

平成30年6月4日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07842

研究課題名(和文) CaMKI-deltaの活性調節機構と生理機能の解明

研究課題名(英文) Activation mechanism and physiological functions of CaMKI-delta

研究代表者

末吉 紀行 (Sueyoshi, Noriyuki)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：90346635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI)は、Ca²⁺刺激に応じて上流のCaMK kinaseによって活性化される酵素であるとされてきた。当研究室の過去の研究によって、ゼブラフィッシュ初期発生時の軟骨形成にはCaMKI-deltaが関与していることが強く示唆されていた。本研究では、CaMKI-deltaのCaMK kinaseに依存しない新規活性化メカニズムを発見するとともに、内在性基質の候補としてDlx1を同定した。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI) is known to be activated by the upstream kinase, CaMK kinase. Recently, we have found that CaMKI-delta, one of the isoform of CaMKI, plays an important role in the generation of cartilage and fins during zebrafish embryogenesis. In this study, we found a CaMK kinase-independent activation mechanism of CaMKI-delta. In addition, we identified Dlx1 as a candidate for endogenous substrate of CaMKI-delta.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：CaM kinase phosphorylation zebrafish Dlx1 phosphatase CaMKK CaMKI

1. 研究開始当初の背景

細胞内情報伝達の Key Molecule であるプロテインキナーゼ(PK)の機能に関しては、まだ明らかにされていない点が多い。脊椎動物の胚発生過程では、限られた時間・空間において各組織が決まったルールに従って器官形成されるが、この過程もタンパク質リン酸化によって厳密に制御されているはずである。しかし、胚発生過程のいつ、どこで、どの PK が器官形成に関与しているかについての研究はあまり進んでいない。

そこで我々は以前に、PK 間で高度に保存された領域に着目し、PK を網羅的に検出することが出来る抗体(マルチ PK 抗体)を開発していた (*Anal. Biochem.* **347**: 112-120, 2005)。この抗体を利用した発現スクリーニングでは 90%以上の確率で PK を選択的に検出できるので、胚発生過程で発現量が変動する PK を簡便かつ網羅的に検出・同定するのに有用なツールとして使えるのではないかと考えた。

マルチ PK 抗体を用いたウエスタンブロッティングおよび発現スクリーニングを行い、ゼブラフィッシュ初期発生に関与していると考えられる Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ)の2種類のスプライスバリエーション、すなわち 392 アミノ酸からなる CaMKIδ-L と、29 bp の挿入によってフレームシフトが起こり C 末端が 24 残基短くなった CaMKIδ-S (368 アミノ酸)を取得した。また、これとは別に C 末が 100 残基長い CaMKIδ-LL も見出した。

ゼブラフィッシュの3種の CaMKIδアイソフォームについて研究を進めた結果、以下の点が明らかとなった。

- CaMKI は上流の CaMK kinase (CaMKK) によってアクチベーションループ内の Thr 残基がリン酸化されて活性化される。従って、Ca²⁺イオンフォアである Ionomycin 等で細胞に刺激を与えないとリン酸化されない。実際マウスの CaMKIαは Ionomycin を添加しないと活性化されないが、CaMKIδは刺激の有無にかかわらず有意にリン酸化されているという大変興味深い現象を見出した。
- アンチセンスモルフォリノオリゴ(AS-MO)を用いた gene knockdown の結果、L と S では受精後 24 時間において頭部の形成異常と体節の萎縮が見られた。LL では上記に加え胸鰭が萎縮するという表現型が見られた。
- これらの表現型は、それぞれのアイソフォームの精製タンパク質を AS-MO と同時にインジェクションすることでレスキューされた。しかし、キナーゼ活性のない変異体タンパク質ではレスキューされなかった。

以上の結果より、CaMKIδの3種のアイソフォームは他の CaMKI アイソフォームとは異なる独特の活性調節機構を持っていることと、**胚発生段階や組織によって分布が異なっていること**、また、**ゼブラフィッシュの初期発生に重要な役割を担っていること**などが強く示唆された。

2. 研究の目的

CaMKI は、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇とともに活性化された上流の CaMKK によってアクチベーションループ内の Thr 残基がリン酸化されることで活性化される。その後速やかにホスファターゼによって脱リン酸化され、元の活性の低い状態に戻るとされている。しかし、前述の通り、CaMKIδは Ca²⁺がなくても十分な活性を持続的に保持しているので、従来考えられてきたような Ca²⁺濃度の上昇で活性化されるだけでなく、Ca²⁺やカルモジュリン、CaMKK に依存しない制御機構が存在する可能性が高い。そこで、本研究では「なぜ CaMKIδは Ca²⁺刺激がなくても活性があるのか?」と「CaMKIδアイソフォーム間

の機能的役割分担は?」の2点について明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では「CaMKIδの活性調節機構の解明」と「CaMKIδの内在性基質の探索」を試みた。

については CaMKIδが Ca²⁺刺激がなくても有意にリン酸化され活性を持っていることに着目した。可能性としては「CaMKIδにはホスファターゼが作用しにくい」、「αには作用するが、δには作用しないホスファターゼがある」、「CaMKK によって一旦活性化されると、自己リン酸化によって持続的に活性を維持する」、「未知のリン酸化サイトを自己リン酸化することで活性化する機構が存在する」などが考えられるが、「CaMK はカルシウム刺激によって活性化される」というこれまでの常識を覆す重要項目であるので、推定リン酸化部位の点変異体や質量分析を駆使して重点的に検討した。

については、CaMKIδ-L、-S、-LL をノックダウンした際の表現型の違いや CaMKIδアイソフォーム間での機能的役割分担を理解する上で極めて重要であるので、溶液中で等電点分離が可能な MicroRotor を用いた新手法 (*Senga et al. Anal. Biochem.* **408**: 345-347, 2011)、あるいは two-hybrid screening により CaMKIδの内在性基質の同定を試みた。

4. 研究成果

CaMKIαとCaMKIδのホスファターゼ抵抗性に注目した活性調節機構の比較解析

CaMKI は Ca²⁺/CaM 存在下で上流の CaMKK によってリン酸化されて活性型となり、下流の基質をリン酸化する。これまでの報告では、CaMKI は Ca²⁺刺激によってリン酸化および活性化されることになっているが、内在性 CaMKI のリン酸化状態を比較したところ、Ca²⁺刺激がない状態で CaMKIαは全くリン酸化されていなかったのに対し、CaMKIδは有意にリン酸化されていた。我々は、この現象が CaMKIαとδの N 末領域のアミノ酸配列の相違により、CaMKIδ がホスファターゼ抵抗性となることで起こることを見出した。まず、ホスファターゼ抵抗性を比較するために、CaMK の制御に関与する CaMK ホスファターゼ(CaMKP)を用いてリン酸化 CaMKI の脱リン酸化アッセイを行った。その結果、CaMKIαは速やかに脱リン酸化されるのに対し、CaMKIδはほとんど脱リン酸化されなかった。このホスファターゼ抵抗性は、PPM1A、PPM1B、PPM1D など他のホスファターゼを用いた場合にも同様に見られた。次に、ホスファターゼ抵抗性がキナーゼ活性に依存しているのかを調べるために、キナーゼ活性のない変異体である CaMKIδ(K54R) と CaMKIα(K49R) を用いて脱リン酸化アッセイを行った。その結果、それぞれの変異体はそれぞれの WT と同様の結果を示したことから、ホスファターゼ抵抗性にキナーゼ活性は関係ないことが明らかになった。ホスファターゼ抵抗性に重要な領域を決定するために、CaMKIδの N 末領域を CaMKIαと入れ替えたキメラ変異体を作製したところ、CaMKIδのサブドメイン 周辺を CaMKIαのアミノ酸に置換した変異体は、ホスファターゼによる脱リン酸化を受けやすくなった。以上の結果より、CaMKIαとの N 末領域の一次構造の違いによって CaMKIδはホスファターゼ抵抗性になっており、低 Ca²⁺状態でも脱リン酸化されることなく、リン酸化状態を維持していることが示唆された。

タンパク質のリン酸化試薬として有用な

CaMKI δ (1-299)の開発

タンパク質を幅広くリン酸化できるリン酸化試薬としてのプロテインキナーゼは、リン酸化タンパク質の機能解析を行う上で非常に有用なツールとなる。当研究室では以前、大腸菌での大量発現を可能にした Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ II の活性断片 (CX-30K-CaMKII) を開発したが、不溶性画分のみで発現することから、精製の際に変性や再生化などの煩雑なステップを要し、簡便には取得できないという問題点があった。我々は、CaMKI 特有の活性調節機構を明らかにする過程で、大腸菌発現系で取得した Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI) の C 末端欠損変異体 CaMKI (1-299) は CX-30K-CaMKII よりも遥かに高い恒常的活性を示し、かつ可溶性画分に大量に発現することを見出した。CaMKI (1-299)は、アフィニティーカラムを用いた 1 ステップの精製により、大腸菌培養液 1 L から 220 mg と大量にかつ簡便に取得できた。次に、CaMKI (1-299) の安定性を CX-30K-CaMKII や PKAc と比較したところ、凍結融解に対してはどの酵素も安定であったが、40°C の熱処理に対しては CX-30K-CaMKII と PKAc は失活するが、CaMKI (1-299) は安定して活性を保持した。最後に、比活性及び基質特異性を PKAc と比較したところ、比活性は CaMKI (1-299)の方が 5 倍ほど高く、PKAc があまりリン酸化しない塩基性タンパク質を CaMKI (1-299)は好んでリン酸化することが明らかとなった。以上の結果より、CaMKI (1-299)は単独または PKAc との組み合わせで用いることのできる“リン酸化試薬”として有用であることが示された。(特願 2016-095770)

恒常活性型 CaMKI δ の活性化領域外自己リン酸化を介した新規活性化メカニズム

細胞周期や細胞の分化など様々な生命現象に関与する Ca²⁺/カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI) は、Ca²⁺シグナリングの下流で働く Ser/Thr キナーゼであり、Ca²⁺/CaM の結合及び CaMK キナーゼ (CaMKK) による活性化ループ内の Thr のリン酸化を介して完全に活性化される。そのため、内在性 CaMKK を持たない大腸菌から取得した CaMKI α (1-294)は、CaMKK で活性化させた CaMKI α とは比較できないほど弱い活性しか示さない。しかし我々は、CaMKI α と最も相同性の高いアイソフォームである CaMKI δ の C 末端欠損変異体である CaMKI δ (1-299) を大腸菌で発現させた場合、CaMKK によるリン酸化を受けなくても完全に活性化することを見出した。CaMKI δ (1-299)の CaMKK 非依存的な活性化の謎を解明するために CaMKI α との比較解析を行った結果、CaMKI δ (1-299)が自己リン酸化によって高度に活性化していること、また興味深いことにその自己リン酸化部位は活性化ループ内の Thr (CaMKK によるリン酸化部位) とは異なることを明らかにした。そこで CaMKI δ (1-299)を質量分析に供し、推定されたリン酸化部位である Ser-296 を Ala 置換した CaMKI δ (1-299,S296A)を解析したところ、この変異体は自己リン酸化/活性化しないことが判明した。さらに、Ser-296 のリン酸化を模した CaMKI δ (1-299,S296E)変異体では脱リン酸化状態でも高い活性を示すことが明らかになった。以上の結果より、CaMKI δ は Ser-296 の自己リン酸化を介して活性化するというユニークな活性化機構を有するアイソフォームである可能性が示唆された。

非リン酸化型プロテインキナーゼの簡易調製法の開発とそれを活用した高活性型 CK1 の取得

大腸菌を用いたタンパク質発現系は、非修飾型のタンパク質を大量取得する上で非常に有効な手段である。しかし、プロテインキナーゼ (PK) を

発現させた場合、しばしば大腸菌内で自己リン酸化し、リン酸化タンパク質として精製される。この自己リン酸化は、原核細胞内で PK を過剰発現させた際のアーティファクトである場合があり、またその不均一性から、精製酵素に複数のリン酸化アイソフォームが混在してしまうという問題点も存在する。前述の通り、CaMKI δ のCaMKK非依存的な活性化には、大腸菌内での自己リン酸化が重要であることが示されているが、その研究の過程で、非リン酸化フォームのCaMKI δ の取得が困難かつ煩雑であった。さらに、Wnt シグナルや概日リズムなどの重要な生命現象に関わるカゼインキナーゼ1 (CK1) は、自己リン酸化によって不活性化するという独特な活性制御機構を持つキナーゼであり、従来の大腸菌発現系を用いて調製した本酵素は、高度に自己リン酸化/不活化した酵素として精製される問題があった。

本研究では以上の問題点を解決するため、λプロテインホスファターゼを恒常的に発現する大腸菌株BL21(DE3)pλPPを開発し、これを用いて発現/精製したPKが非リン酸化型酵素として取得できるかを検証した。

まず、様々なPKs (CaMKI δ , CoPK02, DYRK1A, PKL01)についてオーソドックスな BL21(DE3)と今回樹立したBL21(DE3)pλPPを用いて発現/精製を行い、リン酸化の有無についてSDS-PAGEにおけるシフトアップバンドで評価した。その結果、従来の発現系で調製したPKsでは大腸菌内で自己リン酸化が亢進しており、SDS-PAGEにおけるシフトアップバンド、及びリン酸化部位特異的抗体を用いたウエスタンブロットングでリン酸化バンドが検出された。それに対し、BL21(DE3)pλPPで発現/精製したPKsではそれらのリン酸化バンドは消失しており、単一の非リン酸化型酵素として精製できていることが明らかになった。

次に、生理学的にも重要なCK1の3つのアイソフォーム (α , δ , ϵ) の発現についても、BL21(DE3)とBL21(DE3)pλPPを用いて比較検討を行った。まず、各菌株からリコンビナントCK1sを調製し、Phos-tag SDS-PAGEに供することで自己リン酸化の有無を検証した。BL21(DE3)より取得したCK1sではPhos-tag SDS-PAGEにおいて顕著なシフトアップバンドが観察されたが、BL21(DE3)pλPPで調製したものはこれが消失しており、CK1sについても本調製法によって簡便に非リン酸化型酵素が取得できることが示された。次に、カゼインを基質とした*in vitro* キナーゼアッセイによりリン酸化活性を比較したところ、いずれのアイソフォームにおいてもBL21(DE3)pλPPで取得したCK1sの方が活性が高く、特にCK1 δ では約27倍も比活性の高い精製酵素を取得できることが判明した。

以上の結果から、BL21(DE3)pλPPを利用した本調製法を用いることで簡便に非リン酸化型PKsを取得することができ、さらにCK1sにおいては、面倒な*in vitro* 脱リン酸化処理などのステップを介さずにより比活性の高い精製酵素を調製できることが示された。

CaMKI δ による Distal-less homeobox 1 (Dlx1) のリン酸化を介した osteocalcin の転写制御

我々は以前、ゼブラフィッシュの初期発生に重要なプロテインキナーゼを探索し、3種類のCaMKI δ アイソフォーム (CaMKI δ -S, L, LL) を同定した。これらの中で最も哺乳動物のCaMKI δ と相同性の高いCaMKI δ -LLのノックダウン実験から、CaMKI δ -LLは骨形成に重要なプロテインキナーゼであることが考えられた。そこで、CaMKI δ -LLが関与する骨形成の分子

メカニズムの解明を目的とした。まず two-hybrid 法を用いて CaMKI δ -LL の結合因子を探索したところ、骨形成に關与する転写因子 Distal-less homeobox 1 (Dlx1) が同定された。Dlx1 は GST-pull down においても CaMKI δ -LL と直接結合した。また、293T 細胞において CaMKI δ -LL と Dlx1 を共発現させた場合、両者は核にて共局在した。さらに、ゼブラフィッシュ胚発生過程における RT-PCR の結果から、CaMKI δ -LL と Dlx1 はどちらも初期胚において発現していることが明らかになった。次に、Dlx1 が CaMKI δ -LL の基質であるかを調べるために *in vitro* キナーゼアッセイを行った。その結果、CaMKI δ -LL は Dlx1 の Ser-206 を主にリン酸化することが明らかになった。CaMKI δ -LL による Dlx1 のリン酸化の意義を調べるため、骨形成に關与する osteocalcin のプロモーター配列を用いた Luc assay を行ったところ、Dlx1 の転写活性は CaMKI δ -LL との共発現により増加した。以上の結果より、CaMKI δ -LL はリン酸化を介して Dlx1 による osteocalcin の転写を促進し、骨形成を誘導することが示唆された。

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 12 件)

1. Yamashita, M., Sueyoshi, N., Yamada, H., Katayama, S., Senga, Y., Takenaka, Y., Ishida, A., Kameshita, I., Shigeri, Y. "Characterization of CoPK02, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom *Coprinopsis cinerea*" **Biosci. Biotechnol. Biochem.** in press, 2018. 査読有
2. Akizuki, K., Toyama, T., Yamashita, M., Sugiyama, Y., Ishida, A., Kameshita, I., Sueyoshi, N. "Facile preparation of highly active casein kinase 1 using *Escherichia coli* constitutively expressing lambda phosphatase" **Anal. Biochem.** 549, 99-106, 2018. 査読有
3. Ishida, A., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Functions and dysfunctions of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) and CaMKP-N/PPM1E" **Arch. Biochem. Biophys.** 640, 83-92, 2018. 査読有
4. Oi, A., Katayama, S., Hatano, N., Sugiyama, Y., Kameshita, I., Sueyoshi, N. "Subcellular distribution of cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) is regulated through phosphorylation by dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A)" **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 482, 239-245, 2017. 査読有
5. Senga, Y., Akizuki, K., Katayama, S., Shigeri, Y., Kameshita, I., Ishida, A., Sueyoshi, N. "High-performance CaMKI: A highly active and stable form of CaMKI δ produced by high-level soluble expression in *Escherichia coli*" **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 475, 277-282, 2016. 査読有
6. Ozaki, H., Katoh, T., Nakagawa, R., Ishihara, Y., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Taniguchi, T., Hirano, T., Yamazaki, T., Ishida, A. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) interacts with neurofilament L and inhibits its filament association" **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 477, 820-825, 2016. 査読有
7. Sugiyama, Y., Yamashita, S., Uezato, Y., Senga, Y., Katayama, S., Goshima, N., Shigeri, Y., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Phosphorylated TandemMBP: A unique protein substrate for protein phosphatase assay," **Anal. Biochem.** 513, 47-53, 2016. 査読有
8. Katayama, S., Senga, Y., Oi, A., Miki, Y., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Expression analyses of splice variants of zebrafish cyclin-dependent kinase-like-5 and its substrate, amphiphysin 1." **Gene** 583, 15-23, 2016. 査読有
9. 片山将一、千賀由佳子、杉山康憲、末吉紀行、龜下勇 ゼブラフィッシュ cyclin-dependent kinase-like 5 による amphiphysin 1 のリン酸化 香川大学農学部学術報告 第 68 巻 17-23, 2016. 査読有
10. Katayama, S., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Critical determinants of substrate recognition by cyclin-dependent protein kinase like-5 (CDKL5)." **Biochemistry** 54, 2975-2987, 2015. 査読有
11. Senga, Y., Ishida, A., Shigeri, Y., Kameshita, I., Sueyoshi, N. "The phosphatase-resistant isoform of CaMKI, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I-delta (CaMKI-delta), remains in its 'Primed' form without Ca²⁺-stimulation." **Biochemistry** 54, 3617-3630, 2015. 査読有
12. Onouchi, T., Kishino-Kaneko, Y., Kameshita, I., Ishida, A., Sueyoshi, N. "Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) by protocadherin- γ C5 (Pcdh- γ C5)." **Arch. Biochem. Biophys.** 585, 109-120, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 仲谷 美里、大沢 仁、植田 早紀、秋月 一駿、茂里 康、石田 敦彦、龜下勇、末吉 紀行 金属依存性プロテインホスファターゼ PPM1H の PKA によるリン酸化 第 91 回日本生化学会大会、2018 年 9 月、京都。
2. 秋月 一駿、絹見 朋也、小野 彩夏、千賀 由佳子、茂里 康、龜下勇、石田 敦彦、末吉 紀行 恒常活性型 CaMKI δ の活性化領域外自己リン酸化を介した新規活性化メカニズム 第 91 回日本生化学会大会、2018 年 9 月、京都。
3. 大沢 仁、仲谷 美里、植田 早紀、乾優依子、秋月 一駿、茂里 康、石田 敦彦、龜下勇、末吉 紀行 金属依存性プロテインホスファターゼ PPM1H のリン酸化とリン酸化部位特異的抗体の作製 日本農芸化学会中四国支部第 51 回講演会(例会) 2018 年 6 月、山口
4. 小野 彩夏、秋月 一駿、千賀 由佳子、龜下勇、石田 敦彦、末吉 紀行 CaMKI δ の自己リン酸化による新規活性化メカニズムの解析 日本農芸化学会中四国支部第 51 回講演会(例会) 2018 年 6 月、山口
5. Akizuki, K., Toyama, T., Yamashita, M., Ishida, A., Kameshita, I., Sueyoshi, N.

- Establishment of a new *Escherichia coli* strain constitutively expressing lambda phosphatase, and application to the preparation of highly active casein kinase 1. 24th IUBMB Congress & 15th FAOBMB Congress, 2018年6月、ソウル
6. 山田 寛樹, 小林 博子, 金子 啓祐, 山下 雅史, 亀下 勇, 末吉 紀行 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* に存在する calmodulin 2 (CcCaM2) は 149 番目のシステイン残基を介したジスルフィド結合により二量体を形成する 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月, 神戸
 7. 秋月 一駿, 遠山 拓, 石田 敦彦, 亀下 勇, 末吉 紀行 λ phosphatase を恒常的に発現する大腸菌株 BL21(DE3)p λ PP を利用した高活性型 casein kinase 1 の簡便な調製法 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月, 神戸
 8. 秋月 一駿, 山下 雅史, 遠山 拓, 石田 敦彦, 亀下 勇, 末吉 紀行 非リン酸化型プロテインキナーゼの簡易調製法の開発とそれを活用した高活性型 CK1 の取得 第 68 回日本電気泳動学会総会, 2017 年 11 月, 広島大学
 9. 末吉 紀行, 千賀 由佳子 タンパク質のリン酸化試薬として有用な高活性型 Ca^{2+} /calmodulin 依存性プロテインキナーゼ I δ (CaMKI δ) の開発と新規活性化メカニズムの解明 香川大学・産総研マッチング研究支援事業 成果報告会, 2017 年 5 月, 香川大学
 10. 末吉 紀行 ゼブラフィッシュで探るプロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの新機能 日本農芸化学会中四国支部 第 25 回若手シンポジウム(第 9 回農芸化学の未来開拓セミナー), 2017 年 5 月, 岡山大学
 11. 千賀 由佳子, 秋月 一駿, 片山 将一, 茂里 康, 亀下 勇, 石田 敦彦, 末吉 紀行 Application of high active form CaMKI δ (1-299) for the study of protein kinase. 高活性型 CaMKI δ (1-299) のキナーゼ研究への活用 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月, 筑波
 12. 大井 愛海, 片山 将一, 波多野 直哉, 亀下 勇, 末吉 紀行 Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) は Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) をリン酸化し、その局在を制御する 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月, 横浜
 13. 秋月 一駿, 山下 雅史, 石田 敦彦, 亀下 勇, 末吉 紀行 λ Phosphatase を恒常的に発現する大腸菌株 BL21(DE3, p λ PP) を用いた非リン酸化型プロテインキナーゼの簡便な調製法の開発 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月, 横浜
 14. 植田 早紀, 櫻村 明理, 小野内 貴士, 成田 拓人, 亀下 勇, 末吉 紀行 Ca^{2+} /calmodulin 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI) による金属依存性プロテインホスファターゼ 1H (PPM1H) のリン酸化 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月, 仙台
 15. 秋月 一駿, 千賀 由佳子, 亀下 勇, 石田 敦彦, 末吉 紀行 恒常的活性型 CaMKI δ (1-299) と CaMKI α (1-294) の活性化メカニズムの比較解析, 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月, 仙台
 16. 山田 寛樹, 小林 博子, 金子 啓祐, 山下 雅史, 亀下 勇, 末吉 紀行 担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea* に存在する 2 種類の Calmodulin (CcCaM1 と CcCaM2) について 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会(例会), 2016 年 6 月, 香川
 17. 遠山 拓, 千賀 由佳子, 秋月 一駿, 亀下 勇, 末吉 紀行 ゼブラフィッシュ Ca^{2+} /CaM 依存性プロテインキナーゼ I γ (CaMKI γ) の機能解析, 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会(例会), 2016 年 6 月, 香川
 18. 成田 拓人, 植田 早紀, 小野内 貴士, 櫻村 明理, 亀下 勇, 末吉 紀行 金属イオン依存性プロテインホスファターゼ 1H (PPM1H) とそのリン酸化部位 (Ser-210) を特異的に認識する抗体の作製 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会(例会), 2016 年 6 月, 香川
 19. 志賀 はる香, 大井 愛海, 片山 将一, 亀下 勇, 末吉 紀行 Cyclin-dependent protein kinase-like 5 (CDKL5) の細胞内局在が変化する要因を解析するツールとしての抗体の作製 支部創立 15 周年記念 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会(例会), 2016 年 6 月, 香川
 20. Akizuki, K., Yamashita, M., Ishida, A., Kameshita, I., Sueyoshi, N. A simple method for preparing nonphosphorylated protein kinases using *E. coli* strain BL21(DE3, p λ PP) which constitutively expresses λ PPase. 12nd International Conference on Protein Phosphatase, 2016 年 10 月, 大阪
 21. 山下 雅史, 片山 将一, 千賀 由佳子, 杉山 康憲, 末吉 紀行, 亀下 勇 担子菌 *Coprinopsis cinerea* の成長菌糸に存在する CaM キナーゼ (CoPK02) の性質 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会, 2015 年 12 月, 神戸
 22. 片山 将一, 大井 愛海, 三木 洋祐, 末吉 紀行, 亀下 勇 Amphiphysin 1 の CLAP 領域は Cyclin-dependent kinase-like 5 によってリン酸化されるた

めに重要である 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸

23. 小野内 貴士、石田 敦彦、亀下 勇、末吉 紀行 Protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdh-γC5) による CaMK phosphatase (CaMKP-N/PPM1E) の分解抑制 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸
24. 大井 愛海、片山 将一、三木 洋祐、波多野 直哉、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇 Dual specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A) による Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) のリン酸化とその意義 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸
25. 秋月 一駿、千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行 Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ) による Distal-less homeobox (Dlx1) のリン酸化とオステオカルシンの転写制御 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸
26. 千賀 由佳子、石田 敦彦、茂里 康、亀下 勇、末吉 紀行 CaMKIα と CaMKIδ のホスファターゼ抵抗性に注目した活性調節機構の比較解析 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸
27. 尾崎 華、加藤 剛志、中川 綾子、石原 康宏、末吉 紀行、亀下 勇、谷口 隆信、山崎 岳、石田 敦彦 CaM キナーゼホスファターゼはニューロフィラメント L と結合して重合を阻害する 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会合同大会、2015 年 12 月、神戸
28. 秋月 一駿、千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行 カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I アイソフォーム (CaMKIα と CaMKIδ) の自己リン酸化に着目した比較解析 第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会、2015 年 5 月、島根
29. 大井 愛海、片山 将一、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇 Rett 症候群の発症に関わる Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) のアミノ酸変異と基質リン酸化活性 第 56 回日本生化学会中国・四国支部例会、2015 年 5 月、島根

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素 I 由来ポリペプチド、リン酸化剤、および製造方法

発明者：秋月 一駿、片山 将一、亀下 勇、末吉 紀行、千賀 由佳子、茂里 康、石田 敦彦

権利者：香川大学、広島大学、産業技術総合研究所

種類：特許権

番号：特願2016-095770

出願年月日：平成 28 年 5 月 12 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

香川大学農学部機能生化学研究室

<https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/sueyoshi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

末吉 紀行 (SUEYOSHI NORIYUKI)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：90346635

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

亀下 勇 (KAMESHITA ISAMU)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60127941

杉山 康憲 (SUGIYAMA YASUNORI)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10632599

石田 敦彦 (ISHIDA ATSUHIKO)

広島大学大学院・総合科学研究科・教授

研究者番号：90212886

(4) 研究協力者

()