

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440056

研究課題名(和文)カルモデュリンキナーゼカスケードの動作原理と新しいリン酸化制御機構の解明

研究課題名(英文) Phosphorylation-dependent regulatory mechanism of calmodulin-kinase cascade

研究代表者

徳光 浩 (Tokumitsu, Hiroshi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20237077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとする細胞内情報伝達機構においては、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多機能性CaM-依存性タンパク質リン酸化酵素群(CaMK)がその中心的な役割を担っている。本研究においては、Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase betaの構造機能解析より、基質認識機構の詳細な分子機構が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Intracellular Ca²⁺ plays an important role in the cellular signal transduction system as a second messenger. Calmodulin (CaM) is one of Ca²⁺-binding proteins, which activates multifunctional CaM-kinases. In this research, we examined the molecular mechanism of substrate recognition for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta based on the structure-function analysis.

研究分野：生化学

キーワード：CaMKK AMPK STO-609 CaMK cascade Protein Kinase Signal Transduction

1. 研究開始当初の背景

細胞内シグナル伝達における翻訳後修飾反応の中でもリン酸化・脱リン酸化反応は中心的な役割を担っている。細胞内カルシウムイオンをセカンドメッセンジャーとする情報伝達においては、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多機能性 CaM-依存性タンパク質リン酸化酵素群(CaMK)がその中心的な役割を担う。一方、これら CaMK は細胞内カルシウムイオン濃度上昇に伴い形成される Ca^{2+}/CaM 複合体の物理的相互作用によりアロステリックな酵素活性化が引き起こされるが、これは CaMK の機能制御の一部に過ぎない。重要な CaMK シグナル伝達の調節機構のひとつに CaMK 自身のリン酸化制御がある。

代表的なCaMKであるCaMKIIの自己リン酸化は一過性の細胞内 Ca^{2+} 上昇を持続的なシグナル伝達へ変換する機構として、CaMKIIがシナプス可塑性や学習・記憶の形成に重要な役割を果たしていることの生化学的論拠となっている。一方、CaMKIおよびCaMKIVはCaMKIIと異なり自己リン酸化による活性化ではなく、同じCaMKファミリーであるCaMKKによる触媒領域(Thr177およびThr196)のリン酸化により、10~30倍のリン酸化酵素活性の増大を引き起こすことが申請者らによるCaMKKの酵素単離とそのcDNAクローニングにより確立された。これら上流、下流ともに共通の活性化因子(Ca^{2+}/CaM)により制御されるリン酸化酵素の分子間リン酸化反応はCaMKカスケード反応と呼ばれる。その後の機能解析からCaMKK/CaMKI経路はシナプス形成などの神経分化への関与、CaMKK/CaMKIV経路はCREBなどの転写因子のリン酸化を介した遺伝子発現調節に関与することが明らかになった。最近では、CaMKK がエネルギーセンサーとして代謝調節に重要な5' AMP活性化キナーゼ(AMPK)の活性化リン酸化酵素として同定され、カルシウム情報伝達による新しい代謝調節の仕組みが示された。

2. 研究の目的

細胞内カルシウム情報伝達機構において多機能性カルモデュリン依存性リン酸化酵素(CaMK)は単一のセカンドメッセンジャーに多様な生理機能をもたらすために、複雑にリン酸化カスケード反応や自己リン酸化などの可逆的修飾を受け、その機能多様性と厳密な細胞内制御機構を獲得していると考えられる。本研究においては、独自に見出した多機能性 CaMK シグナル伝達の新しいリン酸化調節の動作原理とそれらの生理的役割を明らかにすることが目的である。計画した具体的な研究項目は、(1) CaMKI 特異的の自己リン酸化と活性制御 (2) CaMKK によりリン酸化依存的に活性化された AMPK の CaMKK へのフィードバックリン酸化の生理的意義 (3) CaMKK 特異的な AMPK 認識機構の解明 (4) CaMKK による標的 CaMK(CaMKI, CaMKIV)の異なる基質認識機構の解明である。

3. 研究の方法

多機能な細胞内カルシウム情報伝達経路である CaMK カスケード反応の動作原理と新たなリン酸化調節機構の分子メカニズムを解明する目的のために、まず本シグナル伝達経路に関わるタンパク質リン酸化酵素分子(CaMKK, CaMKI, CaMKIV, AMPK)の大腸菌発現系を用いて作成した組換え体を用いて試験管内におけるリン酸化反応を指標に、酵素学的解析を行なう。リン酸化解析は抗リン酸化抗体や質量分析法を用いて行なう。次いで、これらの解析より得られた本シグナル伝達の分子機構および機能解析については遺伝子導入系を含めた培養細胞を用いて、より生理的な条件下において確認、検証する。リン酸化酵素分子の基質認識に関する構造機能解析の結果は、既に得られている CaM-キナーゼ群の立体構造に適合させることにより、本リン酸化カスケード反応の分子機構の詳細を明らかにした。

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase kinase beta (CaMKK) の標的リン酸化酵素であるAMPK活性化リン酸化酵素AMPKについて、その活性化状態を細胞レベルで可視化する技術が開発され(米国Johns Hopkins大学との共同研究)、AMPKは細胞内の様々なオルガネラにおいて異なる活性化状態をとることが明らかとなった。特に本研究では、細胞内でAMPK活性を阻害するペプチド阻害剤AIPについて阻害効果の詳細を検討した。その結果、AIPのAMPK活性阻害は基質分子との拮抗阻害であることが明らかとなった。これはAIP自身が活性型AMPKによりリン酸化されることから確認され、リン酸化部位Thr残基のAla置換ペプチドのAMPK活性に対する阻害効果が低下することとよく一致している。本阻害ペプチドは細胞内に発現させることにより、特異的に細胞内AMPK活性を抑制することも明らかとなった。

(2) これまで細胞内におけるCaMKKシグナル伝達経路を解明するためにCaMKK選択的阻害剤STO-609を開発し、用いてきた。CaMKKにはCaMKK α とCaMKK β の2つのアイソフォームが存在するものの、アイソフォームによるシグナル伝達経路は明らかになっていない。CaMKK選択的阻害剤であるSTO-609を用いた問題点として、STO-609がCaMKK α とCaMKK β 双方の活性を阻害するため、細胞内でのCaMKK α とCaMKK β 個々のシグナル伝達経路を個別に解明することが困難であった。そこで本研究においてはCaMKK α とCaMKK β が異なるシグナル伝達経路を調節するのか、リダンダントな活性化因子であるのかを解明するために、STO-609非感受性CaMKK α / 変異体を作製し、STO-609非感受性CaMKK β / 安定的発現細胞

株を樹立することにより、CaMKKアイソフォーム特異的なシグナル伝達経路や生理現象の調節機構の解明を目指すことを目的とした。ランダム変異導入法によりrat CaMKK A293Tの変異がSTO-609抵抗性を示すアミノ酸変異であることを同定した。また今回作製したSTO-609抵抗性CaMKK変異体は野生型と比べSTO-609による阻害効率が100-1000倍ほど低いことが明らかとなった。またこの変異体のCaM要求性は野生型と比較して変化は見られなかった。このことから、CaM要求性と最大酵素活性に変化がないことが示唆された。遺伝子導入したSTO-609抵抗性CaMKK変異体発現細胞株の細胞抽出液も試験管内の反応においてSTO-609抵抗性を示した。さらに、CaMKIVのThr196のリン酸化を確認したところ、野生型CaMKK α / 変異体発現細胞株ではCaMKIVのThr196のリン酸化がSTO-609依存的に低下したのに対し、STO-609抵抗性CaMKK β / 変異体発現細胞株ではThr196のリン酸化が維持されていた。このことから、この樹立細胞はSTO-609抵抗性を獲得したことを示唆した。またAMPKのThr172のリン酸化はSTO-609抵抗性CaMKK β 変異体発現細胞株のみSTO-609存在下でもリン酸化が維持されていた。このことは現在までの知見と同様に、CaMKK/AMPK経路はCaMKK α ではなくCaMKK β が行っていることが示唆された。

(3) 試験管内におけるCaMKK α とCaMKK β によるAMPKの活性化ループに存在するThr172の時間依存的なリン酸化上昇について検討したところ、CaMKK α がCaMKK β より約14倍高いリン酸化酵素活性を示した。これは過去の多くの報告と一致している。そこでCaMKKアイソフォームのキネティクス解析よりAMPKに対する*K_m*値がCaMKK α 13.1 μM で、CaMKK β 1.5 μM であることが明らかとなり、CaMKKアイソフォーム

間におけるリン酸化活性の差はAMPKに対する親和性の違いによることを明らかになった。このリン酸化効率の差を生み出している一次構造上の特徴を明らかにするために、GST-CaMKK / キメラ変異体またはGST-CaMKK / / キメラ変異体を用いた結果、CaMKK Ser357とLeu358(CaMKK

Ala321とIle322)がAMPKの基質認識に関わることが示唆された。そこで、CaMKK Ala321SerもしくはIle322Leu変異体を用いて、AMPKに対するリン酸化活性を測定した結果、CaMKK Ile322LeuがCaMKK と同様のリン酸化活性を示す(右図)とともにAMPKに対する K_m 値は4.9 μ Mが算出され、AMPKに対する親和性を上昇させることができた。細胞内においても同様の結果得たことから、CaMKKアイソフォーム間で異なる一アミノ酸の違いがAMPKに対する親和性の差を生み出し、基質特異性の差異に基づく酵素活性に影響を及ぼすことを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

- (1) Fujiwara Y, Kawaguchi Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, and Tokumitsu H :Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms. Journal of Biological Chemistry 291, 13802-13808 (2016) 10.1074/jbc.M116.727867
- (2) Furuya Y, Denda M, Sakane K, Ogusu T, Takahashi S, Magari M, Kanayama N, Morishita R, and Tokumitsu H :Identification of Striated Muscle Activator of Rho Signaling (STARS) as a Novel Calmodulin Target by a Newly

Developed Genome-Wide Screen.

Cell Calcium 60, 32-40 (2016)

10.1016/j.ceca.2016.04.004

- (3) Yamaguchi F, Tsuchiya M, Shimamoto S, Fujimoto T, Tokumitsu H, Tokuda M, and Kobayashi R :Oxidative Stress Impairs the Stimulatory Effect of S100 Proteins on Protein Phosphatase 5 Activity. Tohoku J. Exp. Med. 240, 67-78 (2016) 10.1620/tjem.240.67
- (4) Miyamoto T, Rho E, Sample V, Akano H, Magari M, Ueno T, Gorshkov K, Chen M, Tokumitsu H, Zhang J, and Inoue T :Compartmentalized AMPK Signaling Illuminated by Genetically Encoded Molecular Sensors and Actuators. Cell Reports 11, 657-670 (2015) 10.1016/j.celrep.2015.03.057
- (5) Fujiwara Y, Hiraoka Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H :Analysis of Distinct Roles of CaMKK Isoforms using STO-609-Resistant Mutants in Living Cells. Biochemistry 54, 3969-3977 (2015) 10.1021/acs.biochem.5b00149.
- (6) Siddique HR, Feldman DE, Chen CL, Punj V, Tokumitsu H, Machida K. :NUMB phosphorylation destabilizes p53 and promotes self-renewal of tumor-initiating cells by a NANOG-dependent mechanism in liver cancer. Hepatology 62, 1466-1479 (2015) 10.1002/hep.27987
- (7) Tsuchiya M, Yamaguchi F, Shimamoto S, Fujimoto T, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R :Oxidized S100A4 inhibits the activation of protein phosphatase 5 through S100A1 in MKN-45 gastric

carcinoma cells. International Journal of Molecular Medicine 34, 1713-1719 (2014)

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) 藤原 侑哉、川口 義典、藤本 智仁、金山 直樹、曲 正樹、徳光 浩 :Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase シグナル伝達機構の作動原理の解明(基質認識機構)第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日 パシフィコ横浜
- (2) 藤原 侑哉、川口 義典、藤本 智仁、曲 正樹、金山 直樹、徳光 浩 :CaMKKによる選択的 AMPK 活性化の細胞生物学的および生化学的解析 38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月3日(神戸)
- (3) 徳光 浩 :Calmodulin Signal Networkのインターラクトーム解析 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月2日(神戸)
- (4) Fujiwara Y, Hiraoka Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H ANALYSIS OF DISTINCT ROLES OF CAMKK ISOFORMS USING STO-609-RESISTANT MUTANTS IN LIVING CELLS 19th :International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function In Health and Disease 2015年5月31日(ナッシュビル・米国)
- (5) 古谷 雄穂, 西口 みゆ, 傳田美和子, 曲 正樹, 金山 直樹, 森下 了, 徳光 浩 :ヒト Calmodulin 標的分子の網羅的同定 第87回日本生化学会大会 2014年10月18日(京都)
- (6) 藤原 侑哉, 平岡 佑理, 曲 正樹, 金山 直樹, 徳光 浩 :STO-609 抵抗性変異体を用いた CaMKK シグナル伝達の機能解析

第87回日本生化学会大会 2014年10月17日(京都)

- (7) 徳光 浩 :カルモデュリン標的分子の網羅解析から見た カルシウムシグナル伝達の多様性 日本薬学会関東支部 2014年10月04日 昭和薬科大学(東京)

〔その他〕

ホームページ
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳光 浩 (TOKUMITSU, Hiroshi)
岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 20237077

(2) 研究分担者

曲 正樹 (MAGARI, Masaki)
岡山大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号: 50359882

(3) 連携研究者

波多野 直哉 (HATANO, Naoya)
神戸大学・大学院医学(系)研究科・特命助教
研究者番号: 10332280