

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 制御分子 4 の細胞調節機能 : 脳における CaMKII 活性調節と学習記憶に関する研究
Author(s)	山下, 武士
Citation	
Issue date	2007-03-14
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/8345
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 制御分子 $\alpha 4$ の細胞調節機能 ;
脳における CaMKII 活性調節と学習記憶に関する研究
(Regulation of CaMKII by $\alpha 4$, a PP2A regulator,
contributes to learning and memory)

山下 武士

Takeshi Yamashita

熊本大学大学院医学教育部博士課程
臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導 : 阪口 薫雄 教授

高木 克公 前教授

2006 年度

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名: タンパク質脱リン酸化酵素 PP2A 制御分子 $\alpha 4$ の細胞調節機能 ;
脳における CaMKII 活性調節と学習記憶に関する研究
(Regulation of CaMKII by $\alpha 4$, a PP2A regulator,
contributes to learning and memory)

著者名 : 山下 武士

指導教員名 : 阪口 薫雄 教授
高木 克公 前教授

審査委員名 : 神経分化学 担当教授 田中 英明
神経内科学 担当教授 内野 誠
神経発生学 担当教授 大久保 博晶
脳回路構造学担当教授 玉巻 伸章

2006 年度

目次

I. 要旨	1
II. 参考論文リスト	5
III. 謝辞	6
IV. 略語一覧	7
V. 研究の背景と目的	8
A. シグナル伝達分子 $\alpha 4$ の同定	8
B. $\alpha 4$ ファミリー分子	9
B.1 マウス $\alpha 4$	10
B.2 ヒト $\alpha 4$	10
B.3 ラット $\alpha 4$	11
B.4 酵母ホモログ Tap42	11
B.5 イネの $\alpha 4$ ホモログ	13
B.6 組織特異的 $\alpha 4$ ファミリー分子 $\alpha 4$ -b	13
C. PP2A (Protein phosphatase 2A)	15
C.1 セリン/スレオニン・ホスファターゼの分類	15
C.2 PP2A	16
C.3 脳における PP2A の発現および CaMKII との関連	18
D. $\alpha 4$ と PP2Ac	19
D.1 $\alpha 4$ と PP2Ac の直接結合	19
D.2 $\alpha 4$ による PP2A 活性の調節	24
D.3 $\alpha 4$ /PP2Ac と免疫抑制剤ラパマイシン	24
E. ラパマイシン感受性経路	24
F. $\alpha 4$ /PP2Ac による S6K の調節	28
G. 組織特異的 $\alpha 4$ ノックアウトマウス	31

G.1	B 細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウト (B- $\alpha 4$ KO) マウス	31
G.2	T 細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウト (T- $\alpha 4$ KO) マウス	38
H.	本研究の目的	42
VI.	実験方法	43
A.	実験動物	43
B.	細胞株と細胞培養	44
C.	抗体と試薬	44
D.	免疫沈降	45
E.	GST プルダウンアッセイ	45
F.	ウェスタンブロッティング	45
G.	組織染色および免疫組織染色	46
H.	オープンフィールドテスト	46
I.	モリス水迷路テスト	46
J.	シャトルボックス回避学習テスト	47
K.	CaMKII アッセイ	47
L.	PP2A アッセイ	48
M.	統計学的分析	48
VII.	実験結果	49
A.	N- $\alpha 4$ KO マウスの作製	49
B.	$\alpha 4$ -b-Cre マウスにおける Cre タンパクの存在	49
C.	N- $\alpha 4$ KO マウスの脳における $\alpha 4$ タンパクの消失	49
D.	N- $\alpha 4$ KO マウスの脳における細胞構築	54
E.	N- $\alpha 4$ KO マウスの行動解析	54
F.	海馬依存性の空間学習記憶の障害	58
G.	連合学習の障害	61
H.	$\alpha 4$ /PP2Ac と CaMKII α との結合	64
I.	$\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII の活性調節	66
J.	$\alpha 4$ /PP2Ac の脳神経細胞内における局在	68

VIII. 考察	72
IX. 結語	77
X. 参考文献	78

I. 要旨

【目的】 シグナル伝達分子 $\alpha 4$ はタンパク質脱リン酸化酵素 protein phosphatase 2A の触媒サブユニット (PP2Ac) と直接結合してその酵素活性を調節する。そのターゲットの全容は明らかになっていなかった。その理由の1つに $\alpha 4$ 遺伝子ノックアウトは胎生致死となることが挙げられる。そこでこれまでに組織特異的な $\alpha 4$ ノックアウト (KO) マウスの解析がなされている。B および T リンパ細胞それぞれに特異的な KO マウスの解析により $\alpha 4$ はリンパ細胞の増殖、分化に重要であった。本研究にあたり、 $\alpha 4$ には脳および精巣に特異的に発現するファミリー分子である $\alpha 4$ -b が存在すること、PP2Ac は脳において強く発現していることより $\alpha 4$ は脳神経細胞において重要な機能を有していると考えた。さらに $\alpha 4$ -b が存在する脳神経細胞において $\alpha 4$ をノックアウトすれば $\alpha 4$ の機能をより明確にし得ると予想された。そこで本研究において脳神経細胞特異的な $\alpha 4$ KO (N- $\alpha 4$ KO) マウスを作製し解析することにより $\alpha 4$ の脳神経細胞における機能を明らかとすることを目的とした。

【方法および結果】 N- $\alpha 4$ KO マウスの作製には Cre/loxP システムを用いた。脳神経細胞特異的に発現する $\alpha 4$ -b のプロモーター下流に Cre recombinase cDNA を導入して $\alpha 4$ -b-Cre マウスを作製し、 $\alpha 4$ flox マウスと交配することにより N- $\alpha 4$ KO マウスを作製した。ニッスル染色による脳神経細胞の解析では脳神経細胞数、細胞の形態および脳組織の構築は正常であった。次に脳機能を解析するために行動実験を行った。運動機能と情動性は正常であった。モリス水迷路テストにおいて障害を認め、 $\alpha 4$ は海馬依存性の空間学習記憶に重要であることが明らかとなった。このことに着目し、そのシグナル伝達機構を解明するために海馬依存性の学習記憶で最も重要な分子の1つである calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α) と $\alpha 4$ の関連を解析した。野生型マウスの脳神経細胞を用いた免疫沈降実験において $\alpha 4$ は CaMKII α と結合していた。同様に PP2Ac も CaMKII α と結合していた。したがって $\alpha 4$ 、PP2Ac および CaMKII α は複合体を形成していた。次に $\alpha 4$ による CaMKII α の制御をみるために N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬の CaMKII 活性を測定した。N- $\alpha 4$ KO マウスの CaMKII 活性はコントロールマウスに比し有意に上昇していた。すなわち $\alpha 4$ は CaMKII α を負に制御していた。さらに野生型マウスの海馬では $\alpha 4$ と PP2Ac は postsynaptic density (PSD) ではなく細胞質内に局在していた。

【 考察および結論 】 N- α 4 KO マウスは海馬依存性の空間学習記憶が障害されていた。そのメカニズムとして、 α 4 および PP2Ac が CaMKII α と結合することを初めて明らかとした。N- α 4 KO マウスの海馬の CaMKII 活性が上昇していたことなどより、 α 4/PP2Ac は CaMKII 活性を負に調節していることが分かった。 α 4/PP2Ac は脳神経細胞の細胞質内で CaMKII α を脱リン酸化することにより学習記憶に伴うシグナル伝達を制御していると考えられた。

Abstract

Introduction:

$\alpha 4$, a signal transduction molecule, associates directly with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A (PP2Ac) and regulates its enzymatic activity. The downstream molecules of $\alpha 4$ /PP2Ac remain unclear. It is one of the reasons that the gene targeting of $\alpha 4$ was embryonic lethal. Then, conditional gene targeting of $\alpha 4$ has been analyzed. Conditional gene targeting of $\alpha 4$ in B or T lymphocytes demonstrated that $\alpha 4$ played a pivotal role in the proliferation and the differentiation of lymphocytes. It is thought that $\alpha 4$ plays an important role in the neuronal cells because $\alpha 4$ -b, an $\alpha 4$ -related molecule, is selectively expressed in the brain and testis, and PP2Ac is abundantly expressed in the brain. In addition, it is expected that the function of $\alpha 4$ is able to be made clearer by deleting $\alpha 4$ gene in $\alpha 4$ -b expressing neuronal cells. So, to investigate the neuron specific function of $\alpha 4$, $\alpha 4$ gene was deleted in the neuronal cells (N- $\alpha 4$ KO mouse) by conditional gene targeting in this research.

Methods and results:

The Cre/loxP system was used for preparing N- $\alpha 4$ KO mice. $\alpha 4$ -b-Cre transgenic mice were prepared using the plasmid construct in which Cre gene is transcribed under the neuron specific $\alpha 4$ -b promoter. To disrupt the $\alpha 4$ gene in neuronal cells, a female $\alpha 4$ floxed mouse was mated with a male $\alpha 4$ -b-Cre transgenic mouse. The Nissl-stained coronal sections of the N- $\alpha 4$ KO brains did not show any gross abnormalities in the neuron number, cytoarchitecture and histological structure compared to those of control mice. Next, to investigate the brain function, behavioral tests were done. The motor function and anxiety were normal. The N- $\alpha 4$ KO mice were impaired in the Morris water maze test. Thus, it was clear that $\alpha 4$ was involved in spatial learning and memory dependent on hippocampus. To confirm this signal transduction mechanism, the relation between $\alpha 4$ and Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α (CaMKII α) that was one of the most important molecules in the hippocampus-dependent learning and memory was analyzed. $\alpha 4$ was associated with CaMKII α in the immunoprecipitation using the neuronal cells of wild-type mice. As $\alpha 4$, PP2Ac was associated with CaMKII α . Therefore, $\alpha 4$, PP2Ac, and CaMKII α formed the complex. Next, to investigate the regulation of CaMKII α

by $\alpha 4$, the CaMKII activity in the hippocampus of N- $\alpha 4$ KO mice was determined. The CaMKII activity was higher in the hippocampus of N- $\alpha 4$ KO mice than in that of the control mice. That is, $\alpha 4$ negatively regulated CaMKII α . In addition, $\alpha 4$ and PP2Ac were localized in the cytoplasm but not in the postsynaptic density (PSD) in the hippocampus of wild-type mice.

Discussion and conclusion:

N- $\alpha 4$ KO mice showed impaired spatial learning and memory dependent on hippocampus. It was clear for the first time that $\alpha 4$ and PP2Ac were associated with CaMKII α under the signal transduction mechanism. It has been understood that $\alpha 4$ /PP2Ac negatively regulated the CaMKII activity from that the CaMKII activity was enhanced in the hippocampus of N- $\alpha 4$ KO mice, and extra experiments. It was suggested that $\alpha 4$ /PP2Ac regulated the signal transduction in learning and memory by dephosphorylating CaMKII α in the cytoplasm of the neuronal cells.

II. 参考論文リスト

1. 関連論文

Takeshi Yamashita, Seiji Inui, Kazuhiko Maeda, Ding Rong Hua, Katsumasa Takagi, Kohji Fukunaga, and Nobuo Sakaguchi. (2006) Regulation of CaMKII by $\alpha 4$ /PP2Ac Contributes to learning and memory. *Brain Research*, **1082**, 1-10.

2. その他の論文

1. **Seiji Inui, Kazuhiko Maeda, Ding Rong Hua, Takeshi Yamashita, Hideyuki Yamamoto, Eishichi Miyamoto, Shinichi Aizawa, and Nobuo Sakaguchi.** (2002) BCR signal through $\alpha 4$ is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *International Immunology*, **14**, 177-187.
2. **Ding Rong Hua Seiji Inui, Takeshi Yamashita, Kazuhiko Maeda, Katsumasa Takagi, Junji Takeda and Nobuo Sakaguchi.** (2003) T cell-specific gene targeting reveals that $\alpha 4$ is required for early T cell development. *European Journal of Immunology*, **33**, 1899-1906.
3. **Takeshi Yamashita, Seiji Inui, Kazuhiko Maeda, Ding Rong Hua, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi.** (2005) The heterodimer of $\alpha 4$ and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **330**, 439-445.

III. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御指導、御支援下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫学分野 阪口 薫雄教授、熊本大学医学部保健学科生体情報解析学講座・血液免疫検査学分野 乾 誠治教授、並びに同感覚・運動医学講座運動骨格病態学分野 高木 克公前教授に深く感謝致します。

論文作成にあたりましても、阪口 薫雄教授、乾 誠治教授、並びに熊本大学大学院医学薬学研究部感染・免疫学講座免疫学分野の皆さまに深く感謝致します。

IV. 略語一覧

Ab; antibody

CaMKII; calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

CNS; central nervous system

CS; conditioned stimulus

BCR; B cell antigen receptor

BSA; bovine serum albumin

FITC; fluorescein isothiocyanate

HRP; horseradish peroxidase

Ig; immunoglobulin

KO; knockout

LTP; long-term potentiation

MCS; multiple cloning site(s)

N- α 4 KO; neuron specific α 4 knockout

pBS; pBluescriptII KS (-)

PBS; phosphate-buffered saline

PCR; polymerase chain reaction

PP1; protein phosphatase 1

PP2A; protein phosphatase 2A

PP2Ac; the catalytic subunit of PP2A

PSD; postsynaptic density

Tg; transgenic

US; unconditioned stimulus

WT; wild-type

V. 研究の背景と目的

A. シグナル伝達分子 $\alpha 4$ の同定

$\alpha 4$ は B リンパ細胞抗原レセプター (BCR) 複合体を形成する Ig α (MB-1/CD79a) と結合する新規シグナル伝達分子として同定された。以下にその背景と発見の経緯を述べる。

BCR への刺激は抗原特異的 B 細胞の増殖に対して様々なシグナル伝達経路の活性化を誘導する (Sakaguchi et al., 1993, Pleiman et al., 1994, DeFranco, 1995, Reth and Wienands, 1997)。BCR は細胞表面に発現している膜型 immunoglobulin M (IgM) と Ig α (MB-1/CD79a) / Ig β (B29/Cd79b) ヘテロ二量体によって構成されている (Sakaguchi et al., 1993)。この BCR 複合体は細胞内の機能的分子群である src/非 src 型チロシン・キナーゼ、Syk キナーゼ、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) および未知のキナーゼ群にシグナルを伝達していくことが知られている (Reth and Wienands, 1997)。Kuwahara らは MB-1 に結合する 52kDa のリン酸化タンパク p52 を認識するモノクローナル抗体 19-14 を作製した (Kuwahara et al., 1994)。B 細胞において、この分子はプロテイン・キナーゼ C (PKC) を直接活性化させるホルボール・エステル PMA 刺激によってリン酸化が誘導された。また、BCR-クロスリンク刺激後に一過性にチロシン・リン酸化分子の結合が誘導されたことから、BCR を介したシグナル伝達に関与し PKC 活性化経路とチロシン・キナーゼ群を介した活性化経路を結ぶ新しい分子であることが示唆された。そこで Inui らはこの分子をさらに解析するため、モノクローナル抗体 19-14 をプローブとして大腸菌でタンパク質を産生する発現ベクター λ gt11 の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、 $\alpha 4$ cDNA をクローニングした (Inui et al., 1995)。その後、マウス B 細胞を抗 IgM 抗体で刺激するとチロシンリン酸化タンパクが一過性に $\alpha 4$ と結合することから、 $\alpha 4$ は BCR からのシグナル伝達に関与することが確認された (Inui et al., 1995) (図 1)。

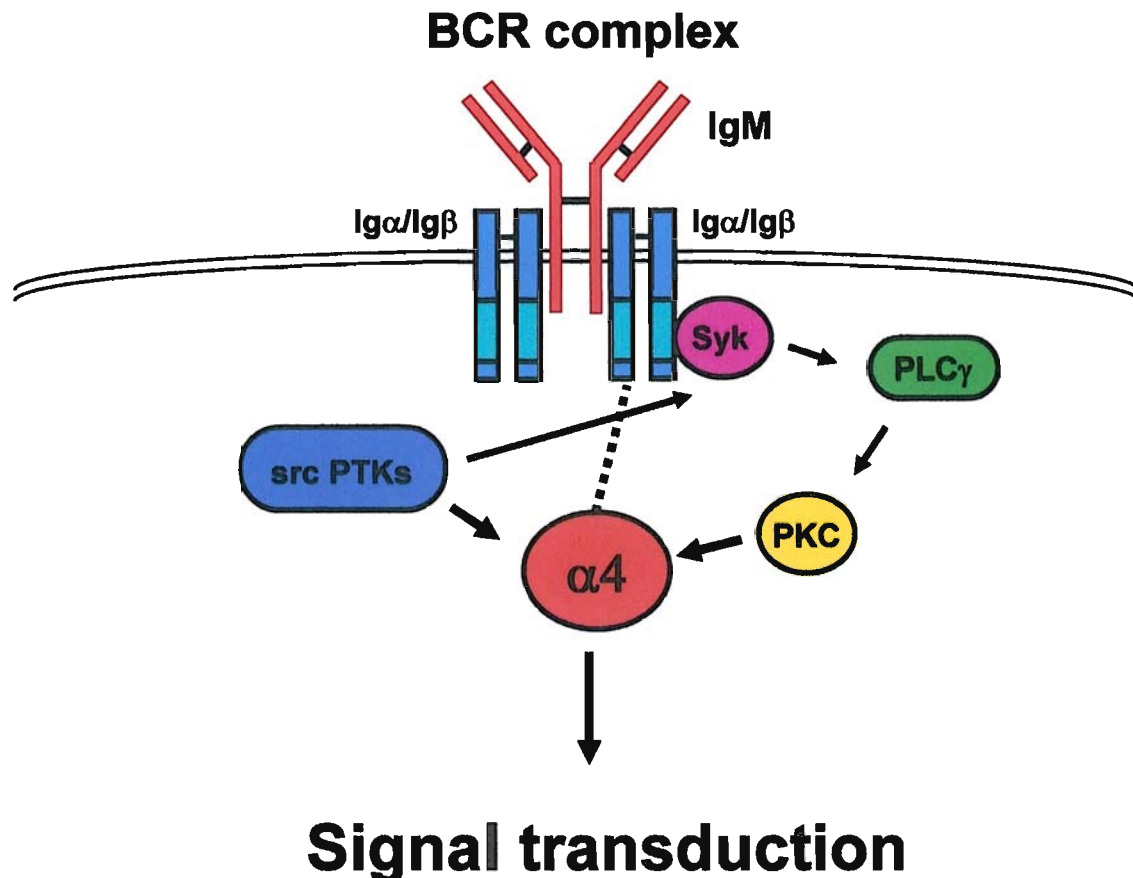


図 1 シグナル伝達分子 $\alpha 4$ の同定

$\alpha 4$ はBリンパ細胞抗原レセプター (BCR) 複合体を形成するIg α (MB-1/CD79a) と結合する新規シグナル伝達分子として同定された。B細胞において、 $\alpha 4$ はプロテイン・キナーゼC (PKC) を直接活性化させるホルボール・エステルPMA刺激によってリン酸化が誘導された。また、BCR-クロスリンク刺激後に一過性にチロシン・リン酸化分子の結合が誘導されたことから、BCRを介したシグナル伝達に関与しPKC活性化経路とチロシン・キナーゼ群を介した活性化経路を結ぶ新しい分子であることが示唆された。

B. $\alpha 4$ ファミリー分子

$\alpha 4$ 分子は既存の分子とは部分的にも相同性が認められない、新しいタイプのシグナル伝達分子である。現在までに $\alpha 4$ 相同遺伝子 (ホモログ) はヒト、マウス、ラット、酵母およびイネで単離されている。予測アミノ酸配列が種を超えて良く保存されていることが特徴的である。ほ乳類においてはアミノ酸レベルで 80%以上の相同性が認められ、非常に高く保存されている。酵母とイネでは、それぞれ全体で 30%の相同性があり、特にカ

ルボキシル基末端 20 アミノ酸残基が 50%以上で保存されている。

また、脳神経細胞および精巣で組織特異的に発現する $\alpha 4$ ファミリー分子として $\alpha 4$ -b が単離された (Maeda et al., 1999)。以下にそれぞれの $\alpha 4$ ファミリー分子について述べる。

B.1 マウス $\alpha 4$

$\alpha 4$ は前述の如く 1995 年、Inui らによってマウス $\alpha 4$ cDNA が単離されたことにより発見された。マウス $\alpha 4$ cDNA は、全長 340 アミノ酸残基をコードする。PKC によるリン酸化可能部位が 6 か所、カゼインキナーゼ II (CKII) によるリン酸化可能部位が 9 か所存在し、さらにプロリンに富んだ src 相同 3 (SH3) 結合様モチーフを持つ。そして、いかなる既存のシグナル伝達分子とも相同性が認められないユニークな構造であった (Inui et al., 1995) (図 2)。 $\alpha 4$ の発現はすべての組織で認められていた。構造がよく保存されていること、発現パターンが ubiquitous であることから $\alpha 4$ は BCR 以外のシグナル伝達にも関与するのではないかと推測された。

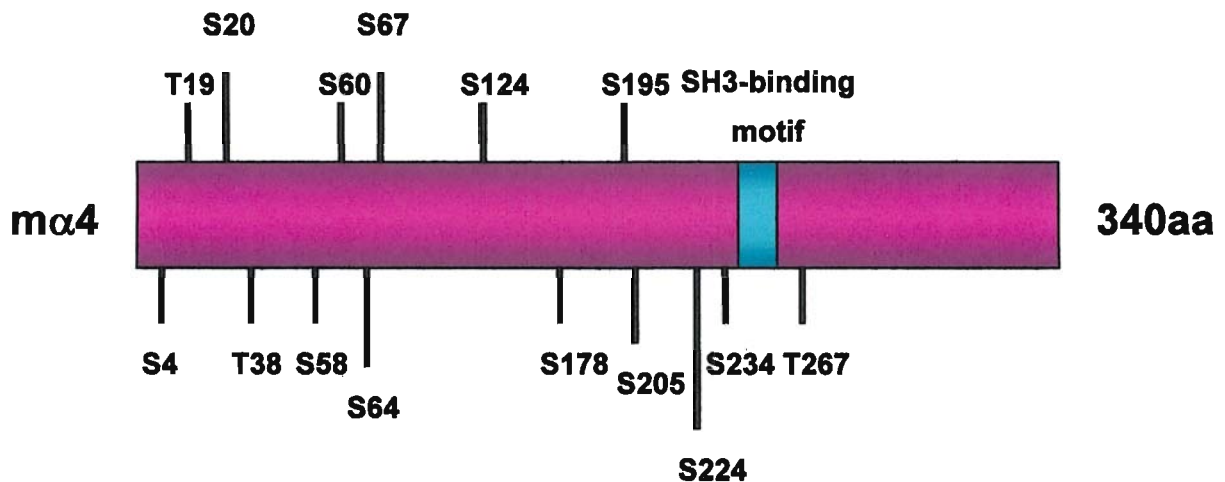


図 2 マウス $\alpha 4$ 分子の構造

S:セリン、T:スレオニンリン酸化可能部位。SH3:src homology domain 3

B.2 ヒト $\alpha 4$

ヒト $\alpha 4$ cDNA はマウス $\alpha 4$ cDNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニン

グシ単離された (Onda et al., 1997)。ヒト $\alpha 4$ cDNA は 339 アミノ酸残基をコードしておりマウス $\alpha 4$ よりも 1 アミノ酸短い。マウスとの相同性はアミノ酸レベルで 82.9% と非常に高く保存されている (図 3)。染色体マッピングの結果から X 染色体の長腕 (Xq13.1-Xq13.3) に位置していることが明らかとなっている。現在、ヒト $\alpha 4$ 遺伝子は Human Gene Nomenclature Committee に IGBP1 (Immunoglobulin-receptor binding protein 1) として登録されている。

B.3 ラット $\alpha 4$

ラット $\alpha 4$ はプロラクチン (PRL) 依存ラットリンパ腫細胞の PRL シグナル伝達に関与する遺伝子の 1 つとして単離された (Too, 1997)。報告されたアミノ酸配列は 374 残基でマウスとヒトの配列に比べ 30 残基以上長い。これはアミノ酸残基 299 番目と 300 番目の間に相当する位置でアデニン塩基が欠失したことにより読み取り枠にミスセンス変異が生じたためと考えられる。このことを考慮すると実際はラット $\alpha 4$ 分子も 340 アミノ酸からなると考えられる。

B.4 酵母ホモログ Tap42

1996 年、アメリカの Di Como らが酵母の $\alpha 4$ 相同遺伝子をクローニングした (Di Como and Arndt, 1996)。それはセリン/スレオニン・ホスファターゼの 1 つ SIT4 に結合する分子を見つける方法で行なったものであった。SIT4 は PP2A (protein phosphatase 2A) と構造の似たホスファターゼである。彼らは SIT4 結合分子を Tap42 と名付け、マウス $\alpha 4$ と構造が類似している事を指摘した。TAP42 は酵母細胞の生存に必須の分子であり、栄養因子の存在が Tap42 と SIT4 および PP2A との結合を誘導することが示された。SIT4 は細胞周期の G1 から S 期への移行に必須であり、SIT4 の突然変異は G1 arrest を起こすことが知られていた。そこで同じく酵母に G1 arrest を起こすことが知られていた免疫抑制剤ラパマイシンとの関係を調べたところ、Tap42 と SIT4 および PP2A との結合はラパマイシンによって阻害されることが明らかとされた。したがって $\alpha 4$ の酵母ホモログである Tap42 はラパマイシン感受性経路 (後述) に関与することが示唆された。Tap42 のアミノ酸配列は $\alpha 4$ と 32% の相同性が認められる (図 3)。

murine $\alpha 4$ -b	MASFTE-E--	MQPKLRELL	ETGIQLLEEV	EAATQPTGSK	PIQEKVREAL	47
murine $\alpha 4$	MAAS-EDE--	LLLPRLPFLF	ETSKLLEDV	EVATEPTGSR	TIQDKVSKGL	47
rat $\alpha 4$	-----E-E--	LLLPRLPFLF	ETSKLLEEL	EVATEPTGSR	TIQDKVSKGL	47
human $\alpha 4$	MAA--EDE--	LQLPRLPFLF	ETGRQLLDEV	EVATEPAGSR	IVQEKVFKGL	46
yeast Tap42	MASVTEQ-FN	DIIS-LYST-	----KL-E--	-HTSLRQDSP	EYQGLLLSTI	39
murine $\alpha 4$ -b	K-LLEKASDM	LSQLDLFSRN	EDWEEIASAD	LKYIMLPALK	GALTLKL---	93
murine $\alpha 4$	E-LLEKAAGM	LSQLDLFSRN	EDLEEIASTD	LKYIMVPALQ	GALTMKQ---	93
rat $\alpha 4$	E-LLEKAAGM	LSQLDLFSRN	EDLEEIASID	LKYIMVPALQ	GALTMKQ---	93
human $\alpha 4$	D-LLEKAAEM	LSQLDLFSRN	EDLEEIASTD	LKYLLVPAFQ	GALTMKQ---	92
yeast Tap42	KKLLNLKTAI	FDRLALFSTN	ETIDDVSTAS	IKFLAVDYYL	GLLISRRQSN	89
murine $\alpha 4$ -b	---VGS--SK	RLGLLQDARE	HFMNFLTQTH	SYHVADFQLP	WAQSSSMEGN	138
murine $\alpha 4$	---VNP--SK	RLDHLQ RARE	HFVHFLTQCH	CYHVAEFQLP	QTKTNSAENN	138
rat $\alpha 4$	---VNP--SK	RLDHLQ RARE	HFIHFLTQCH	CYHVAEFQLP	QTKNNSAENN	138
human $\alpha 4$	---VNP--SK	RLDHLQ RARE	HFINYLTQCH	CYHVAEFELP	KTMNNSAENH	137
yeast Tap42	DSDVAQRQSM	KLIYLKKSVE	SFINFLTLLQ	DYKLLDPLVG	EKLGNFKDRY	139
murine $\alpha 4$ -b	PAATSDAQEQ	-----NLVAM	ASQRQTKIQR	YKQKKA VEQR	LSSLKS AVES	183
murine $\alpha 4$	TASSSMAY--	P-----NLVAM	ASQRQAKIER	YKQKKEVEHR	LSALKS AVES	183
rat $\alpha 4$	TARSSMAY--	P-----NLVAM	ASQRQAKIER	YKQKKEVEHR	LSALKS AVES	182
human $\alpha 4$	TANSSMAY--	P-----SLVAM	ASQRQAKIQR	YKQKKELEHR	LSAMKS AVES	181
yeast Tap42	NPQLSELYAQ	PKNNKDLGSA	QLKRKEKIEL	FQRNKEISTK	LHCLELELKN	189
murine $\alpha 4$ -b	GQADDER---	VREYLLQLR	RWISISLDEI	ENIEQEI---	EILRE--RDS	225
murine $\alpha 4$	GQADDER---	VREYHLLHLR	RWIAVSLEEL	ESIDQEI---	KILKE--KDS	224
rat $\alpha 4$	GQADDER---	VREYLLHLR	RWIGISLEEI	ESIDQEI---	KILKD--KDS	224
human $\alpha 4$	GQADDER---	VREYLLHLQ	RWIDISLEEI	ESIDQEI---	KILRE--RDS	223
yeast Tap42	NDEDHDHDEL	LRLEYLMRLH	H---FSLDTI	NNIEQNLFEC	EMLSNFLKNS	236
murine $\alpha 4$ -b	LGETSASRSS	-PQERPP--L	KPFVLTRSA	QAKVFGAGYP	SLATMTVNDW	272
murine $\alpha 4$	PREETACHSS	LP-EKPP--M	KPFILTRNKA	QAKVFGTGYP	SLATMTVSDW	271
rat $\alpha 4$	PREESACQSS	LP-EKPP--M	KPFILTRNKA	QAKVFGTGYP	SLATMTVSDW	271
human $\alpha 4$	SREASTSNSS	RQ-ERPP--V	KPFILTRNMA	QAKVFGAGYP	SLPTMTVSDW	270
yeast Tap42	VHEVKSSGTQ	IRKESNDDDS	TGFTDKLENI	NKPLIDKKGQ	VLRNFTLVDK	286
murine $\alpha 4$ -b	YEQRQKNEVS	PT-LQEA EKQ	A-PPSETF--	T-VSEKEEPD	LEQKED E--D	315
murine $\alpha 4$	YEQH QKY--G	V---LPDRGI	AKPASAD FQ-	-R-AAQQOED	QE QKDEES-E	312
rat $\alpha 4$	YEQH QKY--G	A---LPDRGI	AKPPSAD FQ-	-R-AAQQOED	QE QKDEEN-E	312
human $\alpha 4$	YEQHRKY--G	A---LPDQGI	AKAAP EEF--	-RKAQQOEE	QEEKEEED-D	311
yeast Tap42	ROQLQKVRG	YGQYGP TMSV	EEFLDK E FEE	GRVLQGG EEP	EQAPDEENMD	336
murine $\alpha 4$ -b	--ENALHRMQ	EWDDWKDTHP	RGYGNRQNMG			343
murine $\alpha 4$	--EKALHRMR	EWDDWKDTHP	RGYGNRQNMG			340
rat $\alpha 4$	--EKALHRMR	EWDDWKDTHP	RGYGNRQNMG			340
human $\alpha 4$	--EQTLHRAR	EWDDWKDTHP	RGYGNRQNMG			339
yeast Tap42	WQDRETYKAR	EWDEFKESHA	KGSGNTMNRG			366

- conserved residue
- PP2Ac-binding region
- Prolin rich region
- C-terminal conserved region

Maeda et al. (1999). *Eur. J. Biochem.* 264, 702-706.

図 3 $\alpha 4$ ファミリー分子

B.5 イネの $\alpha 4$ ホモログ

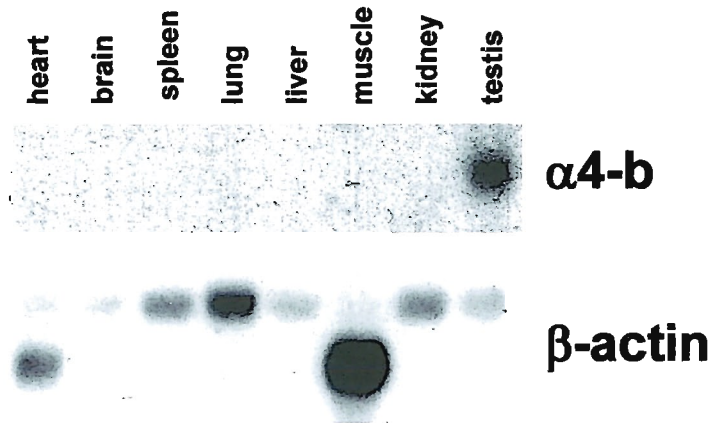
ホモロジー検索により植物のイネにも $\alpha 4$ ホモログが存在することが明らかとなっている。イネの $\alpha 4$ ホモログである pBC601 クローンは寒冷刺激により発現が誘導される遺伝子群の1つとして同定された (Binh and Oono, 1992) が機能については明らかではない。

B.6 組織特異的 $\alpha 4$ ファミリー分子 $\alpha 4$ -b

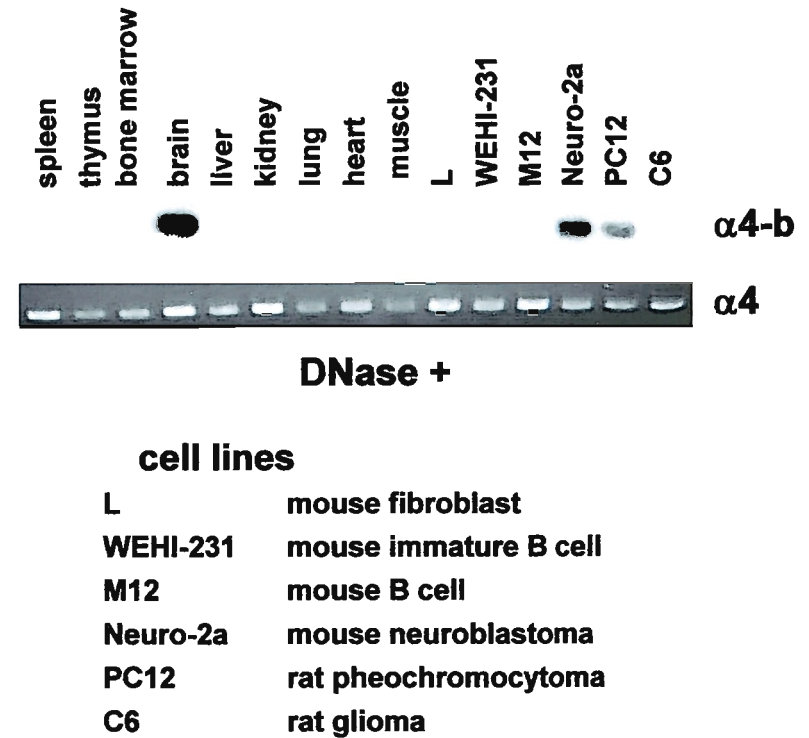
$\alpha 4$ -b は脳神経細胞および精巣で組織特異的に発現する $\alpha 4$ のファミリー分子として同定された (Maeda et al., 1999)。Maeda らは新たな $\alpha 4$ 関連配列を含んだファージ DNA クローンを単離し $\alpha 4$ -b と名付けた。脳 cDNA ライブラリーから単離した $\alpha 4$ -b cDNA の構造からは $\alpha 4$ -b 遺伝子はイントロンレスの遺伝子であった。ノーザンブロットティングと RT-PCR の解析から $\alpha 4$ -b 遺伝子は脳と精巣でのみ発現していた (図 4)。In situ ハイブリダイゼーションによる解析では $\alpha 4$ -b mRNA は海馬錐体細胞や小脳プルキンエ細胞を含め神経細胞で発現しているがグリア細胞では発現していなかった (図 5)。 $\alpha 4$ -b 遺伝子は 343 アミノ酸残基をコードしておりマウス $\alpha 4$ より 3 アミノ酸長かった。アミノ酸配列はマウス $\alpha 4$ (66%)、ヒト $\alpha 4$ (66%)、ラット $\alpha 4$ (67%)、酵母 Tap42 (33%) およびイネ pBC601 (32%) と高い相同性を示した (図 3)。 $\alpha 4$ 遺伝子が ubiquitous に発現しているのに対し $\alpha 4$ -b 遺伝子は脳神経細胞および精巣でのみ発現しており、 $\alpha 4$ および $\alpha 4$ -b の組織特異的な機能の存在が示唆された (図 4, 5)。

また、 $\alpha 4$ と同様に PP2Ac と結合する (後述) ことが明らかとなっており $\alpha 4$ -b は PP2Ac を調節することにより脳神経細胞や精巣においてシグナル伝達に関与するものと考えられた。

Northern blot analysis



RT-PCR analysis



Maeda et al. (1999). *Eur. J. Biochem.* 264, 702-706.

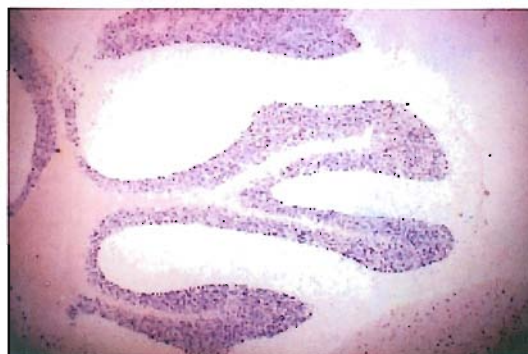
図 4 $\alpha 4\text{-b}$ は脳神経細胞および精巣特異的に発現する $\alpha 4$ ファミリー分子である 1
 $\alpha 4\text{-b}$ は脳神経細胞および精巣で組織特異的に発現する $\alpha 4$ のファミリー分子として同定された (Maeda et al., 1999)。ノーザンブロッティングとRT-PCRの解析から $\alpha 4\text{-b}$ 遺伝子は脳と精巣でのみ発現している。

$\alpha 4$ -b mRNA expression in murine brain

Hippocampus



Purkinje cells



in situ hybridization

Maeda et al. (1999). *Eur. J. Biochem.* 264, 702-706.

図 5 $\alpha 4$ -b は脳神経細胞および精巣特異的に発現する $\alpha 4$ ファミリー分子である 2

In situ ハイブリダイゼーションによる解析では $\alpha 4$ -b mRNA は海馬錐体細胞や小脳プルキンエ細胞を含め脳神経細胞で発現していたが、グリア細胞では発現していなかった。

C. PP2A(Protein Phosphatase 2A)

C.1 セリン/スレオニン・ホスファターゼの分類

$\alpha 4$ が結合し、その機能を調節している PP2A は代表的なセリン/スレオニン・ホスファターゼである。ホスファターゼは細胞内におけるシグナル伝達に重要である。多くのシグナル伝達はリン酸化反応によってなされるが、キナーゼによるリン酸化反応はホスファターゼによる脱リン酸化反応によって調節される。セリン/スレオニン・ホスファターゼの数はこれまでに同定されているセリン/スレオニン・キナーゼに比較してはるかに少ない (Hunter, 1995)。セリン/スレオニン・ホスファターゼは、数多い種類のリン酸化されたタンパク質を基質とし得るために様々な調節分子と結合することによって数多くのホロ酵素型をつくっている。セリン/スレオニン・ホスファターゼは酵素学的性質に基づき、4 種類 (PP1, PP2A, PP2B, PP2C) に分類されている (Cohen, 1989)。さらに、PP2A のサブファミリーである PP4 (Brewis et al., 1993)、PP6 (SIT4 / Bastians and Ponstingl, 1996) や新

しいファミリー分子である PP5 (Chen et al., 1994)、PP7 (Huang and Honkanen, 1998) が報告されている。

C.2 PP2A

PP2A は哺乳動物細胞において量的に最も豊富なホスファターゼであり、細胞増殖や細胞周期のコントロールといった重要な機能を有する (Lechward et al., 2001, Sontag, 2001, Zolnierowicz, 2000)。PP2A ホロ酵素は触媒 (C-) サブユニットと様々な調節サブユニットの複合体からなる (Mumby and Walter, 1993, Wera and Hemmings, 1995)。C-サブユニットは調節 A-サブユニットと結合し、さらにこの A/C ダイマーは様々な B-サブユニットや他の結合分子と結合する (Ruediger et al., 1992)。A-サブユニットや様々な B-サブユニットを含むホスファターゼ調節分子が結合することにより、PP2A は多様なホロ酵素型 (図 6) として存在し、多様な基質親和性、基質特異性および細胞内局在を持つことが可能となっている (図 7) (Janssens and Goris, 2001, Turowski et al., 1997, Agostinis et al., 1992)。したがって PP2A においては C-サブユニット (PP2Ac) に結合する調節分子がその機能を規定しており重要な役割を果たしている。

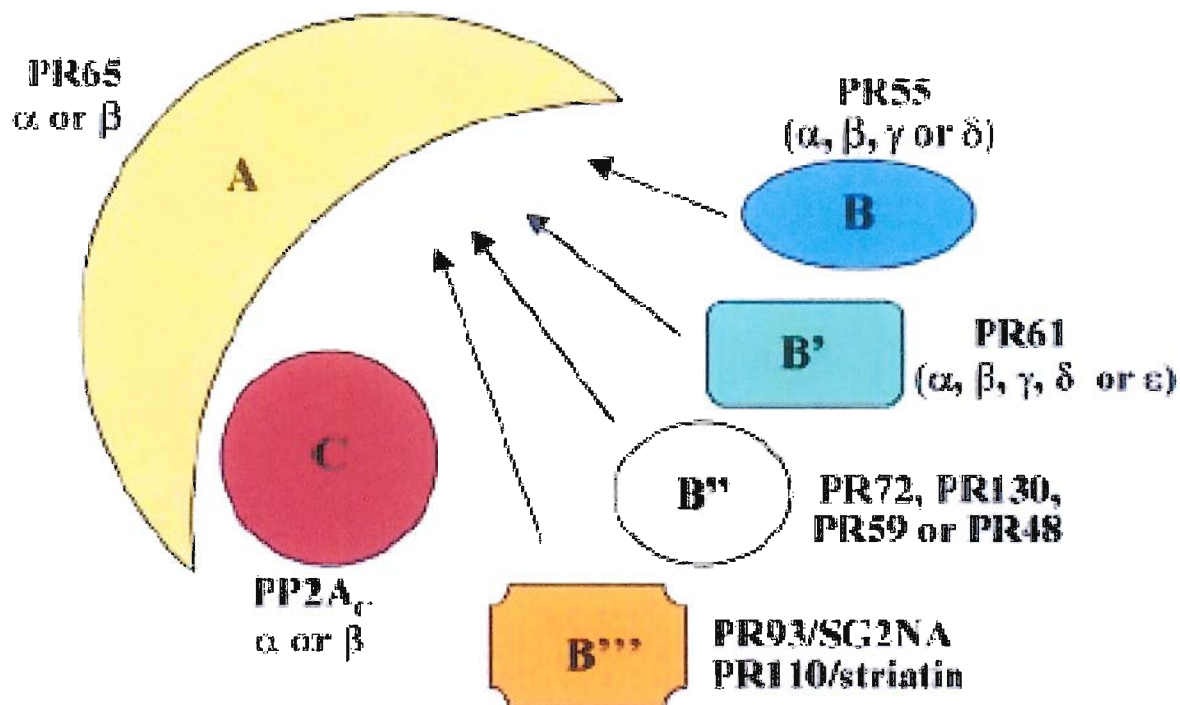
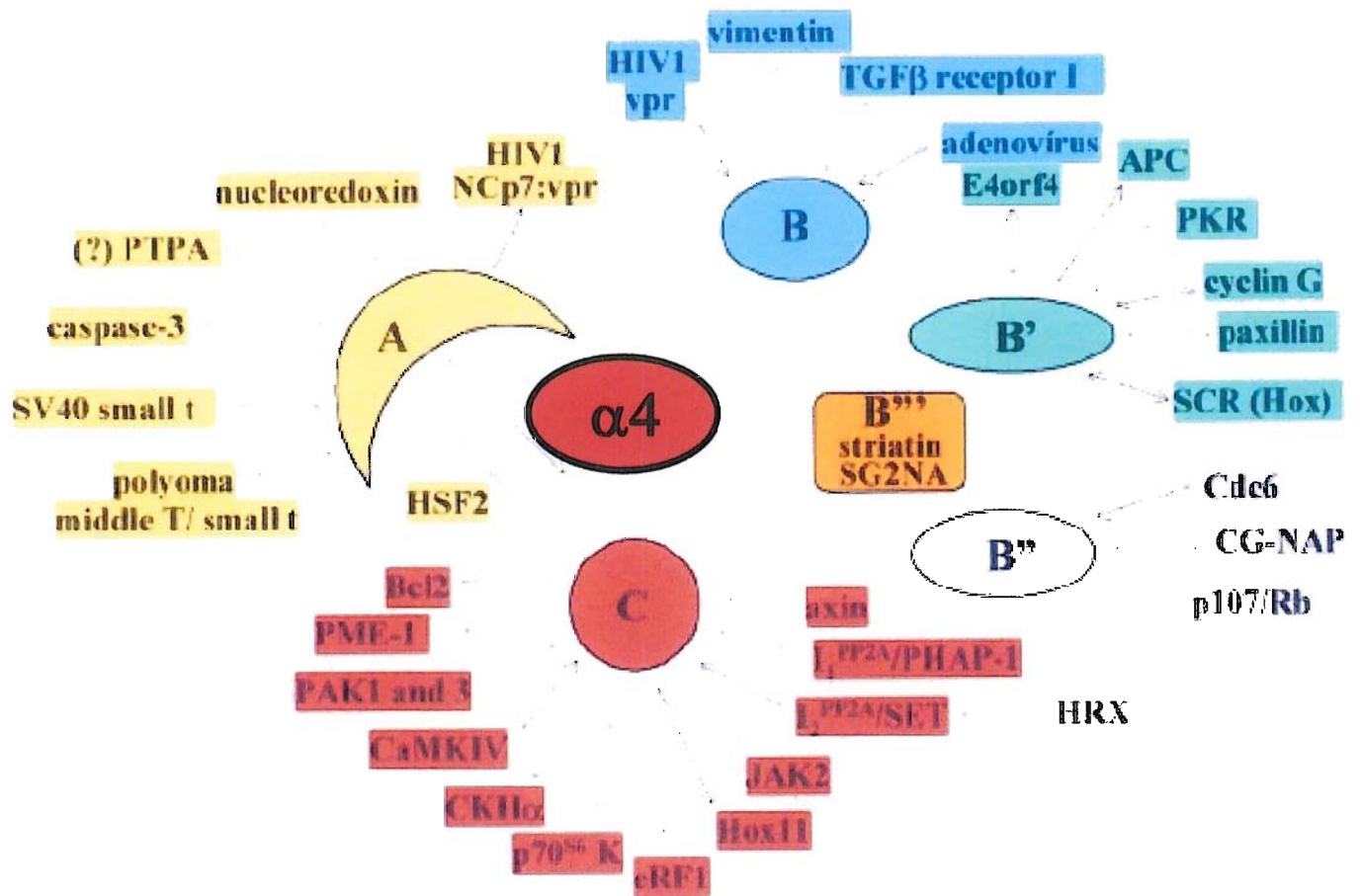


図 6 PP2A ホロ酵素の構造

Janssens, V., and Goris, J. (2001). *Biochem. J.* 353, 417-439.



Janssens, V., and Goris, J. (2001). *Biochem. J.* 353, 417-439.

図 7 PP2A 結合分子

C-サブユニットはA-サブユニットや様々なB-サブユニットを含むホスファターゼ調節分子が結合することにより、PP2Aは多様なホロ酵素型として存在し、多様な基質親和性、基質特異性および細胞内局在を持つことが可能となっている。

$\alpha 4$ はA-サブユニットと競合的にC-サブユニット (PP2Ac) と直接結合する、A-サブユニットやB-サブユニットのカテゴリーに属さない新しいPP2A調節分子である (後述)。

その他のPP2Acに結合する分子として、eRF1 (Andjelkovic et al., 1996)、HOX11 (Kawabe et al., 1997)、CK2 α (Heiche et al., 1997)、CaMKIV (Westphal et al., 1998)、Axin (Hsu et al., 1999)、Bcl-2 (Deng et al., 1998)、S6キナーゼ (S6K) (Westphal et al., 1999, Peterson et al., 1999, Yamashita et al., 2005)、E-cadherin/ β -catenin (Gotz et al., 2000)、MID1 (Liu et al., 2001)、PKC α (Boudreau et al., 2002)、Cyclin G2 (Bennin et al., 2002) などが報告されている (表1)。

結合タンパク質	特徴
eRF1	AC ダイマーに結合し、PP2A をリボソームに局在させる。
HOX11	C サブユニットに結合し、PP2A 活性を阻害する。
CK2 α	AC ダイマーに結合し、PP2A 活性を増強する。
CaMKIV	ABC トリマーに結合し、PP2A の基質となる。 SV40 small-t 抗原により結合が阻害され CREB 活性が変化。
Axin	C サブユニットに結合し、PP2A を Axin, APC, GSK3 および β -catenin 複合体のターゲットとする (Wnt シグナルに関与させる)。
Bcl-2	ABC トリマーに結合し、PP2A は Bcl-2 を脱リン酸化する。 アポトーシスにおける Bcl-2 の機能を制御する。
S6K	α 4/PP2Ac とトリマーを形成し、BCR および LPS 刺激により PP2A 活性が阻害され S6K 活性は増強する。
E-cadherin/ β -catenin	C α サブユニットにより E-cadherin/ β -catenin 複合体が 細胞膜において安定化する。
MID1	α 4 と結合して C サブユニットと共に複合体を形成。 この結合は MID1 を微小管に結合させ、中線の形成を制御する。
PKC α	C サブユニットに結合し、PP2A にて脱リン酸化される。 この結合は肥満細胞における IL-6 産生の制御に重要である。
Cyclin G2	C および B'サブユニットと結合し、細胞周期進行の阻害に関与する。

表 1 PP2A の C サブユニット (PP2Ac) と結合する分子群

C.3 脳における PP2A の発現および CaMKII との関連

PP2A の C-サブユニット (PP2Ac) には α と β という二つのアイソフォームが存在し、量的には α は β の約十倍である。二つのアイソフォームともにその発現は ubiquitous であるが、特に脳と心臓で強く発現していることが明らかとなっている (Khew-Goodall and Hemmings, 1988)。したがって PP2A は脳においても重要な機能を有することが示唆されていた。

CaMKII は脳において多量に存在するプロテインキナーゼで、海馬依存性の学習記憶に

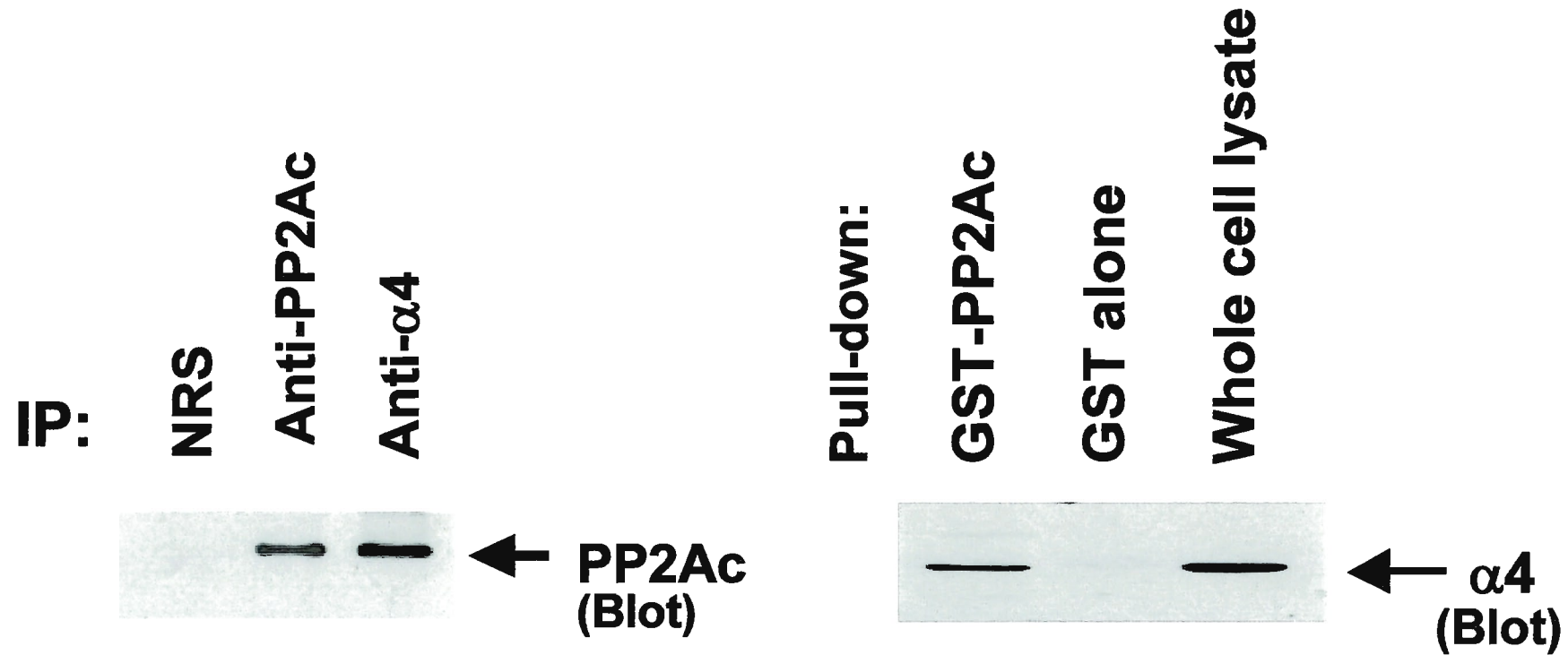
重要であることが明らかにされている (Lisman et al., 2002)。最近、この CaMKII と PP2A との関連が報告されている。CaMKII は自己リン酸化することにより活性型となり、シナプス機能調節に重要なシナプス後肥厚 (PSD, postsynaptic density) へ移行する。CaMKII が活性化型となるスイッチオンが自己リン酸化であるのに対し、スイッチオフにあたる脱リン酸化を担うプロテインホスファターゼの重要性が認識されるようになった。PSD においては PP1 によって主に脱リン酸化されることが報告されてきた。(Strack et al., 1997)。一方、PP2A も CaMKII の脱リン酸化に関与しているとの報告がなされるようになった。ラット海馬抽出液においては CaMKII の脱リン酸化活性の 90% を PP2A と PP2C が占め、PP1 は全体の 10% にすぎないことが報告されている (Fukunaga et al., 2000)。また、ラット脳スライス系の系において細胞質の CaMKII の脱リン酸化は主に PP2A が担っていた (Bennechib et al., 2001)。さらに PP2A が学習記憶に関与するという報告もされている。海馬スライスでのシナプス伝導効率の長期増強 (LTP, long-term potentiation) 発現刺激により PP2A 活性が低下し、またカリクリン A (PP1 と PP2A の阻害剤) によるプロテインホスファターゼの阻害により海馬において LTP 様の伝達増強を認めた (Fukunaga et al., 2000)。これらの結果は PP2A が細胞質内において CaMKII を脱リン酸化し学習記憶を制御している可能性を示唆している。

D. $\alpha 4$ と PP2Ac

D.1 $\alpha 4$ と PP2Ac の直接結合

$\alpha 4$ は PP2Ac と細胞内で直接結合する (Inui et al., 1998, Murata et al., 1997, Nanahoshi et al., 1998, Chen et al., 1998) (図 8)。Inui らは $\alpha 4$ の中央領域 (94-202 番目) のアミノ酸が PP2Ac との結合に重要であることを示した (Inui et al., 1998)。また筆者は Inui らとともに PP2Ac の 19-22 番目および 150-164 番目のアミノ酸が $\alpha 4$ との結合に重要であることを明らかとした (Yamashita et al., 2005) (図 9 および 10)。

前述のごとく、脳神経細胞および精巣で組織特異的に発現する $\alpha 4$ のファミリー分子である $\alpha 4$ -b も $\alpha 4$ と同様に PP2Ac と結合することが明らかとされている (Maeda et al., 1999) (図 11)



Inui et al. (1998). *Blood* 92, 539-546.

図 8 $\alpha 4$ はPP2Acと直接結合する

(A) T細胞株Jurkat細胞の細胞抽出液を抗 $\alpha 4$ 抗体、抗PP2Ac抗体およびNRS（非免疫ウサギ血清・陰性コントロール）と共に4°C、2時間反応させて免疫沈降（IP）を行なった。沈降物はSDS-PAGEで展開しニトロセルロース・フィルターに転写後、抗PP2Ac抗体でブロットした。

(B) Jurkat細胞の細胞抽出液（Whole Cell lysate）[5 x 10⁷個]にGST-PP2Ac融合タンパク、GST alone（陰性コントロール）を混合後、グルタチオン・セファロースビーズを加えてプルダウン・アッセイを行なった。沈降物をSDS-PAGE後、フィルターに転写し抗 $\alpha 4$ 抗体でブロットした。

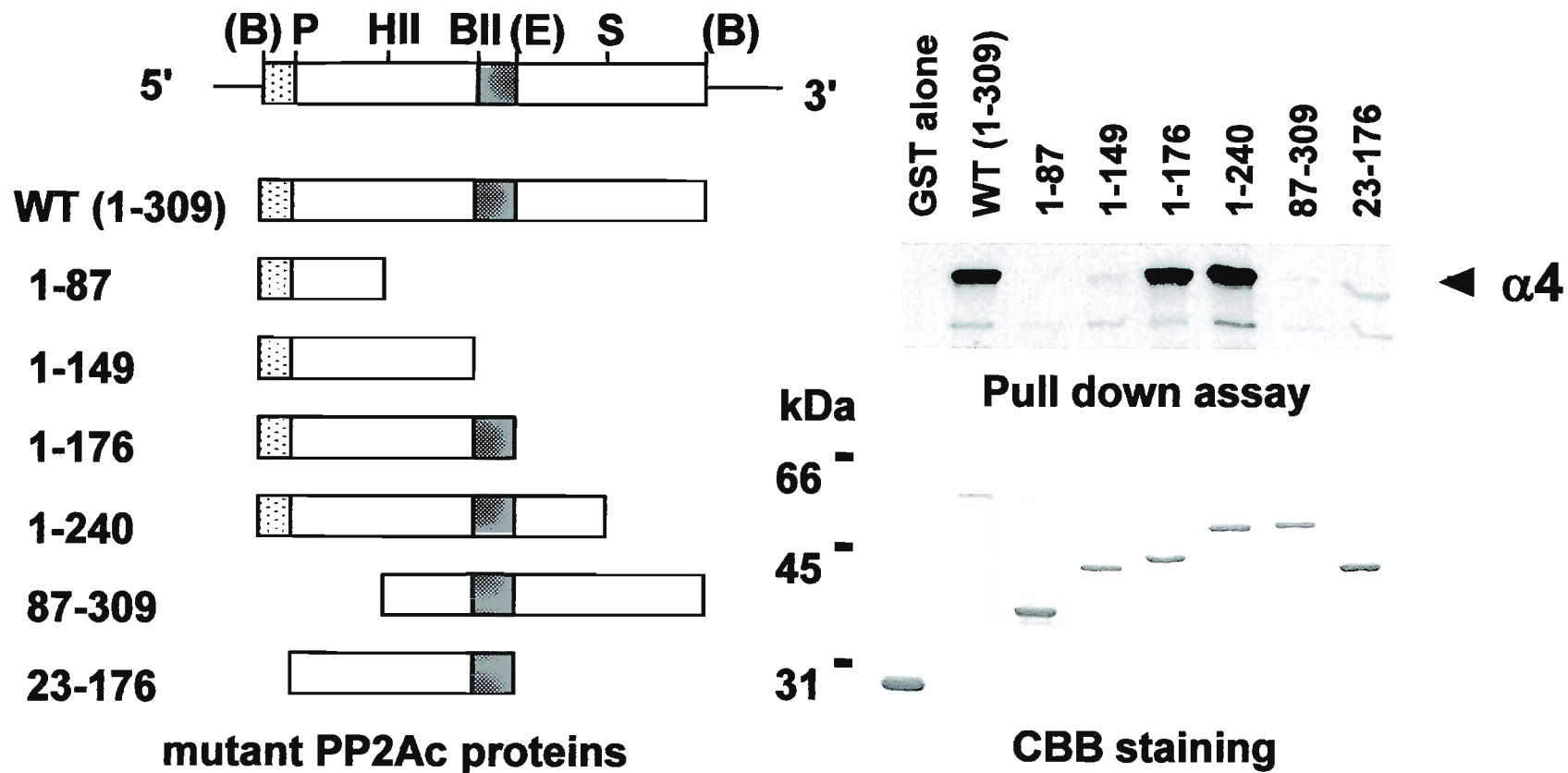


図 9 PP2Acの $\alpha 4$ 結合部位 1

GST-PP2Ac融合タンパクの全長 (WT) および左に示す6種類のミュータントを作製した。それぞれのGST-PP2Ac融合タンパクをWTマウスの脾臓B細胞の細胞抽出液と混合後、プルダウン・アッセイを行った。沈降物をSDS-PAGE後、フィルターに転写し抗 $\alpha 4$ 抗体でブロットした (右上図)。右下図のCBB (Coomassie Brilliant Blue) 染色はGST-PP2Ac融合タンパクが等量であることを示す。左図の色付き部はプルダウン・アッセイより明らかとなったPP2Acの $\alpha 4$ との結合に必要な部位である。B, *Bam*HI; BII, *Bgl*II; HII, *Hinc*II; P, *Pst*I; S, *Sac*I.

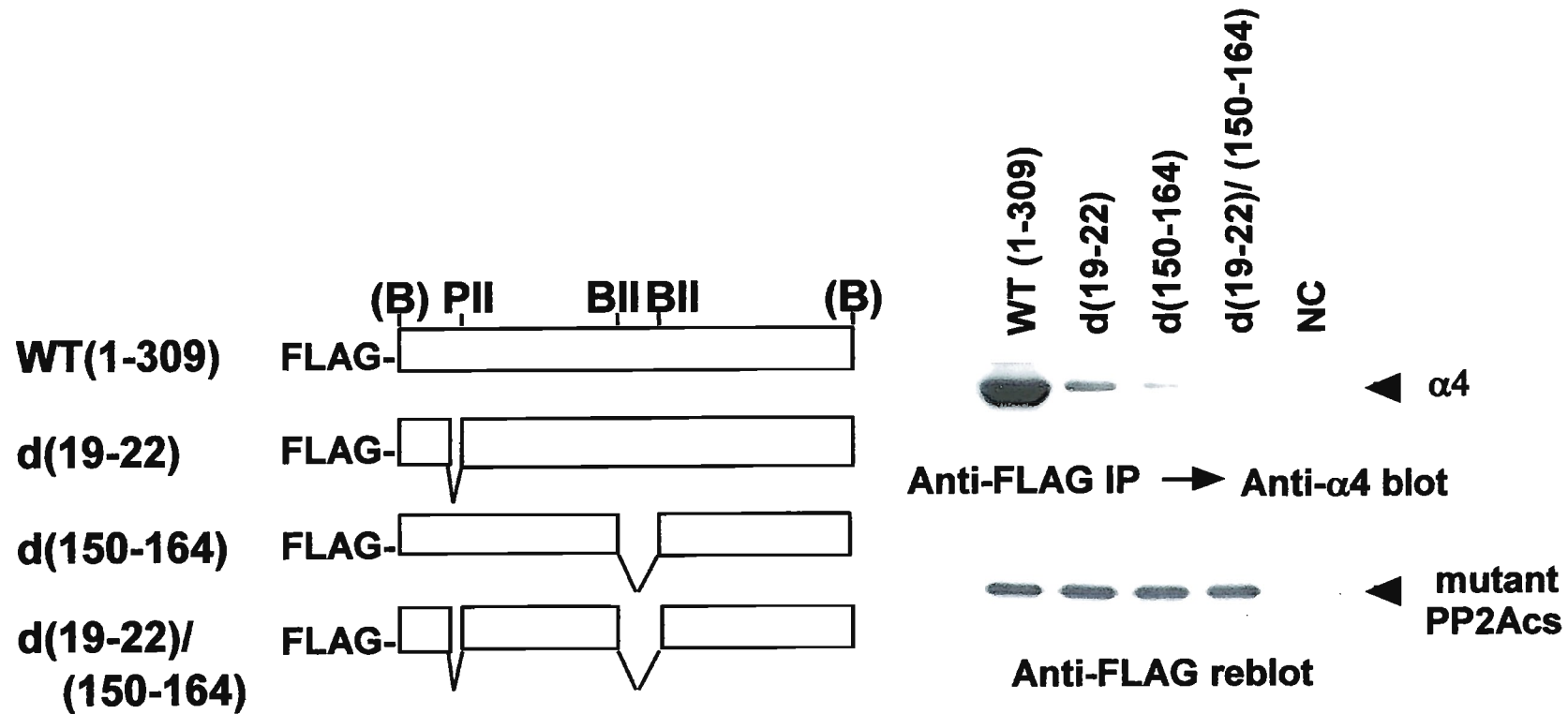
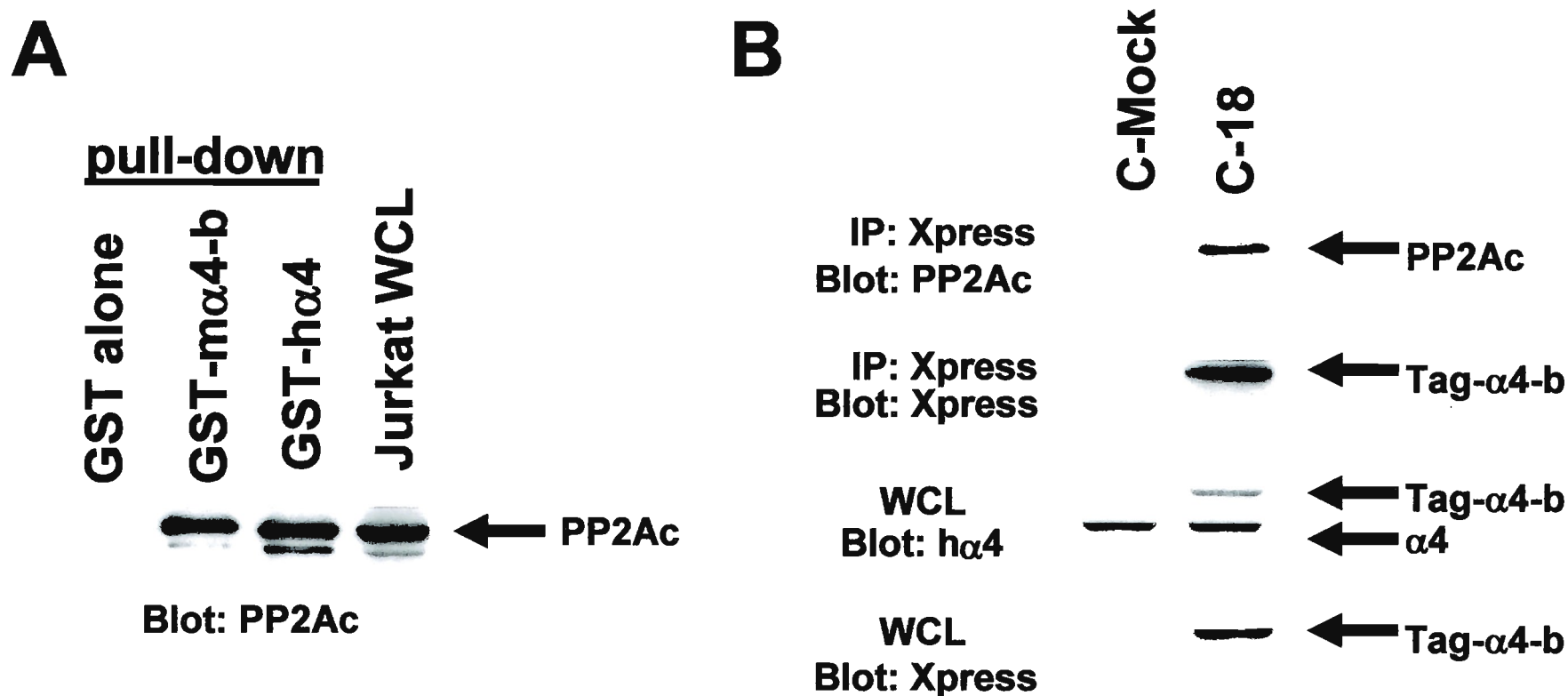


図 10 PP2Acの $\alpha 4$ 結合部位 2

FLAGタグ付きのPP2Ac cDNAの全長 (WT) および左に示す3種類のミュータントを作製した。それぞれのFLAG-PP2Ac cDNAを293T細胞にトランスフェクトし、細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGEで展開しニトロセルロース・フィルターに転写後、抗 $\alpha 4$ 抗体でブロットした (右上図)。その後フィルターを脱プローブし抗FLAG抗体で再ブロットした (右下図)。B, *Bam*HI; BII, *Bg*III; PII, *Pvu*II.



C-18 : Cos-7 cells transfected with Xpress- $\alpha 4$ -b cDNA
C-Mock : with control vector

Maeda et al. (1999). *Eur. J. Biochem.* 264, 702-706.

図 11 $\alpha 4$ -b は $\alpha 4$ と同様、PP2Acと結合する。

(A) GST alone (陰性コントロール)、GST- $\alpha 4$ -b, GST-human $\alpha 4$ (陽性コントロール) 融合タンパクをそれぞれJurkat細胞の抽出液と混合後、グルタチオンセファロースビーズを加えてプルダウンアッセイを行なった。沈降物はSDS-PAGEで展開させ、ニトロセルロースフィルターに転写後、抗PP2Ac抗体でブロットした。

(B) C-18 (Xpressタグ付き $\alpha 4$ -bをトランスフェクションしたCOS-7細胞) およびC-Mock (発現ベクターのみ) から細胞抽出液 (WCL) を調整し、抗Xpress抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行なった。沈降物はSDS-PAGE後、フィルターに転写した抗PP2Ac抗体でブロットした (上段目)。フィルターを脱プローブ後、抗Xpress抗体で再プローブしてTag- $\alpha 4$ -bタンパクの沈降を確認した (二段目)。また、Tag- $\alpha 4$ -bと内在性 $\alpha 4$ タンパクの発現は、WCLを抗 $\alpha 4$ 抗体および抗Xpress抗体でブロットして確認した (三、四段目)。

D.2 $\alpha 4$ による PP2A 活性の調節

また、Inui らは MBP (ミエリン塩基タンパク) およびヒストンを基質とした *in vitro* ホスファターゼ・アッセイにより $\alpha 4$ が PP2A 活性を増強することを示した (Inui et al., 1998) (図 12)。すなわち $\alpha 4$ は PP2Ac と直接結合することにより PP2Ac の酵素活性を調節しており、 $\alpha 4$ が PP2Ac の調節サブユニットとして機能することが明らかとなっている。

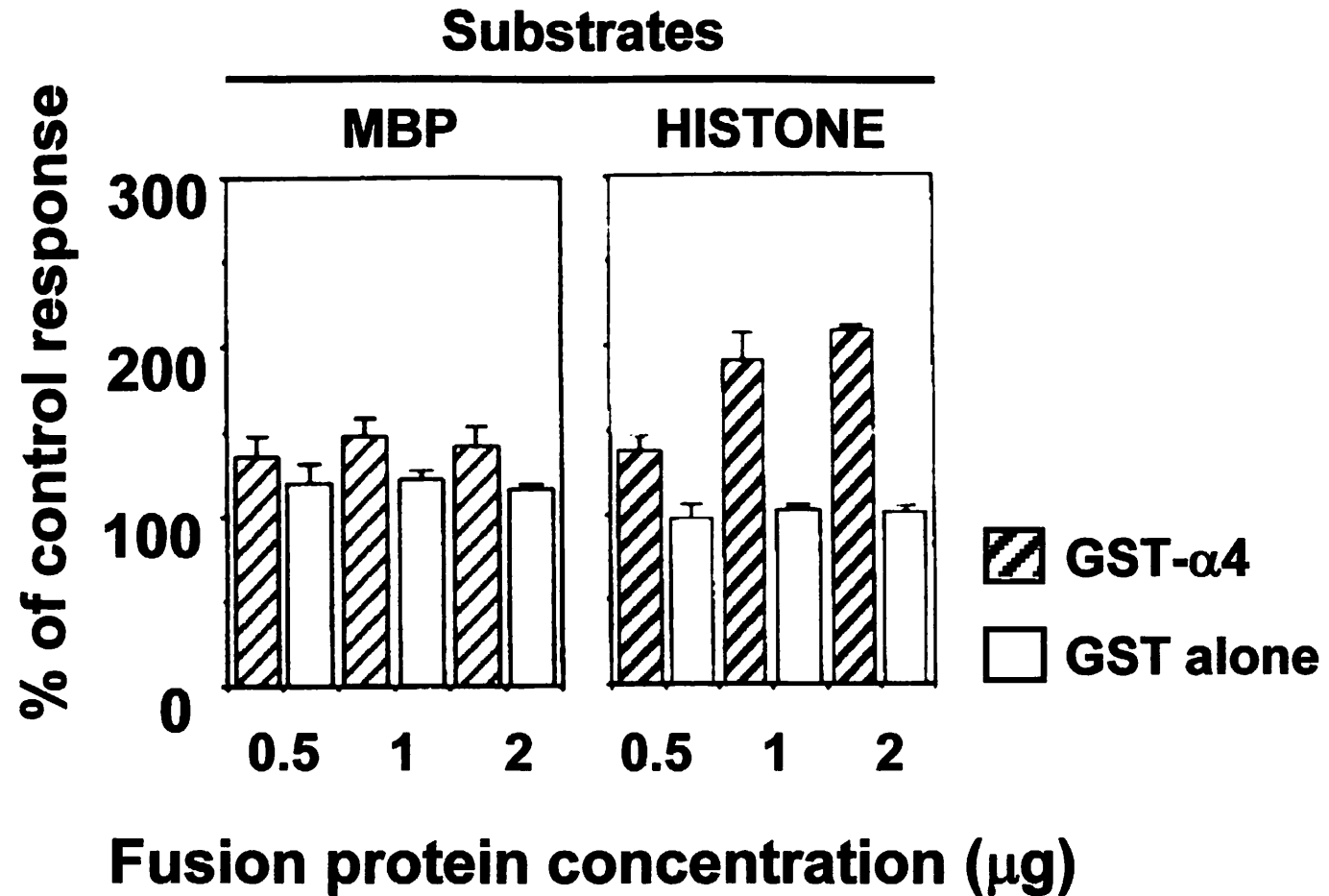
D.3 $\alpha 4$ /PP2Ac と免疫抑制剤ラパマイシン

$\alpha 4$ と PP2Ac の結合は、免疫抑制剤ラパマイシンによる増殖抑制に感受性をもつ T リンパ細胞株 Jurkat 細胞において、ラパマイシンによって濃度依存的に解離する (Inui et al., 1998) (図 13)。したがって $\alpha 4$ は後述するラパマイシン感受性経路に関与することが示唆されている。

E. ラパマイシン感受性経路

免疫抑制剤ラパマイシンはリンパ細胞や上皮細胞の細胞増殖を阻害する (Abraham, 1998, Abraham and Wiederrecht, 1996)。ラパマイシンは免疫抑制剤 FK506 と類似の構造をもつが、ラパマイシンと FK506 は T 細胞活性化の異なるステージに作用することが知られていた (Dumont et al., 1990)。すなわち FK506 は T 細胞抗原レセプター (TCR) からのシグナル伝達を阻害するのに対し、ラパマイシンは IL-2 レセプターからの増殖シグナルを阻害する。ラパマイシンが阻害するシグナル伝達経路はラパマイシン感受性経路と称され、ラパマイシンの標的分子は mTOR (mammalian target of rapamycin) であることが明らかとなっている。mTOR は PI3-K と同構造のキナーゼ・ドメインを持ち、4E-BP1 および S6K をリン酸化する (Burnett et al., 1998, Hara et al., 1997)。非リン酸化型の 4E-BP1 はインヒビターである、eIF-4E と結合しており 4E-BP1 がリン酸化すると eIF-4E がはずれて活性化型となり、5'キャップ構造をもつ mRNA の翻訳を導く (Brown et al., 1996, Thomas and Hall, 1997, Khaleghpour et al., 1999)。S6K はリボソーム・タンパク S6 をリン酸化し、mRNA の翻訳効率を増加させてほ乳動物細胞における細胞周期の進行を誘導する (Brown and Schreiber, 1996, Thomas and Hall, 1997, Dufner and Thomas, 1999)。

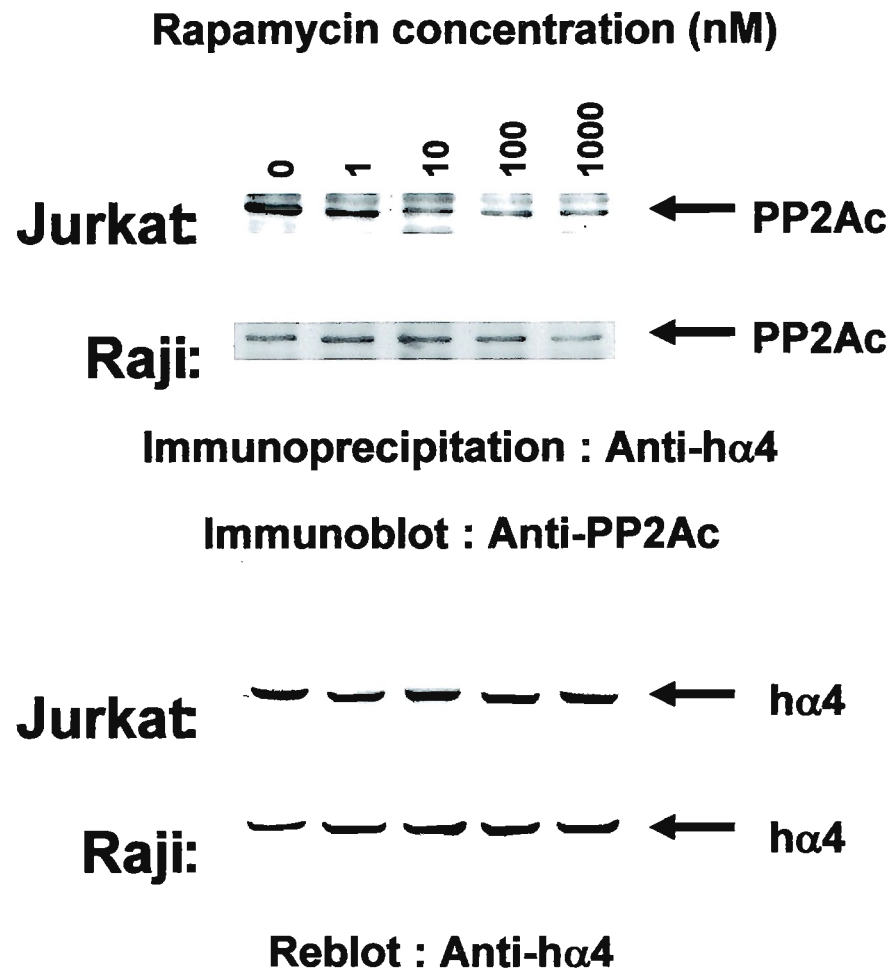
$\alpha 4$ と PP2Ac の結合がラパマイシンによって阻害されることから、 $\alpha 4$ /PP2Ac 複合体は mTOR を介したラパマイシン感受性経路に強く関連していることが示唆された (図 14)。



Inui et al. (1998). *Blood* 92, 539-546.

図 12 α4はPP2Acの酵素活性を調節する

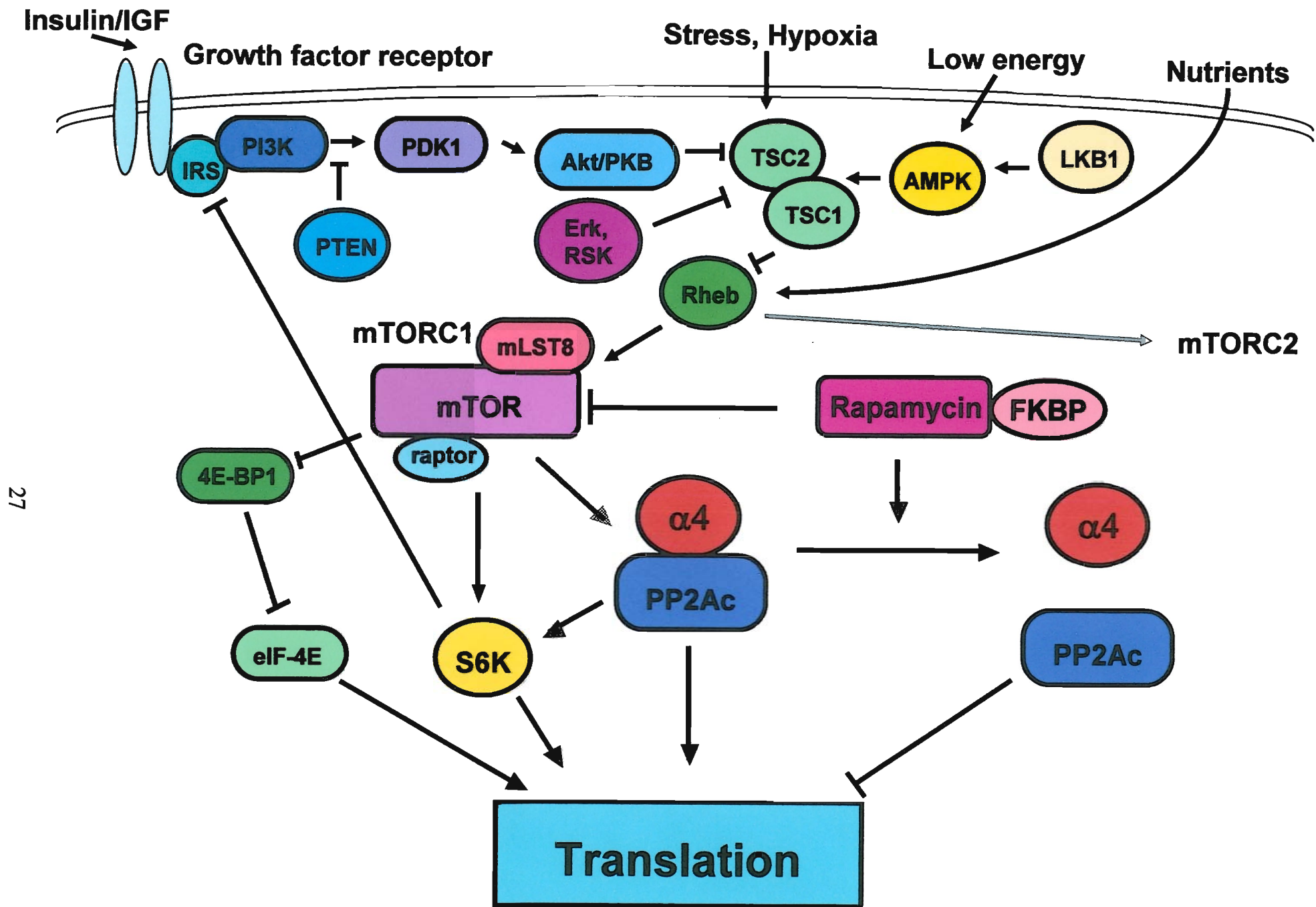
PP2Aホロ酵素とリン酸化したMBP（ミエリン塩基タンパク）およびヒストンH1を反応させて *in vitro* ホスファターゼ・アッセイを行なった。そこにGST-alone（陰性コントロール・白棒）およびGST-α4融合タンパクを加えてPP2Aの酵素活性の変化を計測した。値はGST融合タンパクを加えずに計測したPP2Aの酵素活性を100%としたパーセント表示である。



Inui et al. (1998). *Blood* 92, 539-546.

図 13 α 4とPP2Acの結合はラパマイシンによって阻害される

ラパマイシンによる増殖抑制に感受性のあるJurkat細胞と抵抗性のRaji細胞に0 - 1,000nMのラパマイシンを加えて、抗 α 4抗体で免疫沈降し沈降物をSDS-PAGEで展開後抗PP2Ac抗体でブロットした(上二段)。その後フィルターを脱プローブし抗 α 4抗体で再ブロットした(下二段)。



27

図 14 ラパマイシン感受性経路

F. $\alpha 4$ /PP2Ac による S6K の調節

S6K は哺乳動物細胞において S6K1 と S6K2 の 2 つのファミリー分子をもち、S6K 活性はリン酸化および脱リン酸化によって調節される (Thomas and Hall, 1997, Thomas, 2002, Volarevic and Thomas, 2001)。S6K の脱リン酸化は PP2A によってなされることが明らかとなっている (Ferrari et al., 1993)。また、上述のように哺乳動物細胞において PP2A は S6K と結合することが報告されている (Westphal et al., 1999, Peterson et al., 1999)。

S6K の活性化はこれまでに、マクロファージの細胞株では LPS (lipopolysaccharide) 刺激によって、また B 細胞においては BCR-クロスリンクによって誘導されることが報告されている (Li et al., 1997, Li et al., 1999, Salh et al., 1998)。また、B 細胞の活性化は、BCR-クロスリンクと同様に LPS 刺激によって誘導され、その活性化はラパマイシンによって阻害される、すなわちラパマイシン感受性であることが明らかとなっている (Sakata et al., 1999)。

筆者は B 細胞において LPS 刺激により $\alpha 4$ は PP2Ac、さらに S6K との結合が誘導されて (図 15)、 $\alpha 4$ /PP2Ac/S6K ヘテロトリマー複合体を形成することを明らかとした (図 16) (Yamashita et al., 2005)。そのシグナル伝達において $\alpha 4$ は PP2Ac 活性を負に調節することにより S6K 活性を正に調節し、細胞増殖に関与していると考えられた。上述の如く MBP やヒストンを基質とした *in vitro* の実験では $\alpha 4$ は PP2Ac 活性を正に調節した。したがって $\alpha 4$ は基質や結合物質などの変化により、PP2Ac を正にも負にも調節し得ることが明らかとなった。

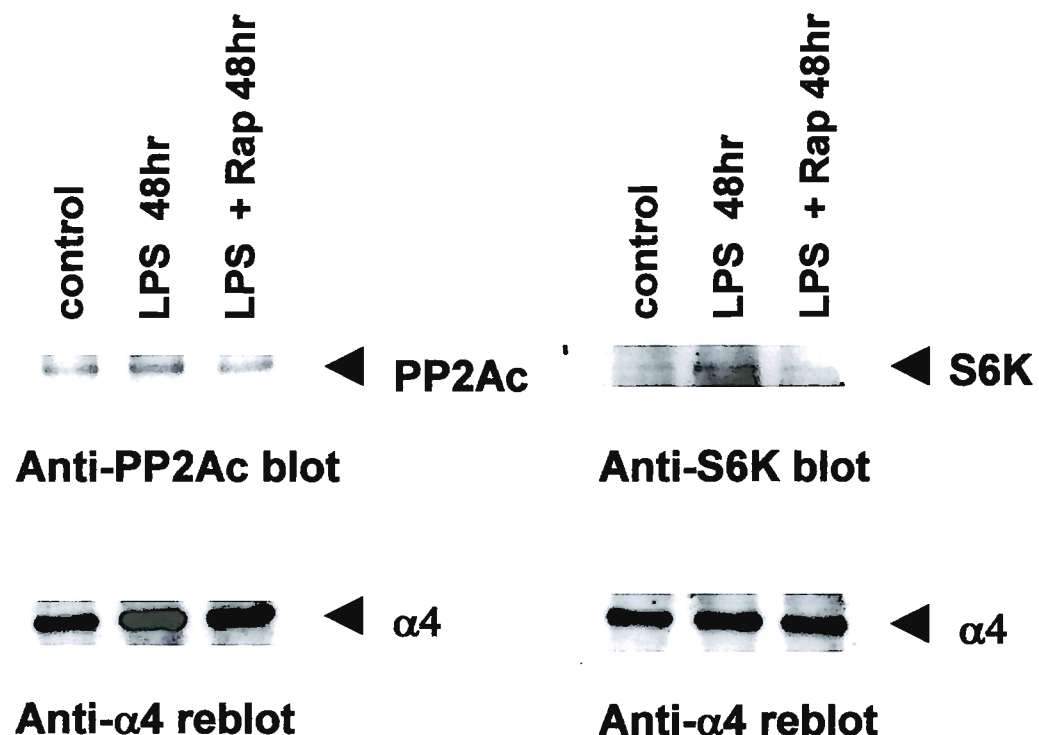


図 15 $\alpha 4$ はLPS刺激下により強くS6Kと結合する

WTマウスの脾臓B細胞にLPS (25 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (25 $\mu\text{g/ml}$) +ラパマイシン (100 nM) を加え、培養した。48時間後に細胞を回収し細胞抽出液を抗 $\alpha 4$ 抗体で免疫沈降した。沈降物をSDS-PAGEで展開しニトロセルロース・フィルターに転写後、抗PP2Ac抗体 (左図)、抗S6K抗体 (右図) でブロットした。その後フィルターを脱プローブし抗 $\alpha 4$ 抗体で再ブロットした (下図)。

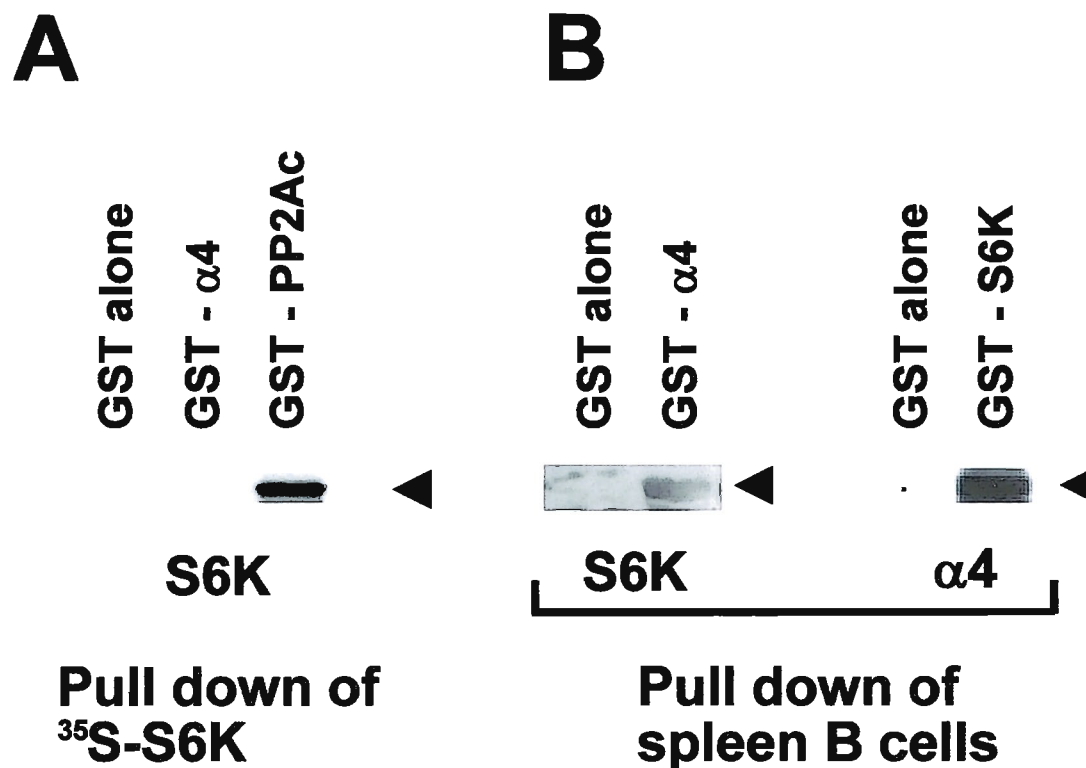


図 16 $\alpha 4$ / PP2Ac / S6Kヘテロトリマー複合体の形成

(A) [^{35}S]メチオニンでラベルしたS6K1タンパクを*in vitro* translation kit を用いて*in vitro*で生合成した。S6K1タンパクとGST alone (陰性コントロール)、GST- $\alpha 4$ およびGST-PP2Ac融合タンパクを混合後、グルタチオン・セファロースビーズを加えてプルダウン・アッセイを行なった。沈降物をSDS-PAGE後、フィルターに転写しオート・ラジオグラフィーにて[^{35}S]-S6K1を検出した。

(B) WTマウスの脾臓B細胞の細胞抽出液とGST alone (陰性コントロール)、GST- $\alpha 4$ およびGST-S6K1融合タンパクを混合後、プルダウン・アッセイを行なった。沈降物をSDS-PAGE後、フィルターに転写し抗S6K抗体 (B左図) および抗 $\alpha 4$ 抗体 (B右図) でブロットした。

G. 組織特異的 $\alpha 4$ ノックアウトマウス

Inui らは $\alpha 4$ の *in vivo* における機能を解析するため、 $\alpha 4$ 遺伝子を欠損したマウス胚性幹細胞の作成を試みたが、致死性であった。したがって $\alpha 4$ はほ乳類の発生に必須である事が示された。そこで組織特異的に $\alpha 4$ をノックアウトすることにより $\alpha 4$ の機能を解析することとした。 $\alpha 4$ はその発見の経緯から B 細胞において BCR からのシグナル伝達に関与すると考えられたため、筆者は Inui らと共に B 細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウトマウス (Inui et al., 2002) を作成し解析した。さらに BCR と TCR からのシグナル伝達の類似性から $\alpha 4$ は T 細胞においても重要な機能を果たすと考えられたため、T 細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウトマウス (Ding et al., 2003) を作成し解析した。組織特異的な $\alpha 4$ 遺伝子の欠損には Cre-loxP システムを用いた。以下にそれぞれのマウスの解析により明らかとなったことを述べる。

G.1 B 細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウト (B- $\alpha 4$ KO) マウス

B- $\alpha 4$ KO マウスは雄の CD19-Cre マウス (B 細胞特異的に発現する CD19 のプロモーター下流に Cre recombinase cDNA を導入したトランスジェニックマウス) と雌の $\alpha 4$ -flox マウス (後述) を交配して作成した。B- $\alpha 4$ KO マウスは正常に成長し、脳、肝臓、心臓、腎臓および胸腺の構築も正常であった。

B- $\alpha 4$ KO マウスの B 細胞数はコントロールと同等であったが、成熟 B 細胞数が減少していた。すなわち $\alpha 4$ B 細胞では分化が障害されていた。

B- $\alpha 4$ KO マウスの B 細胞では、IL-4、抗 CD40 抗体および LPS をそれぞれ加えた抗 IgM 抗体刺激後の細胞増殖が障害されていた (図 17)。また抗 IgM 抗体刺激後の S6K の活性化が低下していた (図 18)。さらに抗 IgM 抗体、抗 CD40 抗体および LPS 刺激による細胞増殖に対するラパマイシン感受性の低下が認められた (図 19)。したがって、 $\alpha 4$ は *in vivo* においても BCR からのシグナル伝達に関与しており、 $\alpha 4$ の下流に S6K が存在していること、また $\alpha 4$ はラパマイシン感受性経路に関与することが明らかとなった。

B- $\alpha 4$ KO マウスは T 非依存性 (TI) 抗原および T 依存性 (TD) 抗原刺激による抗体産生能が低下していた (図 20)。さらに TD 抗原刺激に対する反応においてはクラススイッチ (図 17)、胚中心形成 (図 21) および V 領域体細胞突然変異が強く障害されていた (図 22)。

B- $\alpha 4$ KO マウスの解析により *in vivo* において $\alpha 4$ は抗原刺激によるシグナル伝達において B 細胞の活性化と分化に重要であることが明らかとなった。

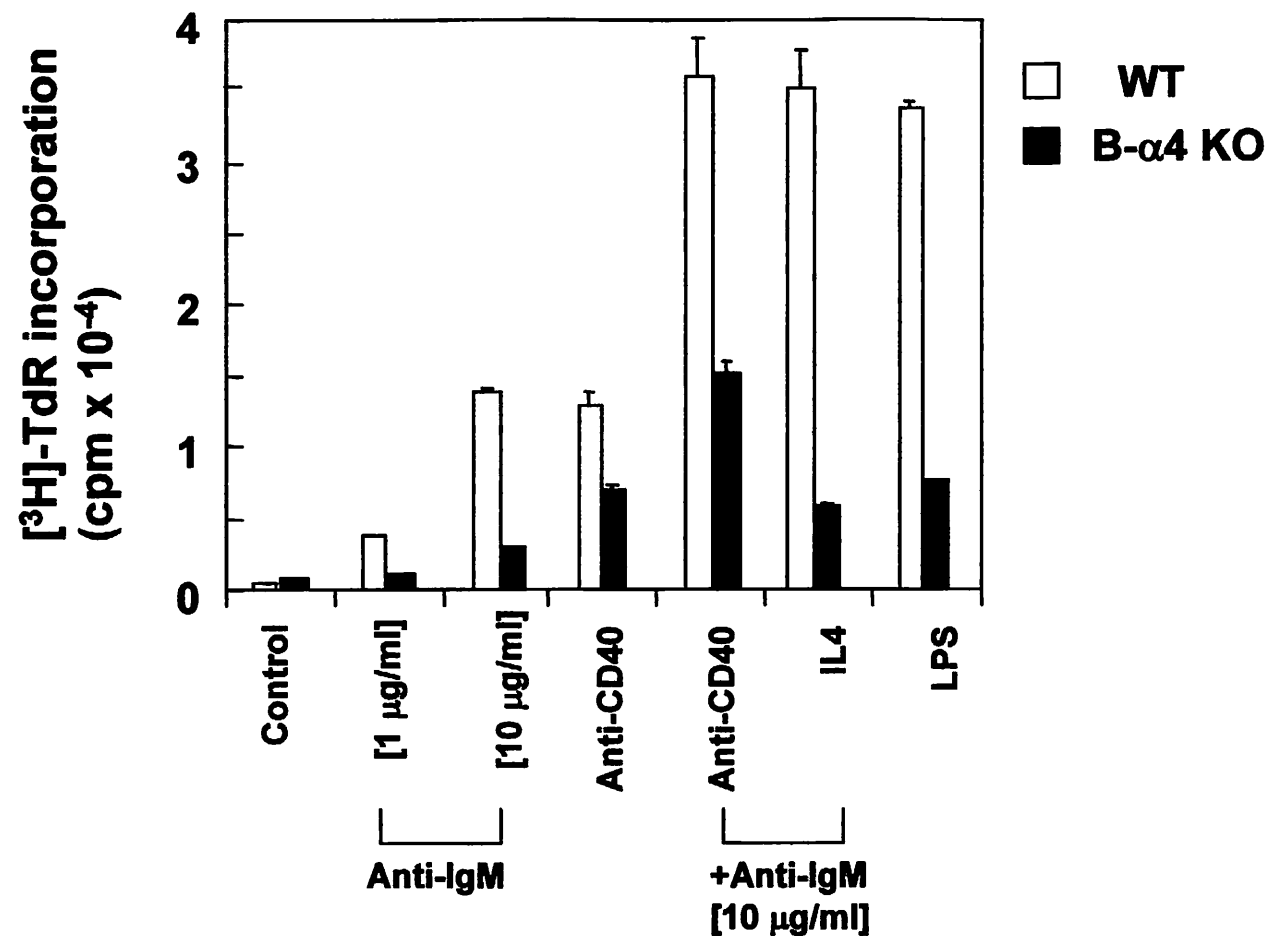


図 17 α4はB細胞の増殖に重要である

WTおよび B-α4 KOマウスの脾臓B細胞を抗Thy1抗体を結合させたDyna-beadsを用いてB細胞を純化し、抗IgM抗体 (1および10 μg/ml)、抗CD40抗体 (2 μg/ml)、抗IgM抗体 (10 μg/ml) +抗CD40抗体、抗IgM抗体 (10 μg/ml) +IL-4 (100 U/ml) およびLPS (10 μg/ml) を加えて48時間培養した。36時間の時点で [³H] サイミジンを加えて、12時間後に [³H] の取込みを計測した。

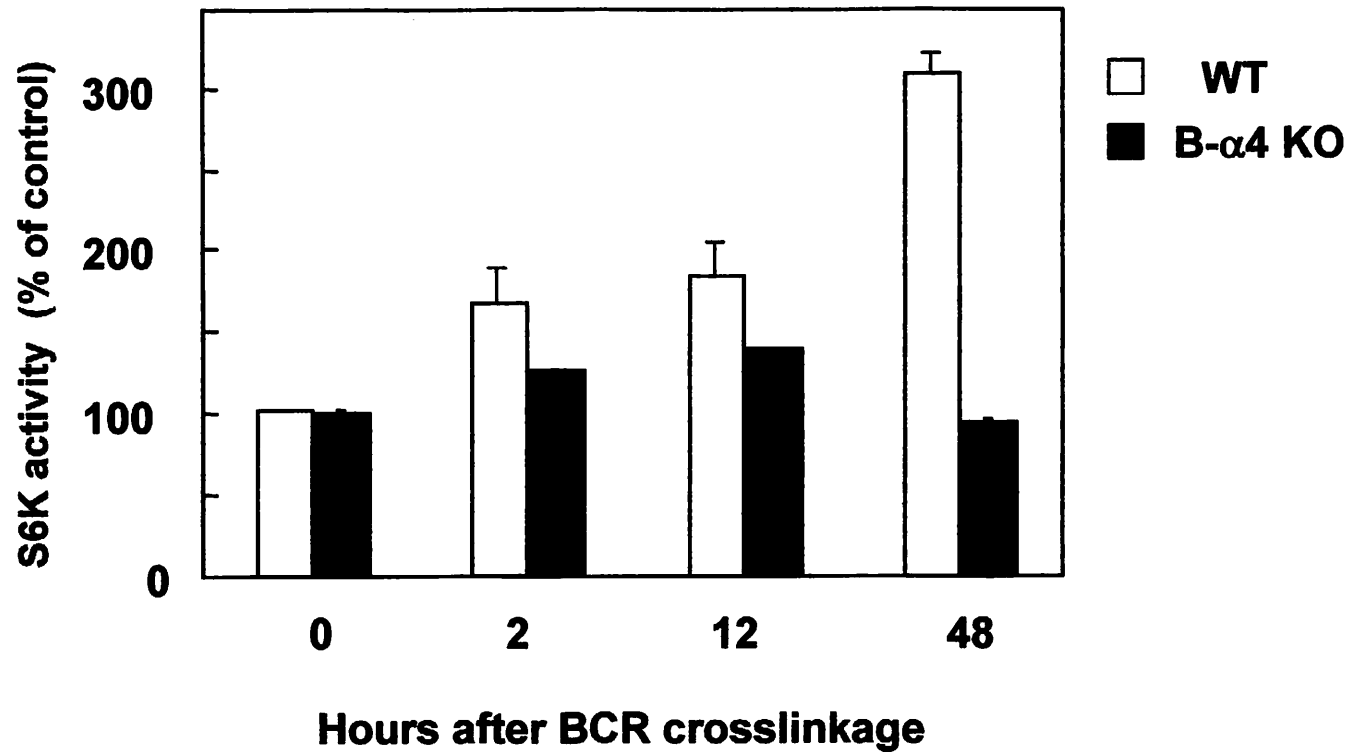


図 18 S6Kは $\alpha 4$ の下流シグナル伝達分子である

WTおよび B- $\alpha 4$ KOマウスの脾臓B細胞に抗IgM抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加え、0 - 48時間培養した。0、2、12、48時間の時点で細胞を回収し細胞抽出液を抗S6K抗体で免疫沈降した。沈降物のS6K活性を Kemptideを基質として計測した。値は0時間の未刺激でのS6K活性を100%としたパーセント表示である。

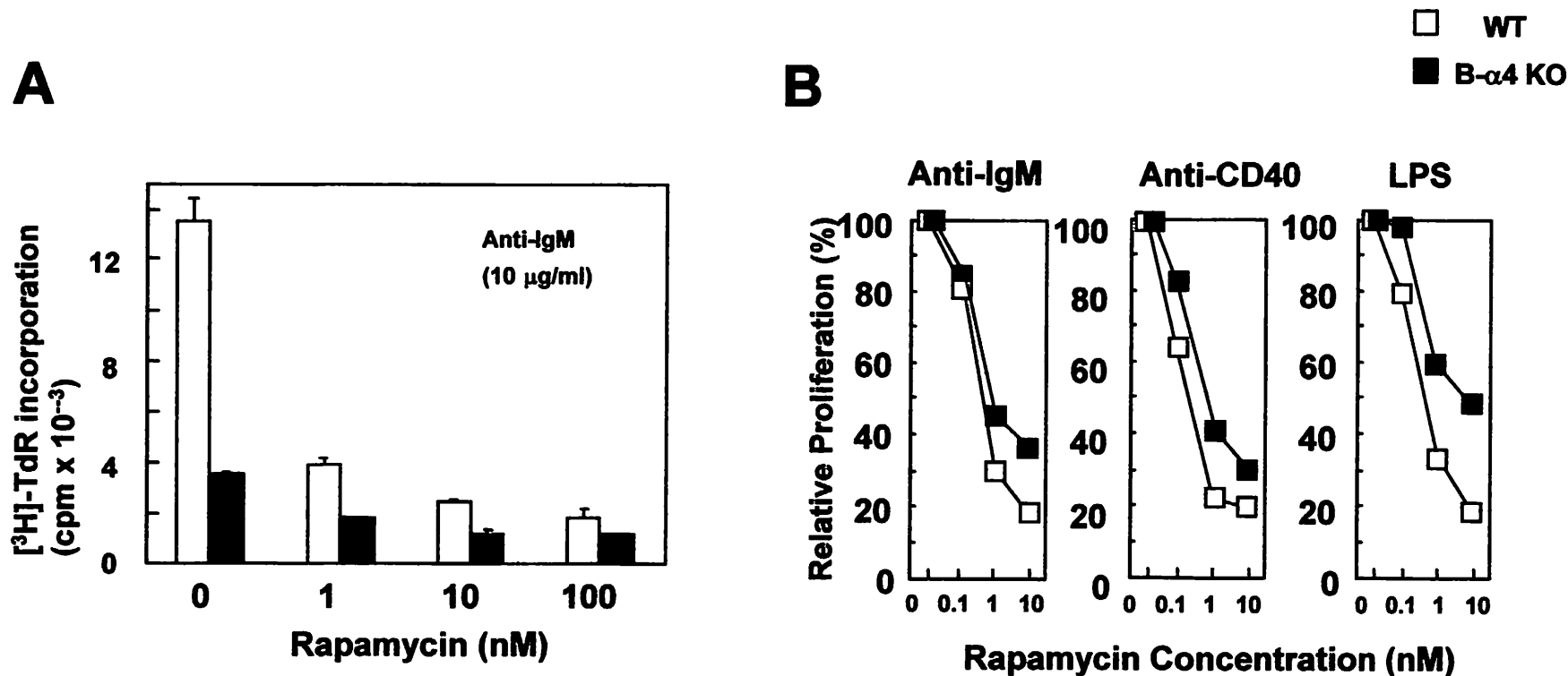


図 19 $\alpha 4$ はラパマイシン感受性シグナルに関与する

WTおよび B- $\alpha 4$ KOマウスの脾臓B細胞に抗IgM抗体 (10 $\mu\text{g/ml}$) およびラパマイシン (0 - 100 nM) を加えて、 $\alpha 4$ のラパマイシンによる増殖抑制に対する影響をみた。(B) は (A) の値をWT、B- $\alpha 4$ KOマウスそれぞれでラパマイシンを加えないときの[3H]の取込みを100%としたときのパーセント表示である。(B) ではさらに抗CD40抗体 (2 $\mu\text{g/ml}$)、LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 刺激に対するラパマイシン感受性をみた。

Specific immune response to T independent and T dependent antigen

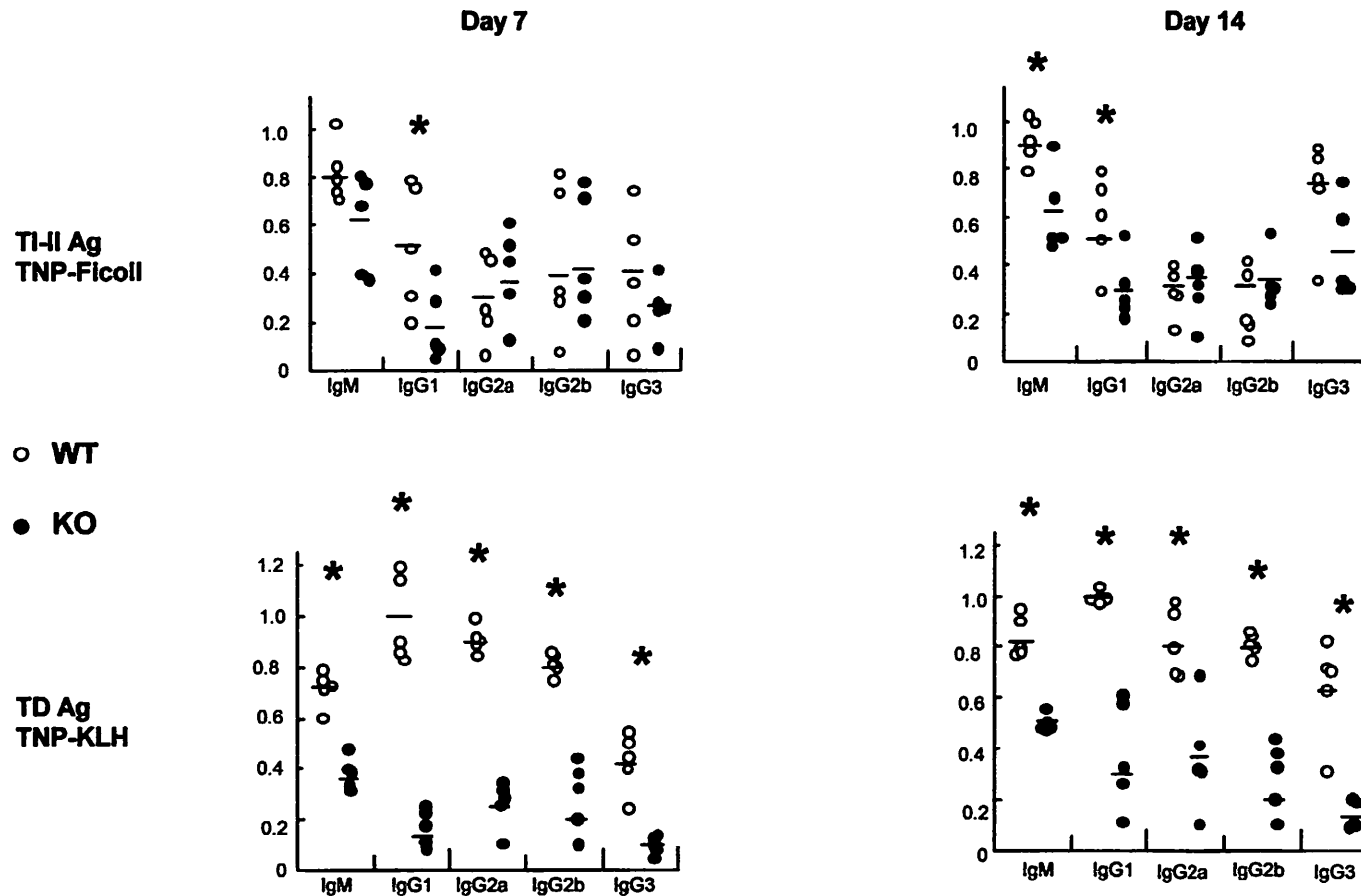
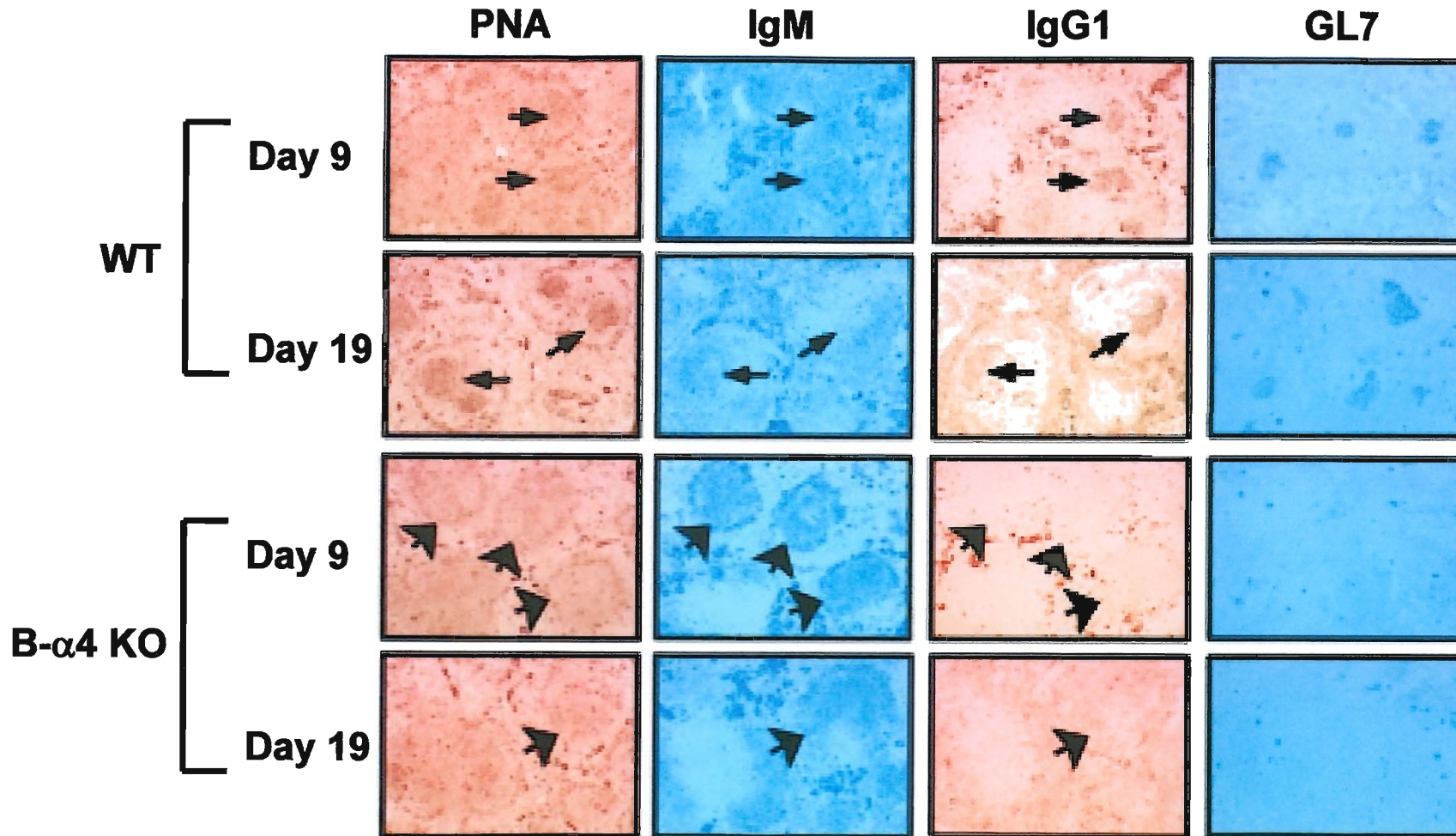


図 20 B- α 4 KOマウスの抗体産生能およびクラススイッチの障害

WTマウスおよびB- α 4 KOマウスをT非依存性抗原であるTNP-フィコールで免疫し、7日後および14日後の血清中のIgMおよびIgGサブクラス抗体価をELISAにて測定した（上段）。さらにT依存性抗原であるTNP-KLHで免疫し、同様に測定した（下段）。

*; $p < 0.05$

Germinal center formation is impaired in B- α 4 KO mouse



36

図 21 B- α 4 KOマウスの胚中心形成の障害

WTマウスおよびB- α 4 KOマウスをT依存性抗原であるNP-CGGで免疫し、9日後および19日後の脾臓凍結切片をPNA、抗IgM抗体、抗IgG1抗体および抗GL7抗体で免疫化学染色を行なった。

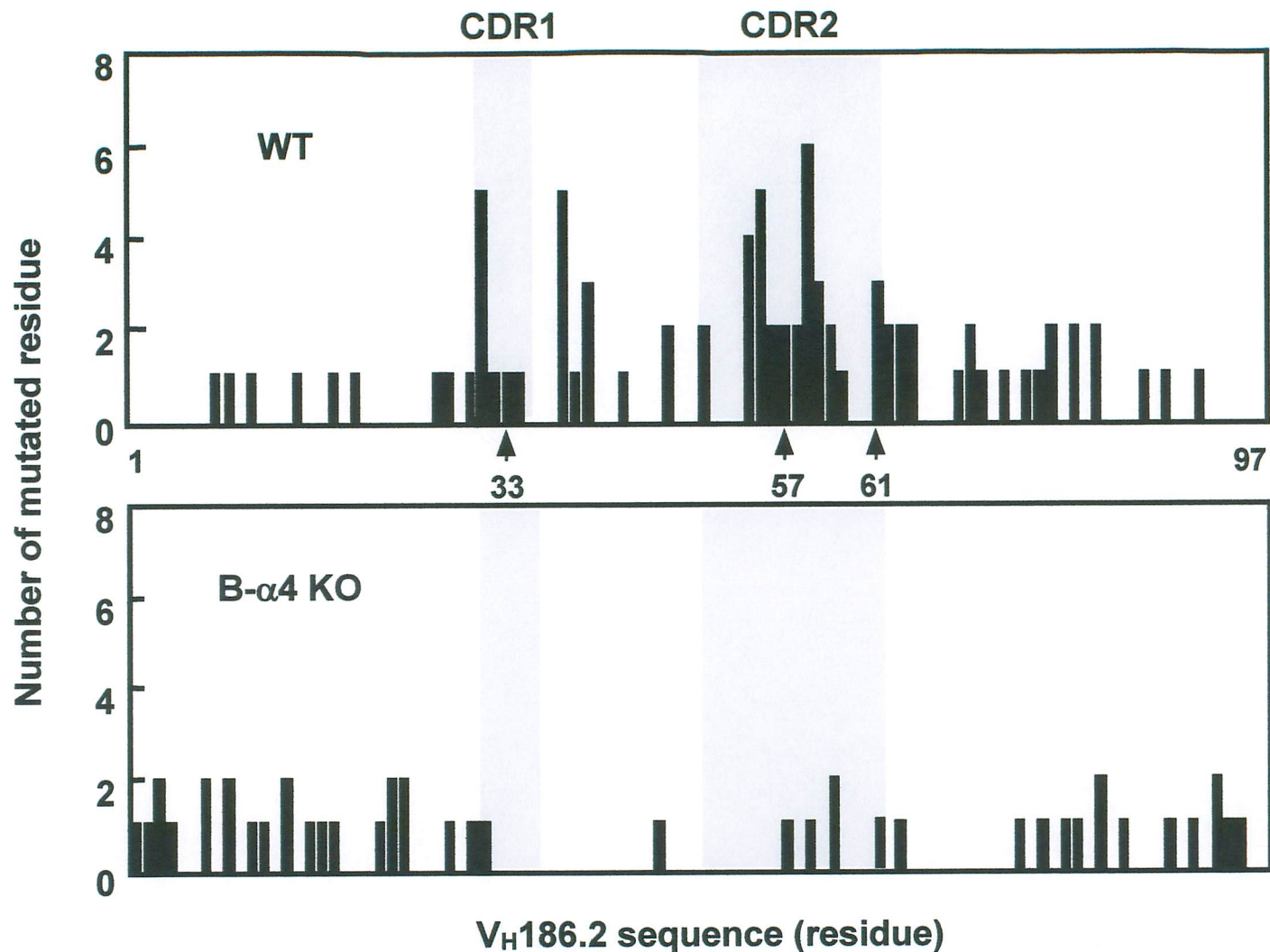


図 22 B- α 4 KOマウスのV領域体細胞突然変異の障害

WTマウスおよびB- α 4 KOマウスをNP-CGGで免疫し、28日後の脾臓からRNAを抽出した。ランダムプライマーを用いてRT-PCRを行ないcDNAを合成した。IgMクラスのV_H186.2転写部位をPCRにて増幅した。30クローンのPCR産物をシーケンスし、V領域体細胞突然変異数を算出した。

CDR= complementarity determining region (相補的決定領域/超可変領域)

G2 T細胞特異的 $\alpha 4$ ノックアウト (T- $\alpha 4$ KO) マウス

T- $\alpha 4$ KO マウスは雄の Lck-Cre マウス (T細胞特異的に発現する Lck のプロモーター下流に Cre recombinase cDNA を導入したトランスジェニック・マウス) と雌の $\alpha 4$ -floxed マウスを交配して作成した。T- $\alpha 4$ KO マウスは正常に成長し、主要な器官や組織の構築も正常であった。

T- $\alpha 4$ KO マウスの胸線細胞数はコントロールの 5%以下に減少し、組織構築が障害されていた (図 23)。また胸腺における T細胞の分化は CD4/CD8 ダブルネガティブ (DN) 3 ステージでほぼ止まっていた (図 24、25)。したがって $\alpha 4$ は初期の T細胞分化に重要であり、このため T- $\alpha 4$ KO マウスの胸腺は形成不全となったものと考えられた。さらに T- $\alpha 4$ KO マウスの胸線細胞は抗 CD3 抗体およびサイトカイン (IL-2、IL-1 および TNF) 刺激に対する増殖能が障害されていた。

脾臓T細胞は減少しており、抗CD3抗体+IL-2、抗CD3抗体+抗CD28抗体刺激に対する増殖能が障害されていた。また、抗CD3抗体刺激によるCD25 (IL-2レセプター α) の発現が障害されていた。したがって $\alpha 4$ はTCR複合体をなすCD3からのシグナル伝達に関与し、T細胞の増殖に重要であることが明らかとなった。

T- $\alpha 4$ KOマウスの解析により $\alpha 4$ は初期T細胞分化に必要な胸線細胞の増殖に重要であることがわかった (図25)。

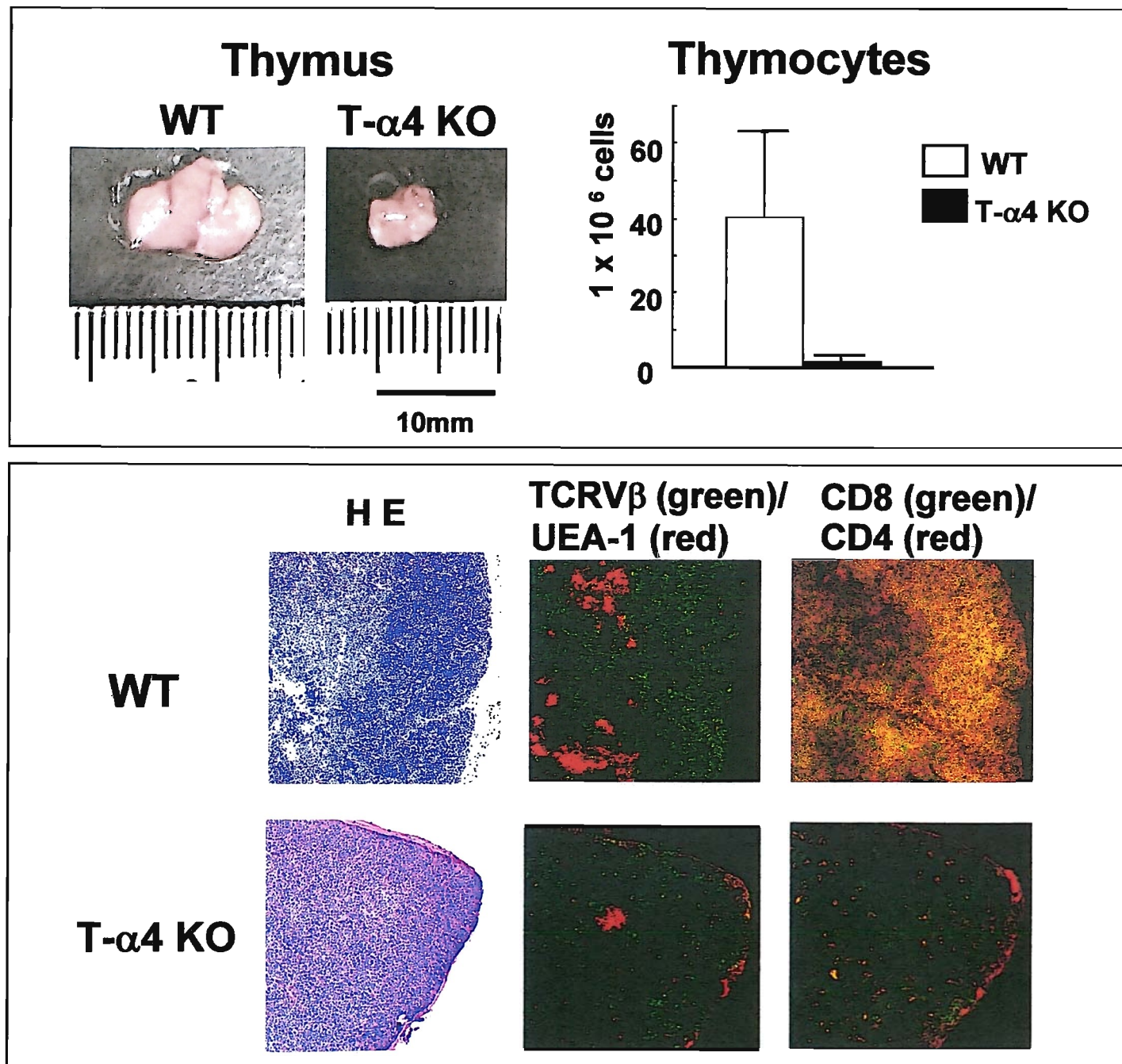


図 23 T- α 4 KOマウスの胸腺細胞数減少および組織構築の障害

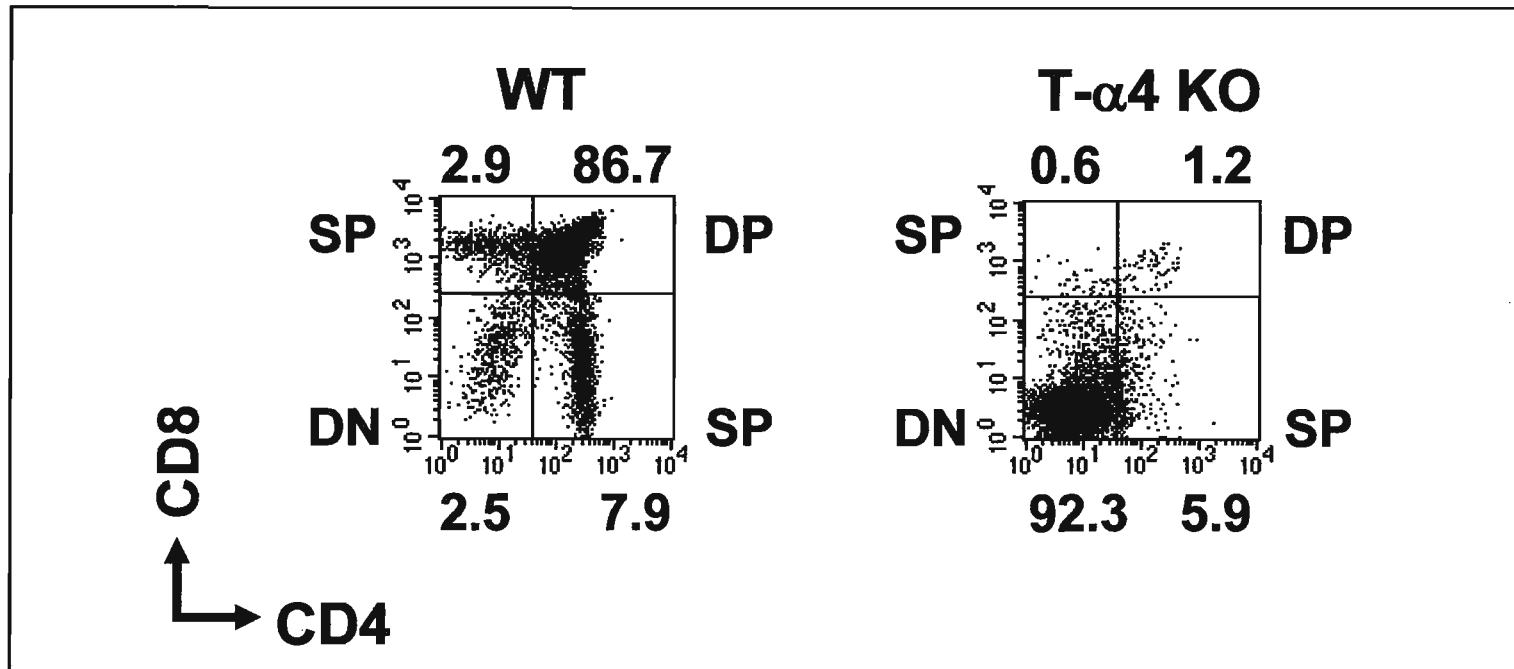
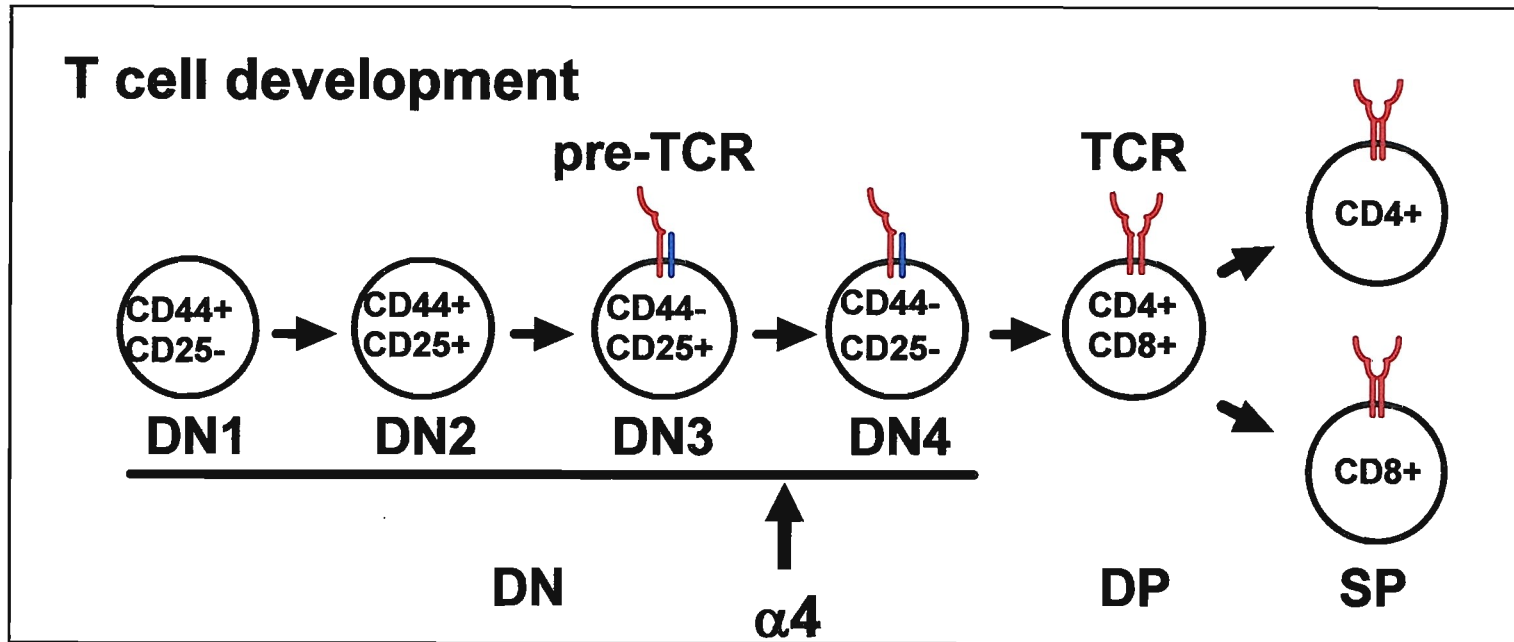


図 24 T-α4 KOマウスのT細胞分化障害1

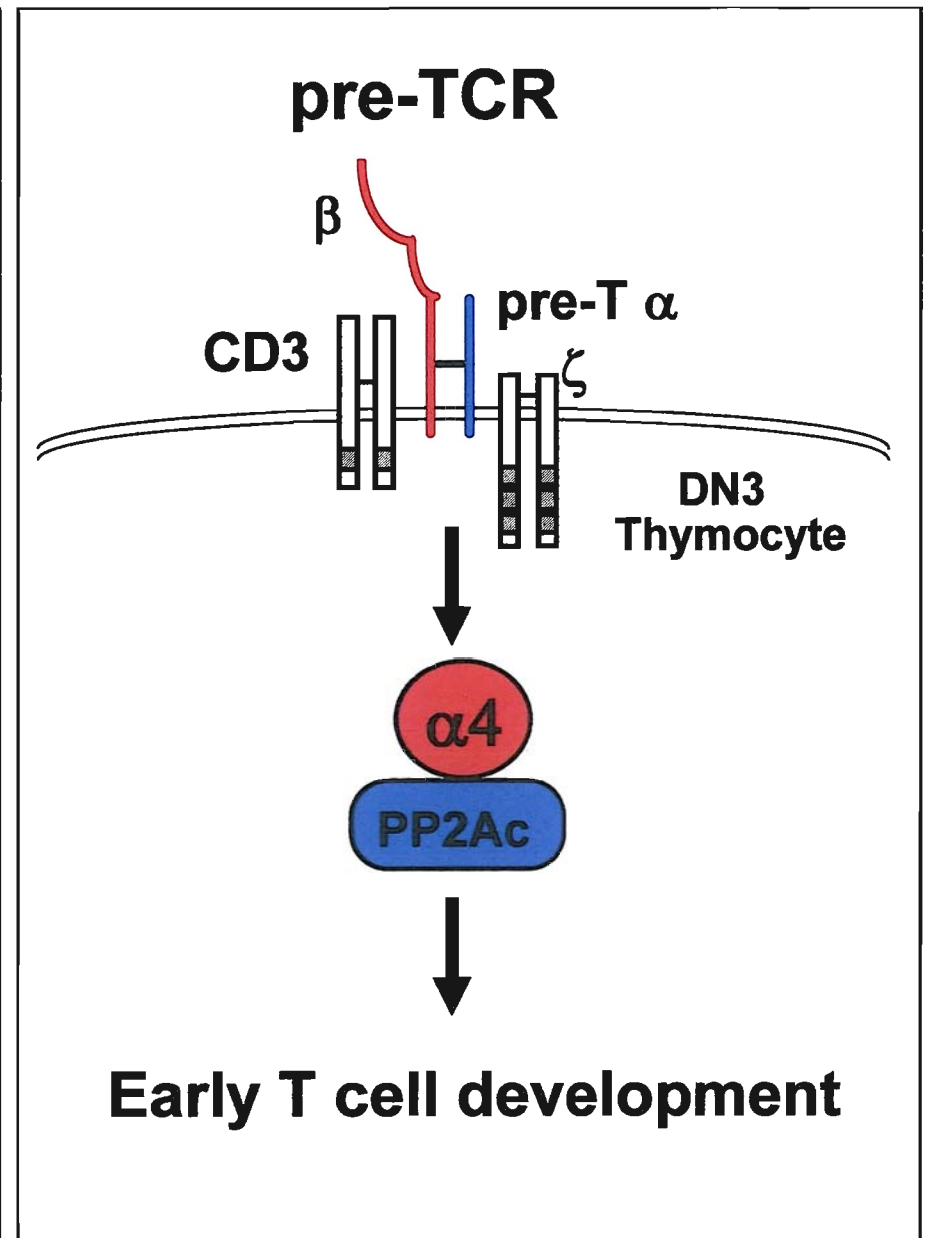
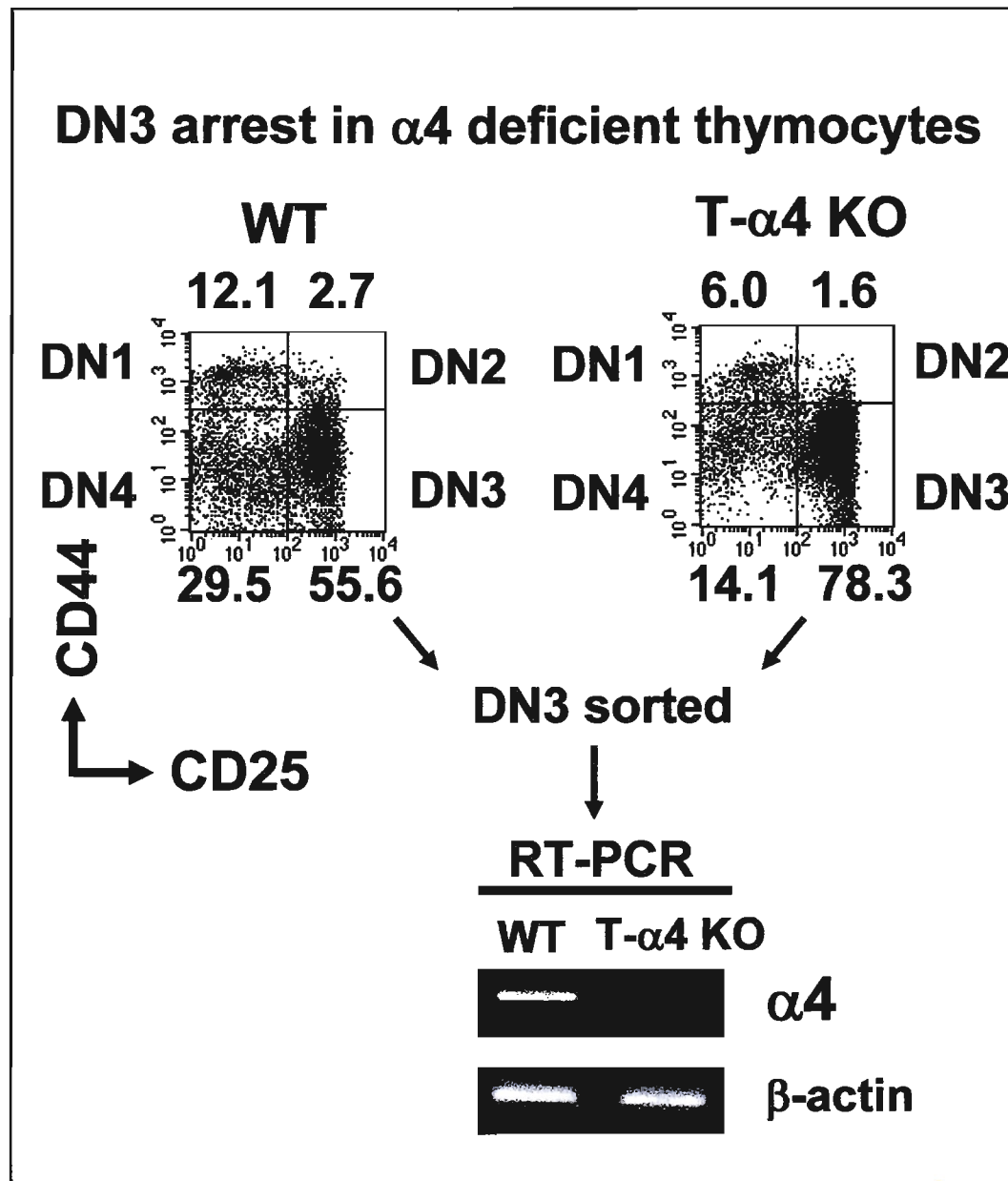


図 25 T- $\alpha 4$ KOマウスのT細胞分化障害2

H. 本研究の目的

$\alpha 4$ には脳および精巣に特異的に発現するファミリー分子である $\alpha 4\text{-b}$ が存在すること、PP2A は脳において強く発現していることより $\alpha 4$ は脳神経細胞において重要な機能を有していると考えた (図 26)。さらに $\alpha 4\text{-b}$ が存在する脳神経細胞において $\alpha 4$ をノックアウトすれば $\alpha 4$ の機能をより明確にし得ると予想された。そこで本研究において脳神経細胞特異的な $\alpha 4$ KO (N- $\alpha 4$ KO) マウスを作製し解析することにより $\alpha 4$ の脳神経細胞における機能を明らかとすることを目的とした。

$\alpha 4$ / $\alpha 4\text{-b}$ and PP2Ac expression

tissue	$\alpha 4$	$\alpha 4\text{-b}$	PP2Ac
brain	+	++	++
thymus	+		+
lung	+		+
heart	+		++
spleen	+		+
liver	+		+
kidney	+		+
testis	+	++	+
muscle	+		+
bone marrow	+		+

図 26 $\alpha 4$ 、 $\alpha 4\text{-b}$ および PP2Ac の発現部位

$\alpha 4$ が ubiquitous に発現するのに対し、 $\alpha 4\text{-b}$ は脳および精巣のみに発現する。また、PP2Ac は ubiquitous に発現するが脳と心臓で強く発現している。

VI. 実験方法

A. 実験動物

$\alpha 4$ -b-Cre マウス

Cre 遺伝子は pBS185 ベクター (Gibco/BRL, NY) より、制限酵素 *Xho* I - *Hind* III にて切り出した。 $\alpha 4$ -b の最小プロモーター領域 (ATG より -289) は *Bst* EII - *Xho* I 断片とした。これらの断片を pBSKS (-) ベクター (Statagene, La Jolla, CA) の *Apa* I - *Hind* III サイトに挿入した。ベクター領域は *Asp*718 - *Eco*RI で切り出して 2.4 kb の最終コンストラクトとした。C57BL/6 マウスの近交受精卵細胞の雄性前核へ最終コンストラクトをマイクロインジェクションすることによりキメラマウスを得、C57BL/6 マウスと交配させて $\alpha 4$ -b-Cre トランスジェニックマウス ($\alpha 4$ -b-Cre マウス) を得た。 $\alpha 4$ -b-Cre マウスは実験に用いるまでに C57BL/6 マウスと 3 回以上交配した。

$\alpha 4$ -flox マウス

$\alpha 4$ 遺伝子のエクソン 2 の下流に 2 つの loxP サイトで挟んだネオマイシン耐性遺伝子を導入してターゲティング・ベクターを作製した。エクソン 1 の上流にもう 1 つの loxP サイトを挿入した。このベクターを CBA マウス由来の胚性幹細胞にエレクトロポレーションし、G418 セレクションにて 500 以上のコロニーを得た。サザンブロッティングにより $\alpha 4$ 遺伝子を相同遺伝子組換えしていることをスクリーニングした。この胚性幹細胞クローンからキメラマウスを得、このマウスと C57BL/6 マウスを交配して $\alpha 4$ -flox マウスを得た。 $\alpha 4$ -flox マウスは C57BL/6 マウスと 12 回以上バッククロスした後に使用した。

N- $\alpha 4$ KO マウス

脳神経細胞特異的なノックアウトマウス (N- $\alpha 4$ KO マウス) は雌の $\alpha 4$ -flox マウスと雄の $\alpha 4$ -b-Cre マウスを交配することにより作製した。Cre-loxP システムでは *Cre* 遺伝子の存在下で loxP 配列の組換えが起こり 2 つの loxP 配列間で挟まれた遺伝子配列を欠損させる。 $\alpha 4$ 遺伝子は X 染色体に位置するため、flox および *Cre* 遺伝子を持った雄のマウスが $\alpha 4$ -b 存在下でのみ $\alpha 4$ を欠失することとなる。つまり雄の性染色体は XY であるから、雌の $\alpha 4$ -flox マウスからの flox+ の X 染色体かつ雄の $\alpha 4$ -b-Cre マウスからの Y 染色体を受け継いだ雄のマウス (Cre+) が N- $\alpha 4$ KO マウスである (図 28)。全てのマウスは熊本大学動物資源開発研究センター (CARD) のガイドラインに沿って取り扱い、CARD 内で飼育

した。

B. 細胞株と細胞培養

脳神経細胞株として Neuro2a を用いた。Neuro2a はマウスの神経芽細胞腫由来の細胞株であり、 $\alpha 4$ および $\alpha 4-b$ 遺伝子の発現が確認されている (Maeda et al., 1999)。Neuro2a は 熊本大学大学院医学薬学研究部生体医科学専攻分子・細胞医科学講座神経分化学 田中英明教授より御供与頂いた。

Neuro2a は 5%の CO₂、37 °C の環境下で 10% 熱不活化ウシ胎児血清 (Intergen, Purchase, NY)、2 mM L-グルタミン (Flow Laboratories, North Ryde, N.S.W. Australia)、100 µg/ml ストレプトマイシン、100 u/ml ペニシリン、5 x 10⁻⁵ M 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加えた Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地 (GIBCO BRL) で培養した。

C. 抗体と試薬

抗ヒト、および抗マウス $\alpha 4$ 抗体はそれぞれ GST-h $\alpha 4$ 、GST-m $\alpha 4$ 融合タンパクを作製してウサギに免疫し、その血清を用いた。抗 PP2Ac 抗体は Upstate Biotechnology 社より、抗 Cre 抗体は BABCO 社より、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体およびストレプトアビジン-HRP は Vector 社より、tyramide signal amplification fluorescein system は PerkinElmer 社より、抗 CaMKII 抗体 (H-300) は Santa Cruz 社より、抗 FLAG 抗体 (M2) および抗 HA 抗体 (Y-11) は Stratagene 社より購入した。抗リン酸化 CaMKII 抗体は福永浩司先生 (東北大学大学院・薬学研究科教授) より御供与頂いた。ヒト $\alpha 4$ (Inui et al., 1998)、マウス CaMKII α (Hanley et al., 1989) cDNA はそれぞれ、公表されたシーケンスに基づいて RT-PCR にて作製した。プライマーはヒト $\alpha 4$ が 5'-GGATCCAGATGGCTGCTGAGGACGAG-3' および 5'-GGATCCC GCCCATGTTCTGTCGGTTCC-3'、マウス CaMKII α が 5'-GGGGATCCATGGCTACCATCACCTGCAC-3' および 5'-GGGAATTCTCAATGCGGCAGGACGGAGG-3' を用いた。GST- $\alpha 4$ 、GST-PP2Ac cDNA はそれぞれのコーディング領域を PCR で回収し、pBS ベクター (Stratagene) の MCS の BamHI サイトにサブクローニングし、BamHI で切り出して GST 遺伝子を持つ pGEX-3X (Pharmacia Biotech AB 社) の BamHI サイトに挿入して作製した。

D. 免疫沈降

1% TNE 溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.05% NaN₃, 100 μM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 10 μg/ml aprotinin] に Neuro2A 細胞およびマウス脳細胞を氷上で 15 分間インキュベーション後、14,000 回転/分、20 分間の遠心で可溶分画を回収した。調整した細胞抽出液 (1 x 10⁷ cells 相当) に 1μl の沈降抗体を加え、4°C で 2 時間反応させた。それぞれの沈降抗体に合わせて、プロテイン G またはプロテイン A-セファロースビーズ (Pharmacia 社)を加えて免疫複合体を沈降した。1% TNE 溶液で 4 回洗浄し 30 μl の 2 x SDS サンプルバッファー[0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 20% グリセロール, 0.002% BPB 溶液, 10% 2-ME] に溶解し 5 分間煮沸して免疫複合体を抽出した。抽出した試料は SDS-PAGE (SDS 変性 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で泳動後、ウエスタンブロットティングで検出した。

E. GST プルダウンアッセイ

各 10 μg の GST 融合タンパクを 5 x 10⁷ 個の C57BL/6 マウスの脳細胞抽出液と混合し 4 °Cで一晩反応させた。30 μl のグルタチオンセファロースビーズ (Pharmacia 社) を加え、GST 融合タンパクを沈降した。1% TNE 溶液で 4 回洗浄し 10 μl の 2 x SDS サンプルバッファーに溶解し 5 分間煮沸して GST 融合タンパクを抽出した。抽出した試料は SDS-PAGE で泳動後、ウエスタンブロットティングで検出した。

F. ウエスタンブロットティング

上述の如く調整した試料を SDS-PAGE にて泳動した。SDS-PAGE によって分離されたタンパク質を電気ブロットティング装置を用いてニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell 社) にプロットした。ブロットティングはトランスファー溶液 [0.025 M Tris, 0.2 M Glycine, 10% メタノール] 中で 100 V、4 °C で 60 分間行った。トランスファー後の膜をブロッキング溶液 [5% スキムミルク, PBS-0.1% Tween20] 中で 1 時間インキュベートした後、一次抗体を加えて 1 時間インキュベートした。PBS-0.1% Tween20 で 15 分 1 回、5 分 2 回洗浄後、二次抗体中で 1 時間インキュベートした。15 分 1 回、5 分 4 回洗浄後、ECL ウエスタンブロットティングキット (Amersham 社) を用いてシグナルを X 線フィルムに露光して検出した。

G. 組織染色および免疫組織染色

マウスの脳は4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し摘出した。その後30%スクロース/PBSで置換した (Higo et al., 1996)。

ニッスル染色

脳をマイクロトームにて冠状方向に50 μm の厚さでスライスし切片を作製した。クレシルバイオレット (Sigma 社) で染色し、光学顕微鏡で観察した。

免疫組織染色

脳をティシューテック O. C. T. コンパウンド (Miles 社) に包埋、凍結しクリオスタットで20 μm の厚さの凍結切片を作製した。凍結切片は室温にて解凍後、4%パラホルムアルデヒドで20分間固定した。5% BSAにて37 $^{\circ}\text{C}$ で30分間ブロックした後、抗 Cre 抗体または抗 CaMKII 抗体にて37 $^{\circ}\text{C}$ 、60分間インキュベートした。次にビオチン化抗ウサギ IgG 抗体にて37 $^{\circ}\text{C}$ 、60分間インキュベートした。最後に FITC- tyramide にて37 $^{\circ}\text{C}$ 、5分間インキュベートした後、コンフォーカル・レーザー・スキャン顕微鏡 (FV300, オリンパス社) にて観察した。

H. オープンフィールドテスト

運動能力および情動性をみるためにオープンフィールドテストを用いた。装置は30 cm四方の亚克力箱からなる。箱のX,Y軸の床から2 cmの高さに、10 cmおきに赤外線ビームを通し、それぞれの軸の2つのビームについてフリップフロップ (flip-flop) 回路を構成することにより、動物の移動量 (locomotion) を測定した。20分のセッションのうち、前半の10分間は点灯して明期とし、後半の10分間は照明を消して暗期とした。

I. モリス水迷路テスト

海馬依存性の空間学習記憶を検討するためにモリス水迷路テストを施行した (Yukawa et al., 2000)。テスト装置は内側を黒くペイントした直径90 cm、深さ60 cmの円形のプールより成り、中に入れる水も墨で黒くしておいた。プールは直方体形の部屋に置かれ、プールの周囲には様々な視覚的な目印を設置した。マウスがプールを泳ぐ様子はプールの上部に設置した小さいTVカメラで撮影した。プールを4区画に分け、そのうちの1区画に

直径 9 cm の足場を置き、足場のないある 1 区画からマウスを放して足場に到達するまでの様子を撮影し、かかった時間を測定する。まず可視テストを行なった。これは足場を水面上 1 cm に位置しマウスに足場が見えている状態で行なうもので 1 日に 5 回行なった。次に空間学習記憶テストを行なった。これは足場を水面下 1 cm に位置してマウスには足場が見えない状態で行なうもので、マウスはテストを繰り返すうちにプール周囲の様々な目印を空間的に捉えて見えない足場の位置を学習していく。このテストはトレーニングとして 1 日に 5 回を 3 日間行ない、最後に空間記憶の獲得を確認するプローブテストを行なった。プローブテストとは足場を取り去り、足場があったはずの区画にマウスが 60 秒間中何秒間留まっているかを計測するものである。

J. シャトルボックス回避学習テスト

20 x 10 x 20 cm の 2 ウェイ-シャトルボックスを使用した (Sasaki et al., 1999)。1 cm の高さの区切りにより左右の 2 区画に分かれ、一方から他方への移動を反応とする。実験は 1 日に 50 試行の逃避/回避訓練を平均 30 秒の試行間隔で行った。試行では CS (conditioned stimulus) としてブザー音信号 (1500 Hz、85 dB) が与えられ、10 秒後に US (unconditioned stimulus) として電気ショック (160 V、0.5 mA) が始まる。動物が隣室に逃げると両方の刺激は停止する (逃避反応)。もし、CS 開始から 10 秒以内に隣室に移動すれば、その時点で CS は停止し、US は与えられない (回避反応)。この反応時間はコンピューター・ソフト (Sample Cat : CASE 社) により記録された。

K. CaMKII アッセイ

海馬の細胞抽出液における CaMKII のリン酸化活性を CaM Kinase II assay kit (Upstate 社) を用いて測定した。方法はキットのプロトコールに従った。100 μ M の autocalcitol 2 (KKALRRQETVDAL) を基質として、4 M MOPS (pH 7.2)、5 mM β -グリセロホスフェート、0.2 mM DTT、50 μ M ATP、8 μ g/ml カルモジュリン、PKA および PKC 阻害剤中でリン酸化させた。Ca²⁺非依存性および依存性のリン酸化活性を測定するために 1 mM EGTA または 0.2 mM CaCl₂ を加えて測定した。15 mM Mg²⁺ および 1 μ Ci/ μ l [γ -³²P]-ATP (3,000 Ci/mmol) を加えた後にアッセイを開始した。10 分間のインキュベート後に 25 μ l の試料を P81 紙にスポットしその放射性活性を測定した。基質のリン酸化は放射性活性に基づいて計算し

た。

L. PP2A アッセイ

0.05% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 75 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 M Leupeptin, 75 μ M pepstatin A および 0.1 mg/ml aprotinin からなるバッファーにてマウス海馬を超音波破碎機によりホモジェネートした。15,000 x g で 5 分間遠心分離した後、不溶成分を除いた。オカダ酸 (PP1 および PP2A 阻害剤) に感受性のあるホスファターゼ活性を 32 P-カゼインを基質として測定した。ホスファターゼ・アッセイは、HEPES (50 mM, pH 7.5), DTT (1 mM), EDTA (3 mM), BSA (1 mg/ml), inhibitor 2 (PP1 阻害剤、200 nM), 32 P-カゼイン (4 μ g) および土オカダ酸 (3 nM) のバッファー 25 μ l で行なった。アッセイの反応は海馬細胞抽出液 2.5 μ l を加えて開始した。30°C、10 分間インキュベートした後、25 μ l のトリクロロ酢酸および 50 μ l の BSA (6 mg/ml) を加えて反応を終了した。ボルテックスによる混和後、遠心分離した上清 (80 μ l) のインキュベート中に放出した 32 P 活性を測定した。オカダ酸感受性 PP2A 活性はオカダ酸を加えない時の値からオカダ酸を加えた時の値を減じて算定した。

M. 統計学的分析

マウスの行動実験には ANOVA および post hoc test (Scheffes's test) を用いて統計学的分析を行なった。CaMKII および PP2A アッセイには student's *t* test を用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

VII. 実験結果

A. N- α 4 KO マウスの作製

N- α 4 KO マウスは雌の α 4-flox マウスと雄の α 4-b-Cre マウスを交配することにより作製した (図 27)。Cre-loxP システムでは Cre 遺伝子の存在下で loxP 配列の組換えが起こり 2 つの loxP 配列間で挟まれた遺伝子配列を欠損させる。 α 4 遺伝子は X 染色体に位置するため、flox および Cre 遺伝子を持った雄のマウスが α 4-b 存在下でのみ α 4 を欠失することとなる。つまり雄の性染色体は XY であるから、雌の α 4-flox マウスからの flox+ の X 染色体と雄の α 4-b-Cre マウスからの Y 染色体を受け継いだ雄のマウス (Cre+) が N- α 4 KO マウスである (図 28)。

B. α 4-b-Cre マウスにおける Cre タンパクの局在

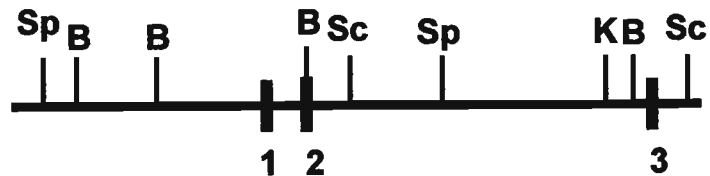
α 4-b-Cre マウスにおける Cre タンパクの発現を脳の凍結切片を作製し、免疫組織化学染色により確認した (図 29)。Cre タンパクは大腦、間脳および小脳でも発現していたが、海馬の脳神経細胞で特に強く発現していた。コントロールには脳神経細胞における重要なシグナル伝達分子である CaMKII を用いた。海馬における Cre タンパクの分布は CaMKII と類似していた。

C. N- α 4 KO マウスの脳における α 4 タンパクの消失

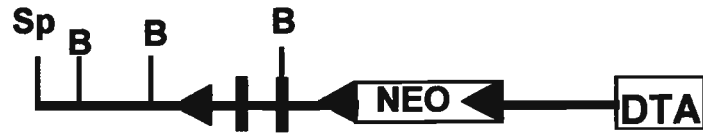
N- α 4 KO マウスの脳において α 4 タンパクが消失していることを確かめるために N- α 4 KO マウスの脳を大腦、間脳、小脳および海馬に分けてそれぞれに細胞可溶化液を作製し抗 α 4 抗体でウェスタンブロッティングを行なった。海馬についてはさらに CA1、CA3 および DG にわけて解析した。大腦、間脳、小脳および海馬の各組織で α 4 は検出されなかった (図 30A, B)。

$\alpha 4$ flox mouse

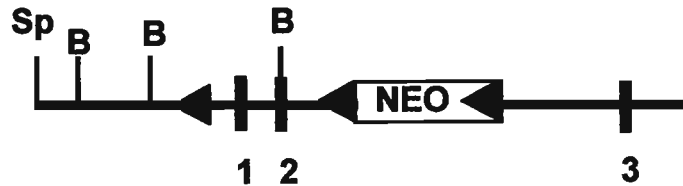
Wild-type locus



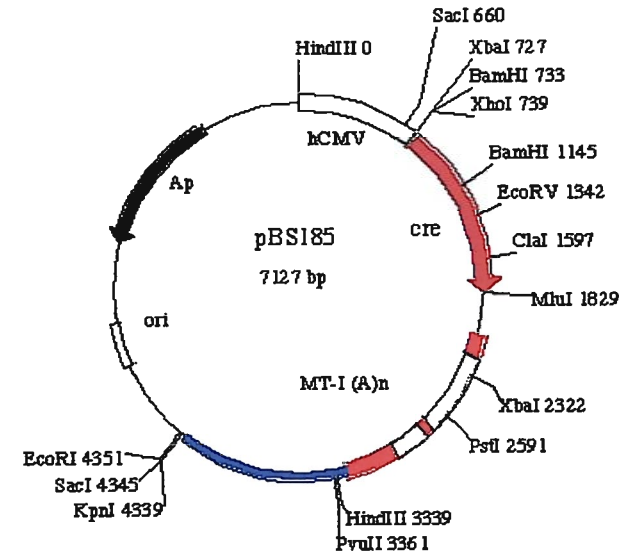
Targeting vector



Targeted locus



$\alpha 4$ -b-Cre mouse



$\alpha 4$ -b minimal promoter

Cre

MT-I poly A

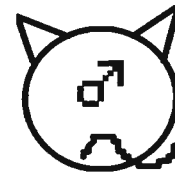
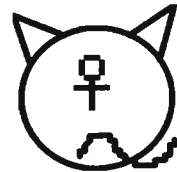
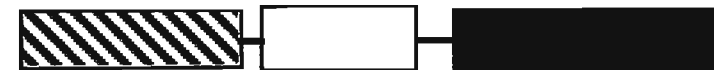


図 27 N- $\alpha 4$ KOマウスの作製1

$\alpha 4$ flox ♀マウスと $\alpha 4$ -b-Cre♂マウスを交配しN- $\alpha 4$ KOマウスを作製した。

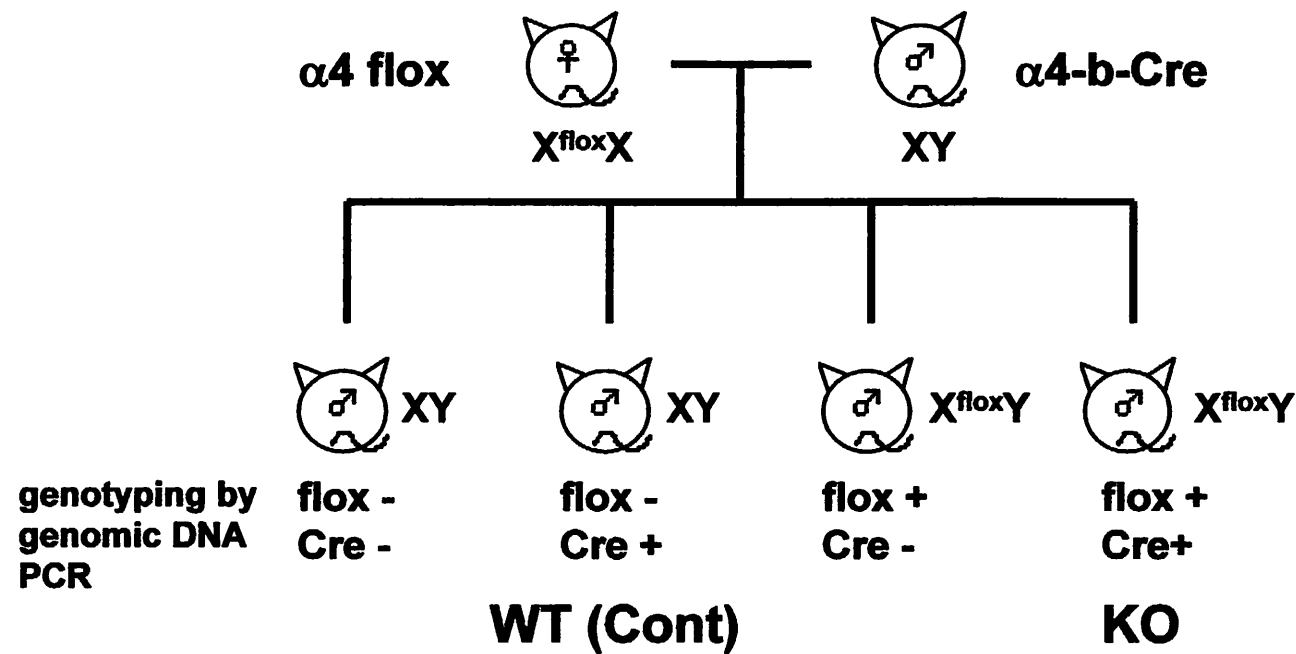


図 28 N- $\alpha 4$ KOマウスの作製 2

$\alpha 4$ flox ♀マウスと $\alpha 4$ -b-Cre♂マウスを交配し N- $\alpha 4$ KO マウスを作製した。仔マウスの尾よりゲノムDNAを抽出し、flox, Creにそれぞれ特異的なプライマーでPCRを行ない遺伝子型をスクリーニングした。 $\alpha 4$ はX染色体上に存在するため、flox + / Cre + ♂マウスがN- $\alpha 4$ KO マウスとなる。flox - / Cre + ♂マウスをコントロールマウスとした。

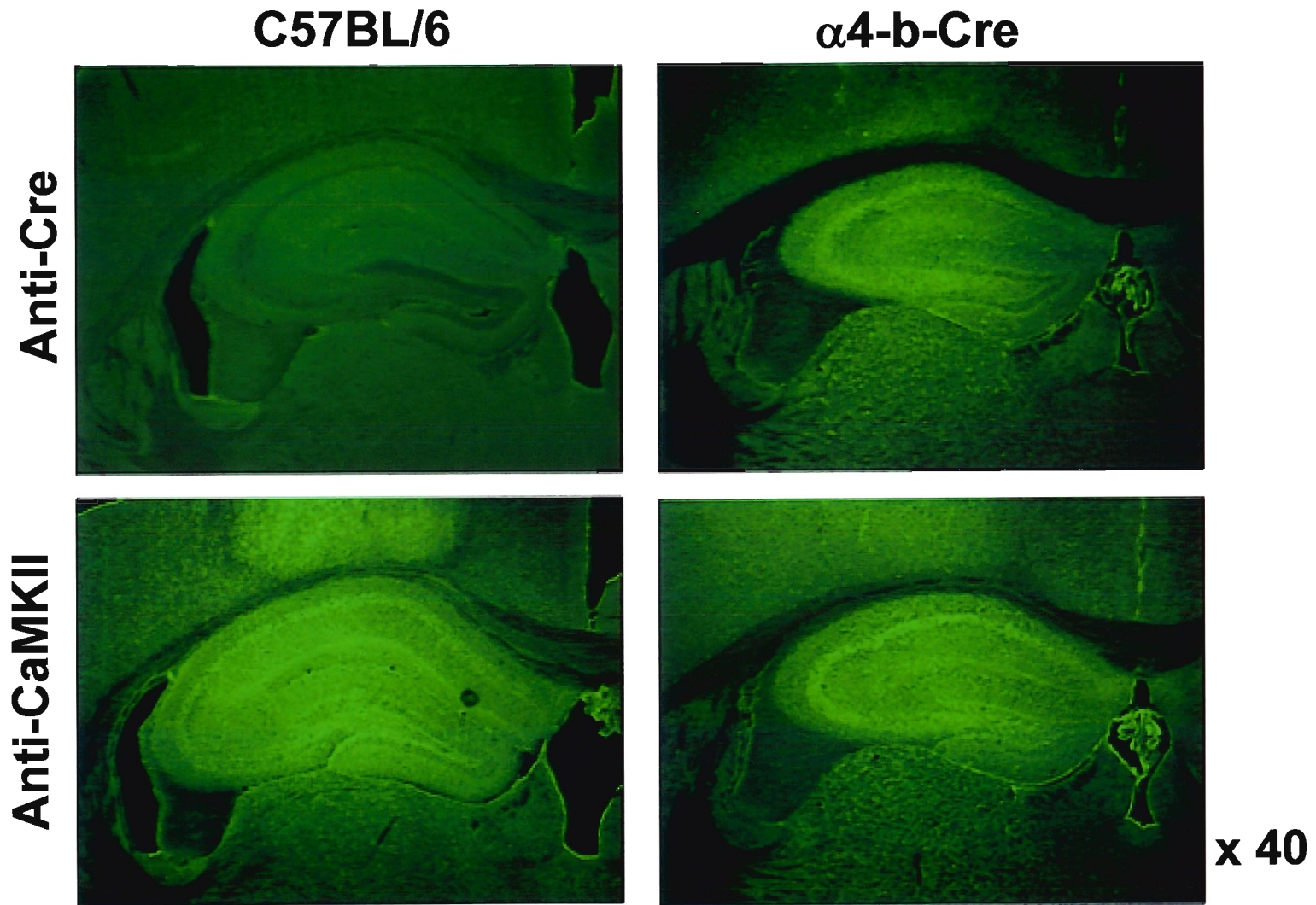


図 29 $\alpha 4$ -b-CreマウスにおけるCreタンパクの発現

$\alpha 4$ -b-Creマウスの脳の凍結切片を作製し、抗Cre抗体にて免疫組織化学染色を行なった。Creタンパクは海馬の脳神経細胞（錐体細胞）で強く発現していた。コントロールには脳神経細胞における重要なシグナル伝達分子であるCaMKIIを用いた。

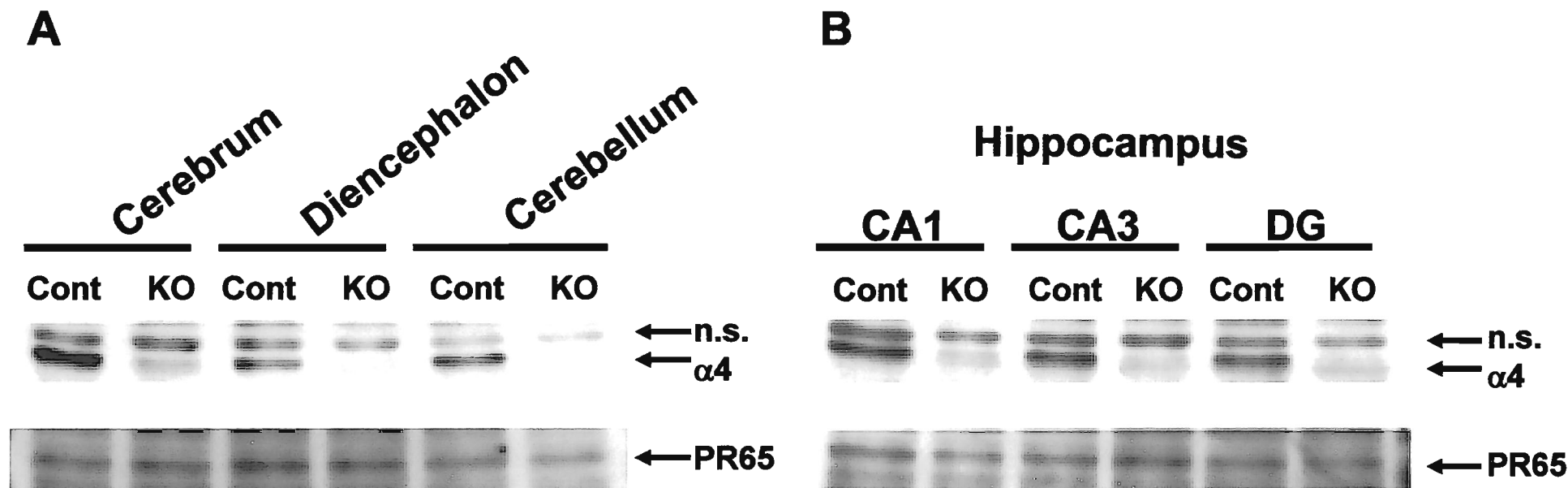


図 30 N- α 4 KOマウスにおける α 4タンパクの消失

(A) コントロール (α 4-b-Cre) マウスおよびN- α 4 KOマウスの脳を大脳、間脳、小脳および海馬に分けてそれぞれに細胞可溶化液を作製し抗 α 4抗体でウェスタンブロッティングを行なった。

(B) 海馬についてはさらにCA1、CA3およびDGにわけて解析した。コントロールには抗PP2A Aサブユニット (PR65) 抗体を用いた。n.s. = non-specific band

D. N- α 4 KO マウスの脳における細胞構築

N- α 4 KO マウスの脳の大きさと質量はコントロールと同等であった。脳組織の形態や脳神経細胞の構築に変化があるかどうかを解析するために、脳切片のニッスル染色を行なった。大脳、線条体、海馬および小脳において組織の形態、細胞構築に異常は認めなかった(図 31)。

B- α 4 KO マウスや T- α 4 KO マウスでは細胞数の減少や組織構築の障害を認めた。本研究の目的は α 4 の脳神経細胞における機能を明らかにすることであるが、 α 4 の消失により脳神経細胞数が減少したり脳組織構築の障害があれば、 α 4 のシグナル分子としての機能がマスクされてしまう危険性がある。そこで α 4-b-Cre マウスを用いることにより、 α 4 は α 4-b の存在する組織でのみ消失するため α 4-b は存在しており、脳神経細胞や脳組織の発達の障害を避けることが可能であった。したがって、N- α 4 KO マウスは *in vivo* での脳神経細胞における α 4 の機能を明らかとするのに、非常に適した実験系であると考えられた。

E. N- α 4 KO マウスの行動解析

N- α 4 KO マウスは体重(図 32)、摂食行動および生殖能力に異常を認めなかった。さらに KO マウス (n=9) の運動能力と情動性をみるためにオープンフィールドテストを行なった(図 33)。KO マウスの運動能力および情動性はコントロール [C57BL/6 マウス (n=10) および α 4-b-Cre マウス (n=9)] と同等であった。なお、以下のすべての実験において C57BL/6 マウスおよび α 4-b-Cre マウスは有意差を認めなかったため、コントロールマウスとして α 4-b-Cre マウスのみを表記する。

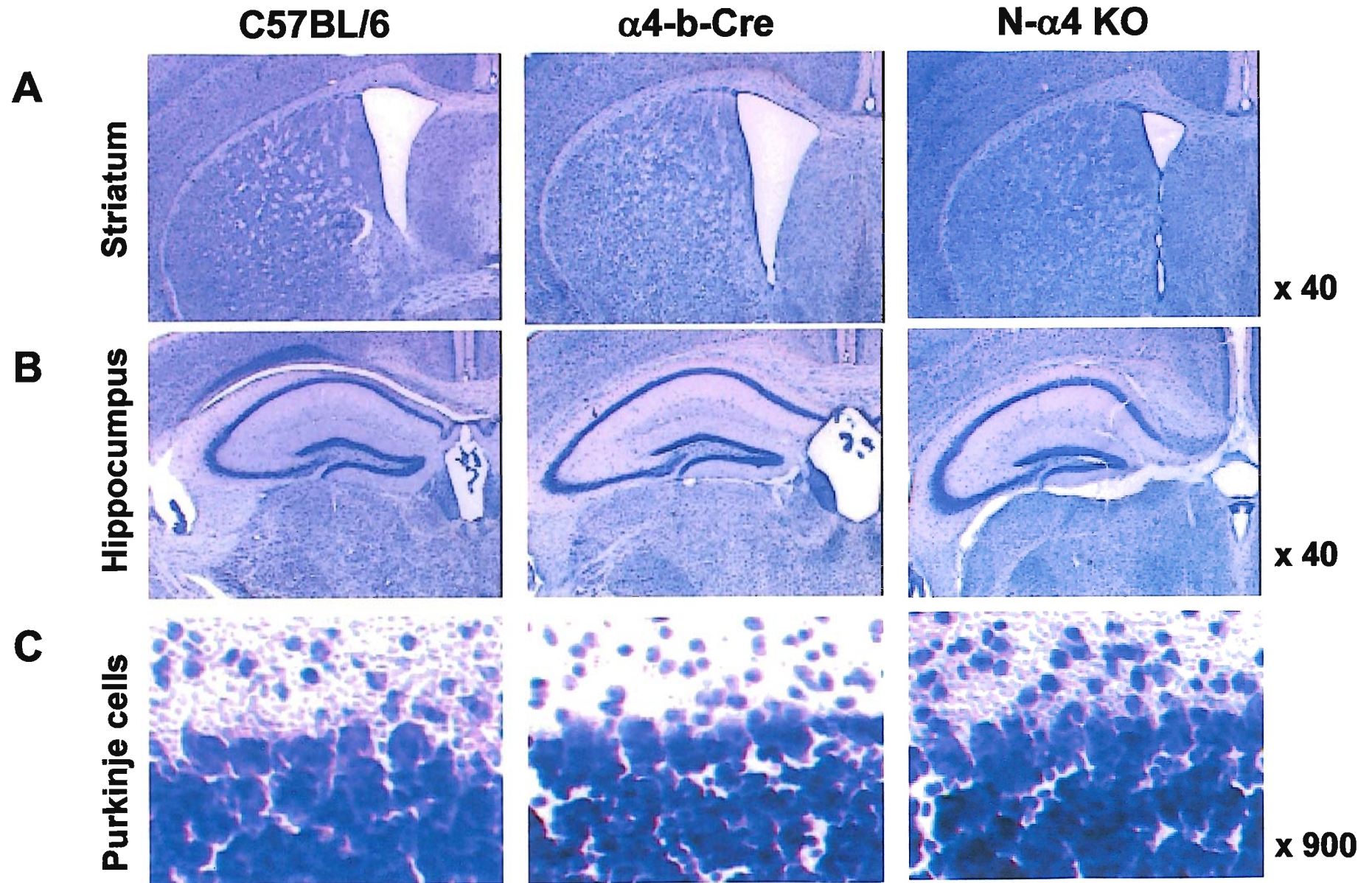


図 31 N- $\alpha 4$ KOマウスの脳における細胞構築

C57BL/6マウス、 $\alpha 4$ -b-CreマウスおよびN- $\alpha 4$ KOマウスの脳切片のニッスル染色を行なった。光学顕微鏡にて観察し、脳神経細胞数、細胞構築および脳組織の形態を解析した。

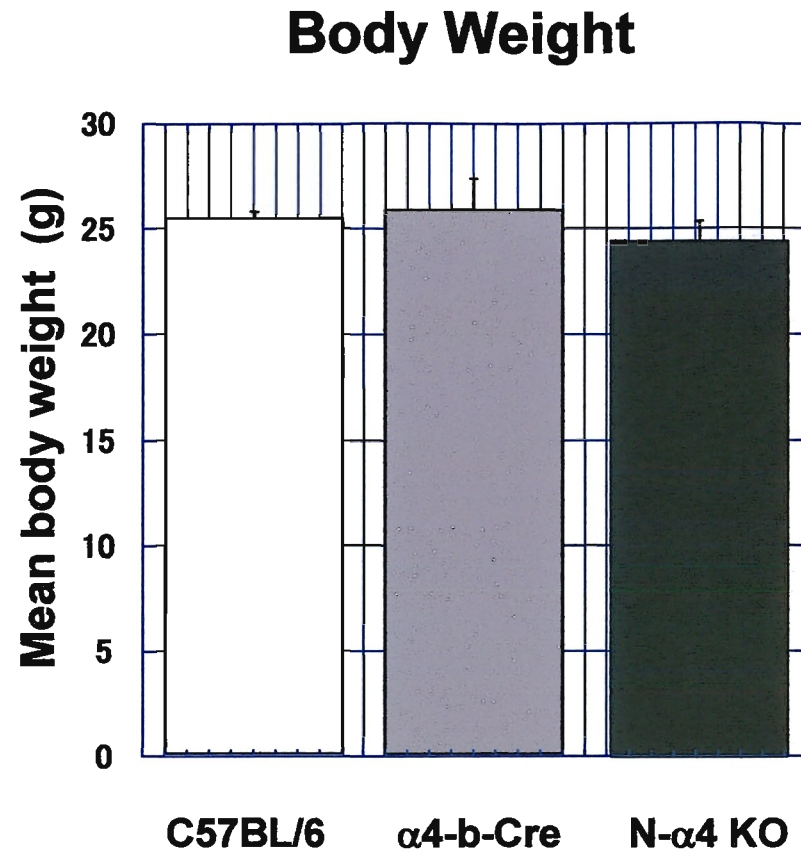


図 32 N- $\alpha 4$ KOマウスの体重

C57BL/6マウス (n = 10)、 $\alpha 4$ -b-Creマウス (n = 9) およびN- $\alpha 4$ KOマウス (n = 9) の体重を測定した。生後8~12週のマウスを使用した。

open field locomotion

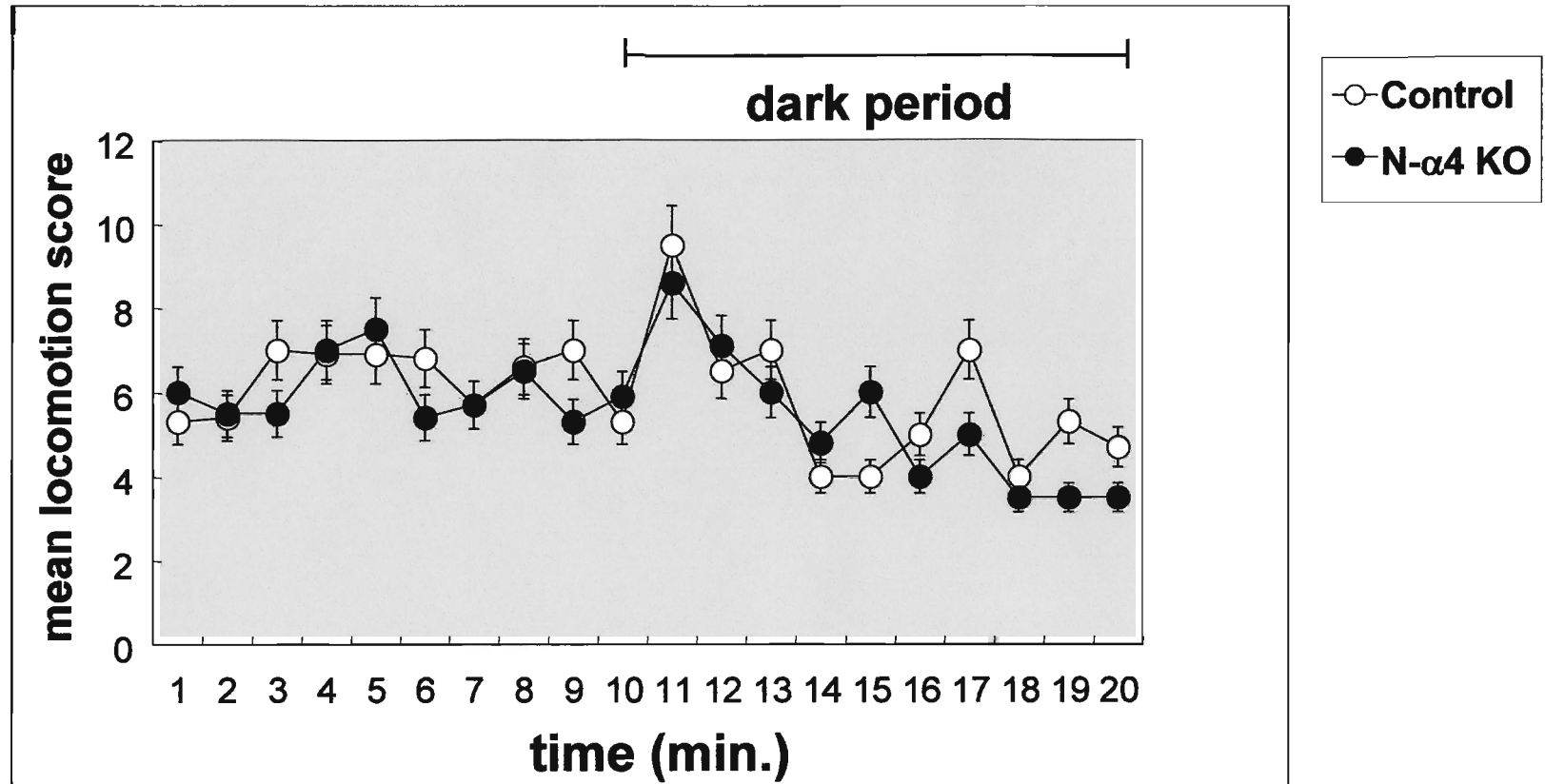


図 33 N-α4 KOマウスの運動能力および情動性

コントロール ($\alpha 4$ -b-Cre) マウス (n = 9) およびN- $\alpha 4$ KOマウス (n = 9) に対し、オープンフィールドテストを行なった。30 cm x 30 cmの亚克力箱に1匹のマウスを放し、移動量 (locomotion) を測定した。20分のセッションのうち、前半の10分間は点灯して明期とし、後半の10分間は照明を消して暗期とした。

F. 海馬依存性の空間学習記憶の障害

ここで最も重要な脳機能の一つである学習記憶についての行動解析を行なった。モリス水迷路テストは海馬依存性の空間学習記憶の解析に用いられる、一般的な行動実験である。詳細は実験方法の項に記したが、このテストは直径 90 cm、深さ 60 cm の円形のプールに行ない、プールの周囲には様々な視覚的な目印を設置しておく。プールを 4 区画に分け、そのうちの 1 区画に直径 9 cm の足場を置き、足場のないある 1 区画からマウスを放して足場に到達するまでの様子を撮影し、かかった時間を測定する。海馬依存性の空間学習記憶テストは足場を水面下 1 cm に位置してマウスには足場が見えない状態で行なうもので、マウスはテストを繰り返すうちにプール周囲の様々な目印を空間的に捉えて見えない足場の位置を学習していく。最後に空間記憶の獲得を確認するプローブテストを行う。プローブテストとは足場を取り去り、足場があったはずの区画にマウスが 60 秒間中何秒間留まっているかを計測し、海馬依存性の空間記憶が定着しているかどうかをみるものである (図 34)。

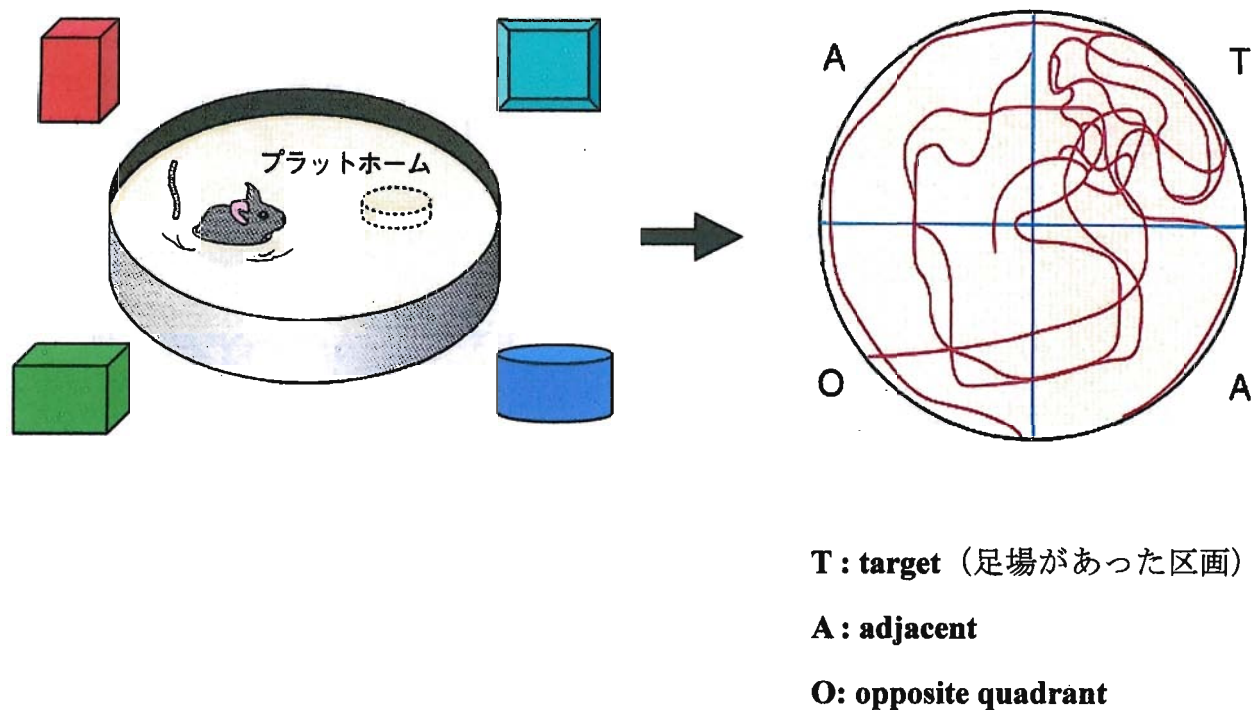


図 34 モリス水迷路テスト

海馬依存性の空間学習記憶を解析する行動実験。テスト装置は内側を黒くペイントした直径 90 cm、深さ 60 cm の円形のプールより成り、中に入れる水も墨で黒くする。プールは直方体形の部屋に置き、プールの周囲には様々な視覚的な目印を設置した。マウスがプールを泳ぐ様子はプール上部の小さい TV カメラで撮影した。プールを 4 区画に分け、そのうちの 1 区画に直径 9 cm の足場 (プラットフォーム) を置き、足場のないある 1 区画からマウスを放して足場に到達するまでの様子を撮影し、かかった時間を測定する。

まず、第1日目に足場を水面上1 cmの可視の状態で行なつた。N- α 4 KO マウス (n=9) はコントロールマウス (n=9) と有意差なく足場へたどりつき、試行を重ねるにつれて要した時間は短縮した [F(1,88) = 0.425, p = 0.516, ANOVA] (図 35A)。したがって N- α 4 KO マウスは水泳能力および動機づけは正常であり、以下の海馬依存性の空間学習記憶の解析は正確に評価し得るものと考えられた。

2日目から3日間、足場を水面下1 cmに位置し足場が見えない状態で1日5試行、計15試行を行なつた(トレーニング期間)。全般的にN- α 4 KO マウスはコントロールマウスに比し、より時間を要した印象であったが、有意差は認めなかった[F(1,268) = 1.104, p = 0.0648, ANOVA]。試行を重ねるにつれて双方のマウスは同様に要する時間を短縮したが、第4日目の11~15回目の試行では有意にN- α 4 KO マウスはコントロールマウスより時間を要した[F(1,88) = 4.974, p = 0.028, ANOVA] (図 35B)。

すべての試行が終了した後に海馬依存性の空間記憶の獲得を確認するためにプローブテストを行なつた。これは足場を外してマウスを60秒間泳がせ、足場があったはずの区画にどれくらいの時間留まっていられるかを計測するもので、海馬依存性の空間記憶が獲得されていればマウスはその区画により長時間留まっていることとなる。また全4区画のため空間記憶の獲得がない状態での1区画に留まる平均の時間(チャンスレベル)は15秒となる。N- α 4 KO マウスの平均時間は11.8秒、コントロールマウスは24.0秒でありN- α 4 KO マウスは有意に海馬依存性の空間記憶の獲得が障害されていた[F(1,16) = 4.639, p = 0.0469, ANOVA] (図 35C)。

Morris water maze test

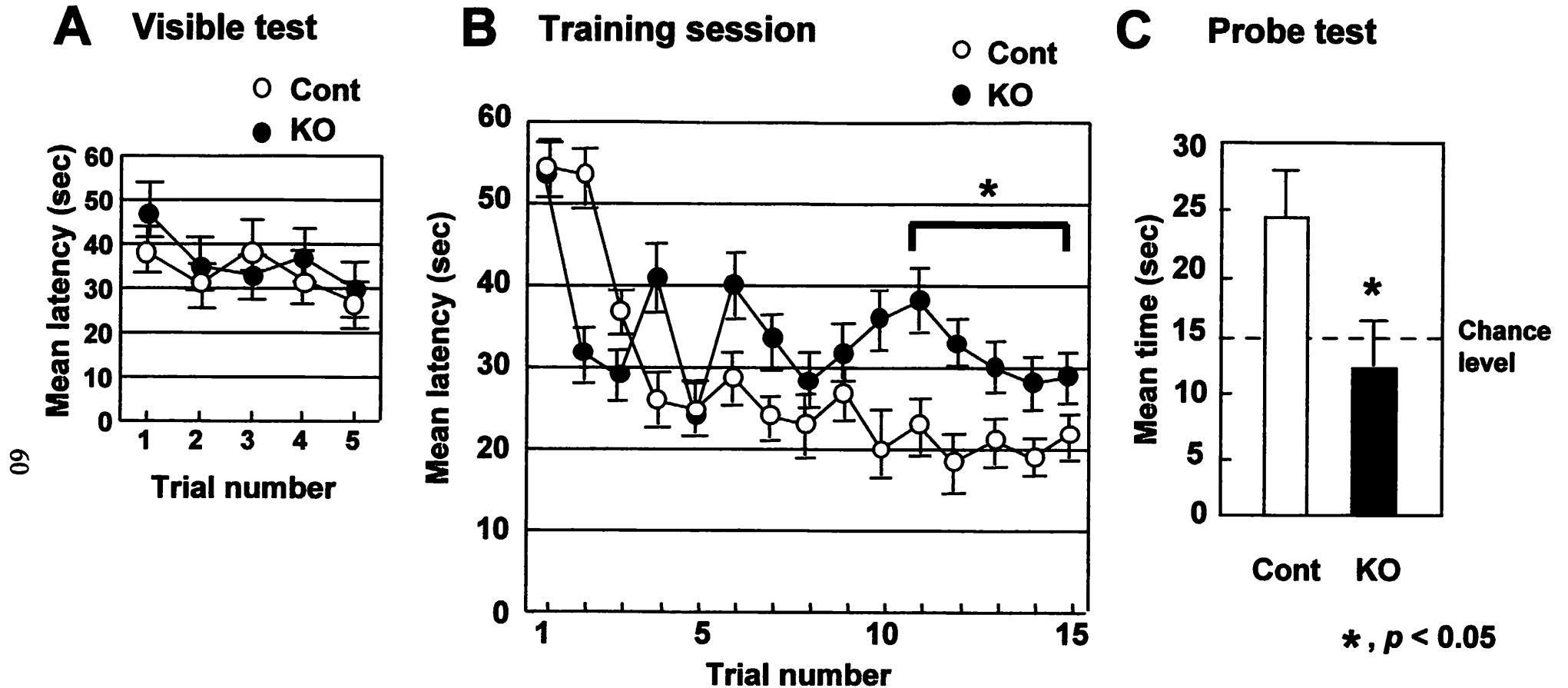


図 35 海馬依存性の空間学習記憶の障害

(A) 最初に可視テスト (Visible test) を行なった。これは足場を水面上1 cmに位置しマウスに足場が見えている状態で行なうもので1日に5回行なった。(B) 次に空間学習記憶テストを行なった。これは足場を水面下1 cmに位置してマウスには足場が見えない状態で行なうもので、マウスはテストを繰り返すうちにプール周囲の様々な目印を空間的に捉えて見えない足場の位置を学習していく。このテストはトレーニングとして1日に5回を3日間行なった。(C) 最後に空間記憶の獲得を確認するプローブテストを行なった。プローブテストとは足場を取り去り、足場があったはずの区画にマウスが60秒間中何秒間留まっているかを計測するものである。[Cont = $\alpha 4$ -b-Creマウス (n = 9) , KO = N- $\alpha 4$ KOマウス (n = 9)]

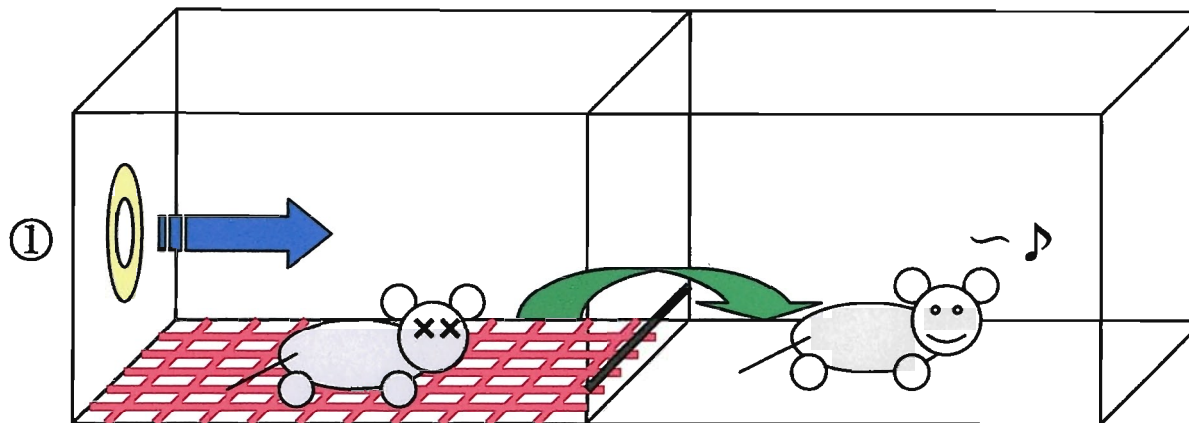
G. 連合学習の障害

次にシャトルボックス回避学習テストを行なった。このテストでは連合学習（恐怖条件づけにより動機づけられたオペラント学習）をみるもので扁桃体が関与している。テストには2ウェイ-シャトルボックスを使用した。1 cm の高さの区切りにより左右の2区画に分かれ、一方から他方への移動を反応とする。実験は1日に50試行（10試行 x 5回）の逃避/回避訓練を平均30秒の試行間隔で行った。試行ではCS（conditioned stimulus）としてブザー音信号（1500 Hz、85 dB）が与えられ、10秒後にUS（unconditioned stimulus）として電気ショック（160 V、0.5 mA）が始まる。CS開始から10秒以内に隣室に移動すれば、その時点でCSは停止し、USは与えられない（図36）。

最後の10試行ブロックではコントロールマウスが10試行中平均7回USを回避するのにに対しN- α 4 KOマウスは10試行中平均5回しかUSを回避し得なかった（図37A）。全50試行ではKOマウスの総回避数はコントロールマウスより有意に少なかった[F(1,88) = 7.76, p = 0.0067, ANOVA]。また10試行ブロック毎にそれぞれpost hoc test (Scheffes's test) にて有意差をみたところ、 p 値は最初の10試行から順に0.792、0.000382、0.0184、0.00900および0.0192であり2番目以降で有意にKOマウスの障害を認めた（図37A）。

またこの50試行を回避するのに要した時間でみると、双方のマウス共に試行を重ねるにつれ時間を短縮しているものの、N- α 4 KOマウスはコントロールマウスよりも有意に長い時間を要していた[F(1,88) = 12.88, p = 0.0018, ANOVA]。10試行ブロック毎の p 値は順に0.109、0.0426、0.0300、0.00701および0.0675であった（図37B）。

① **Conditioned stimulus (CS)**
ブザー音信号(1500Hz, 85 dB)



① の10秒後に②

② **Unconditioned stimulus (US)**
電気ショック(1500Hz, 85 dB)

CS開始から10秒以内に隣室へ移動すれば、USは与えられない。

図 36 シャトルボックス回避学習テスト

連合学習 (associative learning) : 恐怖条件づけにより動機づけられたオペラント学習を解析するもので扁桃体が関与する。

20 x 10 x 20 cmの2ウェイ-シャトルボックスを使用した (Sasaki et al., 1999) 。1 cmの高さの区切りにより左右の2区画に分かれ、一方から他方への移動を反応とする。実験は1日に50試行の逃避/回避訓練を平均30秒の試行間隔で行った。試行ではCS (conditioned stimulus) としてブザー音信号 (1500 Hz、85 dB) が与えられ、10秒後にUS (unconditioned stimulus) として電気ショック (160 V、0.5 mA) が始まる。動物が隣室に逃げると両方の刺激は停止する (逃避反応) 。もし、CS開始から10秒以内に隣室に移動すれば、その時点でCSは停止し、USは与えられない (回避反応) 。この反応時間はコンピューター・ソフト (Sample Cat : CASE社) により記録された。

Shuttle-box avoidance test

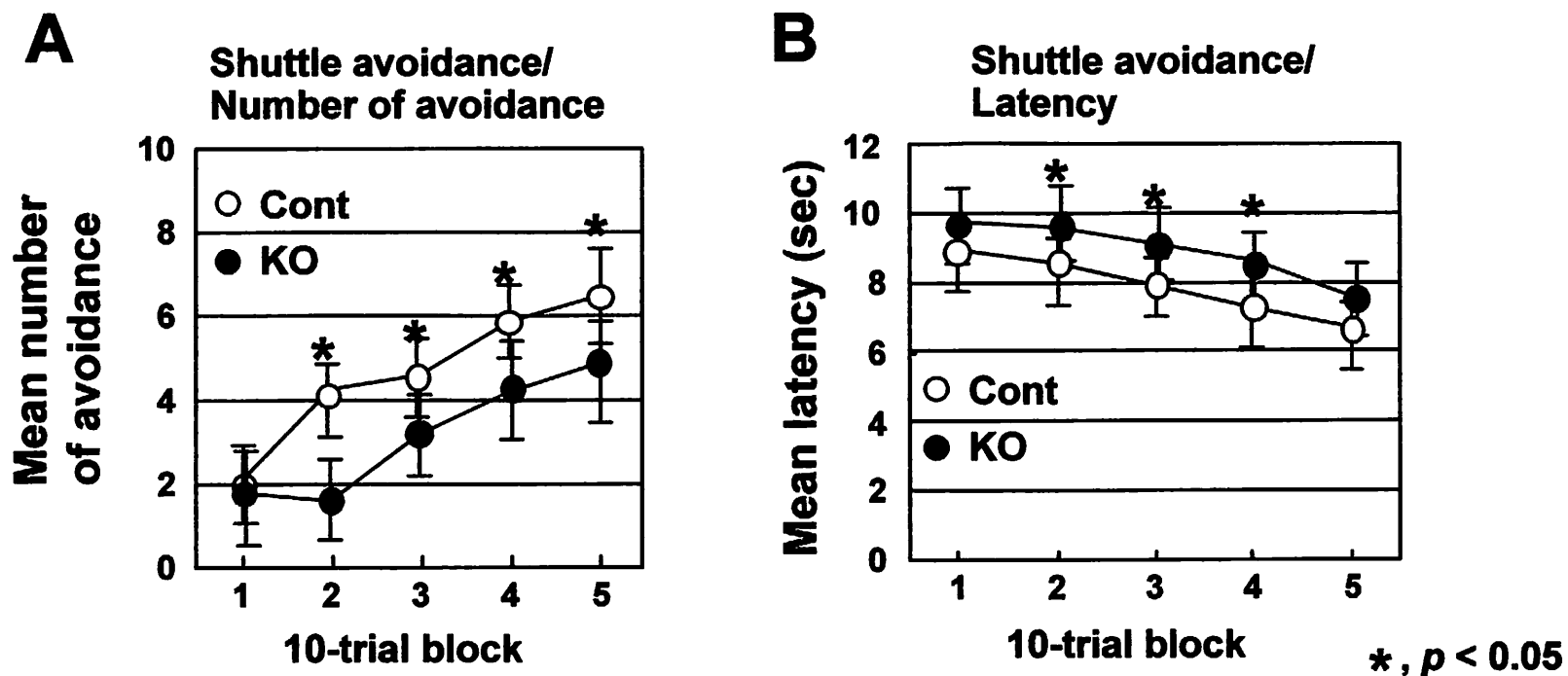


図 37 連合学習の障害

(A) 全50試行中の回避数を10試行毎のブロックで対比した。全50試行中のN- α 4 KOマウス ($n = 9$) の総回避数はコントロール (α 4-b-Cre) マウス ($n = 9$) より有意に少なかった [$F(1,88) = 7.76, p = 0.0067, ANOVA$]。また10試行ブロック毎にそれぞれpost hoc test (Scheffes's test) にて有意差をみたところ、 p 値は最初の10試行から順に0.792、0.000382、0.0184、0.00900および0.0192であり2番目以降で有意にKOマウスの障害を認めた。

(B) 全50試行を回避するのに要した時間を10試行毎のブロックで対比した。全50試行中のN- α 4 KOマウスの総回避時間はコントロールマウスより有意に短かった [$F(1,88) = 12.88, p = 0.0018, ANOVA$]。10試行ブロック毎の p 値は順に0.109、0.0426、0.0300、0.00701および0.0675であった。

H. $\alpha 4$ /PP2Ac と CaMKII α との結合

ここで、 $\alpha 4$ は脳神経細胞においてどのようなシグナル伝達メカニズムによって学習記憶に関与しているのかを解明することとした。実験結果 F. において $\alpha 4$ は海馬依存性の空間学習記憶に重要であることが明らかとなった。海馬依存性の空間学習記憶では最も重要なシグナル伝達分子の1つとして CaMKII α (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α) が挙げられる。そこで $\alpha 4$ と CaMKII α の関連を解析した。

まず FLAG タグ付きの CaMKII α とヒト $\alpha 4$ の cDNA をマウスの脳神経細胞株 Neuro2a にトランスフェクトした。次に抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。沈降物をウェスタンブロッティングにて解析したところ、抗ヒト $\alpha 4$ 抗体で $\alpha 4$ が共沈したことを検出した。すなわち CaMKII α と $\alpha 4$ は結合した (図 38A)。逆に抗ヒト $\alpha 4$ 抗体で免疫沈降し、抗 FLAG 抗体で CaMKII α が共沈したことも検出し得た。

さらに生体内において CaMKII α が $\alpha 4$ と結合しているのかどうかを明らかにするために、C57BL/6 マウスの脳の細胞抽出液を抗 CaMKII 抗体で免疫沈降した。ウェスタンブロッティングにて、抗 $\alpha 4$ 抗体で $\alpha 4$ が共沈したことを検出した (図 38B)。逆に抗 $\alpha 4$ 抗体で免疫沈降し、抗 CaMKII 抗体で CaMKII が共沈したことも検出した。CaMKII が $\alpha 4$ と結合している割合は、抗 $\alpha 4$ 抗体で共沈した CaMKII のバンドの強さから判断すると10%以下と考えられた。 $\alpha 4$ は PP2A の調節分子であるため、PP2Ac が脳神経細胞内で CaMKII と結合しているかどうかを解析した。PP2Ac は $\alpha 4$ と同様に脳神経細胞内で CaMKII と共沈した (図 38B)。

CaMKII α と $\alpha 4$ /PP2Ac との結合をさらに詳しく解析するために、GST- $\alpha 4$ 融合タンパクおよび GST-PP2Ac 融合タンパクを作製した。それぞれの融合タンパクを C57BL/6 マウスの脳細胞抽出液と反応させ、GST プルダウンアッセイを行なった。ウェスタンブロッティングにて GST- $\alpha 4$ 融合タンパク、GST-PP2Ac 融合タンパクそれぞれの沈降物中に CaMKII α のバンドを検出した (図 38C)。したがって $\alpha 4$ 、PP2Ac はそれぞれ直接 CaMKII α と結合しており、 $\alpha 4$ /PP2Ac 複合体は CaMKII α の活性を調節している可能性が示唆された。

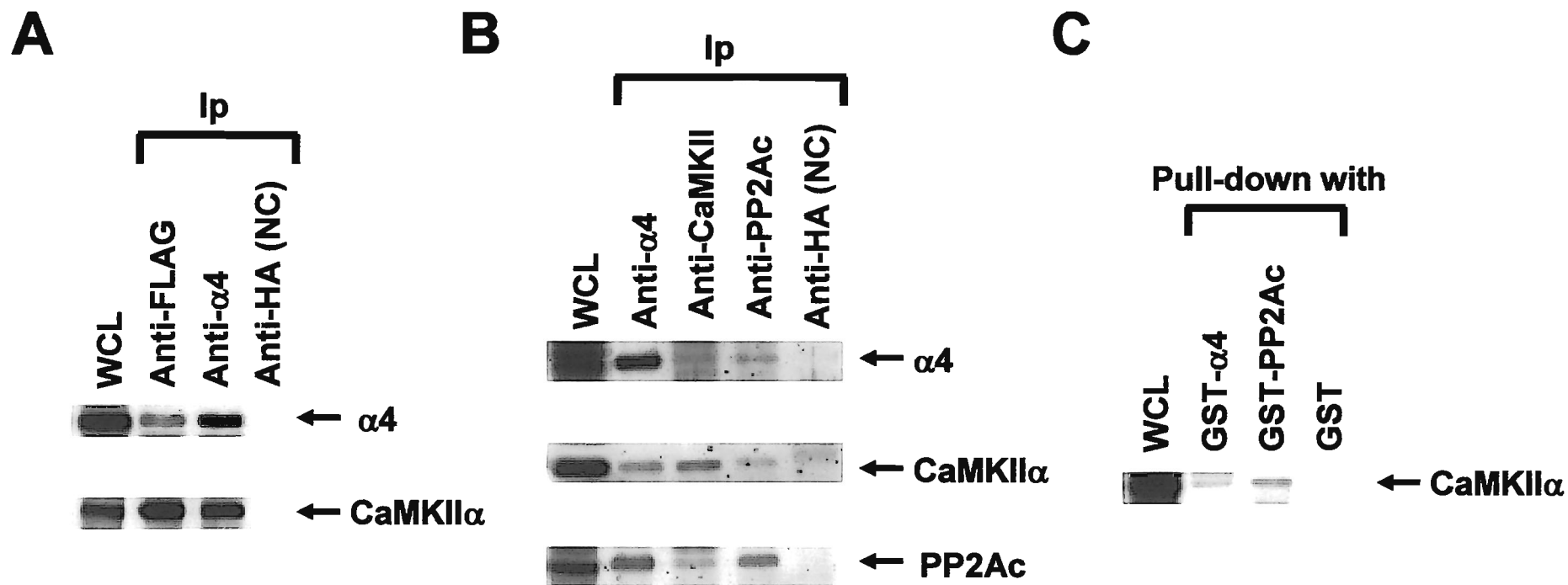


図 38 α4/PP2AcとCaMKIIαとの結合

(A) FLAGタグ付きのCaMKII αとヒトα4のcDNAをマウスの脳神経細胞株Neuro2aにトランスフェクトし、抗FLAG抗体で免疫沈降した。沈降物を抗ヒトα4抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ない、α4の共沈を検出した。逆に抗ヒトα4抗体で免疫沈降し、CaMKII αの共沈を検出した。陰性コントロールとして抗HA抗体を用いた。

(B) C57BL/6マウスの脳の細胞抽出液を抗CaMKII抗体で免疫沈降し、α4の共沈を検出した。逆に抗α4抗体で免疫沈降し、CaMKIIの共沈を検出した。抗PP2Ac抗体で免疫沈降し、CaMKII αの共沈を検出した。逆に抗CaMKII抗体で免疫沈降し、PP2Acの共沈を検出した。

(C) GST-α4融合タンパクおよびGST-PP2Ac融合タンパクを作製した。それぞれの融合タンパクをC57BL/6マウスの脳細胞抽出液と反応させ、GSTプルダウンアッセイを行なった。ウェスタンブロッティングにてGST-α4融合タンパク、GST-PP2Ac融合タンパクそれぞれの沈降物中にCaMKIIαのバンドを検出した。

I. $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII の活性調節

そこで海馬における CaMKII 活性を測定するために、N- $\alpha 4$ KO マウスおよびコントロールマウス ($\alpha 4$ -b-Cre マウス) の海馬の細胞抽出液を作製し、CaM Kinase II assay kit を用いて CaMKII 活性を測定した。N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬における Ca^{2+} 依存性の CaMKII 活性はコントロールに比し、有意に上昇していた (図 39A)。また Ca^{2+} 非依存性の CaMKII 活性は有意差を認めなかった。なお CaMKII のタンパク発現レベルは両マウス間で差はなかった。したがって、 $\alpha 4$ の欠失により CaMKII の活性が上昇しており、生理的な状態では PP2Ac と結合した $\alpha 4$ の機能により CaMKII 活性は負に調節されていることが示唆された。

$\alpha 4$ による CaMKII 活性の調節機構をさらに詳しく解析するために、Neuro2a 細胞に FLAG タグ付きの CaMKII α cDNA と $\alpha 4$ cDNA もしくはコントロールベクターをコトランスフェクトし 12 時間培養した後、CaMKII 活性を測定した。トランスフェクションに Neuro2a 細胞を用いたのは、脳神経細胞の初代培養細胞ではトランスフェクション効率が低く、CaMKII 活性に対する $\alpha 4$ の影響をみるのに適さなかったためである。12 時間の培養後細胞を回収し細胞抽出液として CaMKII 活性を測定した。 $\alpha 4$ を CaMKII α とともにトランスフェクトした Neuro2a 細胞では、コントロールベクターを CaMKII α とともにトランスフェクトしたものに比し、約 20% の CaMKII 活性の低下を認めた (図 39B)。したがって、 $\alpha 4$ の存在下で CaMKII α は活性が低下し、 $\alpha 4$ が存在しない N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬では CaMKII 活性が上昇していることが明らかとなった。

$\alpha 4$ は PP2A の調節分子であるため、N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬において CaMKII 活性が上昇しているのは、PP2A の酵素活性が低下しているためではないかと考えられた。そこで N- $\alpha 4$ KO マウスおよびコントロールマウスの海馬の PP2A 活性を測定した。N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬の細胞抽出液の PP2A 活性はコントロールマウスのものに比し、有意に低下していた (図 39C)。予想どおり $\alpha 4$ は PP2A 活性を正に調節することにより、CaMKII 活性を負に調節しているものと考えられた。

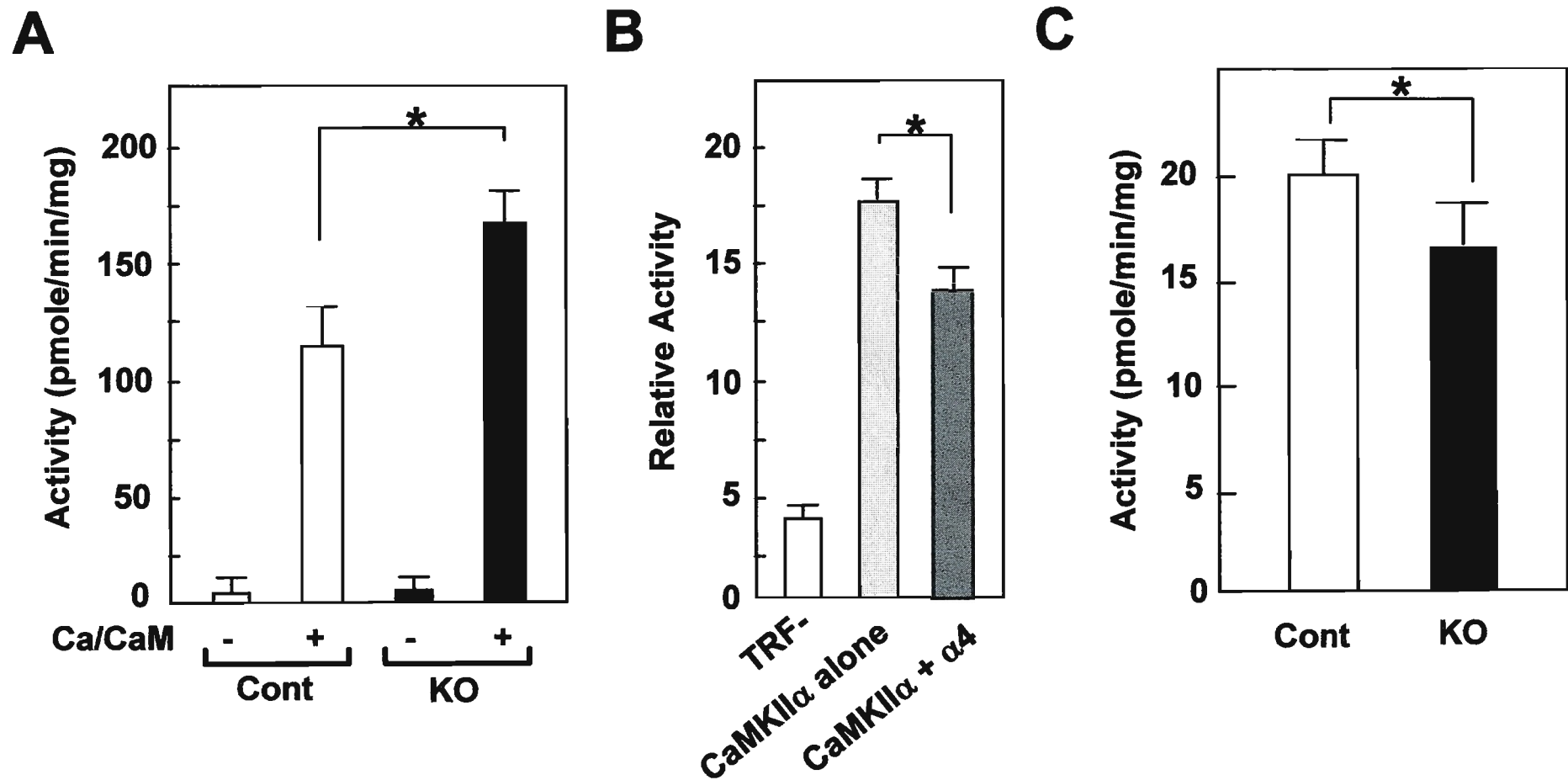


図 39 $\alpha 4$ /PP2AcによるCaMKIIの活性調節

(A) コントロールマウス ($\alpha 4$ -b-Creマウス) およびN- $\alpha 4$ KOマウスの海馬の細胞抽出液を作製し、CaM Kinase II assay kitを用いてCaMKII活性を測定した。

(B) Neuro2a細胞にFLAGタグ付きのCaMKII α cDNAと $\alpha 4$ cDNAもしくはコントロールベクターをコトランスフェクトし12時間培養した後、CaMKII活性を測定した。12時間の培養後細胞を回収し細胞抽出液としてCaMKII活性を測定した。

(C) コントロールマウスおよびN- $\alpha 4$ KOマウスの海馬のPP2A活性を測定した。*, $p < 0.05$

J. $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII α 脱リン酸化の局在

シナプス後細胞において、自己リン酸化して活性化型となった CaMKII α は PSD (post synaptic density) へ移動する。PSD における CaMKII α の脱リン酸化は PP2A によってではなく PP1 によってなされることが報告されている (Strack et al., 1997, 図 40)。したがって、 $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII α の脱リン酸化が脳神経細胞内のどこで起こっているのかを明らかにするために、C57BL/6 マウスの海馬の細胞抽出液を細胞質と PSD の分画に分けて、 $\alpha 4$ 、PP2Ac そしてリン酸化 CaMKII α の局在をウエスタンブロッティングで解析した。 $\alpha 4$ と PP2Ac はそのほとんどが細胞質内に位置していた (図 41)。すなわち、PP1 による CaMKII α の脱リン酸化が PSD で起こるのに対し、 $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII α の脱リン酸化は細胞質内で起こるものと考えられた (図 42)。

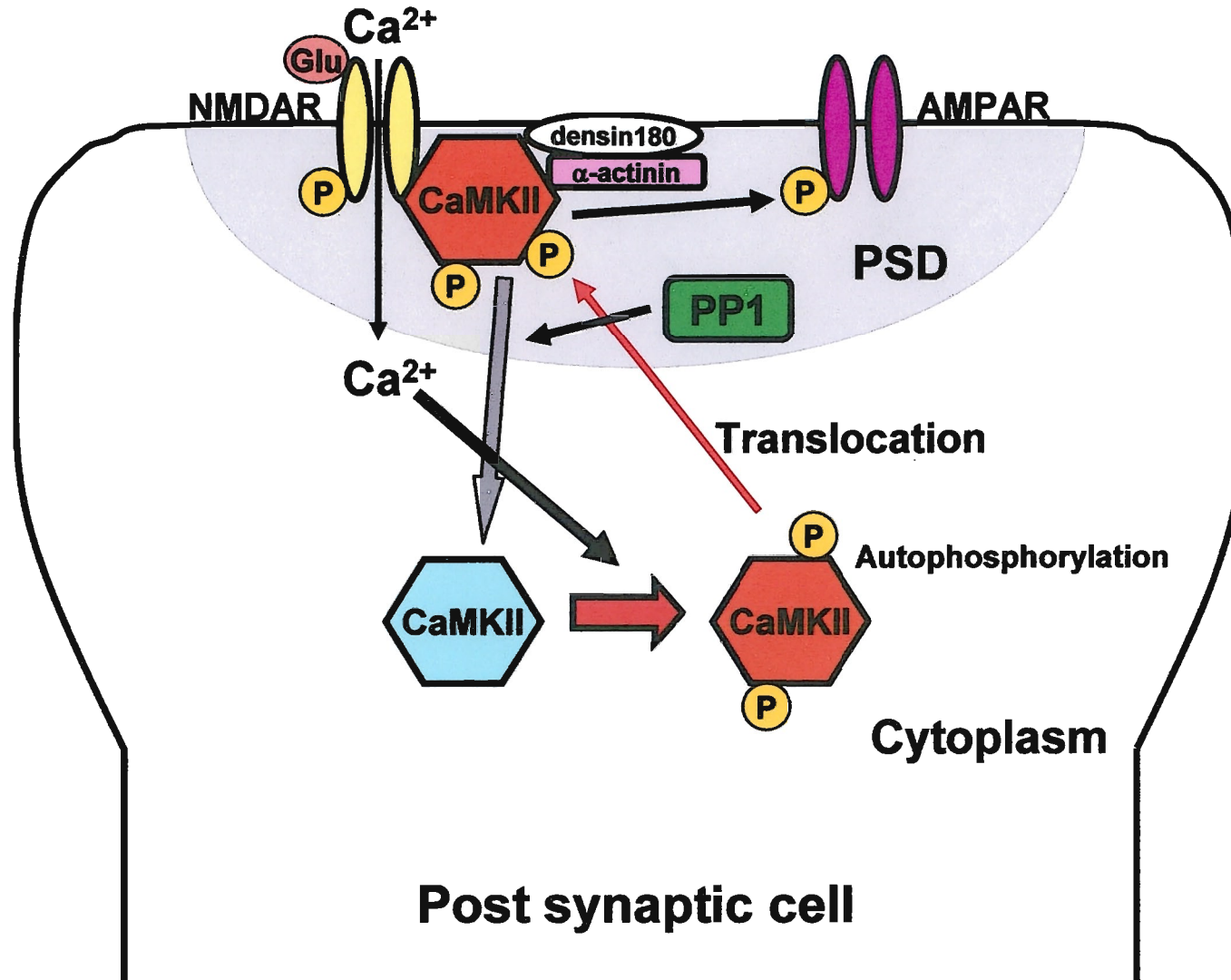


図 40 CaMKII自己リン酸化による活性化とPSDへの移動

シナプス後細胞において、自己リン酸化して活性化型となったCaMKII α はPSD (post synaptic density) へ移動する。PSDにおけるCaMKII α の脱リン酸化はPP2AによってではなくPP1によってなされる。

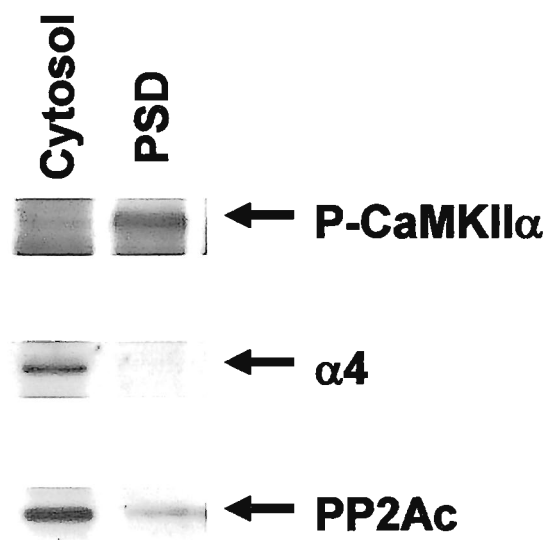


図 41 $\alpha 4$ / PP2Ac による CaMKII α 脱リン酸化の局在

C57BL/6マウスの海馬の細胞抽出液を細胞質とPSD (postsynaptic density) の分画に分けて、抗 $\alpha 4$ 抗体、抗PP2Ac抗体および抗リン酸化CaMKII α 抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。

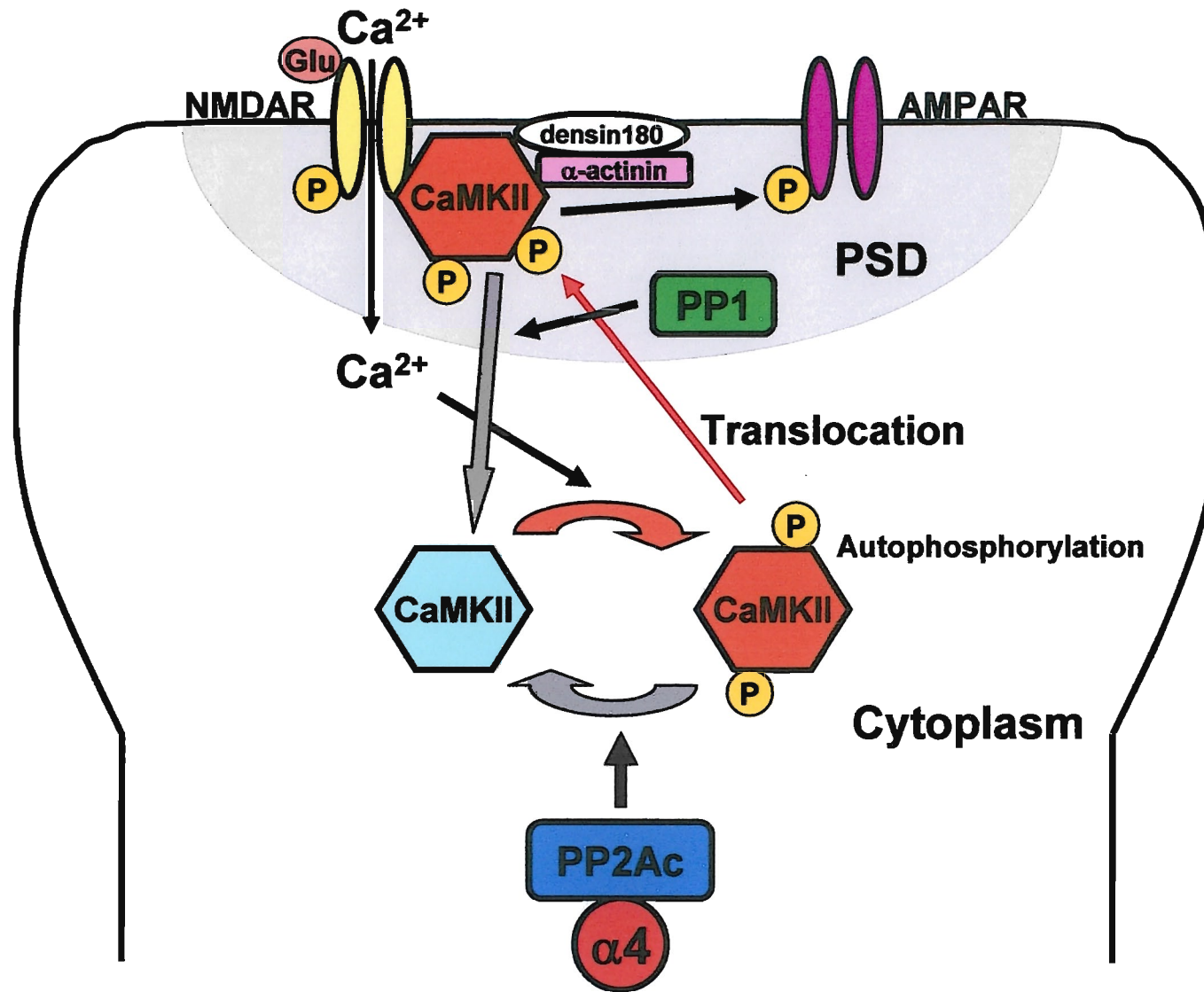


図 42 $\alpha 4$ / PP2Ac による CaMKII の脱リン酸化

シナプス後細胞において、リン酸化した CaMKII α は PSD (post synaptic density) へ移動する。PSD における CaMKII α の脱リン酸化は PP2A によってではなく PP1 によってなされる。実験 J. において、 $\alpha 4$ と PP2Ac はそのほとんどが細胞質内に位置していた (図 40)。すなわち、PP1 による CaMKII α の脱リン酸化が PSD で起こるのに対し、 $\alpha 4$ / PP2Ac による CaMKII α の脱リン酸化は細胞質内で起こることが示唆された。

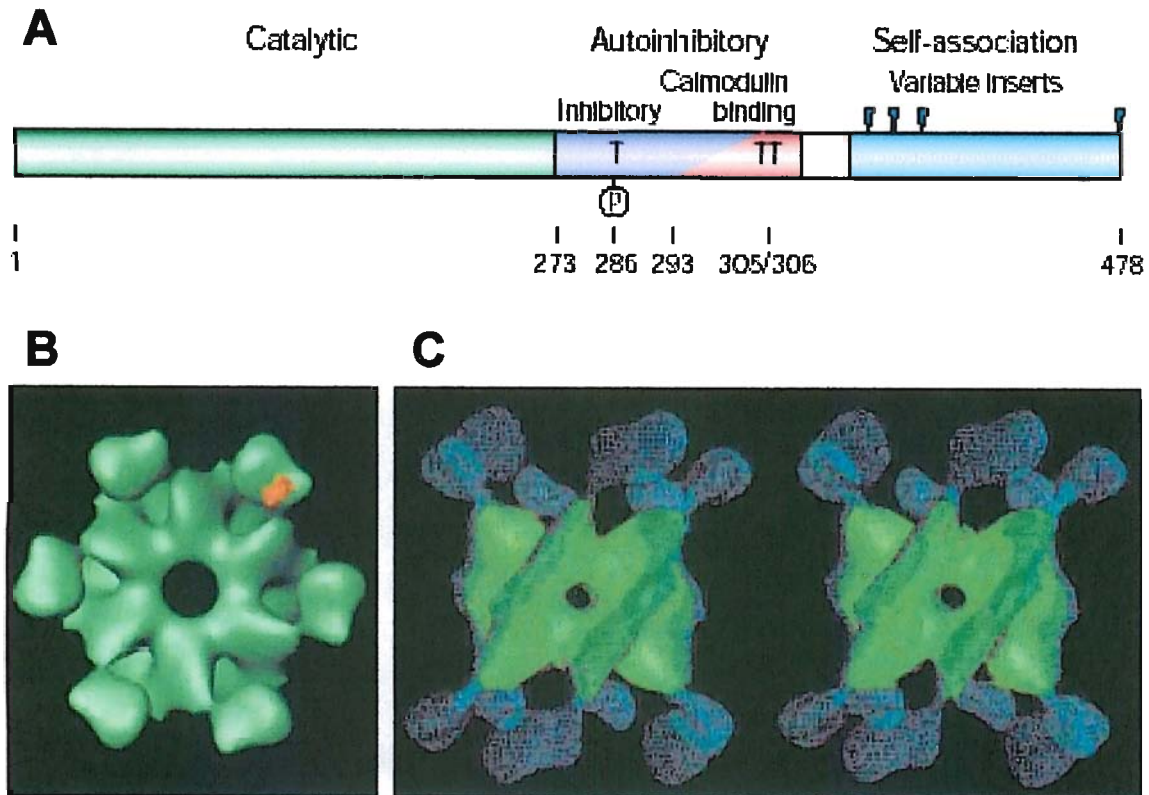
VIII. 考察

CaMKII の脱リン酸化は PP1 と PP2A の両方によってなされ得ることが報告されてきた (Lisman et al., 2002)。しかしながら、これまでに CaMKII と PP1 もしくは PP2A との直接結合は報告されていなかった。本研究では CaMKII α が α 4/PP2Ac と脳神経細胞において物理的に結合することを共沈実験およびプルダウンアッセイにて示した。本研究は CaMKII が PP2Ac およびその調節分子である α 4 と物理的に結合することを初めて明らかとしたものである。 α 4 の脳神経細胞特異的な遺伝子ノックアウトは学習記憶の障害を示した。すなわち α 4/PP2Ac は脳神経細胞において重要であることを明らかとした。PSD における CaMKII の脱リン酸化は PP2A によってではなく主に PP1 によってなされ、PSD での CaMKII の 15-20%しか PP2A によって脱リン酸化され得ないことが報告されている (Strack et al., 1997)。しかしながら、本研究で示した *in vivo* における PP2A によってなされた CaMKII 活性の調節は、学習記憶の障害を起こすには十分であった。したがって、PSD においてだけでなく、細胞質内においても CaMKII 活性の調節が学習記憶に重要であることを示すことができた。

CaMKII は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、学習記憶の中核である海馬には特に多く、また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セリン/スレオニンキナーゼである。構造的には 6 個のサブユニットが花のような形をとって重合した多量体が上下に 2 つに重なった 12 個のサブユニットからなる (図 43)。CaMKII には、 α 、 β 、 γ 、 δ の 4 つのアイソフォームがあり、 α 、 β はほぼ脳特異的に、 γ 、 δ は ubiquitous に発現する。大脳皮質、海馬、線条体においては α : β の比は 3 : 1 であり、学習記憶に関しては α サブユニットが重要とされている (Lisman et al., 2002)。したがって、本研究では CaMKII の α サブユニットを用いて解析を行なった。

CaMKII はシナプス後細胞において NMDA 受容体からの Ca^{2+} の流入により活性化する。その活性化において CaMKII α は 286 番目のスレオニン (T286) を自己リン酸化する (Lisman et al., 2002)。CaMKII α が自己リン酸化し活性化型になると Ca^{2+} 非依存性となる (Thiel et al., 1988, Lou and Schlman, 1989)。活性化型となった CaMKII α は PSD へ移行し、PSD を構成する様々な CaMKII α の基質 (イオンチャンネル、受容体、スキャホールドタンパク質、酵素および細胞骨格タンパク質など) をリン酸化することによりシグナルを伝達していく

(図 40)。この Ca^{2+} 刺激後に Ca^{2+} 非依存性となる CaMKII α の機能は、記憶のスイッチではないかと考えられている。CaMKII α のノックアウトマウスや CaMKII α の T286 をアラニンに置換した (T286A : 自己リン酸化不能) ミュータントマウスではともに、空間学習記憶の障害や海馬 LTP (long-term potentiation) の低下を認めた。この結果は CaMKII α の調節メカニズムとしてリン酸化が重要であることを示している。



Lisman et al. (2002). *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175-190.

図 43 CaMKII の構造

(A) CaMKII は触媒ドメイン、自己抑制ドメインおよび自己結合ドメインからなる。T はスレオニン残基を示し T286 が活性化型となる自己リン酸化部位である。

(B) CaMKII は 6 個のサブユニットが花のような形をとって重合した多量体が上下に 2 つ重なった 12 個のサブユニットからなる。オレンジは結合したカルモジュリンを示す。

(C) 上部から見た形の (B) を側方より見たステレオ 3D 立体画像である。

CaMKII α が T286 を自己リン酸化し、Ca²⁺非依存性の活性化型となることが記憶のスイッチオンであるとすれば、スイッチオフは脱リン酸化である。脱リン酸化はプロテインホスファターゼによりなされる。これまでに PSD における CaMKII α は PP1 によって主に脱リン酸化されることが報告されている (Strack et al., 1997)。本研究の対象分子である α 4がその活性を調節している PP2A は脳で豊富に発現しているもう 1 つの主要なプロテインホスファターゼであり、*in vitro* では CaMKII α を脱リン酸化し得る (Lisman et al., 2002)。しかしながら、PSD においては PP2A による CaMKII α の脱リン酸化は 15-20%に過ぎなかった (Strack et al., 1997)。それにもかかわらず PP2A が学習記憶に関与するという報告がなされた。それはラット海馬スライスでの LTP 発現刺激により PP2A 活性が低下したということ、さらにカリクリン A (PP1 と PP2A の阻害剤) によるプロテインホスファターゼの阻害により海馬において LTP 様の伝達増強を認めたというものであった (Fukunaga et al., 2000)。これらの結果より、PP2A による CaMKII α の脱リン酸化も学習記憶に重要であり、それは PSD においてではなく細胞質内においてなされるということが示唆されていた。本研究の結果は *in vivo* においてこの仮説を証明したものであり、さらに CaMKII 活性の調節は α 4/PP2Ac が CaMKII に結合することによりなされるという新しい事実を導きだした。

これまでにいくつかのシナプス後細胞における CaMKII の結合分子が報告されている (Bayer and Schulman, 2001, Lisman et al., 2002)。CaMKII はグルタミン酸による NMDA 受容体の刺激後の Ca²⁺の流入により T286 で自己リン酸化し、活性化型となる。活性化型 CaMKII は基質の豊富な PSD へ移動する。CaMKII は PSD タンパクであるデンシン-180 および α -アクチニンや、NMDA 受容体のサブユニットなどと結合する。デンシン-180 や α -アクチニンは CaMKII に PSD でのアンカリング機能を付与する。また NMDA 受容体も CaMKII のアンカーとして働き、さらに Ca²⁺/カルモジュリンが CaMKII から離れた後でも、CaMKII を活性化型のまま保持する。これまでに報告された CaMKII の結合分子のほとんどは PSD に存在する分子であり、CaMKII を PSD にアンカリングするものや CaMKII の PSD における機能に付与するものであった。 α 4 と PP2Ac は細胞質内で CaMKII と結合し、CaMKII の機能を調節している新しいタイプの CaMKII 調節分子である。 α 4 と PP2Ac は細胞質内で CaMKII を脱リン酸化することにより Ca²⁺-シグナルに起因する、CaMKII の細胞質から PSD への移動を抑制しているのではないかと考えられた。これはなぜ α 4 の

欠失が学習記憶を障害するのか、という問いに対する1つの答えとなり得る。N- α 4 KO マウスでは α 4/PP2Acによる細胞質内でのCaMKIIの脱リン酸化機構が機能しないために定常的にCaMKII活性が上昇しており、学習記憶に伴う刺激に対するシグナル伝達が正常に機能しないのではないかと考えられた。

N- α 4 KO マウスの海馬依存性の空間学習記憶の障害をみるために、モリス水迷路テストを行なった。モリス水迷路は海馬依存性の課題であり、NMDA受容体およびCaMKIIが関与している(Lisman et al., 2002)。この課題中、マウスは見えない足場の位置をプール周囲の様々な目印を手がかりに空間的に学習していく。この空間学習の試行を重ねるにつれてN- α 4 KO マウス、コントロールマウス共に足場にたどり着く時間は短縮した。しかしながら、プローブテストにおいてN- α 4 KO マウスが目的の区画にとどまっていた時間はコントロールマウスよりも有意に短かった。基本的行動や運動能力、水泳速度はKOマウス、コントロールマウス間に有意差はなく、水迷路における足場が可視状態での海馬非依存性のテストでも有意差を認めなかった。これらの結果はN- α 4 KO マウスの空間学習記憶課題における障害が運動機能や情動性の変化によるものではないことを示している。

N- α 4 KO マウスは海馬以外の脳領域に依存性のシャトルボックス回避テストにおいて機能的な障害を認めた。N- α 4 KO マウスとコントロールマウスの有意差はpost hoc testを用いて統計学的に算出した。回避数の分析では最初の10試行ブロックを除くすべてのブロックで有意差を認めた。回避時間の分析では5ブロック中2、3および4番目のブロックで有意差を認めた。マウスは試行を繰り返す毎により学習を深めると考えられるのでより後のブロックで有意差を認めるのは理にかなっている。シャトルボックス回避テストにおける障害は、 α 4の欠失が海馬以外の脳領域にも及んでいるためと考えられた。

遺伝子改変マウスやトランスジェニックマウスモデルによる実験結果は注意深く解釈しなければならない。遺伝子改変は発達の障害をもたらす可能性があり、これらの障害は二次的に成体マウスの表現型を導く危険性がある。しかしながら、本研究で用いたN- α 4 KO マウスは肉眼的外観も脳組織における顕微鏡的構築も正常であった。N- α 4 KO マウスにおいて発達の障害を全く認めなかったのには、 α 4-bが α 4の機能を代償している可能性が考えられる(Maeda et al., 1999)。 α 4-bは脳神経細胞における、 α 4のアイソフォームでありPP2Acと結合し得る。 α 4-bプロモーターを用いた遺伝子ターゲティングでは、 α 4が欠失した脳神経細胞において α 4-bが存在している。本研究における結果は α 4と α 4-bによ

る総合的な調節活性の低下が、脳神経細胞機能の障害を引き起こしたのではないかと考えられた。

本研究において $\alpha 4$ /PP2Ac が CaMKII α と結合し、 $\alpha 4$ が CaMKII 活性を負に調節していることを明らかとした。CaMKII α の活性化に必要な自己リン酸化部位である286番目のスレオニンをアスパラギン酸に変えて CaMKII α を常時、活性化型とした T286D ミュータントマウス (Bejar et al., 2002) が N- $\alpha 4$ KO マウスと同様の表現型を示したことは非常に興味深い事実である。双方のマウスは、共に海馬依存性の課題で障害を示した。N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬で CaMKII 活性が上昇しているのにもかかわらず、海馬依存性の空間学習記憶で障害を示したのは T286D ミュータントマウスと同様に、定常的に CaMKII 活性が上昇しているため、刺激に対するシグナル伝達が正常に機能しないためではないかと考えられた。またこのことは細胞質内における、 $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII α の脱リン酸化が適正な CaMKII 活性化を調節するための重要なメカニズムであることを示唆している。

IX. 結語

シグナル伝達分子 $\alpha 4$ は PP2Ac と直接結合してその酵素活性を調節するが、そのターゲットの全容は明らかになっていなかった。その理由の1つは $\alpha 4$ 遺伝子をノックアウトすると胎生致死となるためである。そこでこれまでに Inui らとともに、組織特異的な $\alpha 4$ ノックアウト (KO) マウスを作製し解析した。B および T リンパ細胞それぞれに特異的な KO マウスの解析により $\alpha 4$ はリンパ細胞の増殖、分化に重要であった。

$\alpha 4$ には脳および精巣に特異的に発現するファミリー分子である $\alpha 4$ -b が存在すること、PP2A は脳において強く発現していることより $\alpha 4$ は脳神経細胞において重要な機能を有していると考えた。さらに $\alpha 4$ -b が存在する脳神経細胞において $\alpha 4$ をノックアウトすれば $\alpha 4$ の機能をより明確にし得ると予想された。そこで脳神経細胞特異的な $\alpha 4$ KO (N- $\alpha 4$ KO) マウスを作製し解析することにより $\alpha 4$ の脳神経細胞における機能を明らかとすることを本研究の目的とした。

N- $\alpha 4$ KO マウスは海馬依存性の空間学習記憶が障害されており、 $\alpha 4$ は脳神経細胞において重要な機能を有していた。そのメカニズムとして、 $\alpha 4$ および PP2Ac が CaMKII α と結合することを初めて明らかとした。N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬の CaMKII 活性が上昇していたこと、 $\alpha 4$ を CaMKII α とともにトランスフェクトした Neuro2a 細胞で CaMKII 活性の低下を認めたことより、 $\alpha 4$ /PP2Ac は CaMKII 活性を負に調節していることが分かった。N- $\alpha 4$ KO マウスの海馬では CaMKII α の活性が常に上昇していることにより学習記憶に伴う刺激に対するシグナル伝達が上手く機能しないのではないかと考えられた。

PSD における CaMKII の脱リン酸化は PP1 によってなされることが報告されてきたが、本研究により細胞質内での CaMKII の脱リン酸化は $\alpha 4$ /PP2Ac によってなされることが示唆された。さらに細胞質内における $\alpha 4$ /PP2Ac による CaMKII 活性の調節は海馬依存性の空間学習記憶に重要であることが明らかとなった。

X. 参考文献

Abraham, R.T., and Wiederrecht, G.J. (1996) Immunopharmacology of rapamycin. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 483-510.

Abraham, R.T. (1998) Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 330-336.

Agostinis, P., Derua, R., Sarno, S., Goris, J., and Merlevede, W. (1992) Specificity of the polycation-stimulated (type-2A) and ATP, Mg-dependent (type-1) protein phosphatases toward substrates phosphorylated by P34cdc2 kinase. *Eur. J. Biochem.* **205** 241-248.

Andjelkobic, N., Zolnierowicz, S., Van Hoof, C., Goris, J., and Hemmings, B.A. (1996) The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1. *EMBO J.* **15**, 7156-7167.

Bastians, H. and Ponstingl, H. (1996) The novel human proteinserine/threonine phosphatase 6 is afunctional homologue of budding yeast Sit4p and fission yeast ppe1, which are involved in cell cycle regulation. *J. Cell. Sci.* **109**, 2865-2874.

Bayer, K.U. and Schulman, H. (2001) Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 917-923.

Bejar, R., Yasuda, R., Krugers, H., Hood, K., and Mayford, M. (2002) Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J. Neurosci.* **22**, 5719-5726.

Bennecib, M., Gong, C., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001) Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at 262/356. *FEBS*

Lett. **490**, 15-22.

Bennin, D.A., Arachchige Don, A.S., Brake, T., Mckenzie, J.L., Rousenbaum, H., Ortiz, L. DePaoli Roach, A.A., and Horne, M.C. (2002) Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *J. Biol. Chem.* **277**, 27449-27467.

Binh, L.T. and Brougoux, P. (1992) Molecular cloning and characterization of genes related to chilling tolerance in rice. *Plant Physiol.* **99**, 1146-1150.

Boudreau, R.T., Garduno, R., and Lin, T.J. (2002) Protein phosphatase 2A and protein kinase Calpha are physically associated and are involved in *Pseudomonas aeruginosa*-induced interleukin 6 production by mast cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5322-5329.

Brewis, N.D., Street, A.J., Prescott, A.R., and Cohen, P.T. (1993) PPX, a novel protein serine/threonine phosphatase localized to centrosomes. *EMBO J.* **12**, 987-996.

Brown, E.J., and Schreiber, S.L. (1996) A signaling pathway to translational control. *Cell* **86**, 517-520.

Burnett, P.E., Barrow, R., Cohen, N.A., Snyder, S.H., and Sabatini, D.M. (1998) RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1432-1437.

Chen, J., Peterson, R.T., and Schreiber, S.T. (1998) $\alpha 4$ associates with protein phosphatase 2A, 4, and 6, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **247**, 827-832.

Chen, M.X., Mcpartlin, A.E., Brown, L., Chen, Y.H., Barker, H.M., and Cohen P.T. (1994) A novel human protein serine/threonine phosphatase, which processes four tetratricopeptide repeat

motifs and localizes to nucleus. *EMBO J.* **13**, 4278-4290.

Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 453-508.

DeFranco, A.L. (1995) Transmembrane signaling by antigen receptors of B and T lymphocytes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 163-175.

Deng, X.M., Ito, T., Carr, B., Mumby, M., and May, W.S. (1998) Reversible phosphorylation of Bcl2 following interleukin 3 or bryostatin 1 is mediated by direct interaction with protein phosphatase 2A. *J. boil. Chem.* **273**, 34157-34163.

Di Como, C.J. and Arndt, K.T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Dev.* **10**, 1904-1916.

Ding, R.H., Inui, S., Yamashita, T., Maeda, K., Takagi, K., Takeda, J., and Sakaguchi, N. (2003) T cell-specific gene targeting reveals that $\alpha 4$ is required for early T cell development. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1899-1906.

Dufner, A., and Thomas, G. (1999) Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp. Cell Res.* **253**, 100-109.

Dumont, F.J., Staruch, M.J., Koprak, S.L., Melino, M.R., and Sigal, N.H. (1990) Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J. Immunol.* **144**, 251-258.

Elgersma, Y., Fedorov, N.B., Ikonen, S., Choi, E.S., Elgersma, M., Carvalho, O.M., Giese, K.P., and Silva, A.J. (2002) Inhibitory autophosphorylation of CaMKII controls PSD association, plasticity, and learning. *Neuron* **36**, 493-505.

Ferrari, S., Pearson, R.B., Siegmann, M., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1993) The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70^{s6k} through dephosphorylation of a novel set of sites. *J. Biol. Chem.* **268**, 16091-16094.

Fukunaga, K., Muller, D., Ohmitsu, M., Bakó, E., DePaoli-Roach, A.A., and Miyamoto, E. (2000) Decreased protein phosphatase 2A activity in hippocampal long-term potentiation. *J. Neurochem.* **74**, 807-817.

Fukunaga, K., Rich, D.P., and Soderling, T.R. (1989) Generation of the Ca²⁺-independent form of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II in cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 21830-21836.

Giese, K.P., Fedorov, N.B., Filipkowski, R.K., and Silva, A.J. (1998) Autophosphorylation at Thr286 of the α calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* **279**, 870-873.

Gotz, J., Probst, A., Mistl, C., Nitsch, R.M., and Ehler, E. (2000) Distinct role of the protein phosphatase 2A subunit C α in the regulation of E-cadherin and β -catenin during development. *Mech. Devl.* **93**, 83-93.

Hanley, R.M., Payne, M.E., Cruzalegui, F., Christenson, M.A., and Means, A.R. (1989) Sequence of the cDNA for the alpha subunit of calmodulin kinase II from mouse brain. *Nucleic Acids. Res.* **17**, 3992.

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.-P., Kasuga, M., Nishimoto, I., and Avruch, J. (1997) Regulation of eIF-4E BP1 Phosphorylation by mTOR. *J. Biol. Chem.* **272**, 26457-26463.

Heriche, J.K., Lebrin, F., Rabiloud, T., Leroy, D., Chambaz, E.M., and Goldberg, Y. (1997)

Regulation of protein phosphatase 2A by direct interaction with casein kinase 2 α . *Science* **276**, 952-955.

Higo, S., Matsuyama, T., and Kawamura, S. (1996) Direct projections from the pedunculopontine and laterodorsal tegmental nuclei to area 17 of the visual cortex in the cat. *Neurosci. Res.* **26**, 109-118.

Hsu, W., Zeng, L., and Constantini, F. (1999) Identification of a domain of axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 3439-3445.

Huang, X. and Honkanen, R.E. (1998) Molecular cloning, expression, and characterization of a novel human serin/threonin protein phosphatase, PP7, That is homologous to *Drosophila* retinal degeneration C gene product (rdgC). *J. Biol. Chem.* **273**, 1462-1468.

Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: The yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* **80**, 225-236.

Inui, S., Kuwahara, K., Mizutani, J., Maeda, K., Kawai, T., Nakayasu, H., and Sakaguchi, N. (1995) Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction. *J. Immunol.* **154**, 2714-2723.

Inui, S., Sanjo, H., Maeda, K., Yamamoto, H., Miyamoto, E., and Sakaguchi, N. (1998) Ig receptor binding protein 1 (α 4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Blood* **92**, 539-546.

Inui, S., Maeda, K., Ding, R.H., Yamashita, T., Yamamoto, H., Miyamoto, E., Aizawa, S.,

and Sakaguchi, N. (2002) BCR signal through $\alpha 4$ is involved in S6 kinase activation and required for B cell maturation including isotype switching and V region somatic hypermutation. *Int. Immunol.* **14**, 177-187.

Janssens, V., and Goris, J. (2001) Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signaling. *Biochem. J.* **353**, 417-439.

Kawabe, T., Muslin, A.J., and Korsmeyer, S.J. (1997) Hox11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle check point. *Nature* **385**, 454-458.

Khaleghpour, K., Pyronnet, S., Gingras, A.-C., and Sonenberg, N. (1999) Translational homeostasis: eukaryotic translation initiation factor 4E control of 4E-binding protein 1 and p70 S6 kinase activities. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4302-4310.

Khew-Goodall, Y. and Hemmings, B.A. (1988) Tissue-specific expression of mRNAs encoding α - and β -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Lett.* **238**, 265-268.

Kremmer, E., Ohst, K., Kiefer, J., Brewis, N., and Walter, G. (1997) Separation of PP2A core enzyme and holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1692-1701.

Kuwahara, K., Matuo, T., Nomura, J., Igarashi, H., Kimoto, M., Inui, S., and Sakaguchi, N. (1994) Identification of a 52-kDa molecule (p52) coprecipitated with the Ig receptor-related MB-1 protein that is inducibly phosphorylated by the stimulation with phorbol myristate acetate. *J. Immunol.* **152**, 2742-2752.

Lechward, K., Awotunde, O.S., Swiatek, W., and Muszynska, G. (2001) Protein phosphatase 2A: Variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochem. Polon.* **48**, 921-933.

Li, H.-L., Forman, M.S., Kurosaki, T., and Pure, E. (1997) Syk is required for BCR-mediated activation of p90Rsk, but not p70S6k, via a mitogen-activated protein kinase-independent pathway in B cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 18200-18208.

Li, H.-L., Davis, W., and Pure, E. (1999) Suboptimal cross-linking of antigen receptor induces syk-dependent activation of p70S6 kinase through protein kinase C and phosphoinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 9812-9820.

Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002) The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 175-190.

Liu, J., Prickett, T.D., Elliott, E., Meroni, G., and Brautigan, D.L. (2001) Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit alpha4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6650-6655.

Lou, L.L., and Schulman, H. (1989) Distinct autophosphorylation sites sequentially produce autonomy and inhibition of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurosci.* **9**, 2020-2032.

Maeda, K., Inui, S., Tanaka, H., and Sakaguchi, N. (1999) A new member of the α 4-related molecule (α 4-b) that binds to the protein phosphatase 2A is expressed selectively in the brain and testis. *Eur. J. Biochem.* **264**, 702-706.

Molloy, S.S., and Kennedy, M.B. (1991) Autophosphorylation of type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in cultures of postnatal rat hippocampal slices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 4756-4760.

Mumby, M.C., and Walter, G. (1993) Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol. Rev.* **73**, 673-699.

Murata, K., Wu, J., and Brautigan, D.L. (1997) B cell receptor-associated protein $\alpha 4$ displays rapamycin-sensitive binding directly to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10624-10629.

Nanahoshi, M., Tsujishita, Y., Tokunaga, C., Inui, S., Sakaguchi, N., Hara, K., and Yonezawa, K. (1999) Alpha4 protein as a common regulator of type 2A-related serine/threonine protein phosphatases. *FEBS Lett.* **446**, 108-112.

Onda, M., Inui, S., Maeda, K., Suzuki, M., Takahashi, E-I., and Sakaguchi, N. (1997) Expression and chromosomal localization of the human $\alpha 4$ /IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway. *Genomics* **46**, 373-378.

Peterson, R.T., Desai, B.N., Hardwick, J.S., and Schreiber, S. (1999) Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4438-4442.

Pleiman, C.M., D'Ambrosii, D., and Cambier, J.C. (1994) The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Immunol. Today* **15**, 393-399.

Reth, M. and Wienands, J. (1997) Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 453-479.

Ruediger, R., Roeckel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G., and Walter, G. (1992) Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4872-4882.

Sakaguchi, N., Matuo, T., Nomura, J., Kuwahara, K., Igarashi, H., and Inui, S. (1993) Immunoglobulin receptor-associated molecules. *Adv. Immunol.* **54**, 337-392.

Sakata, A., Kuwahara, K., Ohmura, T., Inui, S., and Sakaguchi, N. (1999) Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells in vitro. *Immunol. Lett.* **68**, 301-309.

Salh, B., Wagey, R., Marotta A., Tao J.S., and Pelech S. (1998) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 Cells: differential Effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J. Immunol.* **161**, 6947-6954.

Sasaki, H., Inoue, T., Iso, H., and Fukada, Y. (1999) Recovery of visual behaviors in adult hamsters with the peripheral nerve graft to the sectioned optic nerve. *Exp. Neurol.* **159**, 377-390.

Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S., and Wang, Y. (1992) Deficient hippocampal long-term potentiation in α -calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 201-206.

Sontag, E. (2001) Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling. *Cell. Signall.* **13**, 7-16.

Strack, S., Barban, M.A., Wadzinski, B.E., and Colbran, R.J. (1997) Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 1 and 2A. *J. Neurochem.* **68**, 2119-2128.

Takeuchi, Y., Fukunaga, K., and Miyamoto, E. (2002) Activation of nuclear Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and brain-derived neurotrophic factor gene expression by stimulation of dopamine D2 receptor in transfected NG108-15 cells. *J. Neurochem.* **82**, 316-328.

Thiel, G., Czernik, A.J., Gorelick, F., Nairn, A.C., and Greengard, P. (1988) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: Identification of threonine-286 as the autophosphorylation site in the α subunit associated with the generation of Ca²⁺-independent activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6337-6341.

Thomas, G. and Hall M.N. (1997) TOR signaling and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 782-787.

Thomas, G. (2002) The S6 kinase signaling pathway in the control of development and growth. *Biol. Res.* **35**, 305-313.

Too, C.K.L. (1997) Differential expression of elongation factor-2, α 4 phosphoprotein and Cdc5-like protein in prolactin dependent/independent rat lymphoid cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **131**, 221-231.

Turowski, P., Favre, B., Campbell, K.S., Lamb, N.J., and Hemmings, B.A. (1997) Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65 α . *Eur. J. Biochem.* **248**, 200-208.

Volarevic, S. and Thomas G. (2001) Role of S6 phosphorylation and S6 kinase in cell growth. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **65**, 101-127.

Wera, S., and Hemmings, B.A. (1995) Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem. J.* **311**, 17-29.

Westphal, R.S., Anderson, K.A. Mearns, A.R., and Wadzinski, B.E. (1998) A signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent proteinkinase IV and protein phosphatase 2A. *Science* **280**, 1258-1261.

Westphal, R.S., Coffee, R.L., Marotta, A., Pelech, S.L., and Wadzinski, B.E. (1999) Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *J. Biol. Chem.* **274** 687-692.

Yamashita, T., Inui, S., Maeda, K., Ding, R.H., Takagi, K., and Sakaguchi, N. (2005) The heterodimer of $\alpha 4$ and PP2Ac is associated with S6 kinase1 in B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 439-445.

Yukawa, K., Tanaka, T., Toyomi, A., Tsuji, S., Akira, S., and Iso, H. (2000) Impaired water-maze performance in mice lacking transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein β . *Neurosci. Res. Commun.* **26**, 59-67.

Zolnierowicz, S. (2000) Type 2A protein phosphatase, the complex regulator of numerous signaling pathways. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1225-1235.