

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06113

研究課題名(和文) CaMKK /AMPKシグナル伝達制御の解明と分子標的薬の創製

研究課題名(英文) Regulation of CaMKKbeta/AMPK signaling and drug development

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CaMKKを介した細胞内情報伝達機構について以下の知見を得た。(1) CaMKK はHeLa細胞をイソプロテノールにより刺激することにより、速やかにCaMKKのThr144のリン酸化が上昇することを見出し、アドレナリン受容体を介したcAMP経路によるリン酸化調節が示唆された。(2) CaMKKは細胞内において、Thr144が速やかに脱リン酸化されることから、Thr144残基のリン酸化/脱リン酸化制御は動的に調節されている。(3) 新たなCaMKK阻害剤TIM-063とその不活性類縁体TIM-062の開発に成功し、本情報伝達機構の生理機能解明に有用であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM) 依存性プロテインキナーゼ活性化キナーゼ (CaMKK) は、CaMキナーゼ やCaMキナーゼ、5'-AMP活性化キナーゼ (AMPK) をリン酸化依存的に活性化し、遺伝子発現や神経発生、代謝調節に至る多様な細胞内Ca<sup>2+</sup>に応答した生理機能を調節するとともに、前立腺がん増殖などの疾患との関連も示唆されている。本研究により、CaMKKの詳細な細胞内調節機構を解明し、正常および病態におけるCaMKKの役割の一端を解明するとともに、治療薬の開発を目指した新たなCaMKK阻害剤の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have obtained the results regarding CaMKK-mediated intracellular signal transduction as follows; (1) CaMKK is phosphorylated at Thr144 in HeLa cells upon stimulation with isoproterenol, indicating the regulatory phosphorylation of CaMKK by cAMP-mediated signaling. (2) CaMKK is also rapidly dephosphorylated in the cells suggesting the dynamic regulation of CaMKK through phosphorylation/dephosphorylation. (3) We have succeeded to develop a novel CaMKK inhibitor (TIM-063) and an inactive analogue (TIM-062) which could be useful for evaluating the physiological roles of CaMKK-mediated signaling pathways.

研究分野：生化学

キーワード：CaMKK タンパク質リン酸化反応 タンパク質脱リン酸化反応 阻害剤 TIM-063 TIM-062 Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達 タンパク質リン酸化酵素

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。

## 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の中でもリン酸化・脱リン酸化反応は重要な位置を占めている。細胞内  $Ca^{2+}$  を二次伝達因子とするシグナル伝達においても、 $Ca^{2+}$  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-キナーゼ (CaMK) を介したリン酸化反応がその中心的な役割を担う。一方、これら CaMK は細胞内  $Ca^{2+}$  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 の機能制御の一端に過ぎず、複数のリン酸化酵素によるリン酸化カスケード反応による  $Ca^{2+}$  シグナルの増幅伝搬機構が存在する。特に CaMKI 及び CaMKIV は CaMKII と異なり、同じ CaMK ファミリーである CaMKK による触媒領域のリン酸化により、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、CaMK カスケード反応と呼ばれる。近年、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、 $Ca^{2+}$  シグナル伝達による新しい代謝調節の仕組みが示されている。特に、前立腺がん細胞を含めた数種類のがん細胞や非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) においては CaMKK の高発現が、AMPK 経路の過度な活性化を介した細胞への生体エネルギーの過剰供給を惹起することが明らかとなっている。

## 2. 研究の目的

細胞内における CaMK カスケード反応の詳細な分子メカニズムの解明について、CaMKK /AMPK シグナル伝達経路の特異性またそのリン酸化シグナルは活性化の一方ではなく、逆にリン酸化された AMPK による CaMKK のフィードバックリン酸化が CaMKK の  $Ca^{2+}$ /CaM-依存性を保つことが見出されたが、この双方向リン酸化調節が生体内における意義を明らかにする。また新たに見出したアルマジロリピート構造を持つ CaMKK 相互作用分子 (足場タンパク質) による CaMKK シグナル伝達の空間的制御を含めた、より複雑かつ未解明な CaMKK シグナル伝達機構を解明する。さらには、これら CaMKK の詳細な分子機構に立脚した新たな CaMKK 阻害剤の開発研究に結びつけることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### CaMKK フィードバックリン酸化の機能制御

CaMKK の活性化 AMPK による Thr144 のフィードバックリン酸化が CaMKK に  $Ca^{2+}$ /CaM 依存性を与えることから、その動作原理の生化学的解明と AMPK 1 欠損マウスおよびノックダウン細胞を用いた Thr144 リン酸化の個体および生細胞における制御機構について検証する。一方、未刺激の細胞においても Thr144 はリン酸化されていることから、AMPK とは異なる Thr144 リン酸化酵素の同定を行う。Thr144 周辺の一次構造は "MPRRPpTVESH" であり、AGC キナーゼファミリーを候補として探索する。すでに cAMP キナーゼによる Thr144 のリン酸化は確認されており、cAMP シグナルとのクロストークを細胞内で検証するとともに、オカダ

酸等の阻害剤を用いた Thr144 脱リン酸化酵素の同定も行う。これら *in vivo* における CaMKK Thr144 のリン酸化反応は、すでに樹立した抗リン酸化 Thr144 モノクローナル抗体を用いて検出する。

#### 足場分子（アルマジロリピート分子）を介したCaMKKカスケードの空間的制御

GST-CaMKK を用いた機能プロテオミクス法により、CaMKK 相互作用分子としてアルマジロリピート分子(Armc6 と Armcx5)を同定し、GST 共沈法により COS-7 細胞において CaMKK / が Armcx5 と相互作用することを確認した。そこで、Armc 分子を介した CaMKK の細胞内局在変化を免疫蛍光染色法により観察、下流標的キナーゼ(CaMKI, CaMKIV, AMPK)との3者複合体形成の検証を行う。また Armc 分子内の CaMKK 相互作用領域の同定、CaMKK 活性への Armc 分子の阻害・活性化効果を試験管内、細胞レベルにて測定することにより、足場タンパク質による CaMKK/標的リン酸化酵素の新たな空間的制御を解明する。

#### 新規CaMKK 特異的阻害薬の開発

新たに見出した ATP 非拮抗型 CaMKK 阻害剤 TIM-001 の酵素阻害剤としての特性（細胞膜透過性、酵素阻害機構、CaMKK アイソフォームおよび他のリン酸化酵素に対する阻害特異性）を明確にする。その後、TIM-001 誘導体ライブラリーの構築と CaMKK 活性阻害スクリーニングに基づく構造活性相関より阻害化合物の最適化を行う。さらに、細胞内における薬剤活性（細胞膜透過性）を再確認する。TIM-001 誘導体ライブラリーの一部は化学合成済みであり、引き続き合成予定である。

## 4. 研究成果

Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (CaM) 依存性プロテインキナーゼ活性化キナーゼ (CaMKK) は、CaM キナーゼや CaM キナーゼ、5'-AMP 活性化キナーゼ (AMPK) をリン酸化依存的に活性化し、遺伝子発現や神経発生、代謝調節に至る多様な細胞内 Ca<sup>2+</sup>に応答した生理機能を調節するとともに、前立腺がん増殖などの疾患との関連も示唆されている。本研究においてまず、HeLa 細胞において cAMP/PKA 経路が CaMKK (Thr144)のリン酸化に関与しており、細胞内 Ca<sup>2+</sup>と cAMP 経路という二つのセカンドメッセンジャーを介した情報伝達機構が CaMKK 分子上においてクロストークしていることが明らかとなった(Biochim. Biophys. Acta.-General Subjects 1863, 672-680, 2019)。また、未刺激の細胞において CaMKK (Thr144)は、PP2A/PP1 により脱リン酸化状態を保つことが明らかとなり、CaMKK は細胞内において、PKA を含めたリン酸化酵素および脱リン酸化酵素により Thr144 残基のリン酸化/脱リン酸化制御が動的に調節されていることが明らかとなった (Biochemical and Biophysical Research Communications 525, 251-257, 2020)。従来の研究により CaMKK 阻害剤として ST0-609 を開発してきたが、本阻害剤は CaMKK に対する阻害活性が CaMKK に対するものに比べて 10 倍ほど高い CaMKK 阻害剤である。そこで本研究では、種々の ST0-609 誘導体を合成し、CaMKK および CaMKK に対する阻害活性の等しい化合

物を創製することを目的として阻害化合物の探索を行った。その中で、新規に合成した ST0-609 誘導体である TIM-063 は CaMKK $\alpha$  および CaMKK $\beta$  に対する  $K_i$  値がそれぞれ 0.35 および 0.2  $\mu$ M と類似した ATP 競合阻害剤であることが明らかとなった。TIM-063 より置換機-OH(TIM-064)および-NO<sub>2</sub>(TIM-062)を除いた構造類似体は全く CaMKK に対する阻害活性を持たない。さらに、TIM-063 は培養細胞において内因性 CaMKK のリン酸化酵素活性を阻害できるが、不活性類縁体である TIM-062 は細胞内における CaMKK 活性に対する阻害効果をもたないことは、試験管内における作用と一致している。これらの研究結果より、新たな CaMKK 阻害剤 TIM-063 とその不活性類縁体 TIM-062 は、CaMKK 特異的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>シグナル伝達機構解明の新たな分子ツールとして、本情報伝達機構の生理機能解明に有用であることが明らかとなった (Biochemistry 59, 1701-1710, 2020)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takabatake S, Fukumoto Y, Ohtsuka S, Kanayama N, Magari M, Sakagami H, Hatano N, and Tokumitsu H	4. 巻 525
2. 論文標題 Phosphorylation and dephosphorylation of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase at Thr144 in HeLa cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 251-257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.02.056	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 Takabatake S, Ohtsuka S, Sugawara T, Hatano N, Kanayama N, Magari M, Sakagami H, Tokumitsu H.	4. 巻 1863
2. 論文標題 Regulation of Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase by cAMP signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj.	6. 最初と最後の頁 672-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2018.12.012.	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 徳光 浩	4. 巻 90
2. 論文標題 Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase カルシウムシグナル伝達から創薬へ	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 452-461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900452	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 Ohtsuka S, Ozeki Y, Fujiwara M, Miyagawa T, Kanayama N, Magari M, Hatano N, Suizu F, Ishikawa T, Tokumitsu H	4. 巻 59
2. 論文標題 Development and Characterization of Novel Molecular Probes for Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase, Derived from ST0-609	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1701-1710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00149	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高島 翔太、福本 侑世、金山 直樹、曲 正樹、波多野 直哉、徳光 浩
2. 発表標題 CaMKK のリン酸化/脱リン酸化による動的制御機構の解明
3. 学会等名 第39回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大塚 里美、高島 翔太、金山 直樹、曲 正樹、徳光 浩
2. 発表標題 CaMKK シグナル伝達のAMPKおよびPKAによるリン酸化制御機構の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ca <sup>2+</sup> /CaMKK シグナル伝達のcAMP/PKAによるリン酸化制御機構
2. 発表標題 高島 翔太、大塚 里美、金山 直樹、曲 正樹、徳光 浩
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚 里美、尾関 唯、藤原 萌乃、宮川 知之、金山 直樹、曲 正樹、波多野 直哉、石川 彰彦、徳光 浩
2. 発表標題 分子プローブとしてのCa <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase kinase 新規阻害剤と不活性類縁体の開発
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Sakane K, Yamaguchi F, Tsuchiya M, Kondo R, Kanayama N, Magari M, Hatano N, Kobayashi R, Tokumitsu H.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Humana Press, New York, NY	5. 総ページ数 11
3. 書名 Methods Mol Biol.	

〔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 細胞機能設計学研究室 <a href="https://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/">https://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/</a>
--

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	曲 正樹  (Magari Masaki)  (50359882)	岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・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
---------	---------