

細胞内カルシウムイオン作用機構に関する細胞生物学的研究 — 遺伝子発現調節作用とインスリン分泌における役割 —

熊本大学医学部薬理学第一講座 教授 宮本英七
 助教授 福永浩司
 講師 山本秀幸
 笠原二郎

I. はじめに

1. 細胞内カルシウム・ホメオスタシス

牛乳は人体に必要なカルシウムを補給する重要な栄養源である。生体内に存在するカルシウムは、そのほとんどが、骨や歯などの硬組織に沈着している。イオンとして存在しているカルシウムは、硬組織の量に比較すると少ないが、生体内で重要な役割を担っている。骨組織など硬組織と血漿内

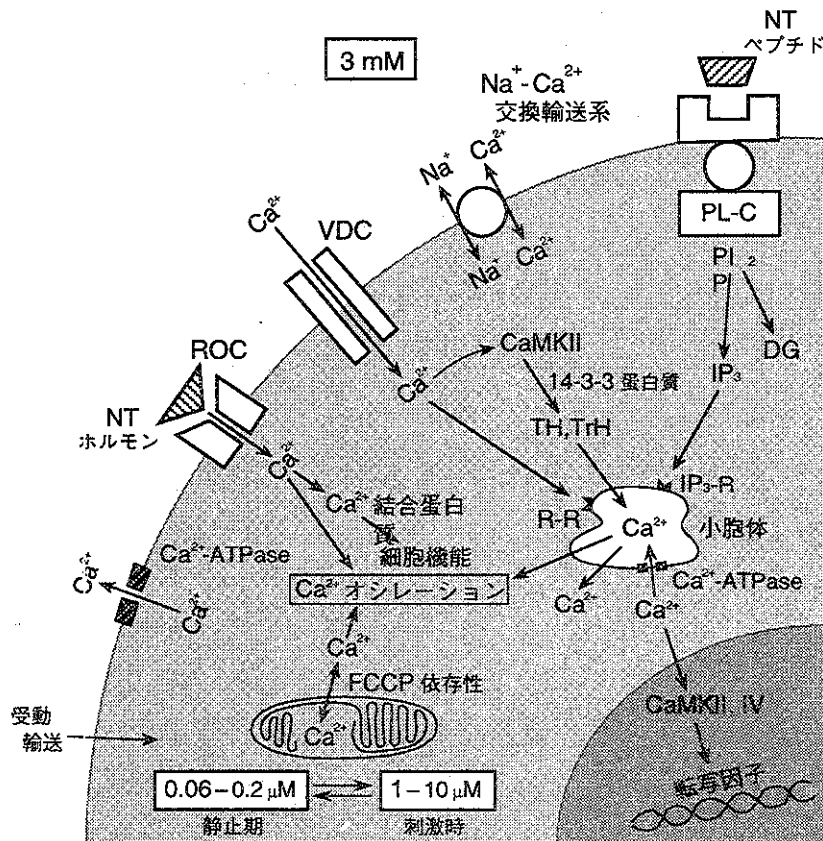


図1. 細胞内Ca²⁺ホメオスタシス

CaMKII, IV; CaMキナーゼ II, IV, DG; ジアシルグリセロール, FCCP; カルボニルシアニドp-トリフルオロメトキシフェニルヒドラゾン, IP₃; イノシトール1,4,5-三リン酸, IP₃R; IP₃受容体, NT; 神経伝達物質, PIP₂; ホスホイノシチド三リン酸, PLC; ホスホリパーゼC, ROC; 受容体作動性Ca²⁺チャネル, R-R; リアノジン受容体, TH; チロシン水酸化酵素, TrH; トリプトファン水酸化酵素, VOC; 電位依存性Ca²⁺チャネル

濃度のバランスおよび細胞外と細胞内濃度の維持によって、生体内でのカルシウムホメオスタシスは保持されている。血漿中など細胞外カルシウムイオン(Ca²⁺)濃度は、全身の細胞種を問わず、約3mMに維持されている(図1)。一方、細胞内Ca²⁺濃度は細胞の静止時において10⁻⁸~10⁻⁷Mに維持され、細胞内外の濃度差は、10,000~100,000倍にも達している。細胞質へのCa²⁺濃度を上昇させるCa²⁺動員経路にはいくつかのものが知られている。NMDAグルタミン酸受容体に見られるような受容体そのものがCa²⁺チャネルを形成している。形質膜に存在している電位依存性Ca²⁺チャネルによって、細胞外から

Ca²⁺を流入させる。形質膜には、Ca²⁺とNa⁺との交換系があり、受動輸送によってもCa²⁺流入をおこす。さらに、細胞内には、小胞体がCa²⁺貯蔵部位を形成し、IP₃刺激、Ca²⁺刺激によって、それぞれ、IP₃受容体、リアノジン受容体が細胞質にCa²⁺を遊離させる。これらの反応によって、細胞内Ca²⁺濃度は10⁻⁶~10⁻⁵Mレベルに上昇する。

一方、細胞内で上昇したCa²⁺は直ちに、Ca²⁺排出機構が作動し始め、Ca²⁺濃度を元のレベルに戻す。Ca²⁺動員機構が主としてチャネルに対し、Ca²⁺排出機構はポンプである。形質膜、小胞体膜に存在しているCa²⁺、Mg²⁺-ATPaseはポンプとして、細胞質内のCa²⁺排出に役立っている。形質膜には、動員の時とは逆方向のCa²⁺-Na⁺交換系が作動し、Ca²⁺を排出させる。

ミトコンドリアは、細胞質のCa²⁺濃度が上昇すると、トランスポーターによって取り込み、濃度が減少すると細胞質内に放出する。

細胞質へのCa²⁺の動員、排出機構は表1のようにまとめることができる。

表1 細胞質へのCa ²⁺ 動員、排出機構		
	Ca ²⁺ 動員	Ca ²⁺ 排出
1. 形質膜	a) 受容体構成Ca ²⁺ チャネル b) 電位依存性Ca ²⁺ チャネル c) Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送系	a) Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase (Ca ²⁺ ポンプ) b) Na ⁺ -Ca ²⁺ 交換輸送系
2. 細胞内貯蔵部位		
1) 小胞体	a) IP ₃ 受容体 b) リアノジン受容体	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -ATPase (Ca ²⁺ ポンプ)
2) ミトコンドリア	Ca ²⁺ トランスポーター	Ca ²⁺ トランスポーター

2. Ca²⁺の関与する細胞機能とCa²⁺シグナリングにおけるCa²⁺/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMキナーゼII) の役割

Ca²⁺の関与する細胞機能は多岐にわたっている(表2)。

細胞内Ca²⁺作用は、Ca²⁺結合蛋白質を介して行なわれている。カルモデュリン(CaM)はCa²⁺結合蛋白質の一つで、Ca²⁺を介する多様な細胞機能に広く関与していると考えられている。Ca²⁺を介する細胞機能は多岐にわたっている。また、その中でCa²⁺/CaMを介する細胞機能も多様である。Ca²⁺を介する作用の中で、プロテインキナーゼを活性化する反応は、多くの細胞機能に関与している(表3)。プロテインキナーゼCのあるものは、Ca²⁺によって活性化され、CaM非依存性で

表2. Ca²⁺の関与する細胞機能

- 1) 刺激・分泌共役 (ホルモン分泌、神経伝達物質放出)
- 2) 刺激・収縮共役 (筋収縮)
- 3) 神経伝達物質の生合成
- 4) 細胞の形態、運動性
- 5) 軸索流
- 6) シナプスの可塑性
- 7) 遺伝子発現
- 8) 受精
- 9) 種々の代謝反応

ある。多くのプロテインキナーゼは $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性であり、その中には、ミオシン軽鎖キナーゼ、ホスホリラーゼキナーゼ、CaMキナーゼI~IVが知られている。

私達は、長年にわたりCaMキナーゼIIについて研究してきた。本酵素は、 10^{-9}M レベルのCaM存在下に 10^{-6}M Ca^{2+} によって活性化される。この濃度の Ca^{2+} は、細胞刺激を受けたときに細胞内に上昇するものであり、酵素を活性化するのに十分な値である。私達は、神経細胞初代培養系、継代培養系、がん細胞系、組織切片などを用い、ホルモン、神経伝達物質、細胞増殖因子などの細胞刺激によって、細胞質に上昇する Ca^{2+} のCaMキナーゼII活性化反応を調べてきた。さらに、酵素の活性化反応に伴って細胞機能が惹起されるいくつかの知見を報告してきた。

本酵素は基質特異性が広く、多様な Ca^{2+} を介する反応に関与すると報告されている。神経伝達物質の放出ホルモン分泌には、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須である。細胞内での標的分子については十分な解明が進んでいない。

表3. Ca^{2+} によって活性化されるプロテインキナーゼ

1. Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ
プロテインキナーゼC (cPKC)
2. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼ
 - a. ミオシン軽鎖キナーゼ
 - b. ホスホリラーゼキナーゼ
 - c. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼI~IV
(CaMキナーゼI~IV)

グルタミン酸受容体は、細胞内カルシウム濃度を上昇させることにより、神経細胞死やシナプス伝達長期増強などに重要な役割を果たしていることが知られている。私達はこれまでに、ニューロン、アストロサイトを用いて、グルタミン酸受容体刺激によるCaMキナーゼII活性化反応を明らかにしてきた。最近、転写調節因子の一つである(CAAT/エンハンサー結合蛋白質(C/EBP)がCaMキナーゼIIによって磷酸化を受けることが報告された。本研究では、培養アストロサイトにおいてグルタミン酸受容体刺激によるC/EBPの発現調節および磷酸化反応を検索し、CaMキナーゼIIの関与を検討した。

本研究ではさらに、刺激-分泌共役を果たす Ca^{2+} の役割を明らかにする目的で、インスリン分泌へのCaMキナーゼIIの関与について調べた。シナプシンI様蛋白質(SILP)がMIN6細胞に存在することを見出し、CaMキナーゼIIによる磷酸化反応がインスリン分泌と密接に関連していることを示した。このことは、CaMキナーゼIIがシナプシンIの磷酸化反応を介して、インスリン分泌に関与していることを示唆している。シナプシンIが、プロテインホスファターゼ2B(PP2B)によって脱磷酸化されることはすでに報告されているが、PP2Bがインスリン分泌反応に関与しているかどうか不明であった。PP2Bの特異的阻害剤であるサイクロスポリンA(CsA)を用いて調べる実験において、

MIN6細胞に存在するPP2Bを阻害すると、分泌刺激因子依存性インスリン分泌を増強し、SILP磷酸化反応と相関していることが明らかになった。

II. 実験方法

1. ラット大脳からのアストロサイト調製法

培養アストロサイトは、McCarthyとde Vellisの方法に従い、生後第1日目のウイスターラット大脳から調製した。得られた大脳皮質から機械的方法により細胞を分離し、75-cm²フラスコに培養液と共に入れた。培養は37℃、95%空気、5%CO₂の下で行なった。7~8日培養後、振盪することで、アストロサイト以外の細胞を取り除いた。アストロサイトは、35-mmか60-mmディッシュに移し、さらに4~5日間培養した。組織化学法で調べると、この時点で、95%以上の細胞はグリア線維性酸性蛋白質に陽性であり、神経細胞の混入を認めなかった。

2. 間接免疫蛍光抗体法

培養アストロサイトの間接免疫抗体法は既報の方法により行なった。細胞を3.7%ホルムアルデヒドにより固定し、0.05%トリトンX-100を含むTBSで処理した。非特異的結合は、2.5%BSA処理により除去した。それぞれ、脳CaMキナーゼII抗体およびC/EBP抗体と終夜インキュベートした。細胞はさらに、フルオレシニン(fluorescein)結合ヤギ抗家兎IgGとインキュベートした。細胞の洗滌後、蛍光顕微鏡にて観察した。

3. イムノブロット法

培養アストロサイトを緩衝液を加えて回収し、遠心沈殿した。沈殿した細胞を可溶化した。蛋白質濃度を測定し、一定量の分画をSDS-PAGEに展開し、既報の方法によりイムノブロット分析を行なった。

4. 細胞の [³²P] オルトリン酸によるラベル法

PKCによるC/EBPのリン酸化反応を除去するために、培養アストロサイトを100nM TPA、13時間インキュベートし、PKCをダウン調節した。TPA処理した培養アストロサイトを [³²P] オルトリン酸と5時間、プレインキュベートし、ATPプールをラベルした。刺激因子によって細胞刺激後、培養液を可及的速やかに吸収し、液体窒素にて凍結した。凍結細胞をディッシュから掻き取り、0.5%トリトンX-100を含む緩衝液にて可溶化した。遠心沈殿後、上清分画に、抗CaMキナーゼII抗体、続いて、抗C/EBP抗体を加え、免疫沈殿した。沈殿物を遠心沈殿にて回収し、SDS化した後、SDS-PAGEにて電気泳動を行なって分析した。

5. マウスインスリノーマMIN6細胞

サルウイルス40T抗原をインスリンプロモーターに結合させ、受精卵に注入してトランスジェニックマウスを作製した。マウスβ細胞株インスリノーマMIN6細胞を得た。本細胞は、グルコースに反応してインスリン分泌を示し、インスリン分泌機構を検索する細胞系として適当と考えられた。

MIN6細胞は、25mMグルコース、50IU/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシン、2μMメルカ

プトエタノール、15%熱不活性化仔ウシ血清を添加したDMEM培養液を用いて培養した。

培養後、MIN6細胞は、128mM NaCl、5mM KCl、2.7mM CaCl₂、1.2mM MgSO₄、1mM Na₂HPO₄、20mM HEPES (pH7.4)、3mMグルコースを含むKrebs-Ringer HEPES (KRH)とインキュベイトした。インキュベイト後、対照群（無添加）および種々の分泌刺激因子添加群で効果を調べた。培養液は分泌されたインスリン濃度を測定し、細胞沈殿物は、CaMキナーゼII活性測定のために用いた。

6. MIN6細胞の[³²P]正燐酸によるラベル法

MIN6細胞を燐酸、血清を含まないDMEMで洗滌後、[³²P]正燐酸 (0.2mCi/ml) を含む培養液で5時間インキュベイトした。5時間後、細胞をKRHで洗い、さらに30分間KRHとインキュベイトした。続いて、細胞を対照群（無添加）および分泌刺激物質添加群に分けての効果を調べた。抗シナプシンI抗体、抗CaMキナーゼII抗体を用いて免疫沈殿し、基質蛋白質燐酸化反応およびCaMキナーゼII自己燐酸化反応をSDS-PAGE後のオートラジオグラフィーによって測定した。

7. [Ca²⁺]_iの測定

細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)はfura-2を細胞に負荷した後、発する蛍光を340および380nmで測定し、標準液濃度に基づいて[Ca²⁺]_iを算出した。

8. インスリン測定

MIN6細胞培養液に分泌されたインスリンはRIA (radioimmunoassay)法によって測定した。

9. プロテインホスファターゼ(PP)活性測定

MIN6細胞を25mMグルコース存在下、種々の濃度のCsAと60分間インキュベイトした。インキュベーション後、培養液を取り除き、細胞を液体窒素上で凍結させた。ついで、細胞は、0.1mMロイペプチン、75μMペプスタチンA、50μg/mlトリプシン阻害剤、1mM DTTと超音波を用いてホモジェナイズし、遠心沈殿して細胞抽出物を得、PP2B活性測定のために用いた。

PP活性測定には、³²P-ラベルしたカゼインを基質として用い、50mM HEPEE (pH7.5)、1mg/ml BSA、1mM DTT、1mM CaCl₂、3μMカルモデュリン、100nMカリクリンAを加え、25μlの総量で行なった。PP2B活性は、トリフルオペラジン(TFP)存在、非存在下で測定された活性の差とした。反応時間は10分であった。

10. RNAブロッティング

総RNAは、ラット脳、マウス脳、MIN6細胞から、酸性グアニジニウムチオシアネート-フェノールクロロホルムによって抽出した。ラットカルシニューリンA、Bに対するcDNAを用いた。5~20μg総RNAをホルムアルデヒドで変性させ、1%アガロースゲル上で電気泳動し、ナイロン膜にトランスファーした。ハイブリダイゼーションは、³²PラベルしたcDNAプローブで行なった。ナイロン膜をまず10分間洗滌後、55°C、60°C、65°Cで1時間洗滌した後、オートラジオグラフィーを行なった。

Ⅲ. 結 果

1. 免疫蛍光抗体法による培養アストロサイトにおけるCaMキナーゼⅡ局在部位

図2は、培養アストロサイトの位相差顕微鏡所見と抗CaMキナーゼⅡ抗体による免疫蛍光顕微鏡所見を示している。CaMキナーゼⅡは細胞内において、細胞質と核の両方に存在している。細胞質での免疫染色性は比較的弱く、核周囲に強い(図2B)。強い免疫反応性は核に認められた(図2B)。強拡大にて、核における免疫染色性を調べると、CaMキナーゼⅡは核マトリックスに存在し、核小体に結合していた(図2D)。また、強い免疫染色性は、紡錘系中心節(図2D、矢印)に観察された。免疫蛍光は、非免疫家兎IgG(図2E)およびあらかじめ精製したCaMキナーゼⅡで処理した抗体(図2F)では観察されなかった。このことは、免疫染色が特異的反応であることを示している。

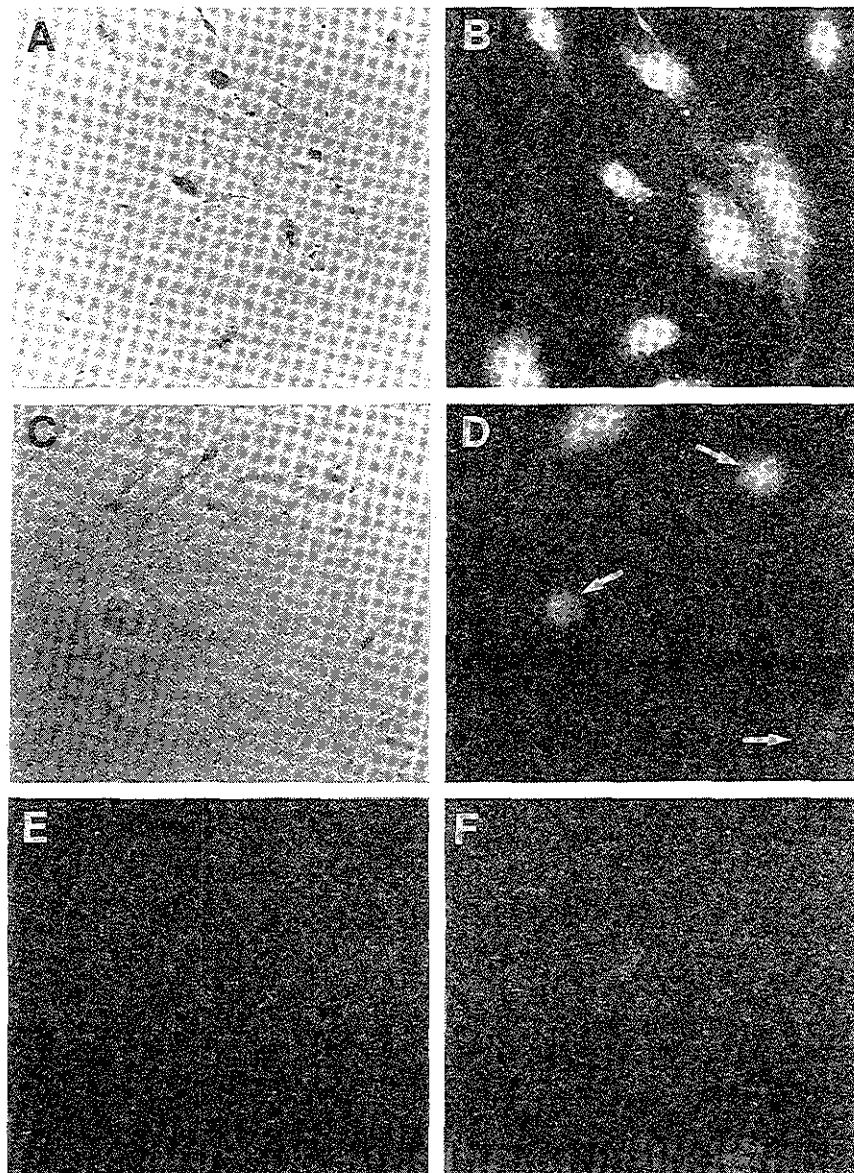


図2. 培養アストロサイトにおけるCaMキナーゼⅡの免疫蛍光局在部位

A、C; 位相差顕微鏡所見

B、D; 精製抗CaMキナーゼⅡ抗体による免疫蛍光

E; 非免疫家兎IgG、F; 精製CaMキナーゼⅡ処理抗体による免疫蛍光

2. C/EBP蛋白質の培養アストロサイトにおける存在と同定

間接免疫蛍光抗体法を用いて、培養アストロサイトにおけるC/EBP蛋白質の存在と分布を調べた。図3は、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ に対する抗体を用いて検索した位相差顕微鏡所見と免疫蛍光顕微鏡所見を示している。C/EBP α 免疫反応性はアストロサイトには観察されなかった。C/EBP β 、C/EBP δ に対する強い免疫染色性が、アストロサイトの特に核に強く観察され、細胞質では弱かった。非免疫家兎IgGやC/EBPであらかじめ吸収処理を行なった抗体では免疫蛍光は観察されず、反応の特異性を示していた。

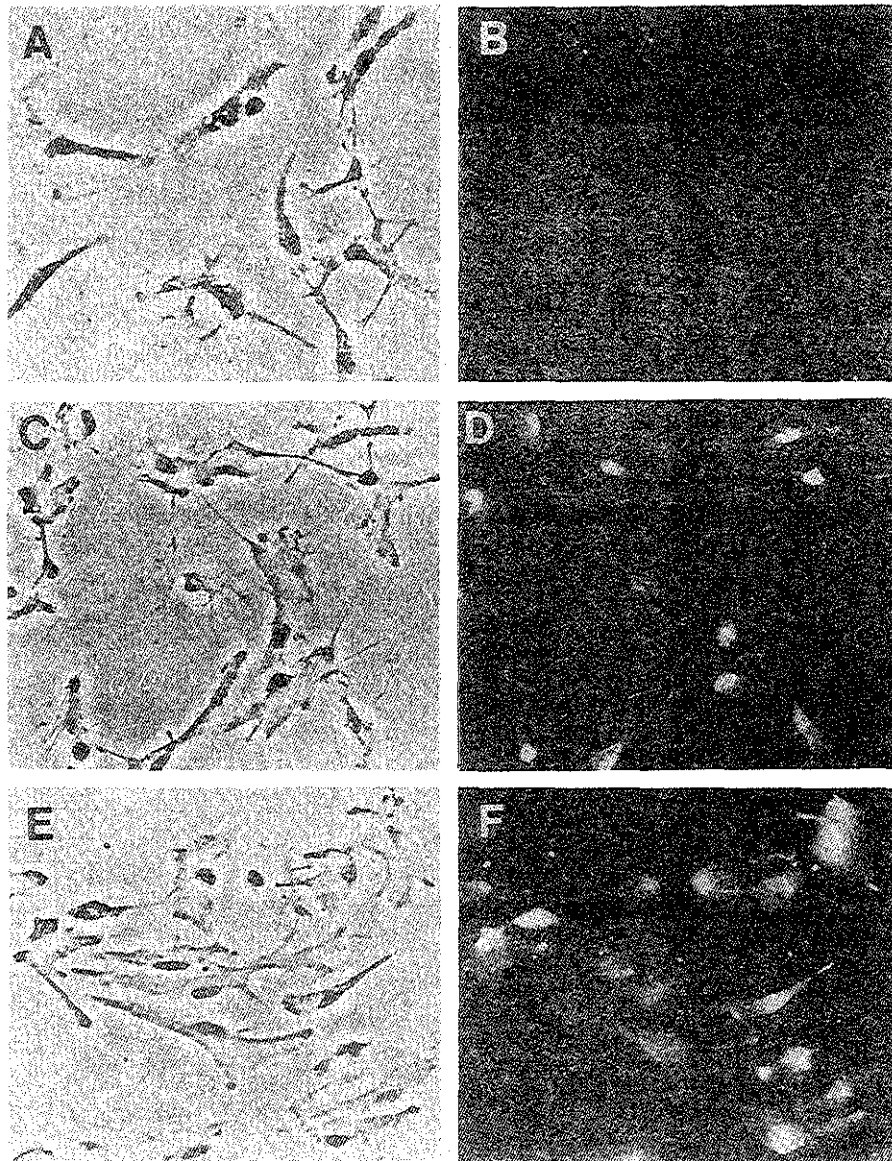


図3. 培養アストロサイトにおけるC/EBP局在部位

A, C, E; 位相差顕微鏡所見

B, D, F; それぞれ抗C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ 抗体を用いての免疫蛍光

免疫組織化学法による検索はイムノブロッティング法によって確認された。アストロサイト(A)には、C/EBP β 、C/EBP δ が存在しているが、C/EBP α は検出されなかった。対照として用いた肝臓

(L)では、C/EBP α 、C/EBP β が存在していたが、C/EBP δ は検出されなかった(図4)。

3. C/EBPのmRNAと蛋白質発現に対するグルタミン酸刺激の効果

培養アストロサイトをを用いて、グルタミン酸刺激によるC/EBP mRNAレベルに対する効果を調べた(図5)。時間的経過で、C/EBP β とC/EBP δ に変化がみられ、C/EBP α は上述のとおり存在していなかった(図5A)。図5Aで得られたデータを統計的処理すると(図5B)、C/EBP β mRNAはグルタミン酸刺激後、約60分で220%まで増加し、以後減少して元のレベルに戻った。一方、C/EBP δ は、グルタミン酸刺激によって減少し始め、120分で最低のレベルとなり、以後、徐々に回復し、12時間で元のレベルに戻った。

グルタミン酸濃度の効果を調べると、C/EBP β mRNA増加には、500 μ Mで最高の刺激効果が得られた。

グルタミン酸による培養アストロサイト刺激によって、C/EBP mRNAの変化が認められたことから、C/EBP蛋白質レベルへの効果を調べた。図6Aに示すように、グルタミン酸刺激によってC/EBP β レベルは増加し、C/EBP δ は減少した。得られたデータを統計的処理によって要約すると、有意にC/EBP β は増加し(刺激後2時間)、C/EBP δ は減少した(刺激後6時間)。このことは、mRNA

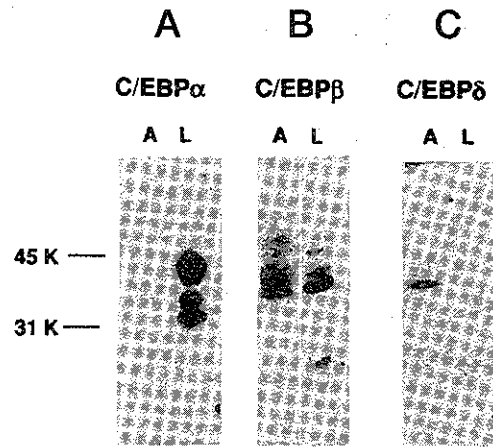


図4. 培養アストロサイトにおけるC/EBPのイムノブロット

A; アストロサイト、L; 肝臓

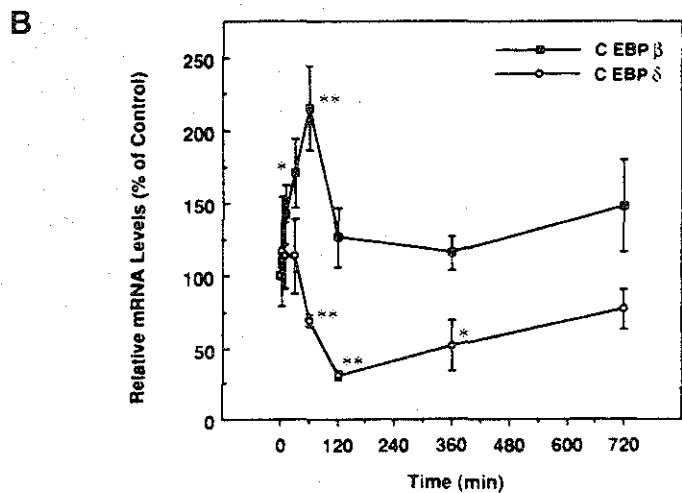
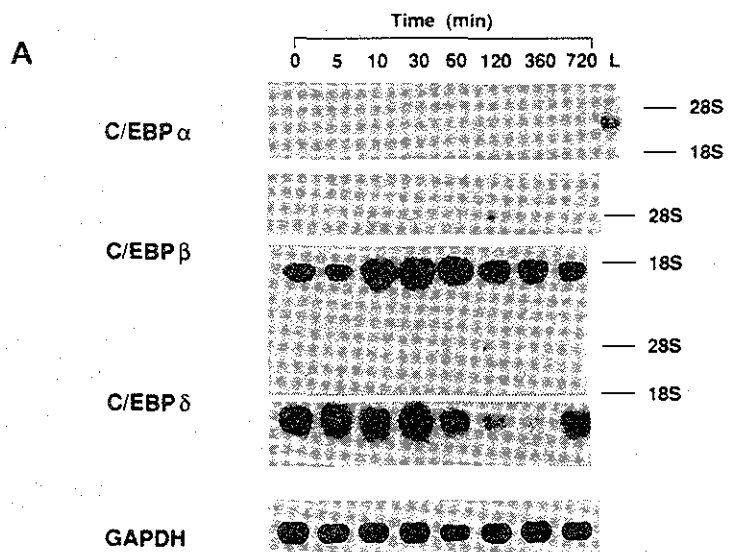


図5. C/EBP mRNAレベルに対するグルタミン酸刺激効果

A; C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、GAPDH (対照) のDNAプローブによるmRNAの変化、L、肝臓

変化に伴って蛋白質レベルが変動していることを示している。

4. C/EBPのDNA結合活性に対するグルタミン酸刺激効果

培養アストロサイトをグルタミン酸刺激後、C/EBP DNA結合活性が変化するかどうかゲルシフト測定法を用いて調べた。DNAプローブとして、C/EBPが結合することの知られている二重らせんオリゴヌクレオチドを用いた。グルタミン酸刺激後、2時間、6時間でDNA結合蛋白質が認められた。過剰のラベルしていないプローブを添加すると、結合蛋白質バンドは消失した。さらに、反応液をあらかじめ、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ の抗体で処理しておく、C/EBP β 、C/EBP δ では結合蛋白質バンドが消失し、上部に移行した。C/EBP α では変化を認めなかった。このことは、グルタミン酸刺激によって、培養アストロサイトにおけるC/EBP DNA結合活性の上昇していることを示している。

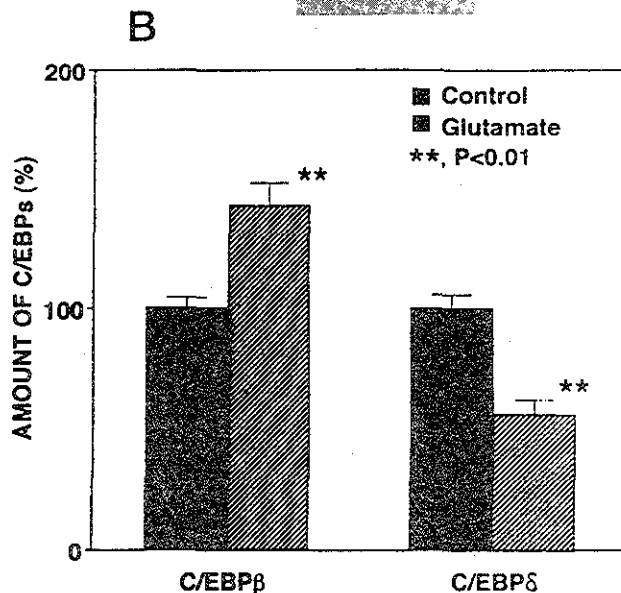
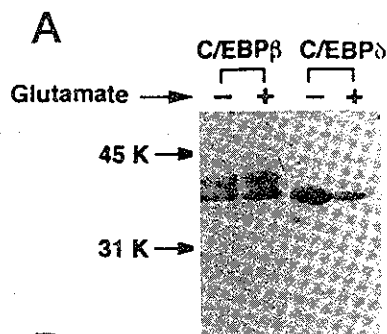


図6. グルタミン酸刺激によるC/EBP蛋白質レベルに対する効果

A; ウェスタンブロット分析
B; データを統計的処理した値を示す。
**P<0.01 (対照に対して)

5. グルタミン酸刺激によるCaMキナーゼII自己リン酸化反応とC/EBP β リン酸化反応の上昇

あらかじめ、培養アストロサイトを13時間、100nM TPAで処理し、PKCの効果を除去した。PKC活性の消失した細胞を [32 P] オルトリン酸で5時間ラベルした。このように処理した細胞を用い、グルタミン酸刺激を行なった(図7)。免疫沈降法によって、CaMキナーゼII、C/EBP β を特異的に検索した。グルタミン酸刺激(G)後5分で、CaMキナーゼII自己リン酸化反応、C/EBP β リン酸化反応が上昇していた(図7A)。細胞内Ca $^{2+}$ キレーターであるBAPTA-AM(B)で細胞を処理しておく、その上昇は阻害された。図7Bは得られたデータを統計的処理をして要約したものである。グルタミン酸刺激によって、CaMキナーゼII自己リン酸化反応とC/EBP β リン酸化反応は有意に上昇し、BAPTA-AM処理により、完全に阻害された。このことは、グルタミン酸刺激によって細胞内にCa $^{2+}$ が流入し、CaMキナーゼIIが活性化される。続いて、C/EBP β がリン酸化されることを示唆している。

6. MIN6細胞におけるCaMキナーゼIIの同定

MIN6細胞からCaMキナーゼIIを既報の方法に従い、部分的に精製した。部分精製したキナーゼが確かにCaMキナーゼIIであることを次の方法によって調べた。a) ラット脳CaMキナーゼIIに対

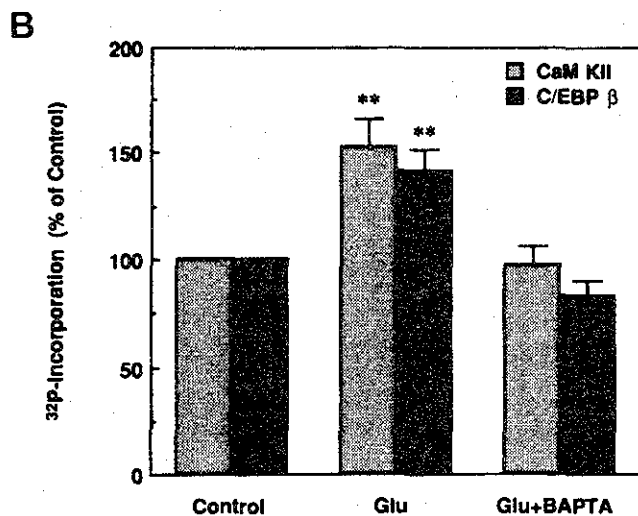
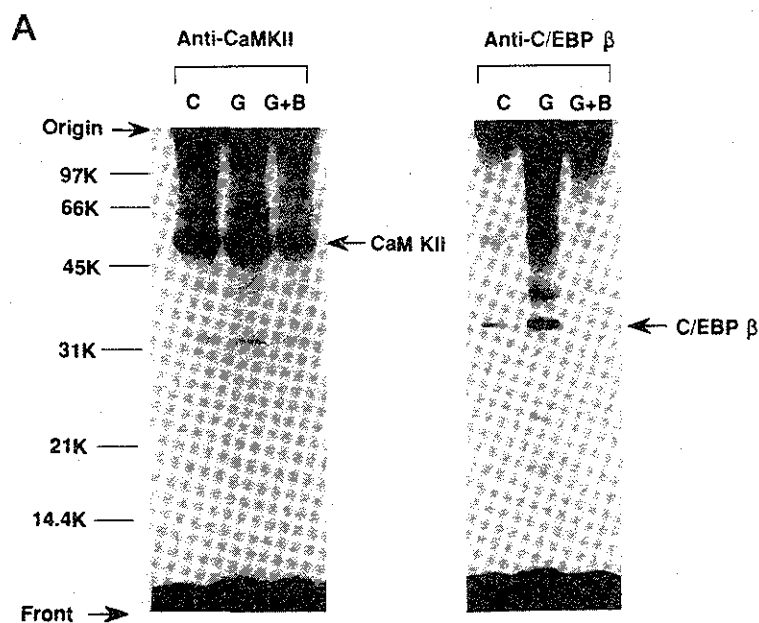


図7. グルタミン酸刺激によるCaMキナーゼII自己リン酸化反応とC/EBPβリン酸化反応に対する効果

A; CaMキナーゼII (CaMKII)自己リン酸化反応とC/EBPβリン酸化反応を示すオートラジオグラフ、C、対照;G、グルタミン酸;B、BAPTA-AM
 B; データを統計的処理した値を示す。** $P < 0.01$ (対照に対して)

する抗体はラット脳CaMキナーゼII α 、 β サブユニットを認識した。本抗体を用いると、MIN6細胞には55kDaバンドが検出された(図8B)。本蛋白質は、 Ca^{2+} /カルモデュリン(CaM)存在下に自己リン酸化された(図8C)。本酵素の基質を調べると、シナプシンI、MAP2、平滑筋ミオシン軽鎖、ミエリン塩基性蛋白質がリン酸化され、脳CaMキナーゼIIの良好な基質として役立つ蛋白質がリン酸化されることがわかった。これらの結果は、55kDa蛋白質がMIN6細胞に存在するCaMキナーゼIIアイソフォームであり、脳酵素と共通した性質を持っていることを示している。

7. 内因性基質の同定

MIN6細胞膜分画には、84kDa蛋白質が存在し、脳シナプシンIに対する抗体に免疫反応した。84

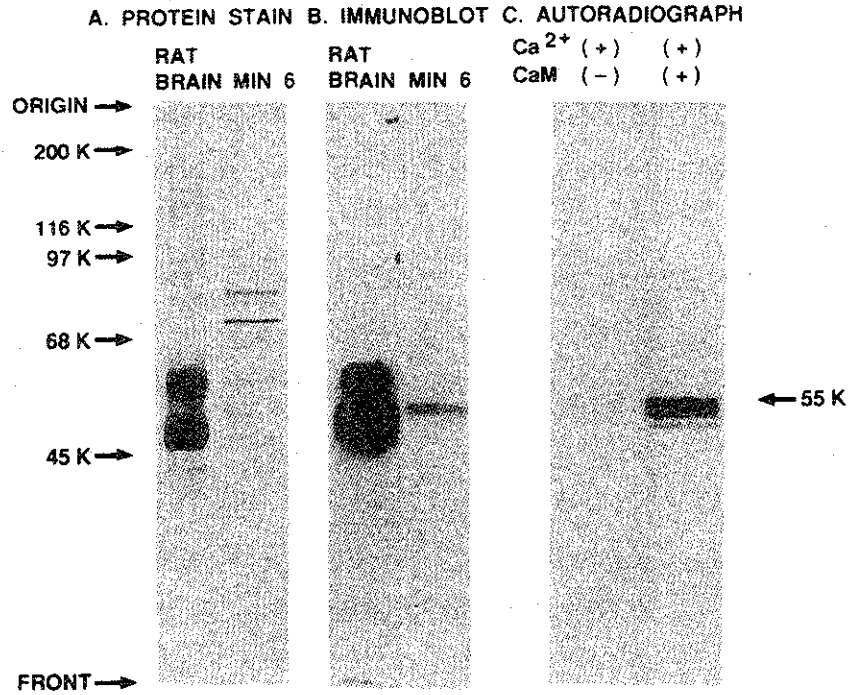


図 8. MIN6細胞に存在するCaMキナーゼIIのイムノプロットによる解析と自己磷酸化反応
MIN6細胞からの既報の方法によりCaMキナーゼIIを部分精製し、得られた酵素標本を蛋白質染色(A)、イムノプロット(B)、自己磷酸化反応(C)を調べた。

kDa蛋白質はSDS-PAGE上、脳シナプシンIa、Ibの間に移行する1バンドとしてみられた(図9 A)。本蛋白質は精製した分泌顆粒分画にも存在することがわかった(図9 A)。

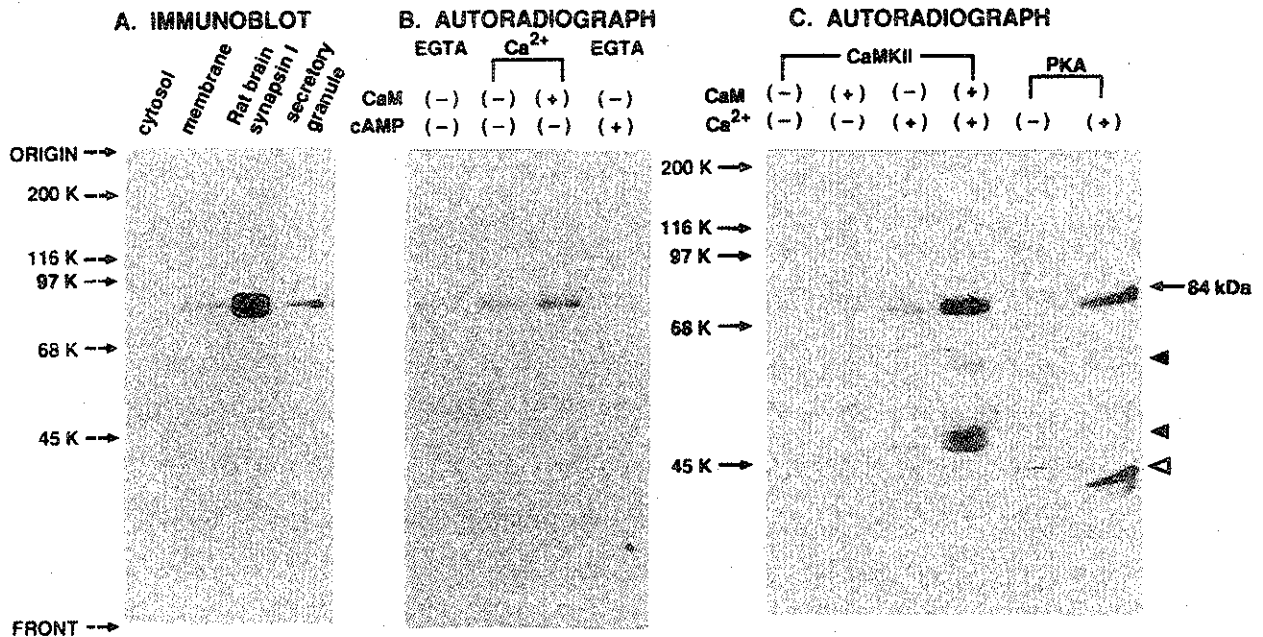


図 9. MIN6細胞から精製したシナプシンI様蛋白質(SILP)のイムノプロット分析とCa²⁺/CaM依存性磷酸化反応

- A, イムノプロット
B, 免疫沈殿した後、内因性酵素による磷酸化反応を調べた。
C, 免疫沈殿した後、外因性CaMキナーゼIIとcAMP-キナーゼ触媒サブユニットをそれぞれ添加して磷酸化反応を調べた。

細胞ホモジェネイトにCa²⁺/CaMを添加すると、84kDa蛋白質の燐酸化反応が見られた(図9B)。cAMPを添加した時には、極めてわずかな燐酸化反応しか認めなかった(図9B)。この点をより明らかにするために、MIN6細胞を可溶化し、免疫沈殿した沈殿物に別に精製したCaMキナーゼII、cAMPキナーゼ触媒サブユニットを添加して燐酸化反応を調べたところ、84kDaの蛋白質は強く燐酸化された(図9C)。

脳シナプシンIの燐酸化部位は、CaMキナーゼIIとcAMP-キナーゼの間で異なっている。黄色ブドウ球菌V8プロテアーゼで処理すると、cAMP-キナーゼとCaMキナーゼIIによる燐酸化シナプシンIからは、それぞれ10kDa(図10f)と30kDa(図10e)の部位1と2の燐酸化ペプチドが得られる。84kDa蛋白質がシナプシンIと類似していることから、cAMP-キナーゼとCaMキナーゼIIで燐酸化後、同プロテアーゼで処理したところ、それぞれ10kDa(図10d)、30kDa(図10c)の燐酸化ペプチドが得られた。このことは、84kDa蛋白質がシナプシンIに構造的に類似した蛋白質であることを示している。本蛋白質をシナプシンI様蛋白質(SILP)と名付けた。

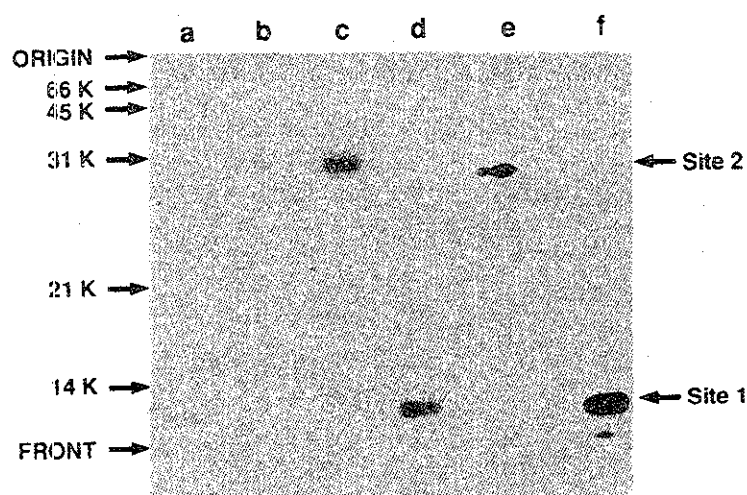


図10. SILPの燐酸化部位

MIN6細胞に存在するSILPを免疫沈殿し、CaMキナーゼIIとa)1mM EGTA;b)1mM Ca²⁺;c)1mM Ca²⁺+3µM CaMおよびd)cAMP-キナーゼ触媒によってSILPを燐酸化した後、黄色ブドウ球菌プロテアーゼで処理した。脳シナプシンIをe)CaMキナーゼII、f)cAMP-キナーゼ触媒サブユニットとインキュベートし、同様のプロテアーゼ処理をした。

8. SILPのMIN6細胞における燐酸化反応

MIN6細胞を用い、あらかじめ[³²P]正燐酸でATPプールを燐酸化した後、5µMイオノマイシン、56mM KCl、25mMグルコース、0.37mMトルブタマイドで細胞刺激した(図11)。反応後、SILPとCaMキナーゼIIを免疫沈殿し、沈殿物をSDS-PAGE、オートラジオグラフィーで分析した(図11A、B、C)。上記のインスリン分泌刺激物質はいずれもSILP燐酸化反応、CaMキナーゼII自己燐酸化反応を増強させた。図11Dは、得られたオートラジオグラフの結果をバイオイメージングアナライザーによって解析し、統計的に処理したものである。CaMキナーゼII自己燐酸化反応、SILP燐酸化反応がインスリン分泌刺激因子に反応して、有意に上昇していることがわかる。

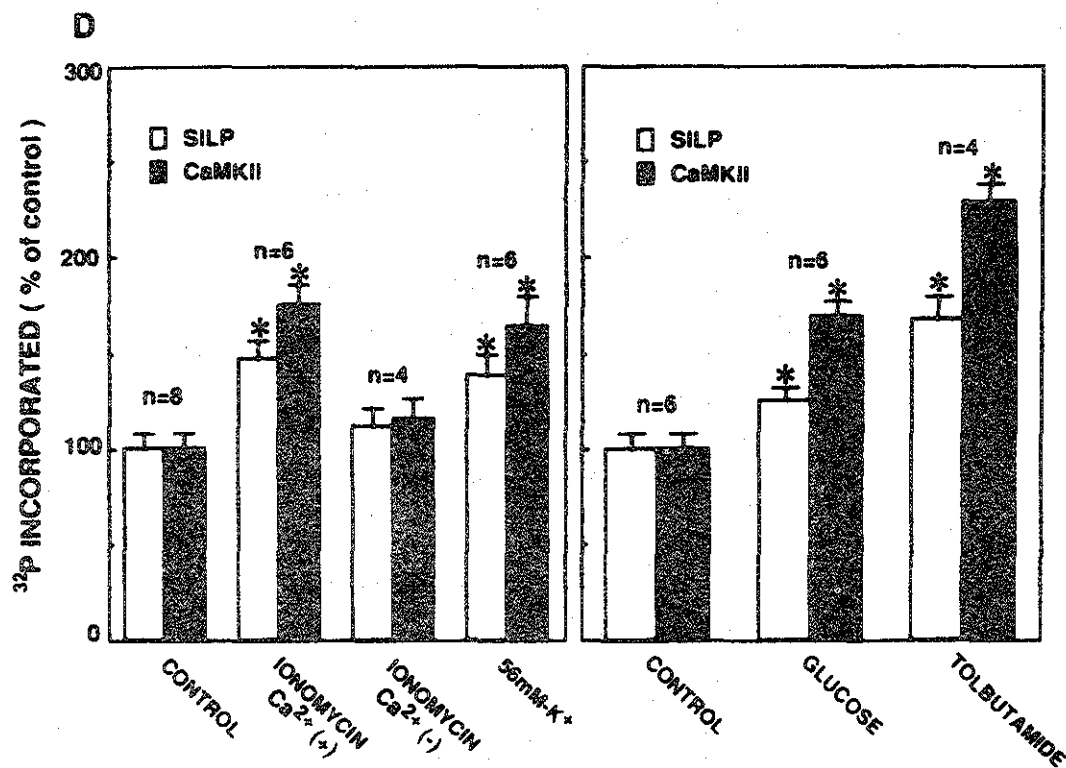
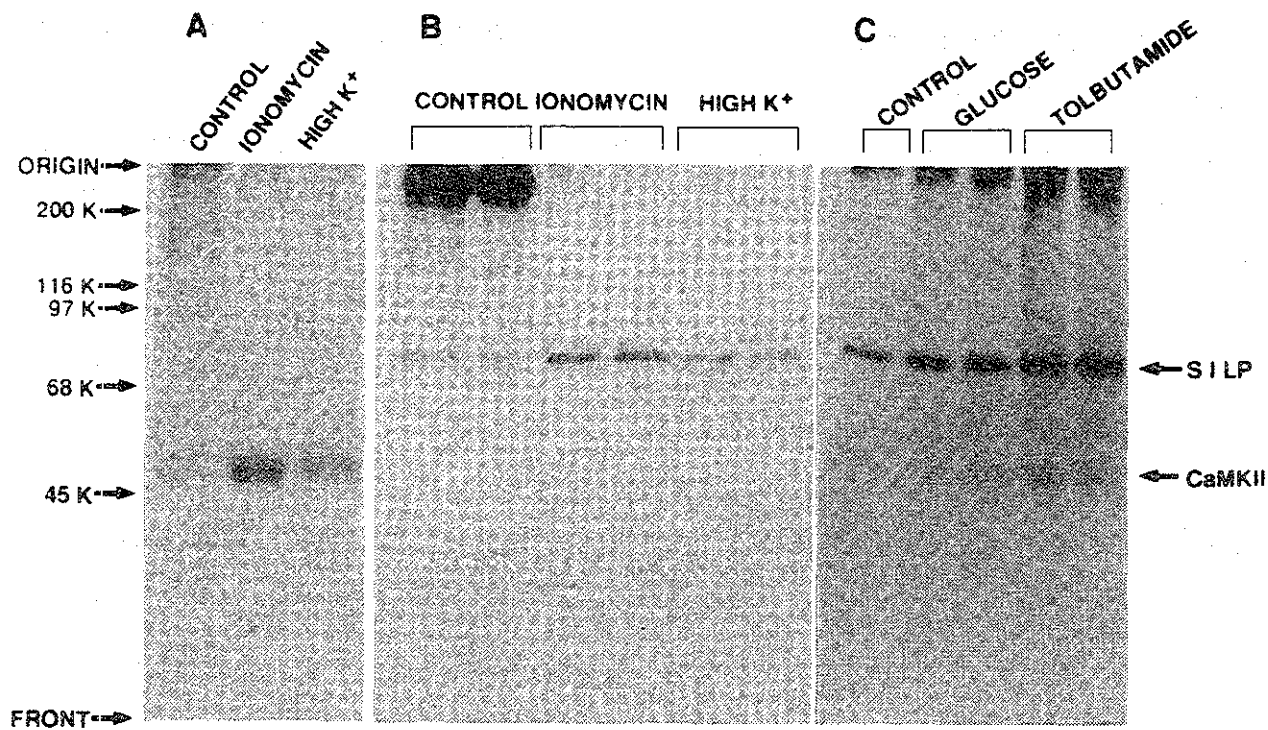


図11. MIN6細胞におけるCaMキナーゼII自己燐酸化反応とSILP燐酸化反応

MIN6細胞をあらかじめ [³²P] 正燐酸と37℃、5時間、インキュベートした。KRHで一度洗った後、KRHと30分間インキュベートし、それぞれのインスリン分泌刺激因子を添加し、3分(AとB)、10分(C)間インキュベートした。CaMキナーゼII、SILPは抗体によって免疫沈殿後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィによって分析した。

A, B, C; オートラジオグラフ

D; データの統計的処理結果、左側はA、Bのデータ、右側はCのデータ

*; P<0.01

9. $[Ca^{2+}]_i$ 、CaMキナーゼII自己リン酸化反応、SILPのリン酸化反応とインスリン分泌の時間的経過の比較

CaMキナーゼIIがインスリン分泌に果たす役割をさらに検索するために、種々の分泌刺激因子による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$)、CaMキナーゼII自己リン酸化反応、SILPリン酸化反応の経時的変化を調べ、互いの相関性を検討した。

図12は、25mMグルコース、0.37mMトルブタマイド、56mM KClを投与した時に観察される $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化を示している。グルコースとトルブタマイド刺激の間に、 $[Ca^{2+}]_i$ の経時的パターンに大きな相違が認められる。グルコース投与では、 $[Ca^{2+}]_i$ が徐々に上昇していくのに対し、トルブタマイド投与では、投与直後に急激な上昇が見られ、その後、ゆっくりと減少していることがわかる。56mM KClでは、投与直後に鋭いピークを示し、一旦減少した後、徐々に増加の傾向を示している。

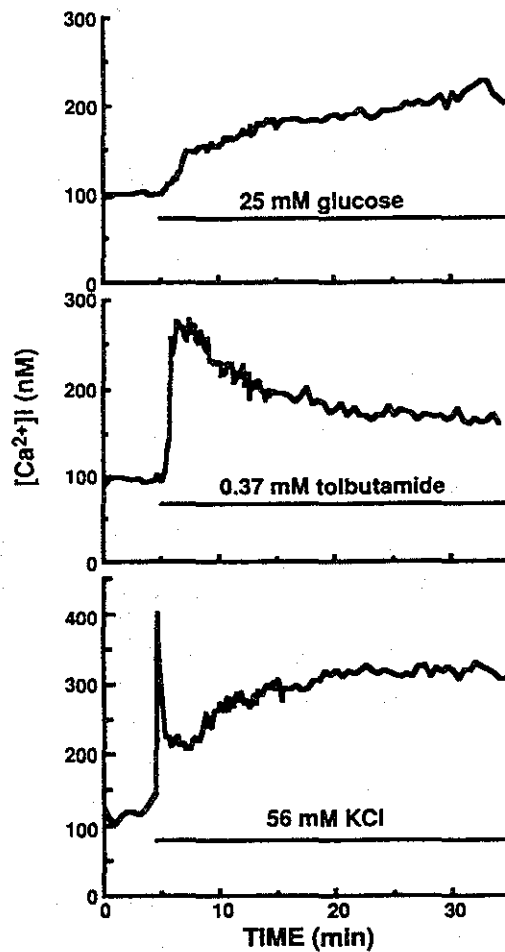


図12. インスリン分泌刺激因子添加後のMIN6細胞内 $[Ca^{2+}]_i$ の経時的変化

MIN6細胞をあらかじめfura-2とインキュベイトした後、グルコース、トルブタマイド、KClで刺激した。蛍光の強度は340nm/380nmの比で測定した。

このような経時的 $[Ca^{2+}]_i$ 変化とCaMキナーゼII自己リン酸化反応、SILPリン酸化反応、インスリン分泌の経時的変化との相関性を調べたのが図13に示されている。図13Aは、グルコース、トルブタ

マイド投与時のCaMキナーゼII自己リン酸化反応の変化をみたものである。トルブタマイド投与では、急激な自己リン酸化反応の上昇を観察し、その後徐々に減少している。グルコース投与では、投与直後の急激な上昇はみられず、ゆっくりと増加していることがわかる。

次に、SILPリン酸化反応を調べると、トルブタマイド投与では、投与直後の急激な上昇がみられたのに対し、グルコース投与では徐々に上昇していることがわかる(図13B)。それぞれのパターンは、CaMキナーゼII自己リン酸化反応のパターン(図13A)に極めて類似している。さらに、CaMキナーゼII自己リン酸化反応のパターン(図13A)、SILPリン酸化反応のパターン(図13B)が、それぞれ分泌

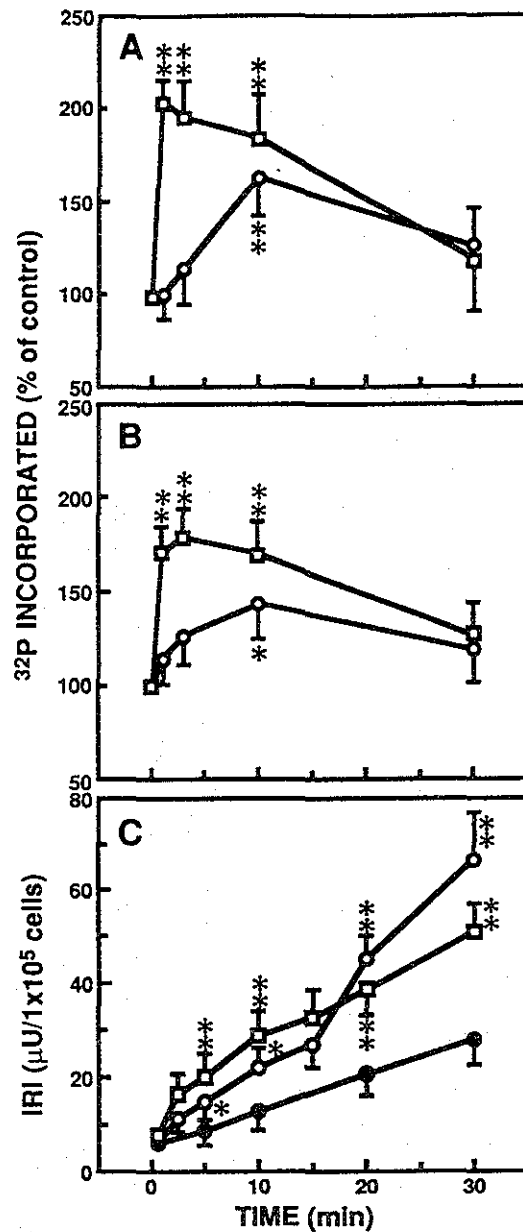


図13. MIN6細胞をトルブタマイド、グルコースによって刺激した後にみられるCaMキナーゼII自己リン酸化反応(A)、SILPリン酸化反応(B)、インスリン分泌(C)

□-□, 0.37mMトルブタマイド;
○-○, 25mMグルコース; ●-●, 対照
*, P<0.05; **, P<0.01

刺激因子を投与した時の $[Ca^{2+}]_i$ 経時的变化のパターンと相関していることが理解される。すなわち、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって、CaMキナーゼII自己燐酸化反応が惹起され、活性化されたCaMキナーゼIIがSILPを燐酸化するに至るカスケードの存在を示す結果と考えられる。

0.37mMトルブタマイド、25mMグルコース投与時のインスリン分泌の経時的变化を調べた(図13C)。トルブタマイド投与時には、インスリン分泌はグルコース投与時に比較して初期に上昇した。グルコースを投与すると、投与後15分以後にインスリン分泌が増加し、トルブタマイド投与時のレベルを超えた。インスリン分泌もまた、トルブタマイド投与時に、投与直後に急激な上昇があるのに対し、グルコース投与時には徐々に上昇していくパターンを示すことがわかった。これらの結果は、トルブタマイド、グルコースなどのインスリン分泌刺激因子を投与した際に観察される $[Ca^{2+}]_i$ 、CaMキナーゼII自己燐酸化反応、SILP燐酸化反応の経時的变化のパターンとインスリン分泌の経時的变化のパターンが極めて相関していることを示している。

10. CaMキナーゼII活性化反応とインスリン分泌との相関性

CaMキナーゼIIの Ca^{2+} /CaM非依存性活性の上昇は、自己燐酸化反応によって惹起され、酵素の活性化反応と考えられている。そこで、種々のインスリン分泌刺激因子投与後のCaMキナーゼII活性化反応(Ca^{2+} /CaM非依存性活性)とインスリン分泌の相関性を調べた(図14)。グルコース、トルブタマイド、KCl、イオノマイシン投与により、投与後10分に認められたCaMキナーゼII Ca^{2+} /CaM非依存性活性(図14A)は、同じ時間経過で測定したインスリン分泌(図14B)の程度とよく相関していることがわかる。すなわち、 Ca^{2+} /CaM非依存性活性は、上記インスリン分泌刺激因子投与によって $4.4 \pm 0.2\%$ (対照群)が $5.6 \pm 0.4\%$ 、 $8.0 \pm 0.4\%$ 、 $8.6 \pm 0.5\%$ 、 $14.2 \pm 0.6\%$ に上昇した。インスリン分泌の変化は、同じ順序で、 $13.2 \pm 1.5 \mu U / 1 \times 10^5$ 細胞(対照群)から、 17.3 ± 1.9 、 20.2 ± 1.8 、 24.8 ± 2.9 、 $33.7 \pm 2.9 \mu U / 1 \times 10^5$ 細胞に上昇した。

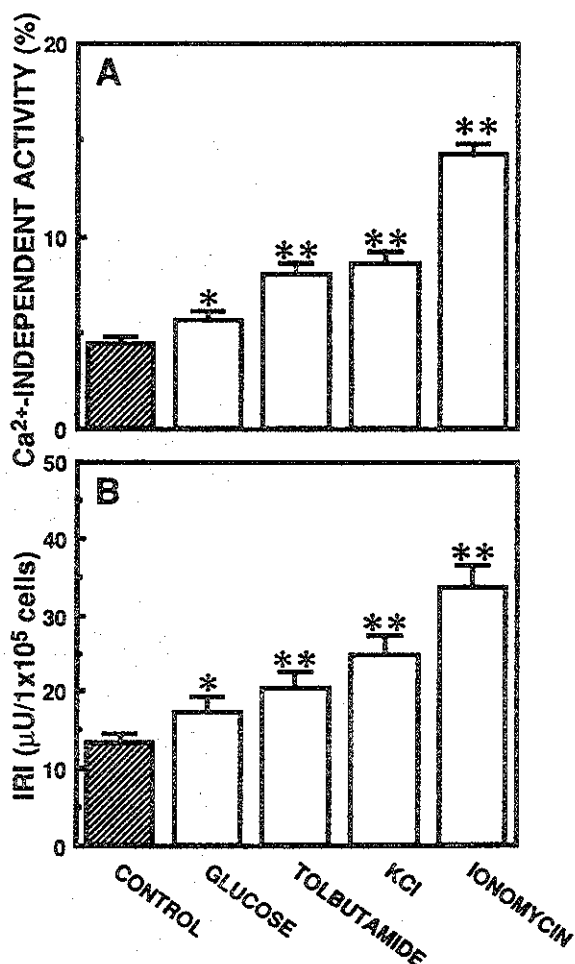


図14. MIN6細胞におけるインスリン分泌刺激因子のCaMキナーゼII非依存性活性とインスリン分泌に対する効果

MIN6細胞を、無添加(control)、25mMグルコース、0.37mMトルブタマイド、56mM KCl、5μMイオノマイシンと10分間インキュベートした後、CaMキナーゼII Ca^{2+} /CaM非依存性活性と培養液中に分泌されたインスリンを測定した。

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

11. MIN6細胞からのインスリン分泌に対するサイクロスポリンA(CsA)の効果

グルコース添加に反応してインスリン分泌をするMIN6細胞を用い、刺激因子の添加、無添加の条件下におけるインスリン分泌に対するCsAの効果調べた(図15)。3mMグルコース、25mMグルコース、0.37mMトルブタミド、56mM KClを添加して、3 μ M/CsA存在、非存在下でのインスリン分泌を測定した(図15)。3 μ Mグルコース添加では、CsAは何の効果も示さなかった。それに対して、分泌促進因子添加の条件下では、CsAはインスリン分泌をいずれも増加させた。このように、CsAは、刺激因子によって増加するインスリン分泌を増強させた。

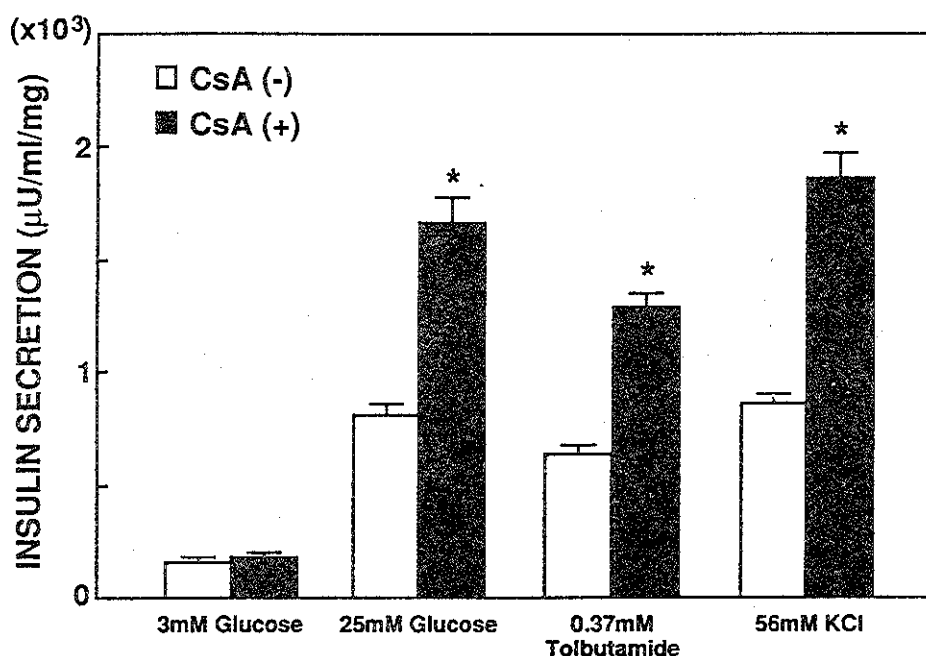


図15. インスリン分泌に対するCsAの効果

MIN6細胞は3mMグルコースと30分間あらかじめインキュベートした後、各薬物と30分間インキュベートし、培養液中に分泌されたインスリン濃度を測定した。

□, CsA無添加; ■, 3 μ M CsA

CsA効果が最適に発揮される濃度を25mMグルコース添加条件下で調べた(図16A)。図16Aから明らかのように、ED₅₀は約1.3 μ M、3 μ M CsAで最大のインスリン分泌効果が得られた。さらに、CsAのインスリン分泌増強効果は、PP2B阻害効果に基づいて発揮されているかどうか調べた(図16B)。興味深いことは、CsAの効果は、MIN6細胞培養液中に投与し、反応後、細胞をホモジェナイズして、その上清中のPP2Bを測定したときに観察されることである。すなわち、細胞系に投与されたCsAは、細胞膜を通過して細胞内に到達し、PP2Bを阻害してそのまま結合して、ホモジェナイズ後も、阻害効果が失われずに保持されることを示している。このようにして測定したCsAの効果は、IC₅₀が約0.9 μ M、最大の阻害効果は3 μ Mで得られ、インスリン分泌増強効果と密接に相関していることがわかった(図16B)。

CsAは電位依存性Ca²⁺チャネルを阻害することが報告されている。MIN6細胞からのインスリン

分泌には、電位依存性L型Ca²⁺チャンネルが重要な役割を演じていることが知られているので、蛍光を発するフラ-2を用いて、細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)を時間的経過で測定した。CsAは[Ca²⁺]_iに対し特記すべき効果を示さなかった。このことは、CsAの効果は電位依存性Ca²⁺チャンネルを介して発揮されているのではないことを示している。

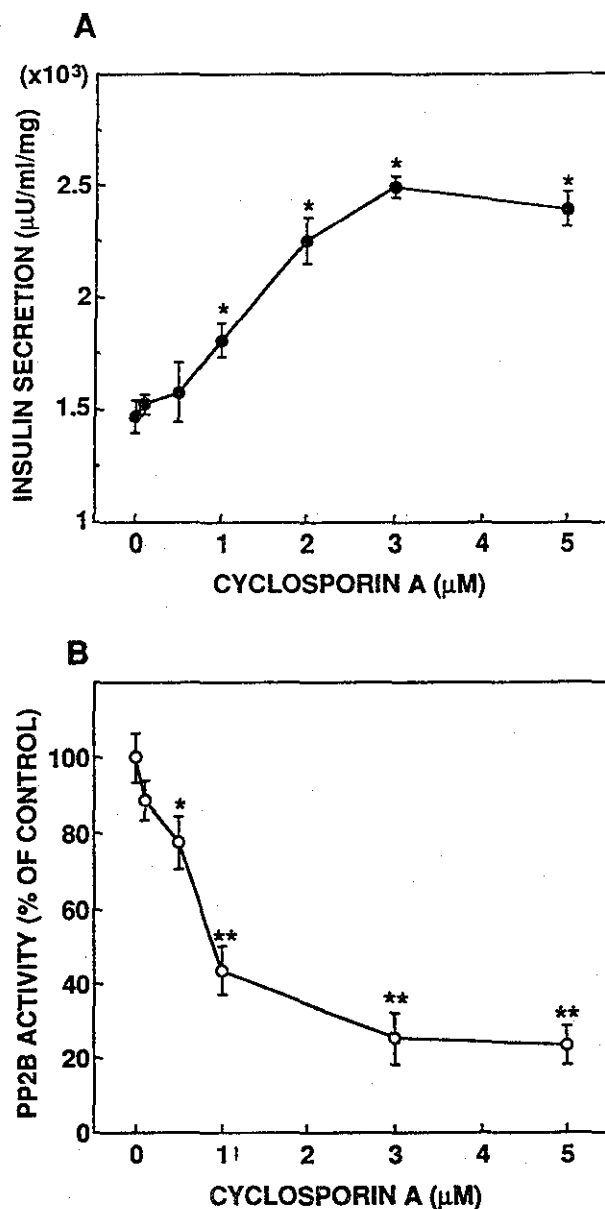


図16. グルコース刺激インスリン分泌に対するCsA濃度の増強効果とPP2B阻害効果

MIN6細胞は3mMグルコースと30分間インキュベートした後、25μMグルコースと種々の濃度のCsAと60分間インキュベートした。A) 培養液中に分泌されたインスリン濃度を測定した。B) 細胞抽出液を調製し、PP2B活性を測定した。

12. CsA存在下におけるインスリン分泌増強効果の時間的経過

25mMグルコースによって刺激されるインスリン分泌促進作用に対するCsA効果の時間的経過を調べた(図17)。CsAは、反応後10分以内には効果を示さなかったが、反応後10分以後には、対照に

比較して有意な増強効果を示した(図17)。刺激効果は、30分から120分まで、ほとんど変わらなかった。これらの結果は、CsAがグルコースによるインスリン分泌促進作用の第1相には効果を持たず、第2相に対して増強作用を持つことを示している。

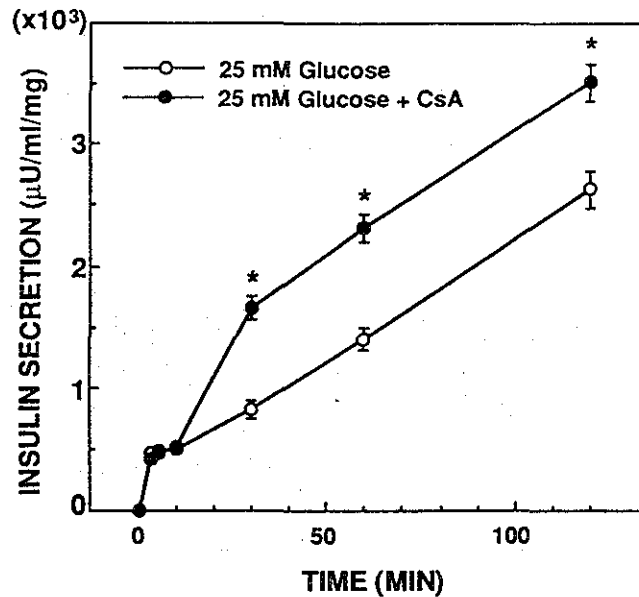


図17. CsA添加、無添加におけるグルコース刺激インスリン分泌の時間的経過

MIN6細胞を25mMグルコース存在下、CsA無添加、3mMとインキュベートし、培養液中インスリン濃度を測定した。

*, P<0.01

13. CsAのCaMキナーゼII自己リン酸化反応とSILPリン酸化反応に対する効果

グルコースによるインスリン分泌反応に対するCsAの増強効果の仲介因子を調べるために、CaMキナーゼII自己リン酸化反応、SILPとMARCKSリン酸化反応を調べた(図18)。CaMキナーゼII自己リン酸化反応とSILPリン酸化反応は、グルコース添加により増加し、CsAはグルコースによる増加作用をさらに増強させた(図18A)。それに対しMARCKSリン酸化反応はCsAによる増強作用を認めなかった(図18B)。CaMキナーゼII自己リン酸化反応とSILPリン酸化反応を時間的経過の中で調べると、反応30分で最大を示し、60分ではまだ有意な高値を示したが、30分に比較して両者ともに減少した(図18C)。

神経細胞においては、シナプシンIはシナプス小胞に結合し、神経伝達物質放出に関与している。N末端側にAキナーゼによるリン酸化部位(部位I)、C末端側に2ヶ所のCaMキナーゼIIリン酸化部位(部位II)を持っていることが知られている。CsAによるSILPリン酸化反応増強効果のプロテインキナーゼの同定と意義を調べるために、リン酸化SILPを黄色ブドウ球菌V8プロテアーゼで処理後、一次元SDS-PAGEを行なって、リン酸化部位を同定した(図19)。CsAによるSILPリン酸化反応増強効果は、CaMキナーゼIIリン酸化部位である部位IIであることが明らかになった(図19A)。部位Iもわずかにリン酸化反応の増強が観察された(図19A)。さらに、部位I、IIリン酸化反応のCsAによる増強効果を

統計的に処理して要約すると図19Bに示される。部位 I、II の磷酸化反応の両方が有意に増強したが、量的には、部位 II 磷酸化反応が主に増強していることが明らかになった。

CaMキナーゼ II 脱磷酸化反応はPP2Bによって触媒されないことは明らかにされている。CaMキナーゼ II 自己磷酸化反応がCsA添加によって増強したことは、PP-1活性を阻害する阻害因子 1 脱磷酸化反応がPP2BのCsAによる阻害によって減少し、その結果、阻害因子 1 のPP-1に対する阻害効果が増加して、PP-1によるCaMキナーゼ II 脱磷酸化反応が減弱したことに基づくと考えられる。さらに、CaMキナーゼ II 活性化反応によりSILPが磷酸化された。このことは、SILP磷酸化部位が部位 II

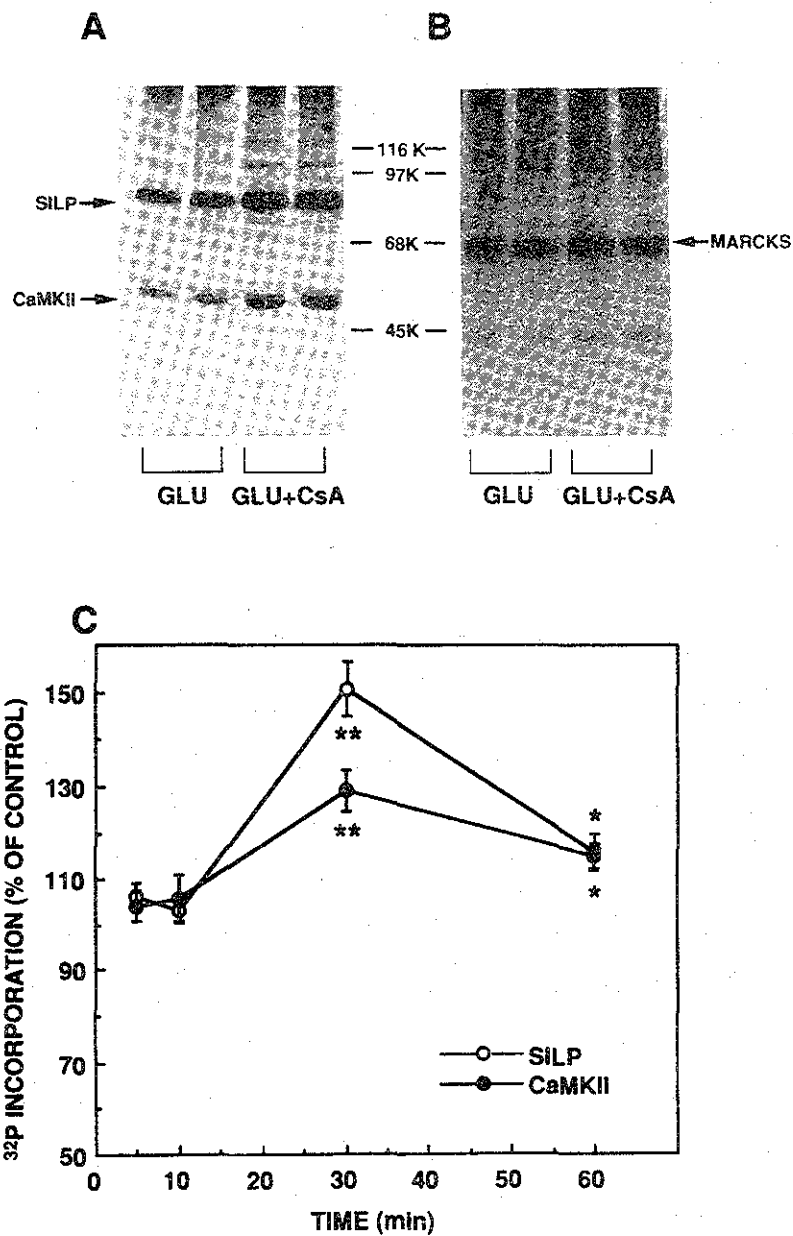


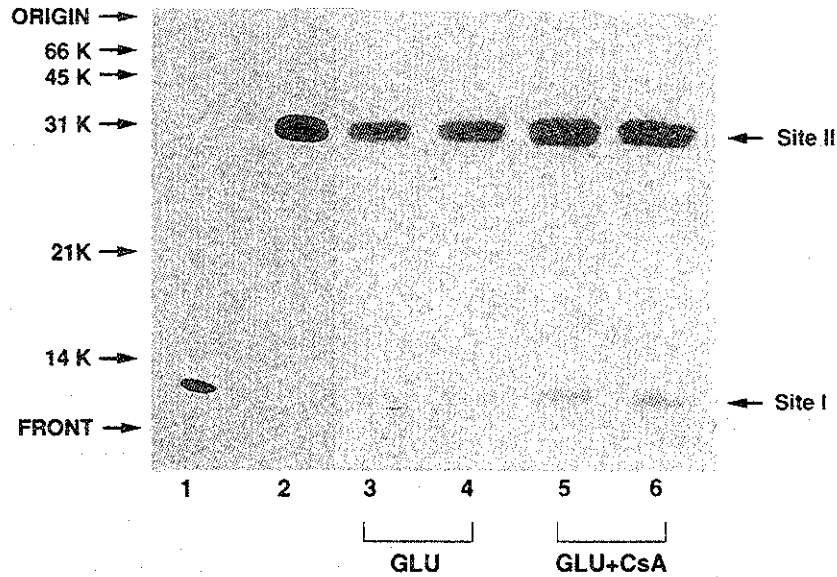
図18. CsA添加によるCaMキナーゼ II 自己磷酸化反応とSILP磷酸化反応の増加

MIN6細胞をあらかじめ5時間、 $[^{32}\text{P}]$ 磷酸とインキュベートした後、3mMグルコースと30分間インキュベートした。ついで、25mMグルコース、CsA無添加、3mM CsA存在下でインキュベートした。A) 各抗体による免疫沈殿後、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行なった。B) CaMキナーゼ II、SILPに取り込まれた磷酸量を測定した。

○, SILP; ●, CaMキナーゼ II

であることによって確かめられた。私達の以前に行なった研究結果から、CaMキナーゼII活性化反応、SILP磷酸化反応、ついでインスリン分泌反応の増強が惹起されたと考えられ、CsAの効果が同様の様式で起こっていることが示唆された。

A



B

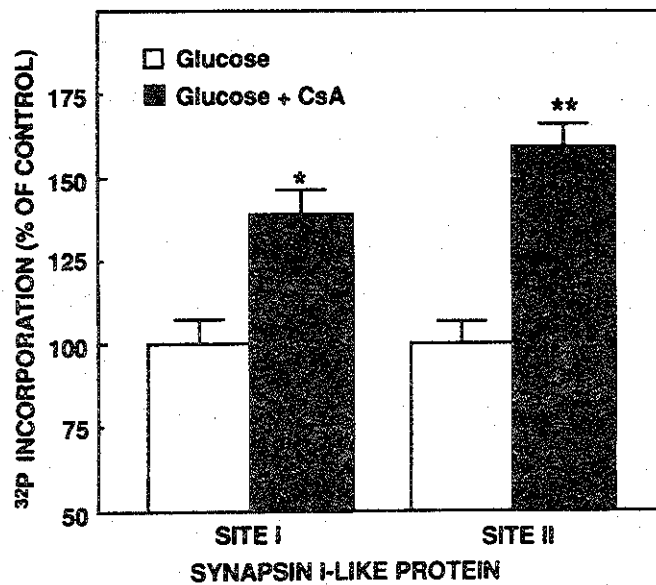


図19. SILP磷酸化部位

SILPを25mMグルコース、CsA無添加、3mM CsA存在下で磷酸化した。磷酸化反応後、SDS-PAGE上のSILPバンドをカットし、黄色ブドウ球菌V8プロテアーゼ処理した。磷酸化ペプチドをSDS-PAGE、オートラジオグラフィーにて調べた。A) 1, 脳シナプシンIをAキナーゼによって磷酸化反応後、処理したもの；2, 脳シナプシンIをCaMキナーゼIIで磷酸化反応後、処理したもの；3~6は、図に示すとおり、25mMグルコース、CsA無添加、3mM添加によって磷酸化反応後、処理したもの。B) 部位I (SITE I)、II (SITE II)に取り込まれた磷酸量を測定した。

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

14. MIN6細胞におけるPP2Bの同定

PP2BがMIN6細胞に発現しているかどうかを調べるために、脳カルシニューリンAのcDNAをプローブとして、mRNAをRNAプロットによって解析した(図20)。RNAプロットを55℃で処理すると、ラット、マウス脳と同様にMIN6細胞からのmRNAが同じ位置に検出された。しかし、洗滌液の温度を65℃に上げると、MIN6のバンドは消失した。一方、カルシニューリンB cDNAをプローブにしたバンドは、65℃で処理してもmRNAのバンドが検出された。MIN6細胞のPP2BサブユニットBは、脳から得たカルシニューリンB cDNAに親和性が高く、ラット脳、マウス脳と共通した性質を持っていることが明らかになった。

言い替えるとMIN6細胞由来PP2Bは脳由来カルシニューリンと構造的に極めて類似しているが、同一ではないことを示している。

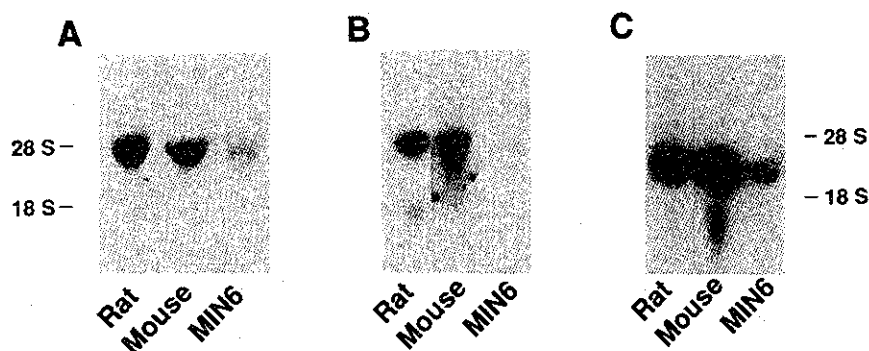
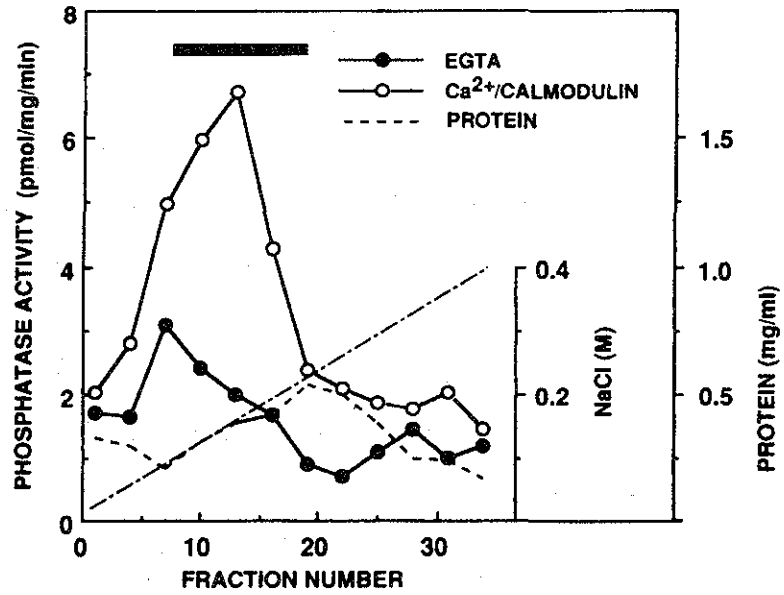


図20. ラット、マウス脳、MIN6細胞におけるカルシニューリンA mRNA

ラット脳(5 μ g)、マウス脳(5 μ g)、MIN6細胞(20 μ g)から抽出したRNAを変性後、電動泳動、オートラジオグラフィーを行なった。サンプルは0.1%SDSを含む1 \times SSCで55℃(A)、65℃(B)で洗滌した。カルシニューリンB mRNAを同溶液で洗滌した(C)。

MIN6細胞におけるPP2Bを確認するために、ウエスタンブロットで確かめた。MIN6細胞抽出液をDEAE-セルロースカラムに展開し、Ca²⁺/カルモデュリン依存性PP2B活性を指標にして、PP2B分画を部分精製した(図21A)。カラム上単一のピークを示した活性分画を集めて、脳カルシニューリンAに対するポリクローン抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行なった(図21B)。MIN6細胞から部分精製したPP2Bは脳カルシニューリンAと同じ61kDaの位置に移動し(図21B第1列)、脳カルシニューリンAに対する抗体に反応した(図21B第4列)。抗体をあらかじめカルシニューリンで処理しておくと、ウエスタンブロット上61kDaの位置に移動するバンドは消失した。これらの結果は、MIN6細胞に存在するPP2Bは蛋白質の性質についても脳カルシニューリンに極めて類似していることを示している。

A



B

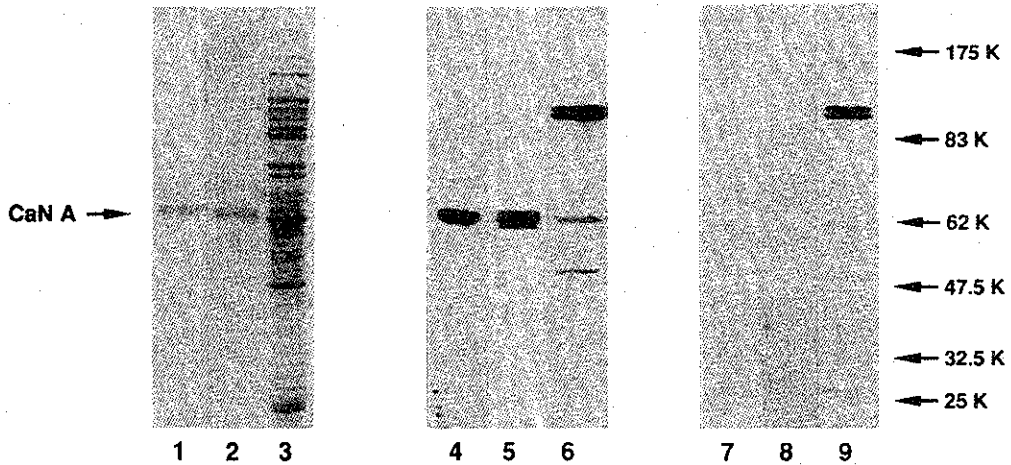


図21. MIN6細胞とマウス脳に存在するPP2Bの分析

A) MIN6細胞抽出液をDEAE-セルロースカラムで展開させ、PP2Bを部分精製した。PP2B活性は、EGTA (●)、Ca²⁺/カルモデュリン(○)存在下で測定した。活性ピークに相当する分面を集め、濃縮した (—)。
 B) 1~3、蛋白質染色；4~5、免疫染色；7~9、抗体を精製したカルシニューリンで処理後、免疫染色に用いた；1,4,7、精製したラット脳カルシニューリン(2μg)；2,5,8、部分精製したマウス脳カルシニューリン(3μg)；3,6,9、部分精製したMIN6細胞PP2B(20μg)。

IV. 考 察

本研究は、培養アストロサイトにC/EBPメンバーが存在し、調節されていることを示した最初の論文である。アストロサイトに存在しているグルタミン酸受容体を刺激することで、C/EBPのmRNAレベル、蛋白質レベルが変動し、燐酸化反応が惹起されることがわかった。

他の研究者達は、アストロサイトにおいてグルタミン酸刺激によって最早期遺伝子であるc-fos、fos B、c-jun、jun B、zif/268のmRNAが30~120分の時間的経過で増加することを示している。本研究でのC/EBP β mRNA増加の時間的経過と類似している。

本研究の結果は、グルタミン酸受容体刺激に基づく遺伝子発現反応が、細胞内Ca²⁺上昇、続いておこるCaMキナーゼII活性化反応を介して惹起されていることを示唆している。すなわち、CaMキナーゼIIは、C/EBP mRNAレベルの調節および磷酸化反応を介してC/EBP β の転写活性を調節していることを示唆している。今後、アストロサイトにおけるC/EBP転写促進反応の標的蛋白質を同定することが必要であろう。

本研究では、CaMキナーゼIIアイソフォーム、その内因性基質であるシナプシン様蛋白質(SILP)が、マウスインスリノーマMIN6細胞に存在していることを示した。CaMキナーゼIIファミリーに属する酵素であることは、次のような基準を満たしていることで明らかであると考えられる。1)脳CaMキナーゼIIに対する抗体と反応すること、2)サブユニットが自己磷酸化反応を示すこと、3)広い基質特異性を示し、脳CaMキナーゼIIの基質として役立つ蛋白質が本酵素にとっても良好な基質であること、4)脳CaMキナーゼIIと同じく、ホロ酵素は大きな分子量を示し、サブユニットは50~60kDaのサイズを示したことなどである。

脳CaMキナーゼIIが50、60kDaの2種のサブユニットを示したのに対し、本酵素は55kDaの1種のサブユニットを示した。このことは、抹消組織、膵臓ランゲルハンス島には、52~55kDaの1種のサブユニットを持つCaMキナーゼIIの存在を示す報告と一致している。

MIN6細胞CaMキナーゼIIの内因性基質として見出されたシナプシンI様蛋白質(SILP)はSDS-PAGE上84kDaの位置に移行し、1バンドを示した。本蛋白質は、種々の性質が脳シナプシンIと極めて類似した蛋白質であることが明らかになった。1)脳シナプシンI抗体で認識されたこと、2)分子量が脳シナプシンIa、Ibに類似していること、3)CaMキナーゼIIとcAMP-キナーゼに磷酸化されること、4)CaMキナーゼII、cAMP-キナーゼで磷酸化後、黄色ブドウ球菌プロテアーゼで処理すると、脳シナプシンIと同様に、それぞれ部位I(10kDa)と部位II(30kDa)の磷酸化ペプチドが得られたことなどである。脳において、シナプシンIはシナプス小胞に結合しており、CaMキナーゼIIの磷酸化反応によってシナプス小胞との結合が解除され、形質膜への移行が可能になり、開口分泌を可能にして神経伝達物質の放出を促進する。SILPは、インスリン分泌顆粒に結合しており、インスリン分泌刺激因子に反応して活性化されたCaMキナーゼIIによって磷酸化された。インスリン分泌(ホルモン分泌)と神経伝達物質放出との類似性を考えると、SILPが脳における神経伝達物質放出に果たすシナプシンIの役割と同様の作用をインスリン分泌に発揮していると示唆された。

最近の私達の研究で、SILPのクローニングを行ない、cDNAを得て、構造解析をすると、3種のアミノ酸の付加と12種のアミノ酸が置換された脳のシナプシンIbに一致していることが確かめられた。今後、さらに、CaMキナーゼII、シナプシンIの過剰発現によるインスリン分泌に対する作用を解析する予定である。

CsAはMIN6細胞においてグルコース刺激インスリン分泌を増強させた。同様のCaAの効果はトルブタマイド、KCl刺激インスリン分泌に対しても観察された。CsAはカルシニューリンに対する特異的な阻害剤であるので、インスリン分泌増強作用を示すCsAの効果は、PP2Bの阻害作用を介して発揮されていると考えられる。

膵臓β細胞は神経外胚葉性であり、脳と共通したいくつかの性質を持っている。シナプス小胞に結合しているいくつかの蛋白質、たとえば、シナプトタグミン、小胞結合膜蛋白質2、25kDaシナプス結合蛋白質が、膵臓分泌顆粒にも存在することが報告されている。このことは、シナプス小胞からの神経伝達物質の放出機構が膵臓β細胞分泌顆粒からのインスリン分泌と共通していることを示唆している。さらに、SILPがMIN6細胞に存在し、CaMキナーゼIIによる磷酸化反応を介してインスリン分泌の増強作用の惹起されることが明らかになった。さらに、CsAによるPP2B活性が阻害され、PP1阻害因子1脱磷酸化反応の阻害によってCaMキナーゼII活性化反応、SILP磷酸化反応が起こり、インスリン分泌増強作用の起こることが示された。このことは、インスリン分泌反応が、蛋白質磷酸化、脱磷酸化反応の両面から制御されていることを示している。

文 献

1. K. Tashima, H. Yamamoto, C. Setoyama, T. Ono and E. Miyamoto : Overexpression of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibits neurite outgrowth of PC12 cells. *J. Neurochem.*, **66**, 57-64 (1996)
2. T. Kimura, T. Ono, J. Takamatsu, H. Yamamoto, K. Ikegami, A. Kondo, M. Hasegawa, Y. Ihara, E. Miyamoto and T. Miyakawa : Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia*, **7**, 177-181 (1996)
3. M. Tsutsui, N. Yanagihara, K. Fukunaga, K. Minami, Y. Nakashima, A. Kuroiwa, E. Miyamoto and F. Izumi : Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor KN-62 inhibits adrenal medullary chromaffin cell functions independent of its action on the kinase. *J. Neurochem.*, **66**, 2517-2522 (1996)
4. N. Yanagihara, Y. Oishi, H. Yamamoto, M. Tsutsui, J. Kondoh, T. Sugiura, E. Miyamoto and F. Izumi : Phosphorylation of chromogranin A and catecholamine secretion stimulated by elevation of intracellular Ca^{2+} in cultured bovine adrenal medullary cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 17463-17468 (1996)
5. S. Yano, K. Fukunaga, M. Takiguchi, Y. Ushio, M. Mori and E. Miyamoto : Regulation of CCAAT/enhancer binding protein family members by stimulation of glutamate receptors in cultured rat cortical astrocytes. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23520-23527 (1996)
6. K. Ebihara, K. Fukunaga, K. Matsumoto, M. Shichiri and E. Miyamoto : Cyclosporin A stimulation of glucose-induced insulin secretion in MIN6 cells. *Endocrinology*, **137**, 5255-5263 (1996)
7. M. Kurino, K. Fukunaga, Y. Ushio and E. Miyamoto : Cyclic AMP inhibits activation of mitogen-activated protein kinase and cell proliferation in response to growth factors in cultured rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.*, **67**, 2246-2255 (1996)

8. S.Hokimoto, H. Yasue, K. Fujimoto, H. Yamamoto, K. Nakao, K. Kaikita, R. Sakata and E. Miyamoto : Expression of angiotensin-converting enzyme in remaining viable myocytes of human ventricles after myocardial infarction. *Circulation*, **94**, 1513-1518(1996)
9. K. Ikegami, T. Kimura, S. Katsuragi, T. Ono, H. Yamamoto, E. Miyamoto and T. Miyakawa : Immunohistochemical examination of phosphorylated tau in granulovacuolar degeneration granules. *Psy. Clin. Neurosci.*, **50**, 137-140(1996)
10. Y. Oishi, H. Yamamoto, M. Nagano, E. Miyamoto and M. Futatsuka : The effects of 2,5-hexanedione and acrylamide on myosin heavy chain isoforms of slow and fast skeletal muscles of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **139**, 15-21(1996)
11. M. Nagano, Y. He, H. Yamamoto, E. Miyamoto and M. Futatsuka : Cross-linking of ovalbumin or neurofilament proteins by allyl chloride *in vitro*. *J. Occup. Health*, **38**, 43-44(1996)
12. E. Miyamoto and K. Fukunaga : A role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 area. *Neurosci. Res.*, **24**, 117-122(1996)
13. K. Fukunaga, D. Muller and E. Miyamoto : CaM kinase II in long-term potentiation. *Neurochem. Int.*, **28**, 343-358(1996)
14. 宮本英七、福永浩司、山本秀幸、山川 孝、田島和周、小野常彦：神経細胞由来の培養細胞を用いての脳賦活薬に関する細胞薬理学的研究。臨床薬理の進歩 '96, 56-64(1996)
15. 宮本英七、齋藤 洋：脳の可塑性と制御物質。日本薬理学雑誌、**108**, 157-159(1996)
16. 宮本英七：シナプス伝達効率の調節と蛋白質リン酸化、脱リン酸化反応。分子から高次脳機能へ脳の階層性をふまえて、(編集：二木宏明、田中啓治、宮本英七、佐武明、中辻憲夫)、(合冊)、pp. 106-114(1996)、共立出版社、東京
17. 宮本英七(E. Miyamoto)：小脳研究と脳科学の未来(From cerebellar studies to understanding of the brain function). *In* : **Japan Prize 1996**(財団法人国際科学技術財団)The Science and Technology Foundation of Japan, pp. 125-128(1996)
18. M. Morioka, S. Nagahiro, K. Fukunaga, E. Miyamoto and Y. Ushio : Calcineurin in the adult rat hippocampus : Different distribution in CA1 and CA3 subfields. *Neuroscience*, **78**, 673-684(1997)
19. M. Sugimura, T. Sato, W. Nakayama, Y. Morishima, K. Fukunaga, M. Ohmitsu, E. Miyamoto and Y. Shirasaki : DY-9760e a novel calmodulin antagonist with cytoprotective action. *Eur. J. Pharmacol.*, **336**, 99-106(1997)
20. 御子柴克彦、宮本英七：細胞内カルシウムホメオスタシスと細胞機能、細胞工学、特集「カルシウムシグナリングと細胞機能」(編集：御子柴克彦、宮本英七)、**16**, 10-15(1997)
21. 福永浩司、宮本英七：CaMキナーゼIIと神経機能、細胞工学、特集「カルシウムシグナリングと細胞機能」(編集：御子柴克彦、宮本英七)、**16**, 55-63(1997)
22. 山本秀幸、宮本英七：脳のSer/Thrホスファターゼの役割。細胞工学、特集「ホスファターゼの

- 細胞生物学 解明の進む脱リン酸化の役割」(監修:矢倉英隆)、16, 210-216(1997)
23. 芳賀達也、三品昌美、植村慶一、宮本英七:序. 蛋白質核酸酵素、増刊号特集「脳における情報伝達 神経機能素子と素過程」(編集:芳賀達也、三品昌美、植村慶一、宮本英七)、42, 199 (1997)
 24. 宮本英七:細胞内シグナル伝達「概説」. 蛋白質核酸酵素、増刊号特集「脳における情報伝達 神経機能素子と素過程」(編集:芳賀達也、三品昌美、植村慶一、宮本英七)、42, 349-352 (1997)
 25. 堀田凱樹、三品昌美、山森哲雄、David Saffen、宮本英七:座談会「脳における遺伝子発現と調節—現状と展望」. 蛋白質核酸酵素、増刊号特集「脳における情報伝達 神経機能素子と素過程」(編集:芳賀達也、三品昌美、植村慶一、宮本英七)、42, 589-607(1997)
 26. 宮本英七:プロテインキナーゼ活性化薬、阻害薬...(1) *Clinical Neuroscience*, 15, 346-347(1997)
 27. 宮本英七:プロテインキナーゼ活性化薬、阻害薬...(2) セリン/スレオニンキナーゼ. *Clinical Neuroscience*, 15, 470-471(1997)
 28. 宮本英七:プロテインキナーゼ活性化薬、阻害薬...(3) チロシンキナーゼ. *Clinical Neuroscience*, 15, 582-583(1997)
 29. 宮本英七、福永浩司:細胞内情報伝達系と可塑性. *Clinical Neuroscience*, 15, 1119-1121(1997)
 30. 山本秀幸、宮本英七:カルシニューリンの構造と機能. 実験医学、特集「カルシニューリンの新たな機能—神経可塑性からアポトーシスへの関与まで」、15, 592-597(1997)
 31. 宮本英七:日本薬理学会創立70周年記念座談会「21世紀への薬理学と薬理学会」. 日本薬理学雑誌、110, 225-242(1997)
 32. E. Miyamoto, K. Fukunaga, H. Yamamoto, S. Yano and D. Muller: Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in neuronal regulation. In: **Kinases and Phosphatases in Lymphocyte and Neuronal Signaling** (ed.: H. Yakura), pp. 252-261(1997), Springer-Verlag, Tokyo
 33. 宮本英七:第2編「薬物と生体機能制御系」第5章「受容体と細胞内情報伝達系」. 標準薬理学(第5版)(監修:海老原昭夫、編集:鹿取 信、今井 正)、pp. 48-58(1997)、医学書院、東京
 34. 宮本英七:分子細胞生物学辞典第1版、(編集:村松正実、岩渕政樹、清水孝雄、谷口維紹、広川信隆、御子柴克彦、柳田充弘、矢原一郎)、(1997)、東京化学同人、東京
 35. 蛭原賢司、福永浩司、松本和也、城谷哲也、岸川秀樹、七里元亮、宮本英七:インスリン分泌調節機構におけるプロテインホスファターゼ2Bの関与. *Peptide Hormones in Pancreas*, 17, pp. 50-54(1997), BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION, 東京
 36. K. Iwase, K. Iyama, K. Akagi, S. Yano, K. Fukunaga, E. Miyamoto, M. Mori and M. Takiguchi: Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Mol. Brain Res.*, 53, 1-12(1998)

37. H. Kimura, K. Fukunaga, Y. Ushio and E. Miyamoto : Basic fibroblast growth factor stimulates phosphorylation of CCAAT/enhancer-binding protein δ by activation of mitogen-activated protein kinase. *Biomedical Res.*, **19**, 65-75(1998)
38. Y. Oishi, A. Ishihara, H. Yamamoto and E. Miyamoto : Hindlimb suspension induces the expression of multiple myosin heavy chain isoforms in single fibres of the rat soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **162**, 127-134(1998)
39. S. Inui, H. Sanjo, K. Maeda, H. Yamamoto, E. Miyamoto and N. Sakaguchi : 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(1998)
40. H. Yamamoto, T. Matsumura, K. Kugiyama, Y. Oishi, N. Ogata, H. Yasue and E. Miyamoto : The antibody specific for myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylated by protein kinase C : Activation of protein kinase C in smooth muscle cells in human coronary arteries. *Arch. Biochem. Biophys.*, **359**, 151-159(1998)
41. K. Fukunaga and E. Miyamoto : Role of MAP kinase in neurons. *Mol. Neurobiol.*, **16**, 79-95(1998)
42. 田村眞理、矢倉英隆、武田誠郎、宮本英七：序. 蛋白質核酸酵素、増刊「プロテインホスファターゼの構造と機能」、**43**, 923(1998)
43. 山本秀幸、宮本英七：細胞骨格蛋白質の脱リン酸化—微小管蛋白質のリン酸化と脱リン酸化反応を中心に—。蛋白質核酸酵素、増刊「プロテインホスファターゼの構造と機能」、**43**, 1004-1012(1998)
44. 福永浩司、宮本英七：神経可塑性とプロテインホスファターゼ. 蛋白質核酸酵素、増刊「プロテインホスファターゼの構造と機能」、**43**, 1062-1071(1998)
45. 宮本英七：概説. 蛋白質核酸酵素、増刊「カルシウムイオンとシグナル伝達」、**43**, 1636-1639(1998)
46. 後藤 恵、山本秀幸、浜崎 禎、宮本英七：カルシニューリンの構造と細胞機能調節. 蛋白質核酸酵素、増刊「カルシウムイオンとシグナル伝達」、**43**, 1706-1714(1998)
47. N. Yanagihara, F. Izumi, E. Miyamoto and M. Oka : Factors affecting adrenal medullary catecholamine biosynthesis and release. *In : Catecholamines : Bridging Basic Science with Clinical Medicine*, Advances in Pharmacology, Vol. 42 (eds. : D.S. Goldstein, G. Eisenhofer and R. McCarty), pp.18-21 (1998), Academic Press, San Diego
48. N. Yanagihara, M. Tsutsui, E. Miyamoto and F. Izumi : Short-term regulation of catecholamine synthesis by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *In : The Adrenal Chromaffin Cell, Archetype and Exemplar of Cellular Signalling in Secretory Control* (eds. : T.Kanno, Y. Nakazato and K. Kumakura), pp. 243-247(1998), Hokkaido University Press, Sapporo
49. 宮本英七：神経の可塑性と神経伝達物質. 神経伝達物質update—基礎から臨床まで (第3版)

- (編著：中村重信)、pp. 58-62(1998)、中外医学社、東京
50. 大野茂男、宮本英七：17. シグナル伝達のカスケードとネットワーク. 細胞機能と代謝マップ：II. 細胞の動的機能 (日本生化学会・編) (編集：西塚泰美、脊山洋右、猪飼 篤、石村 巽、川口昭彦)、pp.119-136(1998)、東京化学同人、東京
 51. M. Ohmitsu, K. Fukunaga, H. Yamamoto and E. Miyamoto : Phosphorylation of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate by mitogen-activated protein kinase in cultured rat hippocampal neurons following stimulation of glutamate receptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 408-417(1999)
 52. Y. Takeuchi, H. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Kimura, S. Ikegami, T. Miyakawa and E. Miyamoto : Nuclear localization of the δ subunit of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in rat cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, **72**, 815-825(1999)
 53. K. Matsumoto, K. Ebihara, H. Yamamoto, H. Tabuchi, K. Fukunaga, M. Yasunami, H. Ohkubo, M. Shichiri and E. Miyamoto : Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J. Biol. Chem.*, in press
 54. M. Nakai, K. Hojo, K. Yagi, N. Saito, T. Taniguchi, A. Terashima, T. Kawamata, T. Hashimoto, K. Maeda, M. Gschwendt, H. Yamamoto, E. Miyamoto and C. Tanaka : Amyloid beta protein (25-35) phosphorylates MARCKS through tyrosine kinase-activated protein kinase C signaling pathway in microglia. *J. Neurochem.*, in press