

令和 6 年 4 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02429

研究課題名(和文) CaMKKシグナル伝達の制御機構解明とそれに基づく分子標的薬創製

研究課題名(英文) Development of inhibitors based on CaMKK-mediated signal transduction

研究代表者

徳光 浩 (Tokumitsu, Hiroshi)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・教授

研究者番号：20237077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKK)は、CaMKI、CaMKIV、PKB/Akt、AMPKなどの下流のプロテインキナーゼをリン酸化・活性化し、様々なCa²⁺依存性の生理学的・病態生理学的経路を制御している。本研究を通して、CaMKKの基質認識機構、精子細胞におけるCaMKKアイソフォームの役割、CaMKKの複合体形成機構、酵素阻害剤TIM-063とCaMKKのCa²⁺/カルモジュリン依存性の相互作用の解明を行った。さらにこのCaMKK阻害剤、TIM-063を用いたタンパク質リン酸化酵素阻害剤の創薬サイクル法を開発し、新たにAAK1阻害剤の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりCa²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMKK)を介した細胞内カルシウムシグナル伝達機構の分子メカニズムと阻害剤との相互作用機構の詳細が明らかとなった。これらの研究により、CaMKKが関与すると考えられる前立腺がんや非アルコール性脂肪性肝疾患、さらには統合失調症や双極性障害などの精神疾患についての分子病態の理解が進み、これら疾患の治療薬開発が前進することが大きく期待される。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK) phosphorylates and activates downstream protein kinases, including CaMKI, CaMKIV, PKB/Akt, and AMPK; thus, regulates various Ca²⁺-dependent physiological and pathophysiological pathways. In this study, we have investigated that the mechanism of substrate recognition of CaMKK, the role of CaMKK isoforms in spermatides, the mechanism of complex formation of CaMKK and the Ca²⁺/calmodulin-dependent interaction of the enzyme inhibitor TIM-063 with CaMKK. Furthermore, a drug discovery cycle method for protein kinase inhibitors using a CaMKK inhibitor, TIM-063, was conducted and a new AAK1 inhibitor was successfully developed.

研究分野：生化学

キーワード：CaMKK 細胞内カルシウムシグナル伝達 タンパク質リン酸化反応 キナーゼ calmodulin CaMキナーゼカスケード 細胞内情報伝達 阻害剤

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内 Ca^{2+} を二次伝達因子とする細胞内シグナル伝達機構において、神経発生、遺伝子発現制御から代謝応答まで多岐に渡る生体機能調節を担う制御酵素として見出された Ca^{2+} /Calmodulin-依存性キナーゼ・キナーゼ (CaMKK) の分子制御機構の解明とその分子基盤に立脚した CaMKK 阻害薬の創製を研究目的とする。具体的には、CaMKK を介したリン酸化情報伝達 (CaMKK/CaMKI・CaMKIV 経路と CaMKK/5' AMP-活性化キナーゼ経路) の未解明な活性化 (基質認識・分子構造)、不活性化機構 (脱リン酸化)、翻訳後修飾 (リン酸化・レドックス制御) など詳細な調節機構の解明と CaMKK 標的キナーゼの探索から新たな Ca^{2+} シグナル経路を見出す。また、CaMKK 活性の誤作動とがん細胞増殖、代謝異常や精神疾患との関連が示唆されており、本研究により世界初の CaMKK 分子標的薬が期待される。

2. 研究の目的

CaMK カスケードの調節機構の個々の作動原理 (活性化、不活性化、基質認識、多量体構造) についてその分子基盤を解明することにより、様々な本情報伝達に関連する正常な細胞機能の制御 (新たなシグナル経路の探索)、さらには CaMKK の機能に伴う疾患の作動原理を理解し、これら分子メカニズムに立脚した特異的 CaMKK 阻害薬の創製を目的とする。

3. 研究の方法

(1) [CaMKK 多量体分子構造の証明] CaMKK 2 量体または多量体形成が示唆された。これを証明するために、相互的精製法を用いて精製した GST-CaMKK・His-CaMKK 複合体をゲル濾過法および化学架橋法を用いて複合体内の CaMKK 分子の化学量論を求め、また隣り合う CaMKK 分子間の相互作用領域を、触媒領域、調節領域などの機能部位変異体と上記相互作用解析法を用いて同定する。さらに、精製した CaMKK 多量体酵素の Ca^{2+} /CaM 結合による酵素活性化能、下流標的キナーゼ (CaMKI・CaMKIV・AMPK) に対する基質認識特異性を測定する。

(2) [CaMKK 阻害薬と CaMKK の相互作用解析]

CaMKK に阻害特異性を持つ STO-609 をリード化合物に、CaMKK にも同等の阻害活性を持つ TIM-063 (2-hydroxy-3-nitro-7H-benzo[de]benzo[4,5]imidazo[2,1-a]isoquinolin-7-one) を Sepharose ビーズ (Kinobeads) に固相化し、CaMKK との相互作用を明らかにする。

(3) [Kinobeads を用いた新たなタンパク質リン酸化酵素阻害剤の開発] TIM-063 を固相化した Kinobeads に相互作用するリン酸化酵素を質量分析により同定する。同定したリン酸化酵素に対する選択的阻害剤を TIM-063 誘導体から選択し、特異的阻害剤としての性質を明らかにするとともに、ドッキングシミュレーションにより阻害剤と酵素との相互作用を解析する。

(4) [CaMKK 基質認識機構の解明] CaMKK の基質認識に重要と考えられる RP-領域の役割を明らかにするために、CaMKK および の RP-領域配列 (23 残基) を CaMKK と同じ位置に挿入した LKB1 変異体 (LKB1 + RP、LKB1 + RP) の新たな基質認識機能獲得について、CaMKI/CaMKIV/AMPK リン酸化能を指標に試験管内および遺伝子導入した HeLa 細胞 (LKB1 欠損細胞) を用いて確認す

る。

4 . 研究成果

Ca²⁺/Calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (CaMKK) は、CaMKI、CaMKIV、PKB/Akt、AMPK などの下流のプロテインキナーゼをリン酸化・活性化し、様々な Ca²⁺依存性の生理学的・病態生理学的経路を制御している。本研究を通して、CaMKK の基質認識機構、精子細胞における CaMKK アイソフォームの役割、CaMKK の複合体形成機構、酵素阻害剤 TIM-063 と CaMKK の Ca²⁺/カルモジュリン依存性の相互作用の解明に至った。さらにこの CaMKK 阻害剤, TIM-063 を用いたタンパク質リン酸化酵素阻害剤の創薬サイクル法を開発し、新たに AAK1 阻害剤 (TIM-098a) の開発に成功した。本研究により CaMKK を介した細胞内カルシウムシグナル伝達機構の分子メカニズムと阻害剤との相互作用機構の詳細が明らかとなるとともに、新たな創薬開発法に繋がった。これらの研究により、CaMKK が関与すると考えられる前立腺がんや非アルコール性脂肪性肝疾患、さらには統合失調症や双極性障害などの精神疾患についての分子病態の理解が進み、これら疾患の治療薬開発が前進することが大きく期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaneshige Riku, Ohtsuka Satomi, Harada Yuhei, Kawamata Issei, Magari Masaki, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 289
2. 論文標題 Substrate recognition by Arg/Pro rich insert domain in calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase for target protein kinases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5971 ~ 5984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16467	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura Kento Nlandu, Yamauchi Haruki, Mima Hiroyuki, Chen Yerun, Ohtsuka Satomi, Magari Masaki, Morishita Ryo, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 659
2. 論文標題 Rapid detection of calmodulin/target interaction via the proximity biotinylation method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokumitsu Hiroshi, Sakagami Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Molecular Mechanisms Underlying Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase Signal Transduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11025 ~ 11025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231911025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Magari Masaki, Nishioka Miku, Hari Tomomi, Ogawa Sayaka, Takahashi Kaho, Hatano Naoya, Kanayama Naoki, Futami Junichiro, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 596
2. 論文標題 The immunoreceptor SLAMF8 promotes the differentiation of follicular dendritic cell dependent monocytic cells with B cell activating ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2659 ~ 2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toshio Kitazawa, Toshiyasu Matsui, Shuichi Katsuki, Akira Goto, Kai Akagi, Naoya Hatano, Hiroshi Tokumitsu, Kosuke Takeya, Masumi Eto	4. 巻 321
2. 論文標題 A temporal Ca ²⁺ -desensitization of myosin light chain kinase in phasic smooth muscles induced by CaMKK /PP2A pathways.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C549-C558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpcell.00136.2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yusei Fukumoto, Yuhei Harada, Satomi Ohtsuka, Naoki Kanayama, Masaki Magari, Naoya Hatano, Hiroyuki Sakagami, Hiroshi Tokumitsu	4. 巻 587
2. 論文標題 Oligomerization of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 160-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satomi Ohtsuka, Taisei Okumura, Yuna abuchi, Tomoyuki Miyagawa, Naoki Kanayama, Masaki Magari, Naoya Hatano, Hiroyuki Sakagami, Futoshi Suizu, Teruhiko Ishikawa, Hiroshi Tokumitsu	4. 巻 61
2. 論文標題 Conformation-Dependent Reversible Interaction of Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase with an Inhibitor, TIM-063	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 545-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Akari, Ohtsuka Satomi, Matsumoto Fumiya, Miyagawa Tomoyuki, Okino Rei, Ikeda Yumeya, Tada Natsume, Gotoh Akira, Magari Masaki, Hatano Naoya, Morishita Ryo, Satoh Ayano, Sunatsuki Yukinari, Nilsson Ulf J., Ishikawa Teruhiko, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of a novel AAK1 inhibitor via Kinobeads-based screening	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-57051-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kirkbride Jason A., Nilsson Garbo Young, Kim Jee In, Takeya Kosuke, Tanaka Yoshinori, Tokumitsu Hiroshi, Suizu Futoshi, Eto Masumi	4. 巻 13
2. 論文標題 PHI-1, an Endogenous Inhibitor Protein for Protein Phosphatase-1 and a Pan-Cancer Marker, Regulates Raf-1 Proteostasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 1741 ~ 1741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom13121741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohtsuka Satomi, Miyai Yumi, Mima Hiroyuki, Magari Masaki, Chiba Yoichi, Suizu Futoshi, Sakagami Hiroyuki, Ueno Masaki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 117
2. 論文標題 Transcriptional, biochemical, and immunohistochemical analyses of CaMKK /2 splice variants that co-localize with CaMKIV in spermatids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102820 ~ 102820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2023.102820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Kento Nlandu, Yamauchi Haruki, Mima Hiroyuki, Chen Yerun, Ohtsuka Satomi, Magari Masaki, Morishita Ryo, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 659
2. 論文標題 Rapid detection of calmodulin/target interaction via the proximity biotinylation method	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 29 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田朱里、大塚里美、泥谷直、田邊史子、森下了、曲正樹、金山直樹、徳光浩
2. 発表標題 新規CaMKK阻害剤TIM-063を用いたDrug-repositioning法の開発
3. 学会等名 第63回 日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川俣一晟、美馬光志、山内陽生、北前勝哉、山内香奈、大塚里美、曲正樹、金山直樹、徳光浩
2. 発表標題 CaMKKの基質認識機構の解明と特異的阻害分子開発への応用
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚里美、吉田朱里、波多野直哉、奥村太晟、澤直樹、田邊史子、傳田美和子、金山直樹、曲正樹、森下了、石川彰彦、徳光浩
2. 発表標題 キナーゼ阻害剤プロテオミクス法を用いた薬効再評価法の開発
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚里美、波多野直哉、奥村太晟、澤直樹、金山直樹、曲正樹、石川彰彦、徳光浩
2. 発表標題 新規CaMKK阻害剤結合担体を用いた酵素・阻害剤相互作用解析
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会（岡山）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福本侑世、原田裕平、波多野直哉、曲正樹、金山直樹、徳光浩
2. 発表標題 Ca ²⁺ /Calmodulin-dependent protein kinase kinase (CaMKK)の多量体形成
3. 学会等名 第62回日本生化学会中国・四国支部例会（岡山）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼重陸、川俣一晟、大塚里美、波多野直哉、曲正樹、金山直樹、徳光浩
2. 発表標題 CaMKK基質認識におけるArg/Pro領域(RP-domain)の役割
3. 学会等名 第94回日本生化学大会(横浜・オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚里美、波多野直哉、奥村太晟、澤直樹、田邊史子、傳田美和子、金山直樹、曲正樹、森下了、石川彰彦、徳光浩
2. 発表標題 CaMKK阻害剤(TIM-063)を用いた阻害剤プロテオミクス解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会(横浜・オンライン)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大塚 里美、宮井 由美、美馬光志、曲正樹、千葉陽一、水津太、阪上洋行、上野正樹、徳光浩
2. 発表標題 マウスCaMKK スプライシングバリエーションの生化学的・組織学的解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会(福岡)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山内陽生、中村謙仁ランドウ、傳田美和子、杉山修世、大塚里美、曲正樹、森下了、徳光浩
2. 発表標題 近接バイオチン化法を用いた新規 Calmodulin 相互作用キナーゼの同定
3. 学会等名 第64回日本生化学会中国・四国支部例会(松山)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学・大学院ヘルスシステム統合科学研究科 細胞機能設計学
<https://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 彰彦 (Ishikawa Teruhiko) (10263617)	岡山大学・教育学研究科・教授 (15301)	
研究分担者	渡辺 泰男 (Watanabe Yasuo) (10273228)	昭和薬科大学・薬学部・教授 (32624)	
研究分担者	曲 正樹 (Magari Masaki) (50359882)	岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Thomas Jefferson University		
スウェーデン	Lund University		