSDにおいては主にPP1がCaMKIIの脱リン酸化に関わっているとされる^(29,33)。従ってPP1の特異的阻害剤は記憶力の改善に有効である可能性が考えられるが、実際、PP1の特異的阻害タンパク質であるI-1の活性化型 (I-1*) を脳特異的に、かつ誘導的に発現できるトランスジェニックマウスではI-1* 依存的に記憶力の有意な改善を示し、特に年老いたマウスではその傾向が顕著であった⁽⁶⁸⁾。I-1 (I-1*) やI-2はPP1の内因性特異的阻害タンパク質であるが細胞膜透過性はないので、薬理学的用途には自ずと限界がある。PP1やPP2Aにはオキサリ酸やカリクリンAなど天然物由来の強力な特異的阻害剤が見出されており、分子薬理学的なツールとして頻用されているが、これらは同時に強力な毒性や発ガンプロモーター活性を有しており、医薬としての利用は困難であろう。PP1やPP2Aは各種組織に広く分布しており、CaMKIIのみならず様々なタンパク質のリン酸化レベルの調節にたずさわっているため、これらを一律に阻害する上記のような阻害剤は生体内のリン酸化を介する情報伝達系全体に大きく影響することは容易に想像できる。脳神経系、特にPSDに限局的に作用するような指向性を持たせたPP1阻害剤の開発が必要であろう。

最近、CaMKIIのみならずCaMKIVも記憶の形成に関与していることがトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた個体レベルの実験で示されたが、

CaMKIVの活性化はリン酸化・脱リン酸化によって厳密に制御されているので、そのリン酸化レベルを上昇させるような薬剤は記憶の改善に有効である可能性もある。既述のように海馬ニューロンのグルタミン酸刺激に伴うCaMKIV活性化ループのThr196のリン酸化はPP2B阻害剤であるシクロスポリンAによって促進されることが示されているので⁽⁶⁶⁾、このような薬剤が記憶の改善にも効果があるかもしれない。しかしながら薬理学的行動実験の結果は現在のところ、この考えには否定的である^(69,70)。

CaMKPはPP1とは異なり、多機能性CaMKに基質特異性が高いので、その特異的阻害剤があれば、PP1やPP2Aの阻害剤に比べて他の系に及ぼす影響が比較的小さいことが期待できる。残念ながら現在のところ、CaMKPやPP2Cと言ったPPMファミリーのプロテインホスファターゼに対しては有効な特異的阻害剤は見出されておらず、それがこれらPPMファミリーのプロテインホスファターゼの生理機能の解明を遅らせている一因となっている。CaMKPに対する特異的阻害剤の探索研究を行うためのCaMKP活性を指標とした大規模スクリーニングを行うにはマイクロプレート上でもできるCaMKPの簡便なアッセイ系が必要である。最近、ホスホセリン・ホスホスレオニンを含むペプチドの簡便な固相合成法が確立され、これまで比較的合成が困難であったホスホセリン・ホスホスレオニンを含む合成ペプチドを簡便かつ大量に得ることが可能となった^(71,72)。我々はCaMKPの基質特異性を調べる目的で、この方法を用いて多数の化学合成リン酸化ペプチドを得ており、これらを基質に用いた非RIの簡便なCaMKP活性測定法を確立した⁽⁵⁹⁾。この方法はマラカイトグリーンを発色試薬とする高感度リン酸化定量法を利用したもので3-(1)に述べた方法に比べると感度は低いものの、大腸菌などで比較的少量に精製酵素が得られる場合には十分に利用可能であり、マイクロプレートを用いた阻害剤/活性化剤の大規模スクリーニングへの応用が期待される。

一方、一過性の脳虚血後に遅れて神経細胞の壊死が起こる現象は遅発性神経細胞壊死と呼ばれ、脳梗塞後の後遺症などしばしば臨床上の重要な問題となる。この遅発性神経細胞壊死の過程にはCaMKIIが関与していると考えられている。CaMKIIの特異的ペプチド阻害剤として広く使用されているAIP⁽⁷³⁻⁷⁵⁾をミリスチル化して細胞膜透過性を付与したミリスチルAIPはNMDA投与⁽⁷⁶⁾やNa²⁺チャンネル活性化剤の投与⁽⁷⁷⁾で誘導される神経細胞死に対して保護効果があったことが報告されている。これらの薬剤によって誘導されるCa²⁺の流入によりCaMKIIの自己リン酸化/活性化が異常に亢進することが遅発性神経細胞壊死を引き起こす一因になっていると考えられ

るが、もしそうなら、CaMKII阻害剤の投与のみならず、CaMKIIの負の制御に関わるプロテインホスファターゼを活性化することでも、同様の効果が期待できるかもしれない。現在のところ、特定のセリン・スレオニンプロテインホスファターゼを活性化できるような特異的活性化剤は知られていないが、今後はそのような化合物の創製・探索も必要かもしれない。

5. まとめと今後の展望

Ca²⁺シグナリングの中心に位置する多機能性CaMKも多くの他のプロテインキナーゼと同様、リン酸化によって活性が調節されているので、スイッチオフの機構に相当するプロテインホスファターゼによる脱リン酸化/脱活性化の機構はリン酸化による活性化の機構と並んで極めて重要である。本稿ではCaMKの活性制御に関わるプロテインホスファターゼについて、我々自身の研究成果も交えながら研究の現状をまとめた。現時点において*in vitro*でCaMKを直接に制御し得ることが判明しているプロテインホスファターゼはPP1, PP2A, PP2B, PP2C, CaMKPの5種である。各CaMKはこれらのうちの複数のプロテインホスファターゼによって制御され得るのであるが、プロテインホスファターゼ自身の活性調節については、PP2AなどPPPファミリーのプロテインホスファターゼに関しては比較的解明が進んでいるとは言え、

全貌の解明には程遠い。各プロテインホスファターゼはそれぞれの活性化因子・阻害因子の影響下でどのように活性が調節され、役割分担を行っているのであろうか？その実態を解明することが今後の重要な課題である。

また、実際の生体内にあってはこれらのプロテインホスファターゼと基質であるCaMKが空間的・時間的にどのように相互作用しているのか、ということも脱リン酸化反応を制御する上での重要な決定要因になっているものと思われる。PSDにおけるCaMKIIとPP1, CaMKIVとsignaling complexを形成しているPP2Aなどがその好例である。殊に前者に関してはLismanとZhabotinskyによって詳しく論議されているように、そのような局在性が生み出す特異的な相互作用が重要な生理的意義を有する可能性が強い⁽³⁰⁾。今後はそのような細胞内局在を考慮に入れた解析がより重要となろう。新規プロテインホスファターゼであるCaMKPに関してはその活性制御の機構や*in vivo*でのCaMKの制御に関する役割を探るとともに、特異的な阻害剤の開発/探索も重要な課題となる。スイッチオフを司るプロテインホスファターゼに着目することでプロテインキナーゼの活性制御を考えるというコンセプトは、記憶をはじめとした多彩な生理作用に関わるCaMKをターゲットとした創薬にも新たな可能性を切り開くかもしれない。

引用文献

- (1) JOHNSON, L. N., NOBLE, M. E. M., and OWEN, D. J. : Active and inactive protein kinases : structural basis for regulation. *Cell*, 85, 149-158 (1996).
- (2) HOOK, S. S., and MEANS, A. R. : Ca²⁺/CaM-dependent kinases : from activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41, 471-505 (2001).
- (3) FUJISAWA, H. : Regulation of the activities of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *J. Biochem.*, 129, 193-199 (2001).
- (4) NAIRN, A. C., and PICCIOTTO, M. R. : Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Semin. Cancer Biol.*, 5, 295-303 (1994).
- (5) SODERLING, T. R. : The Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 232-236 (1999).
- (6) BRAUN, A. P., and SCHULMAN, H. : The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase : from form to function. *Annu. Rev. Physiol.*, 57, 417-445 (1995).
- (7) HUDMON, A., and SCHULMAN, H. : Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II : the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 473-510 (2002).
- (8) HUDMON, A., and SCHULMAN, H. : Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.*, 364, 593-611 (2002).
- (9) SODERLING, T. R., CHANG, B., and BRICKEY, D. : Cellular Signaling through Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. *J. Biol. Chem.*, 276, 3719-3722 (2001).
- (10) MATYNIA, A., KUSHNER, S. A., and SILVA, A. J. : Genetic approaches to molecular and cellular cognition : a focus on LTP and learning and memory. *Annu. Rev. Genet.*, 36, 687-720 (2002).
- (11) KANG, H., SUN, L. D., ATKINS, C. M., SODERLING, T. R., WILSON, M. A., and TONEGAWA, S. : An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term

- memory. *Cell*, 106, 771-783 (2001).
- (12) WEI, F., QIU, C., LIAUW, J., ROBINSON, D. A., HO, N., CHATILA, T., and ZHUO, M. : Calcium-calmodulin-dependent protein kinase IV is required for fear memory. *Nat. Neurosci.*, 5, 573-579 (2002).
- (13) WU, J. Y., RIBAR, T. J., CUMMINGS, D. E., BURTON, K. A., MCKNIGHT, G. S., and MEANS, A. R. : Spermiogenesis and exchange of basic nuclear proteins are impaired in male germ cells lacking Camk4. *Nat. Genet.*, 25, 448-452 (2000).
- (14) PASSIER, R., ZENG, H., FREY, N., NAYA, F. J., NICOL, R. L., MCKINSEY, T. M., OVERBEEK, P., RICHARDSON, J. A., GRANT, S. R., and OLSON, E. N. : CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 105, 1395-1406 (2000).
- (15) WU, H., KANATOUS, S. B., THURMOND, F. A., GALLARDO, T., ISOTANI, E., BASSEL-DUBY, R., and WILLIAMS, R. S. : Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, 296, 349-352 (2002).
- (16) PICCIOTTO, M. R., NASTIUK, K. L., and NAIRN, A. C. : Structure, regulation, and function of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Adv. Pharmacol.*, 36, 251-275 (1996).
- (17) OKUNO, S., KITANI, T., and FUJISAWA, H. : Studies on the substrate specificity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase α . *J. Biochem.*, 122, 337-343 (1997).
- (18) HAWLEY, S. A., SELBERT, M. A., GOLDSTEIN, E. G., EDELMAN, A. M., CARLING, D., and HARDIE, D. G. : 5'-AMP Activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 270, 27186-27191 (1995).
- (19) YANO, S., TOKUMITSU, H., and SODERLING, T. R. : Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396, 584-587 (1998).
- (20) OKUNO, S., KITANI, T., MATSUZAKI, H., KONISHI, H., KIKKAWA, U., and FUJISAWA, H. : Studies on the phosphorylation of protein kinase B by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *J. Biochem.*, 127, 965-970 (2000).
- (21) GOLDBERG, J., NAIRN, A. C., and KURIYAN, J. : Structural basis for the autoinhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. *Cell*, 84, 875-887 (1996).
- (22) SHENOLIKAR, S., and NAIRN, A. C. : Protein phosphatases : recent progress. *Adv. Sec. Mess. Phosph.*, 23, 1-121 (1991).
- (23) BARFORD, D., DAS, A. K., and EGLOFF, M. : The structure and mechanism of protein phosphatases : insights into catalysis and regulation. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 133-164 (1998).
- (24) PRICE, N. E., and MUMBY, M. C. : Brain protein serine/threonine phosphatases. *Curr. Opin Neurobiol.*, 9, 336-342 (1999).
- (25) WINDER, D. G., and SWEATT, J. D. : Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 461-474 (2001).
- (26) SHIELDS, S. M., INGEBRITSEN, T. S., and KELLY, P. T. : Identification of protein phosphatase 1 in synaptic junctions : dephosphorylation of endogenous calmodulin-dependent kinase II and synapse-enriched phosphoproteins. *J. Neurosci.*, 5, 3414-3422 (1985).
- (27) LAI, Y., NAIRN, A. C., and GREENGARD, P. : Autophosphorylation reversibly regulates the Ca²⁺/calmodulin-dependence of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4253-4257 (1986).
- (28) SCHWORER, C. M., COLBRAN, R. J., and SODERLING, T. R. : Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺ (calmodulin) -dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J. Biol. Chem.*, 261, 8581-8584 (1986).
- (29) STRACK, S., BARBAN, M. A., WADZINSKI, B. E., and COLBRAN, R. J. : Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J. Neurochem.*, 68, 2119-2128 (1997).
- (30) LISMAN, J. E., and ZHABOTINSKY, A. M. : A model of synaptic memory : a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron*, 31, 191-201 (2001).
- (31) YOSHIMURA, Y., and YAMAUCHI, T. : Phosphorylation-dependent reversible association of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II with the postsynaptic densities. *J. Biol. Chem.*, 272, 26354-26359. (1997).
- (32) STRACK, S., CHOI, S., LOVINGER, D. M., and

- COLBRAN, R. J. : Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the postsynaptic density. *J. Biol. Chem.*, 272, 13467-13470. (1997).
- (33) YOSHIMURA, Y., SOGAWA, Y., and YAMAUCHI, T. : Protein phosphatase 1 is involved in the dissociation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II from postsynaptic densities. *FEBS Lett.*, 446, 239-242 (1999).
- (34) FUKUNAGA, K., MULLER, D., OHMITSU, M., BAKO, E., DEPAOLI-ROACH, A. A., and MIYAMOTO, E. : Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.*, 74, 807-817 (2000).
- (35) BENNECIB, M., GONG, C., GRUNDKE-IQBAL, I., and IQBAL, K. : Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.*, 490, 15-22 (2001).
- (36) FUKUNAGA, K., RICH, D. P., and SODERLING, T. R. : Generation of the Ca^{2+} -independent form of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.*, 264, 21830-21836 (1989).
- (37) FUKUNAGA, K., KOBAYASHI, T., TAMURA, S., and MIYAMOTO, E. : Dephosphorylation of autophosphorylated Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C. *J. Biol. Chem.*, 268, 133-137 (1993).
- (38) TAKASAWA, S., ISHIDA, A., NATA, K., NAKAGAWA, K., NOGUCHI, N., TOHGO, A., KATO, I., YONEKURA, H., FUJISAWA, H., and OKAMOTO, H. : Requirement of calmodulin-dependent protein kinase II in cyclic ADP-ribose-mediated intracellular Ca^{2+} mobilization. *J. Biol. Chem.*, 270, 30257-30259 (1995).
- (39) EASOM, R. A., TARPLEY, J. L., FILLER, N. R., and BHATT, H. : Dephosphorylation and deactivation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in BTC 3-cells is mediated by Mg^{2+} -and okadaic-acid-sensitive protein phosphatases. *Biochem. J.*, 329, 283-288 (1998).
- (40) HWANG, J., BRAGADO, M. J., DUAN, R., and WILLIAMS, J. A. : Protein phosphatase inhibitors potentiate Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity in rat pancreatic acinar cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225, 520-524 (1996).
- (41) MAKHINSON, M., CHOTINER, J. K., WATSON, J. B., and O'DELL, T. J. : Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J. Neurosci.*, 19, 2500-2510 (1999).
- (42) KIM, S. A., HUDMON, A., VOLMER, A., and WAXHAM, M. N. : CaM-kinase II dephosphorylates Thr286 by a reversal of the autophosphorylation reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282, 773-780 (2001).
- (43) FRANGAKIS, M. V., OHMSTEDE, C., and SAHYOUN, N. : A brain-specific Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMkinase-Gr) is regulated by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 266, 11309-11316 (1991).
- (44) TOKUMITSU, H., BRICKEY, D. A., GLOD, J., HIDAKA, H., SIKELA, J., and SODERLING, T. R. : Activation mechanisms for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. *J. Biol. Chem.*, 269, 28640-28647 (1994).
- (45) PARK, I., and SODERLING, T. R. : Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) IV by CaM-kinase kinase in jurkat T lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, 270, 30464-30469 (1995).
- (46) KASAHARA, J., FUKUNAGA, K., and MIYAMOTO, E. : Differential effects of a calcineurin inhibitor on glutamate-induced phosphorylation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases in cultured rat hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, 274, 9061-9067 (1999).
- (47) WESTPHAL, R. S., ANDERSON, K. A., MEANS, A. R., and WADZINSKI, B. E. : A signaling complex of Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A. *Science*, 280, 1258-1261 (1998).
- (48) MILLWARD, T. A., ZOLNIEWOWICZ, S., and HEMMINGS, B. A. : Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.*, 24, 186-191 (1999).
- (49) ZHANG, T., JOHNSON, E. N., GU, Y., MORISSETTE, M. R., SAH, V. P., GIGENA, M. S., BELKE, D. D., DILLMANN, W. H., ROGERS, T. B., SCHULMAN, H., ROSS, J. J., and BROWN, J. H. : The cardiac-specific nuclear sB isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.*, 277, 1261-1267 (2002).
- (50) DEREMER, M. F., SAELI, R. J., BRAUTIGAN, D.

- L., and EDELMAN, A. M. : Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases Ia and Ib from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 267, 13466-13471 (1992).
- (51) KAMESHITA, I., ISHIDA, A., OKUNO, S., and FUJISAWA, H. : Detection of protein phosphatase activities in SDS-polyacrylamide gel using peptide substrates. *Anal. Biochem.*, 245, 149-153 (1997).
- (52) BURRIDGE, K., & NELSON, A. (1995). : An in-gel assay for protein tyrosine phosphatase activity : detection of widespread distribution in cells and tissues. *Anal. Biochem.*, 232, 56-64 (1995).
- (53) MACKINTOSH, C. : Assay and purification of protein (serine/threonine) phosphatases. in Protein phosphorylation : A practical approach, (Hardie, D. G. ed.), pp.197-230, *Oxford Univ. Press, New York* (1993).
- (54) ISHIDA, A., KAMESHITA, I., and FUJISAWA, H. : Assay of protein phosphatase activities with phosphopeptide-magnetic particle conjugates. *Anal. Biochem.*, 254, 152-155 (1997).
- (55) ISHIDA, A., KAMESHITA, I., and FUJISAWA, H. : A novel protein phosphatase that dephosphorylates and regulates Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.*, 273, 1904-1910 (1998).
- (56) ISHIDA, A., OKUNO, S., KITANI, T., KAMESHITA, I., and FUJISAWA, H. : Regulation of multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253, 159-163 (1998).
- (57) KITANI, T., ISHIDA, A., OKUNO, S., TAKEUCHI, M., KAMESHITA, I., and FUJISAWA, H. : Molecular cloning of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *J. Biochem.*, 125, 1022-1028 (1999).
- (58) ISHIDA, A., KAMESHITA, I., KITANI, T., OKUNO, S., TAKEUCHI, M., and FUJISAWA, H. : Stimulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase by polycations. *Arch. Biochem. Biophys.*, 408, 229-238 (2002).
- (59) ISHIDA, A., SHIGERI, Y., TATSU, Y., ENDO, Y., KAMESHITA, I., OKUNO, S., KITANI, T., TAKEUCHI, M., YUMOTO, N., and FUJISAWA, H. : Substrate specificity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase: Kinetic studies using synthetic phosphopeptides as model substrates. *J. Biochem.*, 129, 745-753 (2001).
- (60) KAMESHITA, I., ISHIDA, A., and FUJISAWA, H. : Phosphorylation and activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.*, 456, 249-252 (1999).
- (61) NAKAMURA, Y., KITANI, T., OKUNO, S., OTAKE, K., SATO, F., and FUJISAWA, H. : Immunohistochemical study of the distribution of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase in the rat central nervous system. *Mol. Brain Res.*, 77, 76-94 (2000).
- (62) SHIGERI, Y., YUMOTO, N., SHIMAMOTO, K., and YASUDA, Y. : Phosphatase derived from human and its inhibiting compound. *Patent abstracts of Japan*, 2001-333776 (2001).
- (63) TAKEUCHI, M., ISHIDA, A., KAMESHITA, I., KITANI, T., OKUNO, S., and FUJISAWA, H. : Identification and characterization of CaMKP-N, nuclear calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *J. Biochem.*, 130, 833-840 (2001).
- (64) TAN, K. M. L., CHAN, S., TAN, K. O., and YU, V. C. : The Caenorhabditis elegans sex-determining protein FEM-2 and its human homologue, hFEM-2 are Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatases that promote apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276, 44193-44202. (2001).
- (65) KOH, C., TAN, E., MANSER, E., and LIM, L. : The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr. Biol.*, 12, 317-321 (2002).
- (66) SILVA, A. J., PAYLOR, R., WEHNER, J. M., and TONEGAWA, S. : Impaired spatial learning in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 206-211 (1992).
- (67) GIESE, K. P., FEDOROV, N. B., FILIPKOWSKI, R. K., and SILVA, A. J. : Autophosphorylation at Thr 286 of the calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*, 279, 870-873 (1998).
- (68) GENOUX, D., HADITSCH, U., KNOBLOCH, M., MICHALON, A., STORM, D., and MANSUY, I. M. : Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. *Nature*, 418, 970-975 (2002).
- (69) BENNETT, P. C., ZHAO, W., LAWEN, A., and NG, K. T. : Cyclosporin A, an inhibitor of calcineurin, impairs memory formation in day-old chicks. *Brain Res.*, 730, 107-117 (1996).
- (70) BENNETT, P. C., SCHMIDT, L., LAWEN, A.,

- MOUTSOULAS, P., and NG, K. T. : Cyclosporin A, FK506 and repamycin produce multiple, temporally distinct, effects on memory following single-trial, passive avoidance training in the chick. *Brain Res.*, 927, 180-194 (2002).
- (71) WAKAMIYA, T., SARUTA, K., YASUOKA, J., and KUSUMOTO, S. : An efficient procedure for solid-phase synthesis of phosphopeptides by the Fmoc strategy. *Chem. Lett.*, 1099-1102 (1994).
- (72) WAKAMIYA, T., TOGASHI, R., NISHIDA, T., SARUTA, K., YASUOKA, J., KUSUMOTO, S., AIMOTO, S., KUMAGAYE, K. Y., NAKAJIMA, K., and NAGATA, K. : Synthetic study of phosphopeptides related to heat shock protein HSP27. *Bioorg. Med. Chem.*, 5, 135-145. (1997).
- (73) ISHIDA, A., and FUJISAWA, H. : Stabilization of calmodulin-dependent protein kinase II through the autoinhibitory domain. *J. Biol. Chem.*, 270, 2163-2170 (1995).
- (74) ISHIDA, A., KAMESHITA, I., OKUNO, S., KITANI, T., and FUJISAWA, H. : A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 806-812 (1995).
- (75) ISHIDA, A., SHIGERI, Y., TATSU, Y., UEGAKI, K., KAMESHITA, I., OKUNO, S., KITANI, T., YUMOTO, N., and FUJISAWA, H. : Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II. *FEBS Lett.*, 427, 115-118 (1998).
- (76) LAABICH, A., and COOPER, N. G. F. : Neuroprotective effect of AIP on N-methyl-D-aspartate-induced cell death in retinal neurons. *Mol. Brain Res.*, 85, 32-40 (2000).
- (77) TAKANO, H., FUKUSHI, H., MORISHIMA, Y., and SHIRASAKI, Y. : Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II mediate neuronal cell death induced by depolarization. *Brain Res.*, 962, 41-47 (2003).

(2003年9月30日受理)