

神経機能におけるCaM KII活性化を研究するためのツール



By Said Goueli, Ph.D.
Promega Corporation

適切かつ有効なプロテインキナーゼ研究ツールは、神経細胞の増殖、シグナル、神経変性など、新たな発見やメカニズム解明の速度を飛躍的に促進させました。プロメガでは神経科学分野において、SignaTECT® CaM KII Kinase Assay System及びAnti-ACTIVE® CaM KII pAb, Rabbit, (pT²⁸⁶)という2つの試薬を開発してきました。SignaTECT® Systemはサンプル中のキナーゼ活性やCaM KIIの活性化を高感度に検出するキットです(ngオーダーからの酵素を検出します)。Anti-ACTIVE® CaM KII pAb, Rabbit, (pT²⁸⁶)は、CaM KIIの制御に決定的な、カルシウム存在下におけるスレオニン残基の自己リン酸化を検出します。これらの試薬はPC12培養細胞や脳組織など、様々なモデルを用いた研究を可能にしました。

はじめに

多くの機能を有するCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼは様々な組織で発現していますが、とりわけ脳組織に豊富に存在します。広い基質特性を持ち、様々な細胞機能に関与しています(1-3)。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質の合成や放出、神経伝達物質受容体やイオンチャネルの修飾、遺伝子発現、樹状突起の発達、さらには記憶・学習の細胞モデルである長期増強(LTP)などのシナプス可塑性といった、相互に関連した複雑な機能を統合する、神経細胞の主要な調停役を担っています(4,5)。

CaM KIIは8-12個のサブユニットから形成されています。個々のサブユニットにはα、β、γ及びδといった様々なアイソフォームが存在し、各々の分子量は51kDa(α)のものから、58-61kDa(β、γ、及びδ)に及びものもあります。α及びβアイソフォームは神経系で非常に強く発現していますが、γ及びδは脳を含め、全ての組織で発現しています(2,3)。この酵素の自己リン酸化は活性化に関して決定的な役割があります。αサブユニットの286番目のスレオニン残基(βサブユニットでは287番目)がリン酸化すると、カルシウム非依存性の活性化型となります(6,7)。自己リン酸化の機能が発動することにより、カルシウムシグナルが一過性であっても長時間の活性状態を保つことが出来るようになります(4,5)。実際、286番目のスレオニン残基のリン酸化により、カルモジュリン(CaM)に対して低い親和性しか示さなかったものが、高親和性の分子に転換します。その多機能性と神経系における広範な分布、個々のアイソフォームの局在性などから、CaM KIIは生理的に極めて重要な役割を担っていると考えられます。α及びβアイソフォームは脳組織で極めて大量に発現しており、全タンパク質量の2%にもなります。これらのサブユニットは、細胞骨格タンパク質が興奮性シナプスのシナプス後膜を裏打ちしている特殊化した領域である、シナプス後膜肥厚(PSD)に濃縮されています。PSDは神経伝達物質受容体やイオンチャネルが集合するための足場を提供しており、このようなモジュレーターやエフェクターは、神経細胞の形態変化や神経可塑性といった神経系の機能に深く関与していると考えられています(8,9)。

CaM KIIは神経系のタンパク質やホスホランパン、Ca²⁺-ATPase、チロシン水酸化酵素などのタンパク質・酵素(1-4)やcAMP-responsive element binding protein(CREB)などの転写因子(10)をリン酸化します。こうしたリン酸化酵素に関して、細胞や組織の粗抽出液中、または精製過程におけるカラム分画中に含まれる酵素活性を選択的に測定できるようなアッセイシステムの開発は、非常に注目を集めています。

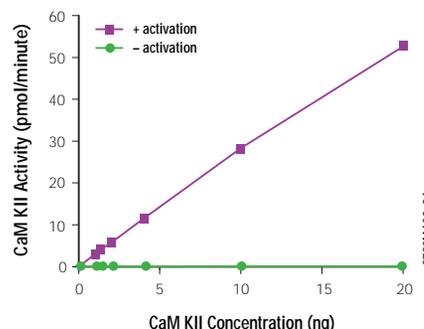


図1. 市販のCaM KII酵素とSignaTECT® Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaM KII) Assay System (カタログ番号V8161)を使用した場合の感度と直線性

SignaTECT® CaM KII Kinase Assay System

プロメガでは、細胞や組織の抽出液を用いて、特定のタンパク質リン酸化酵素の活性を測定する新しいアッセイ系を開発してきました(11)。本アッセイは、ピオチンのストレプトアビジンに対する選択的で強固な(10¹⁵M)結合力を利用しています。ストレプトアビジンでコートされたSAM²® Membrane[®]を用いることで、リン酸化されたCaM KIIのピオチン化基質ペプチドをフリーの標識ATPや内在性のキナーゼによりリン酸化されたタンパク質等から分離します。過剰な[γ-³²P]ATPや内在性のリン酸化タンパク質は簡便な洗浄(1-4分間程度の洗浄を5-7回)で除去できます。メンブレンを乾燥し、ペプチド残基に取りこまれた³²Pを液体シンチレーションカウンターやホスフォイメージャーで解析します。

結果及び考察

本稿で紹介したSignaTECT® CaM KII Assay Systemは、精製された酵素のみならず脳組織や細胞の抽出液サンプルを用いてもCaM KII活性を測定することが出来ます。CaM KIIはカルシウムとカルモジュリンの存在下で活性化しますが、酵素活性はこれらのアクティベーターが存在していてもなくても測定することができます。アクティベーターが存在するときの酵素活性は、アクティベーターが存在しないときに比べて少なくとも10倍になります。また非特異的な結合が極めて少ない為、基質に取りこまれないバックグラウンド放射活性は、反応時に使用された量の0.2%以下に抑えられます。アクティベーターによる強い活性化と、バックグラウンドの低さの組み合わせによって、シグナル/ノイズ比と感度を飛躍的に向上させることができました。



ペプチド基質の濃度を最適化するために、様々な濃度で基質ペプチドを30、2分間反応させ、酵素活性を測定しました。基質濃度が50 μ Mのときに最も良い結果が得られたので、一般的な酵素活性の測定はこの濃度で行っています。2分間の反応時間というのは、酵素活性の直線性が維持される範囲内ということで選択されました。しかし長時間のインキュベーションが望まれる場合は、反応液中の濃度を酵素活性の直線性が保たれる範囲で適宜希釈することが出来ます。図1に示すように、精製された酵素ならば1ngからの活性を検出することができ、濃度が1桁増えても反応の直線性は変わりません(1~10ng)。さらに、酵素活性は5~10 μ gといった極少量の脳抽出液からも検出されました(Promega Notes No.76、7ページ参照)。また、CaM KIIを含むサンプルとしてPC12細胞を用いた実験から、同様の結果が得られています(結果は未掲載)。注意点としては、アクティベーターがないとCaM KIIの活性は極めて低く、実際アクティベーターを含まない実験系における酵素活性はほとんどバックグラウンドと変わりません。最後に、ペプチド基質と酵素が存在しない系ではバックグラウンド値が極めて低く、このことはビオチン化ペプチド基質以外のリン酸化産物はマトリックスに結合しないことを証明するものであり、このシステムで測定した活性は真の値に極めて近いものであることを裏付けるものです。

Anti-ACTIVE[®] CaM KII pAb, Rabbit, (pT²⁸⁶)

CaM KIIの細胞内局在や分布はよく調べられており、その基質は細胞外情報伝達分子への応答に重要な役割を果たしています。その多様な役割を反映するかのよう、CaM KIIは神経細胞内で様々な分布を示しており、局所的にも生理的に重要な働きがあると考えられます。CaM KIIのT²⁸⁶の自己リン酸化は、この酵素をカルモジュリン(CaM)高親和性の分子に転換するだけでなく、PSD分画への局在化を引き起こし(8,9)、脱リン酸化によってPSDから離れて可溶分画に戻ると考えられています(14)。速い興奮性のシナプス伝達を仲介する、AMPA型のグルタミン酸受容体のリン酸化が、CaM KIIの自己リン酸化に引き続いて起こることから、CaM KIIは長期増強(LTP)に必要な因子として注目されています(15)。最近、CaM KIIのT²⁸⁶をA²⁸⁶に置換することによってLTPが顕著に減退し、学習能力の低下がみられることが分かりました(5)。プロメガのAnti-ACTIVE[®] CaM KII pAb, Rabbit, (pT²⁸⁶)は、リン酸化型のCaM KIIを特異的に認識し、非リン酸化型の酵素はほとんど検出しません。脳組織のホモジネートサンプルやPSD分画を用いたウエスタンブロットにおいては、リン酸化型のCaM KIIが優先的に認識され、脳サイトゾール分画2.5 μ gから*in vitro*リン酸化CaM KIIが検出されています(Promega Notes No.76、8ページ参照)。また図2の結果はこの抗体が精製された自己リン酸化型の酵素の場合、10ngまで検出できることを示しています。

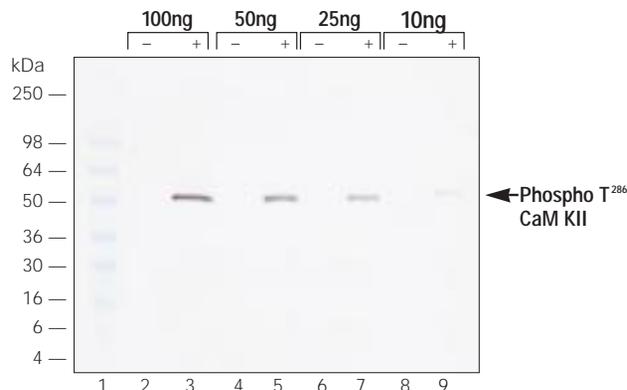


図2. 自己リン酸化型CaM KIIの検出におけるAnti-ACTIVE[®] CaM KII pAb (カタログ番号 V1111) の感度レベル
図示された量の精製された非リン酸化型(-)CaM KII (レーン2、4、6、8) および自己リン酸化型(+)CaM KII (レーン3、5、7、9) についてSDS-PAGEを行い、Anti-ACTIVE[®] CaM KII pAb (5000倍希釈) でウエスタンブロット分析を行った。検出にはDonkey Anti-Rabbit IgG, AP conjugated secondary antibody (カタログ番号 V7971) とWestern Blue[®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (カタログ番号 S3841) を用いた。

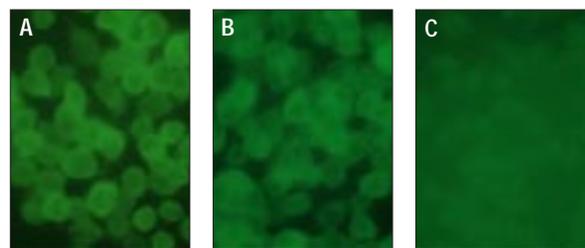


図3. PC12における、Anti-ACTIVE[®] CaM KII pAb (カタログ番号 V1111)を用いた自己リン酸化CaM KIIの免疫組織化学
PC12細胞を固定し、透過処理を施した後、Anti-ACTIVE[®] CaM KII pAb(500倍希釈)とFITC結合の抗ウサギIgG二次抗体(500倍希釈)を用いて検出した。パネルA: 抗体のみ、パネルB: 抗体+非リン酸化型のCaM KIIペプチド(1 μ g/ml)、パネルC: 抗体+リン酸化CaM KII (1 μ g/ml)

In Situでの自己リン酸化CaM KII局在性

Anti-ACTIVE[®] CaM KII pAb による*in situ*での自己リン酸化CaM KII局在性の検出結果では、染色がリン酸化CaM KII由来ペプチドにより阻害され、非リン酸化CaM KII由来ペプチドでは阻害されないことから、本抗体が細胞におけるリン酸化型CaM KIIに結合していることを示しています(図3)。

参考文献

- Schulman, H. and Hanson, P.I. (1993) *Neurochem. Res.* **18**, 65.
- Colbran, R. and Soderling, T.R. (1990) *Curr. Topics Cell. Reg.* **31**, 181.
- Yang, E. and Schulman, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26199.
- Lisman, J. (1994) *Trends Neurosci.* **17**, 406.
- Giese, K.P. et al. (1998) *Science* **279**, 870.
- Frangakis, M., Ohmstede, C.A. and Sahyoun, N. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11309.
- Ikeda, A., Okuno, S. and Fujisawa, H. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 11582.
- Yoshimura, Y. and Yamauchi, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26354.
- Strack, S. et al. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 13467.
- Kapiloff, M.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3710.
- Goueli, B. et al. (1995) *Anal. Biochem.* **225**, 10.
- Casnellie, J.E. (1991) *Meth. Enzymol.* **200**, 115.
- Savage, D. et al. (1992) In: *Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook*, Pierce Chem. Comp., Rockford, IL, 8.
- Strack, S. et al. (1997) *J. Neurochem.* **68**, 2119.
- Barria, A. et al. (1997) *Science* **276**, 2042.

製品案内			
製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
SignaTECT [®] Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase (CaM KII) AssaySystem ^(a)	96 回分	V8161	50,000
Anti-ACTIVE [®] CaM KII pAb, Rabbit, (pT ²⁸⁶)	40 μ l	V1111	65,000
SAM ^{2®} Biotin Capture Membrane	96 回分	V2861	39,000
Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), AP	60 μ l	V7971	14ページ参照
Western Blue [®] Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase	100 ml	S3841	7,000

Anti-ACTIVE, SAM², SignaTECT and Western Blue are trademarks of Promega Corporation and are registered with the U.S. Patent and Trademark Office. Triton is a registered trademark of Union Carbide Chemicals and Plastics Co, Inc. Tween is a registered trademark of ICI Americas, Inc. Vectashield is a registered trademark of Vector Laboratories, Inc. Z-iss is a registered trademark of Carl-Z-iss-Stiftung.

(a) U.S. Pat. No. 6,066,4e2 has been issued to Promega Corporation for quantitation of protein kinase activity.