

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590334

研究課題名（和文） CaM キナーゼのスイッチオフとリン酸化バランス制御

研究課題名（英文） Mechanisms for switching off of CaM-kinases and their involvement in regulation of the cellular phosphorylation balance

研究代表者

石田 敦彦（ATSUHIKO ISHIDA）

広島大学・大学院総合科学研究科・准教授

研究者番号：90212886

研究成果の概要（和文）：

多機能性 CaM キナーゼ(CaMK)の負の制御に関わるプロテインホスファターゼとして同定された CaMK ホスファターゼ (CaMKP/PPM1F) 及び CaMKP-N (PPM1E)の細胞内動態や生理的意義を解明するため、ゼブラフィッシュをモデル動物として、これらの機能を詳しく調べた、その結果、CaMKP は胚の初期発生に必須の役割を果たしていること、CaMKP-N は C 末部分のプロセッシングによって、細胞内局在性や活性が制御されることなどが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To clarify intracellular dynamics and physiological significance of CaM-kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) and its nuclear homolog, CaMKP-N (PPM1E), which had been identified as protein phosphatases involved in negative regulation of multifunctional CaM-kinases, we carried out functional analyses of these enzymes using zebrafish as a model system. These *in vitro* and *in vivo* studies revealed that CaMKP plays a pivotal role in embryogenesis of zebrafish, and that processing of CaMKP-N regulates its catalytic activity and subcellular localization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

CaM キナーゼは Ca^{2+} を介する細胞内情報伝達系において中心的役割を担っている多機能性のセリン・スレオニンプロテインキナーゼである。CaM キナーゼには CaM キナーゼ I、CaM キナーゼ II、CaM キナーゼ IV があるが、最近、脳の高次機能制御や神経細胞死、心不

全や骨粗鬆症など、様々な生理機能の制御や疾病の発症メカニズムに CaM キナーゼが深く関与することが明らかになってきた（文献 1, 4）。CaM キナーゼの活性はリン酸化によって厳密に制御されているので、この制御系の破綻が様々な疾患に関与していることが予想されるが、そのようなリン酸化状態の制御機

構の詳細は不明である。CaM キナーゼのスイッチオンの機構にあたるリン酸化（自己リン酸化）による酵素の活性化機構については、これまで多くの研究者によって詳細な研究が積み重ねられてされてきたが、同様に重要な過程であると考えられるスイッチオフの機構、すなわち脱リン酸化による負の制御機構については、従来あまり研究が進んでいなかった。しかしながら、CaM キナーゼ制御系の詳細やその破綻の分子機構を理解するためには、スイッチオンの機構のみならず、スイッチオフの機構についても詳細な研究が必要である。そのような観点から申請者らは、CaM キナーゼのスイッチオフに関わるプロテインホスファターゼの研究に取り組み、CaM キナーゼを脱リン酸化して制御する新規プロテインホスファターゼの単離・精製及びクローニングに成功して、これを CaMKP と命名した。更に CaMKP の核局在型ホモログとして CaMKP-N を見出した。CaMKP と CaMKP-N はいずれも PPM ファミリーに属するホスファターゼであるが、これまでに見出された何れのホスファターゼとも相同性が低く、独自のサブファミリー（CaMKP ファミリー）を形成している。申請者らの最初の論文 [Ishida et al. *JBC* **273**, 1904 (1998)] 発表以降、CaMKP・CaMKP-N のホモログと考えられる酵素に関する報告が相次ぐようになった。これらの論文では hFEM2, POPX2, PPM1F, POPX1, PPM1E などの名称が使用されているが、hFEM2, POPX2, PPM1F はヒト CaMKP, POPX1, PPM1E はヒト CaMKP-N であることがそれぞれ判明している。これらの報告のうち、線維芽細胞に CaMKP のヒトホモログを発現させると、CaM キナーゼ II 依存性のピメンチンのリン酸化が顕著に抑制されたという報告 [Harvey et al. *JBC* **279**, 24889 (2004)] は CaMKP が CaM キナーゼ II のスイッチオフに関わるという我々の作業仮説を支持しているが、CaMKP・CaMKP-N が p21-activated protein kinase (PAK) のリン酸化の調節を介して細胞骨格の制御に関与しているとの報告もある [Koh et al. *Curr. Biol.* **12**, 317 (2002)/ Xie et al. *J. Cell Sci.* **121**, 514 (2008)]。このように、CaMKP・CaMKP-N の生理的、或いは病態生理的意義が未だ明らかになっていない状況下で本研究は開始された。

2. 研究の目的

CaMKP (PPM1F) 及びそのホモログ CaMKP-N (PPM1E) の生理機能と疾患との関連を解明し、またそのような研究に必要とされる特異的阻害剤を開発するため、以下のような研究の実施を計画した。研究項目は大別して (1) CaMKP を含む signaling complex の解析、(2) 細胞・個体レベルにおける CaMKP の機能解析、

(3) 細胞レベルにおける CaMKP-N の機能解析、(4) 特異的阻害剤の探索と構造決定の 4 つに分かれ、それぞれに関して下記のような手法で研究をおこなった。

3. 研究の方法

(1) CaMKP を含む signaling complex の解析

研究計画当初は、既に報告があった PIX をターゲットにして signaling complex を解析しようとしていたが、より広範に binding partner を探索することに方針を転換した。すなわち、ジゴキシゲニンでラベルした CaMKP をプローブに用いて、ラット脳の不溶性画分をサンプルとして二次元ファウエスタンプロッキングを行い、ポジティブスポットをペプチドマスフィンガープリンティング法で同定した。次に、フルオレセインでラベルした CaMKP を用いた蛍光偏光法にて、それらの候補に対する CaMKP の結合様式を詳しく調べた。

(2) 細胞レベルにおける機能解析

Neuro2a 細胞にゼブラフィッシュ CaMKP (zCaMKP) またはゼブラフィッシュ CaMKP-N、及び各種 CaMK を一過性に発現させた系をモデルとして、それぞれの細胞内局在性やイオノマイシン刺激による CaMK のリン酸化状態などをウエスタンプロッキングや間接蛍光抗体法にて詳しく調べた。

(3) 個体レベルにおける機能解析

モデル動物としてゼブラフィッシュを選び、zCaMKP のアンチセンスモルホリノオリゴヌクレオチドをゼブラ胚にマイクロインジェクションすることにより、zCaMKP の発現を抑えて（アンチセンスノックダウン）胚の初期発生に及ぼす影響を詳しく調べた。

(4) 特異的阻害剤の探索と構造決定

研究計画当初は、海藻の一種であるタマハハキモク由来の CaMKP 阻害物質の単離・精製・同定を目標としていたが、当初の目論見に反して単離精製は困難を極めたので、方針を転換し、入手可能な既知の化合物ライブラリーから改めて CaMKP の特異的阻害剤をスクリーニングすることとした。

4. 研究成果

(1) CaMKP (PPM1F) を含む signaling complex の解析

上記、研究方法 (1) に記した二次元ファウエスタンプロッキング-ペプチドマスフィンガープリンティング法により、ラット脳不溶性画分から CaMKP 結合活性を持つ候補タンパク質をいくつか同定した。そのうちの

あるものは溶液中での CaMKP との結合も確認され、また特異抗体を用いた脳スライス標品での免疫染色でも CaMKP との共局在が示唆されたので、現在、その相互作用について、更に詳しい解析を行っているところである。

(2) 細胞・個体レベルにおける CaMKP (PPM1F) の機能解析

まず、ラット CaMKP に相同性の高いゼブラフィッシュの cDNA を取得して、大腸菌で発現させ、酵素学的性質を詳しく調べたところ、この酵素はラット CaMKP に類似した性質を示した。本酵素はリン酸化された CaM キナーゼ IV に高い基質特異性を示し、また細胞内で CaM キナーゼ I を効率的に脱リン酸化したことから、CaMKP のゼブラフィッシュホモログであると判断した。

次に CaMKP の胚発生における役割を探るため、アンチセンス法により、ゼブラフィッシュ胚における CaMKP のノックダウン実験をおこなった。CaMKP をノックダウンした胚から発生したゼブラフィッシュには全身に著明な発生異常が認められ (Fig. 1 アンチセンス)、この時、全身の細胞に異常なアポトーシスが観察された (Fig. 2)。

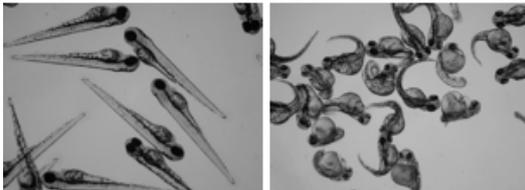


Fig. 1 コントロール アンチセンス

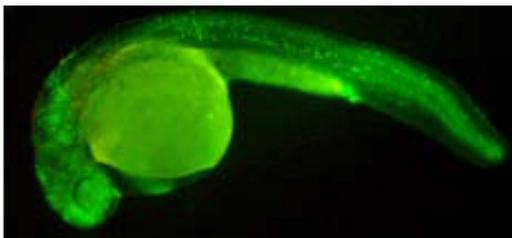


Fig. 2 CaMKP ノックダウンによって発生に異常を来したゼブラフィッシュ個体における異常なアポトーシス。蛍光の点がアポトーシスを起こした細胞を示す。

この発生異常は CaMKP タンパク質を アンチセンスオリゴとともに共注入することで顕著に抑制され、そのレスキュー効果は注入した酵素の酵素活性に依存的であった。

このような発生異常は CaMKP のノックダウンにより、多機能性 CaM キナーゼのリン酸化=活性化/脱リン酸化=不活性化状態のバランスが崩れることが原因ではないかと考え、まず、これまでに報告のないゼブラフィッシュの CaM キナーゼ IV の性質を調べた。ゼブラフィッシュには哺乳類の C 末ドメインが欠落した形の CaM キナーゼ IV が発現していたが、その酵素学的な性質はラット酵素と同様であった。しかし基質特異性やホスファターゼに対する感受性が違うことから、C 末ドメインは基質タンパクや調節因子との相互作用に必要であると考えられた。

(3) 細胞レベルにおける CaMKP-N (PPM1E) の機能解析

多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼの制御に関わる新しいプロテインホスファターゼとして申請者らが発見した CaMKP-N (PPM1E) は、細胞内で著明なプロセッシングを受ける。このプロセッシングの生理的意義を明らかにするため、ヒト CaMKP-N に比べて発現が容易で扱いやすいゼブラフィッシュ CaMKP-N (zCaMKP-N) を用い、Neuro2a 細胞に発現させて、そのプロセッシングのパターンを調べた。Neuro2a において zCaMKP-N はユビキチン化を受け、プロセッシングが、プロテアソーム阻害剤によって顕著に抑制されたことから、プロセッシングにはプロテアソームが関与していることが示唆された。プロテアソーム阻害剤を用いてプロセッシングを抑制した時の細胞内局在を調べることにより、zCaMKP-N の細胞内局在がプロセッシングによって制御されていることが示された。また、そのような局在の変化によって、zCaMKP-N の細胞内の基質へのターゲティングが大きく変化することも判明した。更に、C 末部分がプロセッシングによって切り取られることにより、zCaMKP-N のホスファターゼ活性が著明な活性化を受けることも明らかとなった。以上の結果から、zCaMKP-N はプロセッシング反応により、細胞内局在、基質へのターゲティング、酵素活性が制御されていることが示唆された。(Fig. 3)

以上のように、比較的扱いやすい zCaMKP-N をモデルとした研究から C 末のプロセッシングによる CaMKP-N の活性化機構の存在が示唆されたが、ヒト CaMKP-N は zCaMKP-N とのホモロジーが 48% とかなり低く、また全長のサイズも異なるため、この機構がヒト CaMKP-N などの哺乳類 CaMKP-N についても当てはまるかどうかは不明である。ラット脳を用いた検討

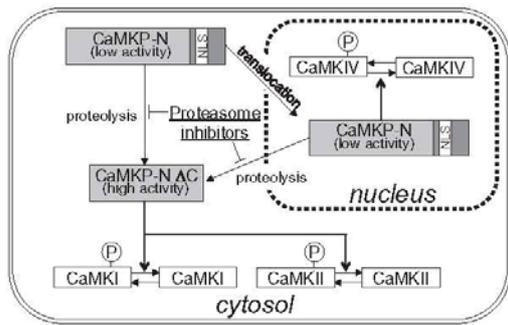


Fig.3 CaMKP-N の細胞内動態

から、脳内には完全長の CaMKP-N や、C 末をプロセシングされた 90 kDa の分子種のみならず、更にプロセシングされた 80 kDa や 60 kDa などといった様々なサイズのプロセシング産物が存在すること、またそのプロセシングのパターンは脳の部位やラットの年齢に応じて変化することなどが明らかとなった。また、ラット海馬のスライス培養を行うと、培養初期に 90 kDa CaMKP-N 分子種が急速にプロセシングされて 80 kDa 分子種に変化することも観察されている。このように、哺乳類の脳内には完全長の CaMKP-N のみならず、プロセシングを受けた様々な CaMKP-N 分子種が存在しているが、完全長 CaMKP-N がプロセシングによって、どのように酵素学的性質が変化するかについてはよくわかっていない。これらを解明するためには、完全長 CaMKP-N を含む各分子種を純粋な形で得る必要があるが、大腸菌や昆虫細胞などの発現系ではヒト CaMKP-N は内在性のプロテアーゼですぐに切断されて各種断片を生じてしまうために、純粋な完全長標品を得るのは難しく、これまでにそのような標品を得て生化学的解析を行った報告はない。そこで、プロテアーゼの影響を受けにくいコムギ胚芽由来の *in vitro* 合成系を用いて、N 末にヒスタグを付けたヒト CaMKP-N を合成したところ、従来法に比べて断片化をかなり抑制することができ、精製条件を工夫することによって、高純度の完全長 CaMKP-N 標品を再現性よく取得することができた。この方法で得られた標品は、CaMKII の自己リン酸化部位を含む合成リン酸化ペプチド基質に対して、オキサダ酸に非感受性で Mn^{2+} 依存性のホスファターゼ活性を示した。次に点突然変異の導入によって、脳内に多く存在することが示されている約 90 kDa の C 末切断型 CaMKP-N 断片、CaMKP-N(1-559)を調製し、同様に単離精製して完全長標品の性質と比較したところ、CaMKP-N(1-559)は完全長 CaMKP-N に比べて顕著に活性化を受けていた。また、何れの標品も可溶性画分及び PSD 画分の自己リン酸化型 CaMKII を効率よく脱リン酸化することも判明した。以上の結果から、CaMKP-N の C 末部

分のプロセシングは酵素を活性化するための機能的プロセシングであることが強く示唆され、C 末プロセシングによる活性化機構がヒト CaMKP-N についてもあてはまる普遍的な分子機構であることが示された。

一方、以上の研究を進めるにあたってはインゲルホスファターゼアッセイ法がしばしば重要な役割を果たしてきたが、一般にはあまり馴染みのない手法であり、詳しい解説も存在しない。そこで、その開発の経緯や応用分野、長所と短所、関連技術などを総説論文にまとめて発表した。

(4) CaMKP 特異的阻害剤の探索と構造決定

研究開始当初は、海産生物タマハハキモク由来の CaMKP 阻害物質の単離・精製・同定を目指した。タマハハキモク粗抽出液のカラムクロマトグラフィーによる分画を行い、部分精製標品の生化学的分析を行ったところ、分子量数万にも及ぶ高分子の多糖類が阻害活性の本体であることを示唆するデータが得られた。しかしながら、これ以上の解析には困難が予想されたので方針を転換し、入手可能な構造既知の化合物ライブラリーを用いて CaMKP の阻害活性を指標に、阻害物質候補をスクリーニングした。既に一次スクリーニングを終了し、特異性の確認なども含めた二次スクリーニングに取りかかろうとしているところである。今後、これらのうち、CaMKP のみに特異的な阻害活性を示す化合物を同定し、その構造を既知の CaMKP 阻害物質と対照させることにより、特徴的な構造を抽出し、必要に応じてその誘導体を合成して阻害活性を調べる予定である。このような手法により、より特異性が高く、阻害活性の強い CaMKP 阻害剤の開発に繋げていこうと考えている。

以上のような研究から、CaMKP は細胞のアポトーシスを制御することによって、胚の初期発生に必須の役割を果たしていること、CaMKP-N については細胞内で C 末部分のプロセシングによって活性化を受け、細胞内での局在性を変化させるとともに、作用する基質も変化することなどが明らかとなった。今後は、CaMKP については、どのような分子機構でアポトーシスの制御に関わるのか、CaMKP-N については、ゼブラフィッシュで得られた知見を元に、哺乳類 CaMKP-N のプロセシングによる制御機構がどうなっているのかについて明らかにしていく必要がある。

また、本研究期間内に完了することは出来なかったが、CaMKP と相互作用するタンパク質との複合体の解析、或いは CaMKP 特異的阻害剤の開発についても、本研究で得られた手掛かりに基づいて、更に研究を進める予定であり、近い将来何らかの結論が得られる見込みである。

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 4 件)

(1) Sueyoshi N., Nimura T., Onouchi T., Baba H., Takenaka S., Ishida, A. Kameshita, I. Functional processing of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP-N): evidence for a critical role of proteolytic processing in the regulation of its catalytic activity, subcellular localization and substrate targeting in vivo **Arch. Biochem. Biophys.** 517, 43-52, (2012) doi:10.1016/j.abb.2011.10.017 (査読有り)

(2) Ishida, A., Kameshita, I.: In-Gel Protein Phosphatase Assays and Other Useful Methods for the Detection of Protein Phosphatase Activities. **Anticancer Agents Med. Chem.** 11, 47-53 (2011) <http://www.benthamdirect.org/pages/content.php?ACAMC/2011/00000011/00000001/0005W.SGM> (査読有り)

(3). Nimura, T., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Ishida, A., Kameshita, I. A minimum size homologue of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV naturally occurring in zebrafish. **J. Biochem.** 147, 857-865 (2010) doi:10.1093/jb/mvq021 (査読有り)

(4) Sueyoshi N., Nimura T., Ishida A., Taniguchi T., Yoshimura Y., Ito M., Shigeri Y., Kameshita I. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase

phosphatase (CaMKP) is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, *Danio rerio*. **Arch. Biochem. Biophys.** 488, 48-59 (2009) doi:10.1016/j.abb.2009.06.003

(査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

(1) ゼブラフィッシュで探る Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP/PPM1F) と核局在型 CaMKP (CaMKP-N/PPM1E) の機能と活性調節機構 末吉紀行¹, 石田敦彦², 亀下勇¹ (¹香川大学農学部応用生物科学科、²広島大学大学院総合科学研究科) 第 84 回日本生化学会大会 平成 23 年 9 月 23 日 京都市・京都国際会館 (招待講演)

(2) 核局在型 Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP-N・PPM1E) の機能的な限定分解 小野内貴士¹、二村貴樹¹、馬場裕美¹、竹中忍¹、石田敦彦²、亀下勇¹、末吉紀行¹

(¹香川大学農学部応用生物科学科、²広島大学大学院総合科学研究科) 第 52 回日本生化学会中国・四国支部総会 平成 23 年 5 月 14 日 広島市・広島大学霞キャンパス

(3) in vitro 合成系で調製したヒト CaM キナーゼホスファターゼ-N (PPM1E) の酵素学的性質 大上恵¹、宮本和寛¹、竹中康浩²、茂里康²、五島直樹²、末吉紀行³、亀下勇³、山崎岳¹、石田敦彦¹

(¹広島大学大学院総合科学研究科、²産業技術総合研究所、³香川大学農学部応用生物科学科) 第 52 回日本生化学会中国・四国支部総会 平成 23 年 5 月 14 日 広島市・広島大学霞キャンパス

(4) Sueyoshi N., Nimura T., Onouchi T., Baba H., Takenaka S., Ishida A., Kameshita I. Functional Processing of Nuclear Ca²⁺/Calmodulin- dependent Protein Kinase Phosphatase (CaMKP-N)
International Symposium on Carcinogenic Spiral & 9th International Conference on Protein Phosphatase 平成23年2月1日
東京都・東京大学

(5)核局在型 Ca²⁺/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP-N) の機能的な限定分解 小野内貴士¹、二村貴樹¹、馬場裕美¹、竹中忍¹、石田敦彦²、亀下勇¹、末吉紀行¹

(¹香川大・農・応用生物科学、²広島大院・総合科学) 第83回日本生化学会大会
平成22年12月7日 神戸市・神戸ポートアイランド

(6) CaM キナーゼ特異的フォスファターゼ
石田敦彦 ナナカマド研究会 平成21年9月10日 旭川市・旭川医科大学 (招待講演)

[図書] (計1件)

(1)基礎の有機化学-生命科学のために 三共出版 (2010) (深宮齋彦、本田計一、石田敦彦、大村尚、根平達夫 共著) 232頁

[その他]

ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/ishiyasu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 敦彦 (ATSUHIKO ISHIDA)
広島大学・大学院総合科学研究科・准教授
研究者番号：90212886

(2)研究分担者
山崎 岳 (TAKESHI YAMAZAKI)
広島大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号：30192397

根平 達夫 (TATSUO NEHIRA)
広島大学・大学院総合科学研究科・助教
研究者番号：60321692

(3)連携研究者
棕田 崇生 (TAKAO MUKUDA)
広島大学・大学院総合科学研究科・助教
研究者番号：60346335

亀下 勇 (ISAMU KAMESHITA)
香川大学・農学部・教授
研究者番号：60127941

末吉 紀行 (NORIYUKI SUEYOSHI)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号：90346635