

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19570134

研究課題名（和文）

カルモデュリン・キナーゼ I Vの標的基質分子同定と情報伝達機構の解明

研究課題名（英文）

Identification and characterization of a novel target for CaM-kinase cascade

研究代表者

徳光 浩（TOKUMITSU HIROSHI）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：20237077

研究成果の概要：機能プロテオミクス法により CaM-キナーゼの新規標的リン酸化酵素を探索した。その結果、神経特異的リン酸化酵素である SAD-キナーゼが CaMKK の標的酵素であることを見いだした。試験管内において SAD-キナーゼは CaMKK によってその Thr189 がリン酸化されることにより、約 60 倍の活性化を示した。この SAD-キナーゼの活性化は培養細胞系においても確認され、CaMKK/SAD-キナーゼという新しい細胞内カルシウムシグナル伝達経路が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：CaM-キナーゼカスケード、細胞内カルシウム、CaMKK、CaM-KIV、SAD-キナーゼ、タンパク質リン酸化反応、シグナル伝達、カルモデュリン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウムは細胞内情報伝達因子として筋収縮、分泌反応、神経伝達物質の放出さらには遺伝子発現調節にいたる様々な生理作用を調節することが知られている。特に、カルシウム受容タンパク質であるカルモデュリン (CaM) を活性化因子とする  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-依

存性タンパク質リン酸化酵素群 (CaM-キナーゼ) によるリン酸化反応を介した情報伝達機構は、これら多様なカルシウムシグナル伝達の中心的なメカニズムの一つと考えられている。研究代表者らによる CaM-キナーゼ活性化リン酸化酵素 (CaM-KK) の同定とその遺伝子クローニングにより、2 種類の多機能性 CaM-キナーゼ (CaM-KI および CaM-KIV) が上流

に位置するCaM-KKによるリン酸化反応を介して機能調節を受けることが明らかとなり、CaM-キナーゼカスケードと呼ばれる新しい細胞内カルシウム情報伝達機構の概念が提唱された。以来、この新しいカルシウム情報伝達系(CaM-キナーゼカスケード)の酵素学的解析を含めた分子メカニズムについて研究を行なってきた。さらに最近では、CaM-キナーゼカスケード分子(CaM-KK/CaM-KI)をそれぞれ線虫 *C. elegans*より遺伝子クローニングし、CaM-キナーゼカスケードが哺乳動物のみならず真核生物において広く保存された情報伝達システムであることを機能的再構成により見出し、遺伝子発現制御への関与を明らかにしてきた。海外におけるCaM-キナーゼカスケード研究の展開は、ノックアウトマウスを用いた個体解析から、小脳の発達や不妊との関連さらには、MITの利根川博士らにより、本カスケードの海馬における後期の長期増強(LTP)への重要性が明らかになった。

## 2. 研究の目的

CaM-キナーゼカスケードを介した新しい細胞内カルシウム伝達機構の詳細な分子メカニズムを探るためにCaM-キナーゼの標的リン酸化基質分子の同定とリン酸化反応による機能調節の解明を目的として本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

研究代表者らは、科学研究費基盤C(一般)(平成17-18年度)『機能プロテオミクス解析法を用いたカルモデュリン・キナーゼカスケードの生理機能解明』により、タンパク質リン酸化酵素・基質間相互作用を質量分析法を用いて捕らえる手法を独自に開発し、多機能性CaM-キナーゼであるCaM-KIの基質分子として、神経細胞運命決定因子の一つと考えられるNumb/Numb1を同定するとともにNumb/Numb1の部位特異的リン酸化の生理的意義の解明に迫ることに成功した。この研究成果を踏まえ、リン酸化基質分子を結合するタンパク質リン酸化酵素の触媒領域変異体をリガンドに用いた基質タンパク質の単離

と質量分析による網羅的な同定法(機能プロテオミクス)を用いることにより、本研究の主眼であるCaM-キナーゼカスケードの標的リン酸化基質分子の網羅的探索を行なうとともに、新たに見いだされたCaM-キナーゼカスケードの生化学的および細胞生物学的解析を行った。

## 4. 研究成果

CaMKK変異体を用いた機能プロテオミクス法によりCaMKKの新規標的リン酸化酵素の探索を行なった。その結果、神経特異的なAMPKファミリーのタンパク質リン酸化酵素であるSAD-キナーゼがCaMKKの標的リン酸化酵素として見いだされた。試験管内においてSAD-キナーゼはCaMKKにより、その触媒領域内に存在するThr189がリン酸化されることにより、約60倍の活性化を示した。さらに本研究においてSAD-キナーゼのリン酸化Thr189を特異的に認識するリン酸化モノクローナル抗体の作製に成功した。この抗体を用いることによりSAD-キナーゼのCaMKKによる活性化およびThr189のリン酸化は遺伝子導入した培養細胞においても検出され、CaMKK/SAD-キナーゼという新しい細胞内カルシウムシグナル伝達経路としてのCaM-キナーゼカスケードの存在が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

- ① Mine T, Matsueda S, Tokumitsu H, Gao H, Danes C, and Ioannides C.G.: Breast cancer cells with stem cell-type markers (CD44+ CD24lo) are eliminated by Notch and Numb peptide-activated T cells. *Cancer Immunology Immunotherapy* 掲載確定 2009 査読有
- ② Fujimoto T, Yurimoto S, Hatano N, Nozaki N, Sueyoshi N, Kameshita I, Mizutani A, Mikoshiba K, Kobayashi R, and Tokumitsu H: Activation of SAD Kinase by Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent

- Protein Kinase Kinase.  
*Biochemistry*, 47 (13), 4151-4159, 2008  
査読有
- ③ Wayman G. A., Lee Y-S., Tokumitsu H,  
Silva A, and Soderling T. R.:  
Calmodulin-kinases: Modulators of  
Neuronal Development and Plasticity  
*Neuron*, 59(6), 914-931, 2008 査読有
- ④ Shimamoto S, Takata M, Tokuta M, Oohira  
F, Tokumitsu H, and Kobayashi R:  
Interactions of S100A2 and S100A6 with  
the tetratricopeptide repeat proteins,  
Hsp90/Hsp70-organizing protein and  
kinesin-light chain. *Journal of  
Biological Chemistry*, 83(42),  
28246-28258, 2008 査読有
- ⑤ Matsumoto K, Murao K, Imachi H,  
Nishiuchi T, Cao W M, Yu X, Li J, Ahmed  
R A M, Iwama H, Tokumitsu H, and Ishida  
T : The Role of  
Calcium/Calmodulin-Dependent Protein  
Kinase Cascade on MIP-1a Gene  
Expression of ATL Cells. *Experimental  
Hematology*, 36 (4), 390-400, 2008 査  
読有
- ⑥ Ichimura T, Taoka M, Hozumi Y, Goto K,  
and Tokumitsu H :  
14-3-3 proteins directly regulate  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein  
kinase kinase  $\alpha$  through  
phosphorylation- dependent multisite  
binding. *FEBS Letters*, 582 (5),  
661-665, 2008 査読有
- ⑦ Kamata A, Sakagami H, Tokumitsu H,  
Sanda M, Owada Y, Fukunaga K, and Kondo  
H : Distinct developmental expression  
of two isoforms of  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein  
kinase kinases. *Neuroscience  
Letters*, 423 (2), 143-148, 2007 査読  
有
- [学会発表] (計 7件)
- ① 藤本智仁、カルモデュリン・キナーゼ I  
アイソフォームの活性化機構の解析、第  
31回日本分子生物学会年会第81回  
日本生化学会大会、2008年12月9  
-12日
- ② 揺本-横倉沙紀、機能的プロテオミクス  
法を用いたカルモデュリン結合タンパ  
ク質の網羅的探索、第31回日本分子生  
物学会年会第81回日本生化学会大会、  
2008年12月9-12日、神戸
- ③ 高田麻紀、Interactions of S100A2 and  
S100A6 with the tetratricopeptide  
repeat proteins, Hsp90/Hsp70-  
organizig protein and kinesin-light  
chain、第31回日本分子生物学会第81  
回日本生化学会大会、2008年12月  
9-12日、神戸
- ④ 嶋本聖子、ユビキチンリガーゼ CHIP の  
Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質 S100 による調節、  
第31回日本分子生物学会年会第81  
回日本生化学会大会、2008年12月  
9-12日、神戸
- ⑤ 藤本智仁、SAD-B の CaM-KK によるリン酸  
化と活性化、第30回日本分子生物学会  
年会第80回日本生化学会大会、200  
7年12月11-14日、横浜
- ⑥ 嶋本聖子、S100 タンパク質による  
Hsp70/Hsp90 分子シャペロン複合体の形  
成調節、第30回日本分子生物学会年  
会第80回日本生化学会大会、2007年  
12月11-14日、横浜
- ⑦ 高田麻紀、Kinesin light chain (KLC)  
と KLC 結合蛋白質の相互作用に対する  
S100 蛋白質の影響について、第30回日  
本分子生物学会年会第80回日本生化学  
会大会、2007年12月11-14日、  
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳光 浩 (TOKUMITSU HIROSHI)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：20237077

(2) 研究分担者

小林 良二 (KOBAYASHI RYOJI)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：00020917