

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase —カルシウムシグナル伝達から創薬へ—

徳光 浩

細胞内カルシウム (Ca²⁺) 動態の調節は真核生物において普遍的な生体制御システムであり、その普遍性は高度に保存されたCa²⁺センサーであるカルモデュリン (calmodulin: CaM) の存在からも明らかである。とくにCa²⁺/CaM依存性リン酸化反応はCaMキナーゼを触媒酵素として、平滑筋収縮から高次中枢神経機能に至る、幅広い生理作用を調節している。近年、細胞内Ca²⁺シグナル伝達におけるリン酸化カスケード反応の調節酵素として見いだされたCaMキナーゼキナーゼ (CaMKK) がAMPKの活性化キナーゼとして、代謝調節からがん細胞増殖まで関与していることがわかってきた。本稿では、CaMKKの分子制御機構からリン酸化カスケードの生理機能、さらにはCaMKK阻害剤STO-609を用いたシグナル伝達解析まで解説する。

1. はじめに

ほぼすべての細胞において、遊離の細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) はセカンドメセンジャーとして細胞内情報伝達を調節し、筋収縮、代謝制御、免疫応答から神経機能に至る多様な細胞応答を制御する。通常100 nM以下に保たれている細胞質のCa²⁺濃度は、細胞外からの刺激により1 μM以上に上昇する。このCa²⁺ダイナミクスは細胞外や小胞体 (ER)、筋小胞体 (SR)、ミトコンドリアなどの細胞内Ca²⁺貯蔵小器官からの流入や排出により厳密に制御されている¹⁾。Ca²⁺の生体における多機能性はカルモデュリン (calmodulin: CaM) に代表されるCa²⁺結合タンパク質とその下流に位置する細胞内酵素、受容体、細胞骨格など標的タンパク質とのCa²⁺依存的な相互作用と、それらの時空間的制御機構により獲得される²⁾。CaMはEF-ハンドCa²⁺結合構造を四つ持つダンベル型のCa²⁺情報伝

達分子であり、その研究の歴史は70年代の垣内史郎教授 (大阪大学) とWai Y. Cheung教授 (セント・ジュード小児研究病院) による発見にまで遡る^{3,4)}。現在までに100種類を超えるCaM相互作用分子が同定されており、プロテオーム解析などの網羅的同定法によりCaMを介したCa²⁺情報伝達機構の多様性はさらに広がりを見せている⁵⁾。中でもタンパク質リン酸化反応はCa²⁺情報伝達経路においても細胞内シグナルの増幅、時空間的制御などの点から中心的な役割を担う生化学的反応であり、Ca²⁺/CaM依存性タンパク質リン酸化酵素 (CaMキナーゼ) により触媒される⁶⁾。本酵素はその基質特異性から、生理機能の限定した酵素群と幅広い基質特異性を持つ多機能性CaMキナーゼに区分される。前者として、δサブユニットにCaMを持つホスホリラーゼキナーゼは最も古く見いだされたCaMキナーゼの一つであり、グリコーゲン分解を促進する⁷⁾。ミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase: MLCK) は平滑筋収縮のCa²⁺調節を担う酵素であり、骨格筋にも存在するがその機能についてはいまだ不明である^{8,9)}。一方、多機能性CaMキナーゼとして10~12量体構造を持ち神経細胞のシナプス後肥厚の2%のタンパク質量を占めるCaMキナーゼII (CaMKII) は、記憶・学習などの高次中枢神経機能に深く関与する^{10,11)}。また単量体の多機能性CaMキナーゼとして、CaMキナーゼI (CaMKI)¹²⁻¹⁵⁾ や核局在を示すCaMキナーゼIV (CaMKIV)¹⁶⁾ が知られている。一般的にCa²⁺/CaM依存性酵素はCa²⁺/CaM複合体の高親和性結合と、それに伴うアロステリックな調節作用により酵素活性が発現する。一方、多機能性CaMキ

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科 (〒700-8530 岡山市北区津島中3-1-1)

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase: From Ca²⁺-signal transduction to drug development

Hiroshi Tokumitsu (Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900452

© 2018 公益社団法人日本生化学会

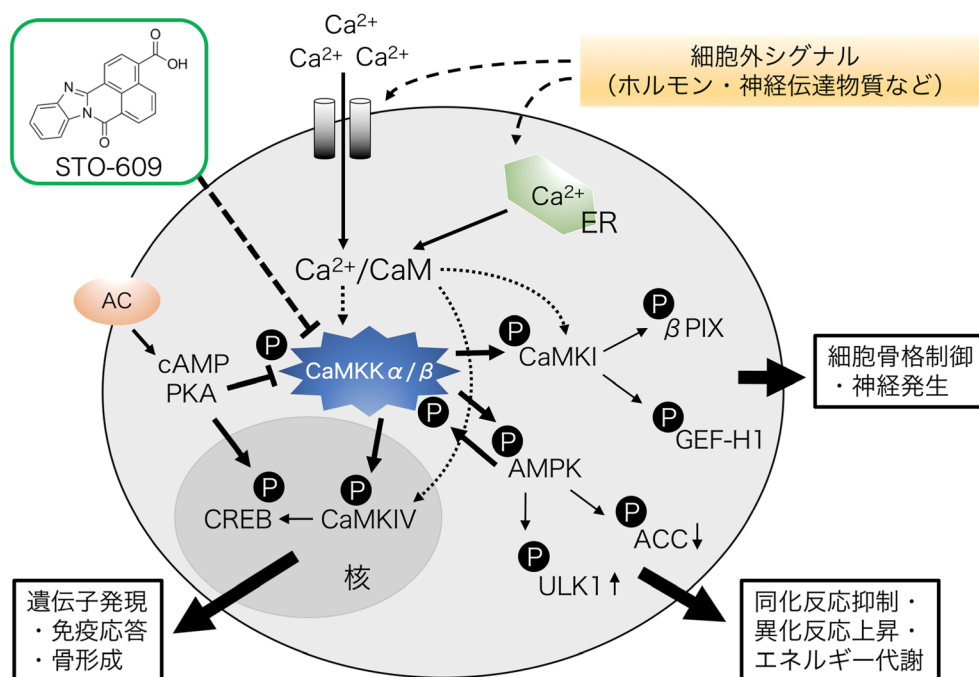


図1 CaMKKを介した細胞内情報伝達機構と生理機能

CaMKKが調節するリン酸化カスケード反応と生理機能を示した。AC：アデニル酸シクラーゼ，cAMP：環状アデノシン一リン酸，PKA：cAMP依存性キナーゼ，CaM：カルモデュリン，AMPK：5'-AMP活性化キナーゼ，CaMK：CaMキナーゼ，CREB：cAMP応答配列結合タンパク質，ACC：アセチルCoAカルボキシラーゼ，βPIX：Pak相互作用スクレオチド交換因子β，GEF-H1：グアニンスクレオチド交換因子H1，ULK1：UNC51様キナーゼ，ER：小胞体，P：リン酸化。

ナーゼであるCaMKIおよびCaMKIVは Ca^{2+} /CaM結合とともに、その触媒領域内に位置する活性化ループのThr残基（Thr177：CaMKIα，Thr196：CaMKIV）が上流キナーゼ（CaMKK）によりリン酸化され、酵素触媒能力は10～30倍上昇する^{17,18)}。すなわちCaMKI/IVを介した Ca^{2+} シグナル伝達経路にはCaMKKによるリン酸化制御が不可欠であり、“CaMキナーゼカスケード”反応と呼ばれる（図1）。近年、代謝調節に重要な5'-AMP活性化キナーゼ（5'-AMP-activated protein kinase：AMPK）がCaMKKのアイソフォームの一つCaMKKβによりリン酸化依存的に活性化されることが見いだされた¹⁹⁻²¹⁾。このCaMKKβ/AMPK経路は代謝調節のみならず、がん細胞増殖など病態との関連も報告されており、これらのシグナル伝達を分子標的とする創薬も期待される。そこで、本稿ではCaMKKの機能調節の分子機構から、その阻害薬、さらにはCaMKKを介したシグナル伝達経路の制御メカニズムについて解説する。

2. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK)

Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ（ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase：CaMKK）は1993年に藤澤仁教授（旭川医科大学）のグループにより、ラット脳抽出液中のリン酸化酵素と推定されるCaMKIV活性化因子として、その存在が初めて報告

された²²⁾。翌年、著者らはラット脳より68kDaのCaMKIV活性化リン酸化酵素を単離精製し、1995年に精製酵素から決定した部分アミノ酸配列をもとにcDNAクローニングに成功し、推定一次配列からこのリン酸化酵素が505アミノ酸残基からなるタンパク質リン酸化酵素であることを明らかにした^{17,18)}。CaMKIV活性化キナーゼの組換え体酵素は、CaMKIVのみならずCaMKIのリン酸化酵素活性も飛躍的に上昇させることから、 Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase（CaMKK）と名づけられた^{17,18)}。なおCaMKKはそれ自体もCaMキナーゼである²³⁾。この遺伝子産物は後にCaMKKアイソフォームの一つであるCaMKKα（CaMKK1）であることが明らかとなる。その後、CaMKKβ（CaMKK2）アイソフォームのcDNAがクローニングされた。CaMKKβは触媒領域から調節領域に至るまでCaMKKαと約70%の相同性を有し、CaMKIおよびCaMKIVの活性化という機能的類似性も示された^{24,25)}（図2A）。CaMKKα,βともに全身に発現し、特に中枢神経系には豊富に存在する。またαアイソフォームは脾臓、膵臓にもmRNA発現がみられる^{18,25,26)}。中枢神経系において、CaMKKαは大脳皮質、海馬に豊富に存在し、CaMKKβは小脳顆粒層における発現が特徴的であり、大脳皮質、海馬にもみられる（図2B）^{26,27)}。ことから中枢神経機能への役割が示唆された。確かにCaMKKα遺伝子欠損マウスはオスのみ文脈の恐怖記憶が損なわれており²⁸⁾、CaMKKβ欠損マウスではcAMP応答配列結合タンパク質（cAMP-

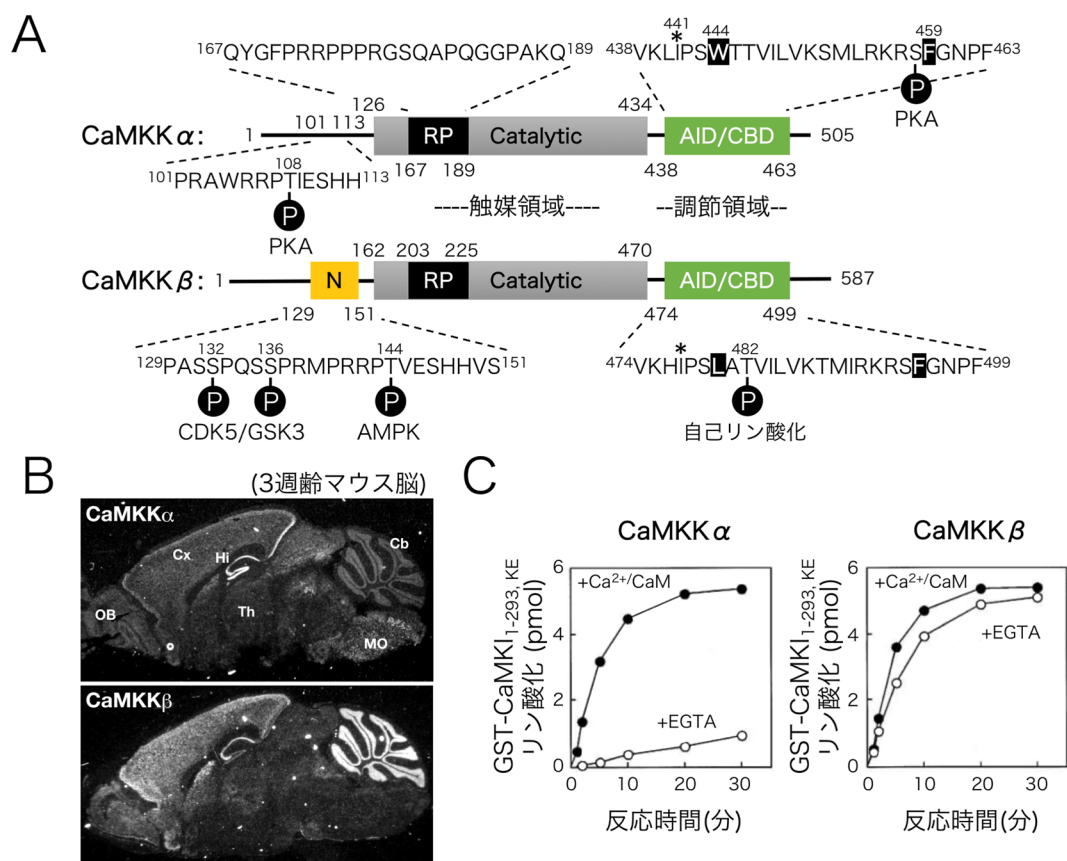


図2 CaMKK α および β の分子構造(A), mRNAのマウス脳内発現分布(B)とリン酸化酵素活性(C) モデル図(A)および酵素活性(C)はラットCaMKK α および β を用いた。Catalytic: 触媒領域, AID: 自己阻害領域, CBD: カルモデュリン結合領域, RP: Arg/Pro領域, P: リン酸化, PKA: cAMP依存性キナーゼ, AMPK: 5'-AMP活性化キナーゼ, CDK5: サイクリン依存性キナーゼ5, GSK3: グリコーゲン合成酵素キナーゼ3. (B)はKamata et al.²⁷⁾より改変した。Cb: 小脳, Cx: 大脳, Hi: 海馬, MO: 延髄, OB: 嗅球, Th: 視床. (C)はTokumitsu et al.³⁴⁾より改変した。

response element binding protein: CREB) リン酸化の減少とともに空間記憶が損なわれ、海馬CA1シナプスにおける後期の長期増強 (LTP) も消失する²⁹⁾。一方、脊椎動物以外の真核生物においてもCaMKKの保存性は高く、下流CaMキナーゼの活性化を指標にすると線虫CKK-1³⁰⁾や糸状菌CMKC³¹⁾にまでみられる。分裂酵母Ssp1も触媒領域の高い相同性とAMPK触媒サブユニット (Ssp2) に対する活性化リン酸化能を有することが報告されているが^{32, 33)}、酵素活性発現におけるCa²⁺/CaM要求性については不明である。

3. CaMKK α の分子構造と活性化メカニズム

CaMKK α および β はともに、N末端領域の触媒領域 (CaMKK α : 126~434, CaMKK β : 162~470) とそれに続くCa²⁺/CaM結合領域を含む調節領域 (CaMKK α : 438~463, CaMKK β : 474~499) をリン酸化酵素のコアとして有する (図2A)³⁴⁾。CaMKK触媒領域内には、Arg/Pro残基に富んだ特徴的な23アミノ酸残基の挿入領域 (RP領域) が存在する。RP領域の欠失は自己リン酸化やペプチド基質

に対するリン酸化能力には影響を与えないが、CaMKIやCaMKIVの活性化能を失うことから、この領域が標的CaMキナーゼに対する特異的な基質認識に重要と考えられる³⁵⁾。他のCaMキナーゼと同様にCaMKK自身も細胞内Ca²⁺濃度が低い場合には、その自己阻害領域 (AID) を含んだ調節領域 (CaMKK α : 438~463, CaMKK β : 474~499) によりリン酸化酵素活性を不活性に保つ。特にIle441 (CaMKK α) はこの自己阻害に重要である (図2A)³⁶⁾。一方、活性化因子であるCa²⁺/CaMはこの自己阻害領域に重複した結合領域 (CBD) に結合することにより、阻害領域による活性阻害機能を解除させることでCaMKK活性を発現する (図3A)。伊倉光彦教授 (トロント大学) らのグループによるNMRを用いた構造解析から、CaMKK α の調節領域ペプチド (CaMKK α : 438~463) とCa²⁺/CaMとの複合体構造が明らかとなった³⁷⁾ (図3B)。これによると、複合体構造には調節領域N末端部分の α -ヘリックス構造とそれに続くループ構造がみられ、Trp444とPhe459がCa²⁺/CaMのN末端、C末端の疎水性ポケットに入り込むことにより、複合体構造を安定化させる (図2A, 図3B)³⁷⁾。興味深いことにCa²⁺/CaMのCaMKK α ペプチド (438~463)

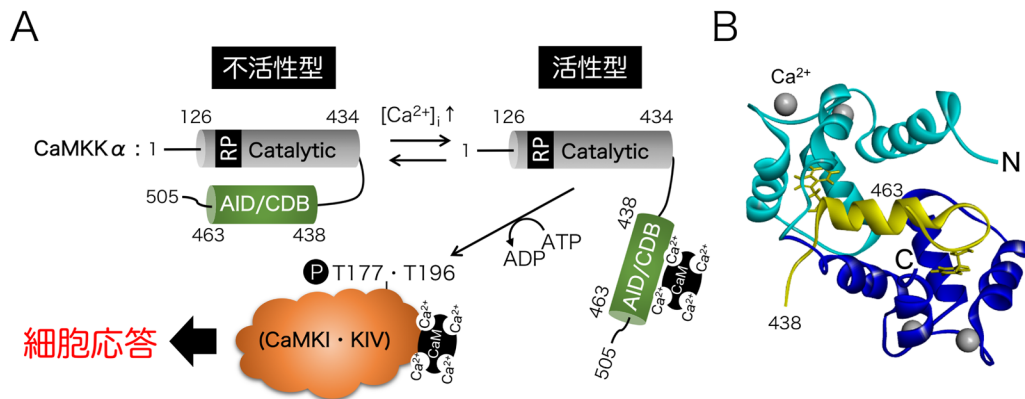


図3 CaMKK α の活性化機構(A)と調節領域 (Val438~Phe463) のCa²⁺/カルモデュリン結合(B)
本モデル図(A)はラットCaMKK α を用いている³⁶⁾。Catalytic: 触媒領域, AID: 自己阻害領域, CBD: カルモデュリン結合領域, RP: Arg/Pro領域, **P**: リン酸化, CaMKI-IV: CaMキナーゼI/IV. (B)はOsawa et al.³⁷⁾より改変した。Ca²⁺/CaMの疎水ポケットにアンカーするTrp444とPhe459を示す。PDB ID: 1ckk.

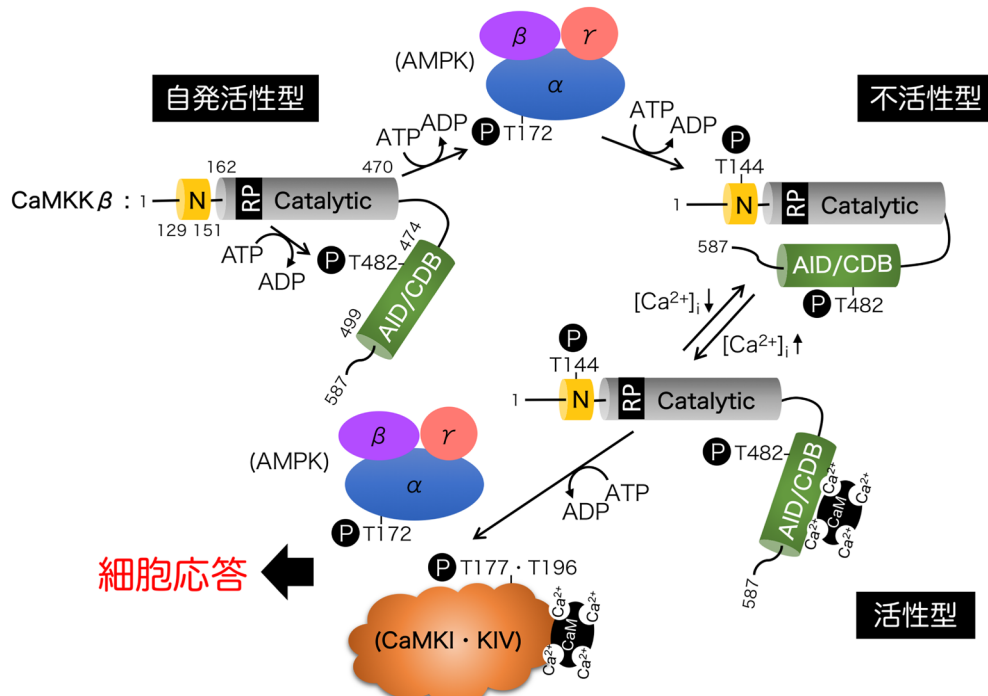


図4 CaMKK β の活性化機構とAMPKによるフィードバックリン酸化制御
モデル図はラットCaMKK β を用いており, Nakanishi et al.⁴⁵⁾より改変した。Catalytic: 触媒領域, AID: 自己阻害領域, CBD: カルモデュリン結合領域, N: N末端調節領域, RP: Arg/Pro領域, **P**: リン酸化, CaMKI-IV: CaMキナーゼI/IV, AMPK α, β, γ : 5'-AMP活性化キナーゼ α, β, γ サブユニット.

への結合方向性はMLCKやCaMKIIのそれと逆向きである。しかし, MLCK, CaMKIIのCaM結合配列をCaMKK α のそれと交換したCaMKK α 変異体の酵素活性の発現は完全にCa²⁺/CaMに依存していることから, CaMキナーゼにおけるCa²⁺/CaM結合による活性化機構にはCa²⁺/CaMの結合方向性は大きな意味を持たないのかもしれない³⁶⁾。またこの調節領域を欠いた恒常的活性型CaMKK α (1~433)の遺伝子導入マウスは, 短期記憶に変化がないものの海馬における長期記憶が選択的に損なわれることから, CaMKK α のCa²⁺/CaMによる厳密な活性制御機構が長期記憶にとっても重要と考えられる³⁸⁾。

4. CaMKK β の分子構造と活性発現メカニズム

厳密なCa²⁺/CaM要求性を持つCaMKK α とは対照的に, CaMKK β 組換え体酵素は高いCa²⁺/CaM非依存性活性〔自発活性 (autonomous activity)〕を発現することが知られており (図2C)^{24, 25, 34)}, Ca²⁺/CaM存在下における総リン酸化活性の70~80%に達する。CaMKK α と相同かつ機能的な調節領域(474~499)を有するにも関わらず (図2A), CaMKK β の自己阻害機構 (Ca²⁺/CaM非存在下における酵素活性抑制) は見かけ上機能していない。これは触媒領域(162~470)のN末端付近に位置する短い領域 (N末

端調節領域：129～151) によることが、この領域を欠失させた変異体CaMKK β Δ 129-151が完全にCa²⁺/CaM依存性酵素になることから明らかとなった(図2A)³⁴⁾。また、CaMKK β はこの自発活性に由来する高い自己リン酸化反応が観察され、特に調節領域(474～499)内のThr482の自己リン酸化は自発活性の発現にも一定程度貢献している(図2A, 図4)³⁹⁾。さらにCaMKK β はCaMKK α と異なり、細胞内においてAMPKを標的リン酸化基質として α サブユニットのThr172のリン酸化依存的な活性化を触媒する¹⁹⁻²¹⁾。AMPKに対するK_m値はCaMKK β とCaMKK α ではそれぞれ1.5 μ Mと13.1 μ Mと約9倍程度見かけ上の基質親和性に差があり、この差が、CaMKK β /AMPK経路を成立させている一因と考えられる⁴⁰⁾。

5. CaMKKのリン酸化制御機構

現在までにCaMKKを活性化する上流リン酸化酵素に関する報告はない。一方、自己リン酸化とは別に細胞内において、このCa²⁺シグナル伝達機構はcAMP/PKA経路によるリン酸化反応により制御される。CaMKK α は触媒領域外側のThr108とCa²⁺/CaM結合領域内のSer458のcAMP依存性リン酸化酵素(cAMP-dependent protein kinase: PKA)によるリン酸化(図2A)がCaMKK活性を負に調節していることが、PC12細胞、海馬神経細胞やJurkat T細胞において見だされている^{41, 42)}。さらにこれらPKAによるCaMKK α のリン酸化は14-3-3タンパク質を呼び込むことにより、Thr108の脱リン酸化を抑制することで、不活性化状態を保持する^{43, 44)}。また最近著者は、CaMKK β /AMPK活性化経路において、下流AMPKがCaMKK β をフィードバックリン酸化することを見だした⁴⁵⁾。CaMKK β によりThr172をリン酸化依存的に活性化したAMPKはCaMKK β のN末端調節領域(129～151)に存在するThr144をリン酸化し、このリン酸化がN末端調節領域の役割である自己抑制機構の解除機能³⁴⁾を抑制することで、CaMKK β をCa²⁺/CaM依存性酵素へと変換する(図4)。このリン酸化制御は培養細胞においても観察され、CaMKK β /AMPK経路の活性化に細胞内Ca²⁺濃度の上昇を必要とするためには、CaMKK β のThr144のリン酸化を介したCa²⁺/CaM依存性酵素への機能変換が必要なのかもしれない。一方、このN末端調節領域内のリン酸化反応については、サイクリン依存性キナーゼ5(cyclin-dependent kinase 5: CDK5)とグリコーゲン合成酵素キナーゼ3(glycogen synthase kinase 3: GSK3)によるSer128, Ser132, Ser136のリン酸化によりCaMKK β の自発活性が抑制されることが報告されており⁴⁶⁾(図2A)、N末端調節領域のリン酸化による制御機構の点において類似している。

6. CaMKK阻害剤STO-609と分子薬理学的解析

著者らはCaMKKシグナル伝達機構の生理機能解明のた

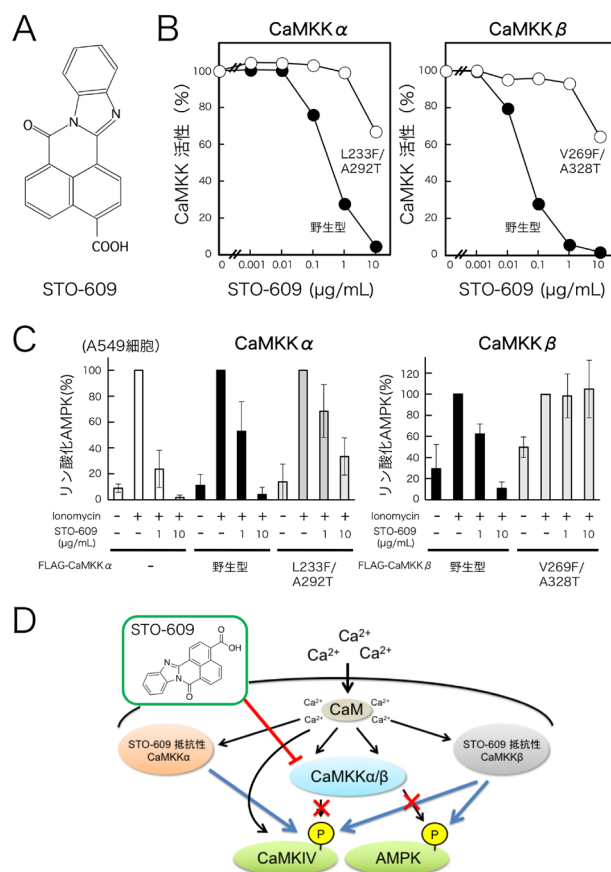


図5 STO-609抵抗性変異体を用いたCaMKK α および β 特異的シグナル伝達解析
CaMKK阻害剤STO-609(A), STO-609の野生型および阻害剤抵抗性CaMKK変異体に対する酵素阻害効果(B), STO-609抵抗性CaMKK変異体発現細胞(A549細胞)を用いたAMPKリン酸化解析(C)とCaMKKシグナル伝達解析法(D). (B), (C)および(D)はFujiwara et al.⁵³⁾より改変した。

め、CaMKK阻害剤STO-609 (7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]-isoquinoline-7-one-3-carboxylic acid)を2002年に住友製薬(当時)との共同研究により開発した⁴⁷⁾。STO-609は現在、広く入手可能となっている(図5A, B)。STO-609は細胞膜透過性を有する基質ATPの競合阻害剤として、CaMKK α に対してはK_i=80 ng/mL, CaMKK β に対してはK_i=15 ng/mLの阻害効率を有する。CaMキナーゼ間においては選択性を持つものの、ATP拮抗薬であること、細胞外シグナル制御キナーゼ8(extracellular signal-regulated kinase 8: ERK8), カゼインキナーゼ2(casein kinase 2: CK2)やMAPキナーゼ相互作用キナーゼ1(MAPK-interacting protein kinase 1: MNK1)などに対する阻害効果⁴⁸⁾や芳香族炭化水素受容体に対するアゴニスト作用⁴⁹⁾も報告されており、STO-609の薬理学的作用に関しては、十分な検討と評価を必要とする。興味深いことに、CaMKKアイソフォーム間に対するSTO-609の阻害効率は5～10倍程度の差がみられる(図5B)。この差は触媒領域に存在する1アミノ酸残基(Leu233: CaMKK α , Val269: CaMKK β)側鎖によるSTO-609に対する立体障害の違いであることが推定

された⁵⁰⁾。これはCaMKK β /STO-609複合体の結晶構造解析⁵¹⁾より明らかとなったVal269 (ヒトCaMKK β : Val270)の主鎖とSTO-609間の水素結合からも強く示唆された。さらに、このアミノ酸残基を立体障害の大きい側鎖を持つアミノ酸残基に置換したSTO-609低感受性変異体は、STO-609の細胞における薬理的評価に役立つものとなった。STO-609添加による神経細胞の軸索伸長阻害は、STO-609低感受性変異体CaMKK α (Leu233Phe) および恒常的活性型CaMKI α の共発現による回復実験から、CaMKKを介したCaMKIシグナル伝達の抑制によることが示された⁵²⁾。さらに、著者らはSTO-609を用いることでCaMKKアイソフォーム特異的なシグナル伝達経路を区別するために、さらなるSTO-609低感受性CaMKK α (Leu233Phe/Ala292Thr) およびCaMKK β (Val269Phe/Ala328Thr) を作製した (図5B)。これらを安定発現させたA549ヒト肺基底上皮腺がん細胞を用いて、細胞内Ca²⁺濃度上昇に応答したAMPKの活性化リン酸化 (Thr172) はCaMKK α ではなくCaMKK β により引き起こされることを確認した (図5C)⁵³⁾。一方、これら変異体安定発現細胞を用いることで、CaMKK α , β ともに細胞内においてCaMKIV活性化酵素となることも明らかにした。すなわち、STO-609低感受性CaMKK変異体による回復実験によりSTO-609の薬理効果とCaMKKアイソフォーム特異性についての評価が可能となった (図5D)。

7. CaMKK/CaMKIV リン酸化カスケード反応の生理機能

核局在を示すCaMKIVは、CREBや血清応答因子 (serum response factor: SRF) などの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現調節への役割が示された^{16, 54-57)}。Importin α により核内移行するCaMKIV⁵⁸⁾はCaMKKによるThr196のリン酸化により、リン酸化基質に対する見かけ上の親和性を約10倍程度上昇させることで、酵素活性を上昇させる。また非リン酸化CaMKIVにはみられないCa²⁺/CaM非依存性活性 (自発活性) がThr196のリン酸化により発現する¹⁷⁾。この自発活性の発現は、CaMKIIにみられる酵素特性であり、一過性のCa²⁺シグナルを自発活性の発現を通して長期にわたるリン酸化反応シグナルとして伝達するものである⁵⁹⁾。しかし、自己阻害領域内のThr286 (CaMKII α)の自己リン酸化による自己抑制機構の解除⁶⁰⁾とは異なり、CaMKIVはその触媒領域内のThr196がリン酸化されることにより、自己抑制領域の酵素触媒領域への分子内相互作用が抑制されることで、自発活性が発現する⁶¹⁾。また最近ではERストレス下においてCaMKIV触媒領域のCys198のポリスルフィド化による可逆的な新たな活性制御も見いだされた⁶²⁾。神経細胞におけるCaMKK/CaMKIVの役割として、CREBのSer133のリン酸化を介した遺伝子発現制御は長期記憶の形成に重要であり^{56, 63)}、CaMKIV遺伝子欠損マウスにおいてはPurkinje細胞における後期の

長期抑圧 (LTD) の消失や脱分極によるCREBリン酸化レベルの上昇が観察できない⁶⁴⁾。また詳細な行動解析よりCaMKIV遺伝子欠損マウスは受動回避試験や空間認識においては正常であるものの、長期の恐怖記憶や不安様行動が軽度減少する⁶⁵⁾。CaMKIVはT細胞にも発現しており、T細胞受容体の刺激に応答して活性化し⁶⁶⁾、AP-1 (activator protein 1, Fos/Jun) のDNA結合および転写活性を上昇させることでインターロイキン2の発現誘導に関与することからも、免疫応答における重要性も示されている⁶⁷⁾。このCaMKK/CaMKIV/CREB経路はNFATc1 (nuclear factor of activated T cells c1) の発現誘導を介した破骨細胞分化を制御し⁶⁸⁾、膵臓 β 細胞や下垂体腫瘍細胞株などの内分泌系細胞においても、インスリンやプロラクチンなどの遺伝子発現を調節する⁶⁹⁻⁷¹⁾。以上のことから、CaMKK/CaMKIV経路は生体内において幅広く細胞内Ca²⁺動員に伴う遺伝子発現制御を担う (図1)。

8. CaMKK/CaMKI リン酸化カスケード反応の生理機能

α , β , γ , δ のアイソフォームを持つCaMKIも¹²⁻¹⁵⁾、活性化ループに存在するThr残基のCaMKKによるリン酸化を介して酵素活性が上昇するが、リン酸化CaMKIVと異なり、Ca²⁺/CaM非依存性活性は認められない。CaMKK/CaMKIカスケードは線虫にまでみられ、CKK-1によるCMK-1のThr179のリン酸化を介したCa²⁺/CaM依存的な活性化機構は哺乳動物のCaMKK/CaMKIカスケード反応と同様である^{30, 72)}。一方、CMK-1はN末端の核移行シグナルによる核局在により、線虫CREB (CRH-1) のSer29のリン酸化を介した転写制御への関与が個体レベルで明らかとなった。線虫には哺乳動物CaMKIVの相同遺伝子がないことから、このCKK-1/CMK-1/CRH-1経路がCaMKK/CaMKIV/CREB依存性転写調節機構として、感覚神経や介在神経において機能しているようである³⁰⁾。またCKK-1/CMK-1経路は熱回避行動の制御に関与していることが報告されている⁷³⁾。哺乳動物のCaMKK/CaMKI経路は神経細胞における軸索伸長や樹状突起形成などの形態制御を担う^{74, 75)}。CaMKKはNMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体, AMPA (α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole propionate) 受容体, GABA (γ -aminobutyric acid) 受容体, さらにはBDNF (brain-derived neurotrophic factor) やニューロトロフィン3を介した細胞内Ca²⁺濃度上昇により活性化され、CaMKI α を介してスパインの形成、シナプスの可塑性や軸索伸長などを制御する (図1)⁷⁶⁻⁷⁹⁾。

9. CaMKK β /AMPK リン酸化カスケード反応の生理機能

AMPKは生体内のエネルギー状態 (AMP: ATP比) に応答して活性化するキナーゼであり、異化反応経路を活性化するとともに、同化反応を不活性化することによりエネ

ルギー代謝経路を制御する。濃度上昇したAMPがAMPKの γ サブユニットへ結合するとともに、触媒サブユニットの活性化ループに位置するThr172が上流活性化リン酸化酵素であるTGF β 活性化キナーゼ1 (transforming growth factor β -activated kinase 1: TAK1) およびLKB1 (liver kinase B1) によるリン酸化を受け、酵素活性が上昇する。これがAMPKシグナル伝達の活性化機構である^{80, 81)}。近年、STO-609を用いた薬理学的解析や遺伝子ノックダウン法によりCaMKK β がAMPK活性化リン酸化酵素として機能しており、細胞内Ca²⁺シグナルにより制御されることが明らかとなった¹⁹⁻²¹⁾。興味深いことに、CaMKK α は細胞内において、AMPK活性化酵素として機能することはできない。これは前述のようにCaMKK β のAMPKに対する親和性がCaMKK α よりも9倍近く高いこともその要因であり、CaMKK触媒領域内のサブドメインVIIIに位置する1アミノ酸残基 (CaMKK α Ile322/CaMKK β Leu358) がCaMKK β とCaMKK α のAMPKに対する基質親和性の差を生み出している⁴⁰⁾。CaMKK β /AMPK経路の生理機能については、視床下部におけるAMPK活性の調節を介したニューロペプチドYの発現とそれに伴う摂食行動の制御、アミノ酸飢餓に誘導される細胞内Ca²⁺濃度の上昇によるCaMKK β /AMPK/ULK1 (UNC51様キナーゼ) を介したオートファジーの調節、甲状腺ホルモンT3によるミトコンドリア脂肪酸酸化系の活性化など、多くの代謝調節経路の制御が報告されている⁸²⁻⁸⁴⁾ (図1)。

10. CaMKKシグナル伝達と疾患

CaMKK β /AMPKリン酸化カスケード反応はエネルギー代謝応答やさまざまな代謝過程の制御に関与していることから、がん細胞増殖への寄与が報告されている。またCaMKK β の肝細胞がんにおける高発現とCaMKK β /CaMKIV経路の活性化はmTOR (mammalian target of rapamycin) /リボソームタンパク質S6キナーゼ経路を制御し、肝がん細胞の増殖に関与している⁸⁵⁾。前立腺がん細胞においてもCaMKK β の発現は向上しており、特にLNCaP細胞においてはアンドロゲン刺激に依存したCaMKK β の発現上昇がAMPK活性化を介した異化代謝反応を刺激することで、がん細胞増殖を誘導することが示されている。STO-609投与によるCaMKK活性の薬理学的阻害は前立腺がん細胞 (C4-2B細胞) や肝がん細胞 (PHM1細胞) 移植ゼノグラフトマウスにおける腫瘍増殖を抑制する^{85, 86)}。またAMPK活性化酵素であるLKB1欠損肺がん細胞においては、グルタミン酸脱水素酵素 (GDH1) により産生した α -ケトグルタル酸が、CaMKK β の基質であるAMPKとの結合を誘導し、過剰に活性化させることで細胞接着喪失によるアポトーシス (アノイキス) に対する抵抗性を与える⁸⁷⁾。高脂肪食やこれに加えてstreptozotocin投与により作製した脂肪肝マウスモデルにSTO-609を投与すると、CaMKK β 活性を阻害することで、脂質代謝などの異化反応を抑制するとともに、

解糖系代謝産物が増加することがメタボローム解析より明らかとなり、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) を改善することが報告された⁸⁸⁾。

11. おわりに

CaMKKの発見から四半世紀が経った現在においても、この調節リン酸化酵素を介した細胞内Ca²⁺シグナル伝達経路の新たな生理機能が見いだされ続けており、中枢神経機能からエネルギー代謝調節に至るまでその多彩な役割が明らかとなってきた。さらには、前立腺がんや肝細胞がんをはじめとするがん細胞増殖への関与の解明は、CaMKK阻害剤STO-609を用いた薬理学的解析による成果の一つである。今後、ATP拮抗薬であるSTO-609とは異なる、新しい阻害機構を持った酵素阻害剤開発の試みは、CaMKKシグナル伝達経路を狙った分子標的治療薬として大きな可能性を秘めているかもしれない。

謝辞

本稿の執筆にあたり、CaMKK研究を支えていただいた多くの共同研究者、同僚・先輩研究者の皆様、淡々とベンチに向かう若い大学院生達に心から感謝いたします。CaMKKの発見に始まり、多大なご指導を賜りましたThomas R. Soderling教授 (OHSU)、共同研究者として、本稿にCaMKKの脳内mRNA発現解析 (図2B) をご提供いただいた阪上洋行教授 (北里大学) ならびにCa²⁺/CaMとの複合体構造 (図3B) をご提供いただいた大澤匡範教授 (慶應大学) に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Berridge, M.J., Lipp, P., & Bootman, M.D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21.
- 2) Van Eldik, L.J. & Watterson, D.M. (1998) Calmodulin and Calcium Signal Transduction: An Introduction, Academic Press, New York, 1-15.
- 3) Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970) Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 1104-1110.
- 4) Cheung, W.Y. (1970) Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 533-538.
- 5) Berggård, T., Arrigoni, G., Olsson, O., Fex, M., Linse, S., & James, P. (2006) 140 mouse brain proteins identified by Ca²⁺-calmodulin affinity chromatography and tandem mass spectrometry *J. Proteome Res.*, **5**, 669-687.
- 6) Soderling, T.R. & Stull, J.T. (2001) Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases *Chem. Rev.*, **101**, 2341-2352.
- 7) Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T., Vanaman, T.C., & Nairn, A.C. (1978) Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase *FEBS Lett.*, **92**, 287-293.

- 8) Adelstein, R.S. & Klee, C.B. (1981) Purification and characterization of smooth muscle myosin light chain kinase *J. Biol. Chem.*, **256**, 7501–7509.
- 9) Nagamoto, H. & Yagi, K. (1984) Properties of myosin light chain kinase prepared from rabbit skeletal muscle by an improved method *J. Biochem.*, **95**, 1119–1130.
- 10) Petersen, J.D., Chen, X.B., Vinade, L., Dosemeci, A., Lisman, J.E., & Reese, T.S. (2003) Distribution of postsynaptic density (PSD)-95 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II at the PSD *J. Neurosci.*, **23**, 11270–11278.
- 11) Lisman, J. (2017) Criteria for identifying the molecular basis of the engram (CaMKII, PKMzeta) *Mol. Brain*, **10**, 55.
- 12) Picciotto, M.R., Czernik, A.J., & Nairn, A.C. (1993) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I. cDNA cloning and identification of autophosphorylation site *J. Biol. Chem.*, **268**, 26512–26521.
- 13) Yokokura, H., Terada, O., Naito, Y., & Hidaka, H. (1997) Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms *Biochim. Biophys. Acta*, **1338**, 8–12.
- 14) Takemoto-Kimura, S., Terai, H., Takamoto, M., Ohmae, S., Kikumura, S., Segi, E., Arakawa, Y., Furuyashiki, T., Narumiya, S., & Bito, H. (2003) Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKI γ , a novel membrane-anchored neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) *J. Biol. Chem.*, **278**, 18597–18605.
- 15) Ishikawa, Y., Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Murata-Hori, M., Hosoya, H., & Kobayashi, R. (2003) Identification and characterization of novel components of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade in HeLa cells *FEBS Lett.*, **550**, 57–63.
- 16) Ohmsted, C.A., Jensen, K.F., & Sahyoun, N.E. (1989) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase *J. Biol. Chem.*, **264**, 5866–5875.
- 17) Tokumitsu, H., Brickey, D.A., Glod, J., Hidaka, H., Sikela, J., & Soderling, T.R. (1994) Activation mechanisms for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaMK-kinase IV kinase *J. Biol. Chem.*, **269**, 28640–28647.
- 18) Tokumitsu, H., Enslin, H., & Soderling, T.R. (1995) Characterization of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase *J. Biol. Chem.*, **270**, 19320–19324.
- 19) Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.P., Momcilovic, M., Johnstone, S.R., Carlson, M., & Carling, D. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells *Cell Metab.*, **2**, 21–33.
- 20) Hawley, S.A., Pan, D.A., Mustard, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., & Hardie, D.G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase *Cell Metab.*, **2**, 9–19.
- 21) Hurley, R.L., Anderson, K.A., Franzoni, J.M., Kemp, B.E., Means, A.R., & Witters, L.A. (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases *J. Biol. Chem.*, **280**, 29060–29066.
- 22) Okuno, S. & Fujisawa, H. (1993) Requirement of brain extract for the activity of brain calmodulin-dependent protein kinase IV expressed in *Escherichia coli* *J. Biochem.*, **114**, 167–170.
- 23) Tokumitsu, H. & Soderling, T.R. (1996) Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade *J. Biol. Chem.*, **271**, 5617–5622.
- 24) Kitani, T., Okuno, S., & Fujisawa, H. (1997) Molecular cloning of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β *J. Biochem.*, **122**, 243–250.
- 25) Anderson, K.A., Means, R.L., Huang, Q.H., Kemp, B.E., Goldstein, E.G., Selbert, M.A., Edelman, A.M., Fremeau, R.T., & Means, A.R. (1998) Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β *J. Biol. Chem.*, **273**, 31880–31889.
- 26) Sakagami, H., Umekiya, M., Saito, S., & Kondo, H. (2000) Distinct immunohistochemical localization of two isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases in the adult rat brain *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 89–99.
- 27) Kamata, A., Sakagami, H., Tokumitsu, H., Sanda, M., Owada, Y., Fukunaga, K., & Kondo, H. (2007) Distinct developmental expression of two isoforms of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases and their involvement in hippocampal dendritic formation *Neurosci. Lett.*, **423**, 143–148.
- 28) Mizuno, K., Ris, L., Sanchez-Capelo, A., Godaux, E., & Giese, K.P. (2006) Ca²⁺/calmodulin kinase kinase α is dispensable for brain development but is required for distinct memories in male, though not in female, mice *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 9094–9104.
- 29) Peters, M., Mizuno, K., Ris, L., Angelo, M., Godaux, E., & Giese, K.P. (2003) Loss of Ca²⁺/calmodulin kinase kinase β affects the formation of some, but not all, types of hippocampus-dependent long-term memory *J. Neurosci.*, **23**, 9752–9760.
- 30) Kimura, Y., Corcoran, E.E., Eto, K., Gengyo-Ando, K., Muramatsu, M.A., Kobayashi, R., Freedman, J.H., Mitani, S., Hagiwara, M., Means, A.R., et al. (2002) A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans* *EMBO Rep.*, **3**, 962–966.
- 31) Joseph, J.D. & Means, A.R. (2000) Identification and characterization of two Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans* *J. Biol. Chem.*, **275**, 38230–38238.
- 32) Hanyu, Y., Imai, K.K., Kawasaki, Y., Nakamura, T., Nakaseko, Y., Nagao, K., Kokubu, A., Ebe, M., Fujisawa, A., Hayashi, T., et al. (2009) *Schizosaccharomyces pombe* cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor *Genes Cells*, **14**, 539–554.
- 33) Valbuena, N. & Moreno, S. (2012) AMPK phosphorylation by Ssp1 is required for proper sexual differentiation in fission yeast *J. Cell Sci.*, **125**, 2655–2664.
- 34) Tokumitsu, H., Iwabu, M., Ishikawa, Y., & Kobayashi, R. (2001) Differential regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms *Biochemistry*, **40**, 13925–13932.
- 35) Tokumitsu, H., Takahashi, N., Eto, K., Yano, S., Soderling, T.R., & Muramatsu, M. (1999) Substrate recognition by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase. Role of the arg-pro-rich insert domain *J. Biol. Chem.*, **274**, 15803–15810.
- 36) Tokumitsu, H., Muramatsu, M., Ikura, M., & Kobayashi, R. (2000) Regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase *J. Biol. Chem.*, **275**, 20090–20095.
- 37) Osawa, M., Tokumitsu, H., Swindells, M.B., Kurihara, H., Orita, M., Shibamura, T., Furuya, T., & Ikura, M. (1999) A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 819–824.
- 38) Kaitsuka, T., Li, S.T., Nakamura, K., Takao, K., Miyakawa, T., & Matsushita, M. (2011) Forebrain-specific constitutively active CaMKK α transgenic mice show deficits in hippocampus-dependent long-term memory *Neurobiol. Learn. Mem.*, **96**, 238–247.
- 39) Tokumitsu, H., Hatano, N., Fujimoto, T., Yurimoto, S., & Ko-

- bayashi, R. (2011) Generation of autonomous activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase β by autophosphorylation *Biochemistry*, **50**, 8193–8201.
- 40) Fujiwara, Y., Kawaguchi, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M., & Tokumitsu, H. (2016) Differential AMP-activated protein kinase (AMPK) recognition mechanism of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms *J. Biol. Chem.*, **291**, 13802–13808.
 - 41) Wayman, G.A., Tokumitsu, H., & Soderling, T.R. (1997) Inhibitory cross-talk by cAMP kinase on the calmodulin-dependent protein kinase cascade *J. Biol. Chem.*, **272**, 16073–16076.
 - 42) Matsushita, M. & Nairn, A.C. (1999) Inhibition of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase *J. Biol. Chem.*, **274**, 10086–10093.
 - 43) Davare, M.A., Saneyoshi, T., Guire, E.S., Nygaard, S.C., & Soderling, T.R. (2004) Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3 *J. Biol. Chem.*, **279**, 52191–52199.
 - 44) Ichimura, T., Taoka, M., Hozumi, Y., Goto, K., & Tokumitsu, H. (2008) 14-3-3 Proteins directly regulate Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase α through phosphorylation-dependent multisite binding *FEBS Lett.*, **582**, 661–665.
 - 45) Nakanishi, A., Hatano, N., Fujiwara, Y., Sha'ri, A., Takabatake, S., Akano, H., Kanayama, N., Magari, M., Nozaki, N., & Tokumitsu, H. (2017) AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the Ca^{2+} /calmodulin (CaM) dependence of Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase kinase β *J. Biol. Chem.*, **292**, 19804–19813.
 - 46) Green, M.F., Scott, J.W., Steel, R., Oakhill, J.S., Kemp, B.E., & Means, A.R. (2011) Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase kinase β is regulated by multisite phosphorylation *J. Biol. Chem.*, **286**, 28066–28079.
 - 47) Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Ishikawa, Y., Ikeda, M., Saji, I., & Kobayashi, R. (2002) STO-609, a specific inhibitor of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase *J. Biol. Chem.*, **277**, 15813–15818.
 - 48) Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S., Alessi, D.R., & Cohen, P. (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update *Biochem. J.*, **408**, 297–315.
 - 49) Monteiro, P., Gilot, D., Langouet, S., & Fardel, O. (2008) Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase inhibitor 7-oxo-7H-benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-3-carboxylic acid (STO-609) *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 2556–2563.
 - 50) Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Ishikawa, Y., & Kobayashi, R. (2003) A single amino acid difference between α and β Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase dictates sensitivity to the specific inhibitor, STO-609 *J. Biol. Chem.*, **278**, 10908–10913.
 - 51) Kukimoto-Niino, M., Yoshikawa, S., Takagi, T., Ohsawa, N., Tomabechi, Y., Terada, T., Shirouzu, M., Suzuki, A., Lee, S., Yamauchi, T., et al. (2011) Crystal structure of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase in complex with the inhibitor STO-609 *J. Biol. Chem.*, **286**, 22570–22579.
 - 52) Wayman, G.A., Kaeck, S., Grant, W.F., Davare, M., Impey, S., Tokumitsu, H., Nozaki, N., Banker, G., & Soderling, T.R. (2004) Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I *J. Neurosci.*, **24**, 3786–3794.
 - 53) Fujiwara, Y., Hiraoka, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M., & Tokumitsu, H. (2015) Analysis of distinct roles of CaMKK isoforms using STO-609-resistant mutants in living cells *Biochemistry*, **54**, 3969–3977.
 - 54) Jensen, K.F., Ohmstede, C.A., Fisher, R.S., & Sahyoun, N. (1991) Nuclear and axonal localization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2850–2853.
 - 55) Enslen, H., Sun, P., Brickey, D., Soderling, S.H., Klamo, E., & Soderling, T.R. (1994) Characterization of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation *J. Biol. Chem.*, **269**, 15520–15527.
 - 56) Bito, H., Deisseroth, K., & Tsien, R.W. (1996) CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca^{2+} - and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression *Cell*, **87**, 1203–1214.
 - 57) Miranti, C.K., Ginty, D.D., Huang, G., Chatila, T., & Greenberg, M.E. (1995) Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 3672–3684.
 - 58) Kotera, I., Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Nagoshi, E., Sakagami, H., Kondo, H., & Yoneda, Y. (2005) Importin α transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin β *EMBO J.*, **24**, 942–951.
 - 59) Colbran, R.J. (1992) Regulation and role of brain calcium/calmodulin-dependent protein kinase II *Neurochem. Int.*, **21**, 469–497.
 - 60) Fukunaga, K., Rich, D.P., & Soderling, T.R. (1989) Generation of the Ca^{2+} -independent form of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in cerebellar granule cells *J. Biol. Chem.*, **264**, 21830–21836.
 - 61) Tokumitsu, H., Hatano, N., Inuzuka, H., Yokokura, S., Nozaki, N., & Kobayashi, R. (2004) Mechanism of the generation of autonomous activity of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV *J. Biol. Chem.*, **279**, 40296–40302.
 - 62) Takata, T., Ihara, H., Hatano, N., Tsuchiya, Y., Akaike, T., & Watanabe, Y. (2017) Reactive sulfur species inactivate Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV via S-polysulfidation of its active-site cysteine residue *Biochem. J.*, **474**, 2547–2562.
 - 63) Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W., & Kida, S. (1998) CREB and memory *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 127–148.
 - 64) Ho, N., Liauw, J.A., Blaeser, F., Wei, F., Hanissian, S., Muglia, L.M., Wozniak, D.F., Nardi, A., Arvin, K.L., Holtzman, D.M., et al. (2000) Impaired synaptic plasticity and cAMP response element-binding protein activation in Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase type IV/Gr-deficient mice *J. Neurosci.*, **20**, 6459–6472.
 - 65) Takao, K., Tanda, K., Nakamura, K., Kasahara, J., Nakao, K., Katsuki, M., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Toyama, K., Adachi, M., et al. (2010) Comprehensive behavioral analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV knockout mice *PLoS One*, **5**, e9460.
 - 66) Park, I.K. & Soderling, T.R. (1995) Activation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) IV by CaM-kinase kinase in Jurkat T lymphocytes *J. Biol. Chem.*, **270**, 30464–30469.
 - 67) Gringhuis, S.I., de Leij, L.F., Wayman, G.A., Tokumitsu, H., & Vellenga, E. (1997) The Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase type IV is involved in the CD5-mediated signaling pathway in human T lymphocytes *J. Biol. Chem.*, **272**, 31809–31820.
 - 68) Sato, K., Suematsu, A., Nakashima, T., Takemoto-Kimura, S., Aoki, K., Morishita, Y., Asahara, H., Ohya, K., Yamaguchi, A., Takai, T., et al. (2006) Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway *Nat. Med.*, **12**, 1410–1416.

- 69) Ban, N., Yamada, Y., Someya, Y., Ihara, Y., Adachi, T., Kubota, A., Watanabe, R., Kuroe, A., Inada, A., Miyawaki, K., et al. (2000) Activating transcription factor-2 is a positive regulator in CaM kinase IV-induced human insulin gene expression *Diabetes*, **49**, 1142–1148.
- 70) Yu, X., Murao, K., Sayo, Y., Imachi, H., Cao, W.M., Ohtsuka, S., Niimi, M., Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Wong, N.C., et al. (2004) The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase cascade in glucose upregulation of insulin gene expression *Diabetes*, **53**, 1475–1481.
- 71) Murao, K., Imachi, H., Cao, W.M., Yu, X., Tokumitsu, H., Inuzuka, H., Wong, N.C., Shupnik, M.A., Kobayashi, R., & Ishida, T. (2004) Role of calcium-calmodulin-dependent protein kinase cascade in thyrotropin (TSH)-releasing hormone induction of TSH and prolactin gene expression *Endocrinology*, **145**, 4846–4852.
- 72) Eto, K., Takahashi, N., Kimura, Y., Masuho, Y., Arai, K., Muramatsu, M.A., & Tokumitsu, H. (1999) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade in *Caenorhabditis elegans*. Implication in transcriptional activation *J. Biol. Chem.*, **274**, 22556–22562.
- 73) Schild, L.C., Zbinden, L., Bell, H.W., Yu, Y.V., Sengupta, P., Goodman, M.B., & Glauser, D.A. (2014) The balance between cytoplasmic and nuclear CaM kinase-I signaling controls the operating range of noxious heat avoidance *Neuron*, **84**, 983–996.
- 74) Takemoto-Kimura, S., Suzuki, K., Horigane, S.I., Kamijo, S., Inoue, M., Sakamoto, M., Fujii, H., & Bito, H. (2017) Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease *J. Neurochem.*, **141**, 808–818.
- 75) Takano, T., Wu, M., Nakamuta, S., Naoki, H., Ishizawa, N., Namba, T., Watanabe, T., Xu, C., Hamaguchi, T., Yura, Y., et al. (2017) Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation *Nat. Commun.*, **8**, 33.
- 76) Saneyoshi, T., Wayman, G., Fortin, D., Davare, M., Hoshi, N., Nozaki, N., Natsume, T., & Soderling, T.R. (2008) Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/ β PIX signaling complex *Neuron*, **57**, 94–107.
- 77) Fortin, D.A., Davare, M.A., Srivastava, T., Brady, J.D., Nygaard, S., Derkach, V.A., & Soderling, T.R. (2010) Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca^{2+} -permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I *J. Neurosci.*, **30**, 11565–11575.
- 78) Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Suzuki, K., Kamijo, S., Fujii, H., Mano, T., Blaesser, F., Chatila, T.A., et al. (2009) Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade *J. Neurosci.*, **29**, 13720–13729.
- 79) Nakamuta, S., Funahashi, Y., Namba, T., Arimura, N., Picciotto, M.R., Tokumitsu, H., Soderling, T.R., Sakakibara, A., Miyata, T., Kamiguchi, H., et al. (2011) Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases *Sci. Signal.*, **4**, ra76.
- 80) Momcilovic, M., Hong, S.P., & Carlson, M. (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase *in vitro* *J. Biol. Chem.*, **281**, 25336–25343.
- 81) Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., et al. (2004) LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1 *EMBO J.*, **23**, 833–843.
- 82) Anderson, K.A., Ribar, T.J., Lin, F., Noeldner, P.K., Green, M.F., Muehlbauer, M.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., & Means, A.R. (2008) Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance *Cell Metab.*, **7**, 377–388.
- 83) Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., & Knecht, E. (2012) Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β) *J. Biol. Chem.*, **287**, 38625–38636.
- 84) Yamauchi, M., Kambe, F., Cao, X., Lu, X., Kozaki, Y., Oiso, Y., & Seo, H. (2008) Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β *Mol. Endocrinol.*, **22**, 893–903.
- 85) Lin, F., Marcelo, K.L., Rajapakshe, K., Coarfa, C., Dean, A., Wilganowski, N., Robinson, H., Sevcik, E., Bissig, K.D., Goldie, L.C., et al. (2015) The CaMKK2/CaMKIV relay is an essential regulator of hepatic cancer *Hepatology*, **62**, 505–520.
- 86) Massie, C.E., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., Warren, A., Scott, H., Madhu, B., Sharma, N., et al. (2011) The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis *EMBO J.*, **30**, 2719–2733.
- 87) Jin, L., Chun, J., Pan, C., Kumar, A., Zhang, G., Ha, Y., Li, D., Alesi, G.N., Kang, Y., Zhou, L., et al. (2018) The PLAG1-GDH1 axis promotes anoikis resistance and tumor metastasis through CamKK2-AMPK signaling in LKB1-deficient lung cancer *Mol. Cell*, **69**, 87–99.
- 88) York, B., Li, F., Lin, F., Marcelo, K.L., Mao, J., Dean, A., Gonzales, N., Gooden, D., Maity, S., Coarfa, C., et al. (2017) Pharmacological inhibition of CaMKK2 with the selective antagonist STO-609 regresses NAFLD *Sci. Rep.*, **7**, 11793.

著者寸描

●徳光 浩 (とくみつ ひろし)

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科教授。博士 (医学)。

■略歴 1986年北海道大学水産学部卒業。91年名古屋大学大学院医学研究科博士課程修了，博士 (医学)。同年日本学術振興会特別研究員，名古屋大学医学部助手。92年よりDNAX分子細胞生物学研究所，OHSU Vollum研究所博士研究員，ヘリックス研究所主任研究員，香川大学医学部准教授，2012年より岡山大学大学院自然科学研究科教授などを経て，2018年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達の分子機構およびタンパク質リン酸化酵素の機能研究により，シグナル伝達のも様性の解明から創薬へと結びつけたい。

■ウェブサイト <http://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/>

■趣味 西洋毛鉤釣り。