

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14853

研究課題名(和文) 活性酸素によるカルモデュリンキナーゼIVの活性制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV by reactive oxygen species

研究代表者

高田 剛 (Takata, Tsuyoshi)

東北大学・医学系研究科・学術研究員

研究者番号：20733257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高次脳機能に重要なカルモデュリンキナーゼIV(CaMKIV)の、活性酸素による制御機構とそれによる細胞内情報伝達経路への影響を明らかにすることを目的とした。CaMKIVの活性化に重要なリン酸化および酵素活性は、過酸化水素による198番目のシステイン残基(Cys198)の酸化修飾を介して可逆的に阻害されることを見出した。ヒト白血病T細胞株やラット小脳顆粒神経細胞初代培養系において、過酸化水素によりCaMKIVおよび下流分子であるcAMP応答配列結合タンパク質(CREB)のリン酸化が阻害されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急速に進む高齢化に伴いアルツハイマー病などの脳神経の損傷を伴う神経疾患への対応が求められている。近年、多くの精神・神経疾患の原因の1つとして活性酸素が注目されている。本研究結果は、記憶能力の維持において重要なCaMKIVと活性酸素の結びつきを直接示したものであり、加齢や神経変性疾患に伴う記憶能力の減退機構の解明・予防や治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of calmodulin kinase IV (CaMKIV) and its effect on intracellular signal transduction pathways. We found that hydrogen peroxide (H₂O₂) limit CaMKIV activity at the active-site Cys residue through oxidation and downstream signaling in cells. Additionally, the Ca²⁺ influx-induced phospho-Thr196 of endogenous CaMKIV was also inhibited upon treatment with H₂O₂ in Jurkat T-lymphocytes and cerebellar granule cells. Phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) at Ser133, which is downstream of CaMKIV, was also decreased upon treatment with H₂O₂.

研究分野：生化学

キーワード：カルモデュリンキナーゼ 活性酸素 酸化修飾 リン酸化修飾 カルシウムシグナル レドックスシグナル 酸化ストレス cAMP応答配列結合タンパク質

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、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急速に進む高齢化に伴いアルツハイマー病などの脳神経の損傷を伴う神経疾患への対応が求められており、近年多くの精神・神経疾患の原因の1つとして活性酸素が注目されている。これまでに、活性酸素はタンパク質を酸化修飾することにより、種々の生理機能を制御することが明らかにされている。しかし、未だ活性酸素の影響が不明な分子も多く、精神・神経疾患を克服するための新しい治療方法の開発や創薬のためには、活性酸素の標的となる分子の特定とそれによる生体機能への影響を明らかにする必要がある。記憶・学習をはじめとする高次脳機能にカルモデュリンキナーゼ IV (CaMKIV) は特に重要な分子である。CaMKIV は、Ca²⁺/カルモデュリン複合体の結合と上流のカルモデュリンキナーゼキナーゼ (CaMKK) による 196 番目のスレオニンのリン酸化により活性化される。活性化した CaMKIV は、転写因子である cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) のリン酸化を介して、神経可塑性や記憶・学習を制御する初期応答遺伝子、神経栄養因子などの遺伝子発現を促進し、細胞保護や記憶固定化を制御している。これまで CaMKIV が活性酸素の標的となることは報告されていなかったが、最近我々は CaMKIV の 198 番目のシステイン残基が酸化修飾されることで、酵素活性が阻害されることを明らかにした。しかしながら、活性酸素の種類による影響や、CaMKIV 活性制御による生体内での影響については未解明なことが残されており、臨床応用への展開に関しても検討することが多い。

2. 研究の目的

本研究では、活性酸素による CaMKIV の活性制御機構とそれによる細胞内情報伝達経路への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 活性酸素による CaMKIV 活性制御機構の解明

大腸菌発現系を用い、CaMKIV の組換えタンパク質を作成した。また、常法によりそのアミノ酸置換体を作成した。組換え CaMKIV を過酸化水素 (H₂O₂) で処置し、酵素活性を測定した。CaMKK による CaMKIV 活性化の検出は、リン酸化 Thr¹⁹⁶ 認識抗体によるウエスタンブロットにて、酵素活性測定は、[⁻³²P]ATP を用いた基質リン酸化の放射性トレーサー法にて解析した。

(2) 活性酸素による CaMKIV 活性制御の細胞での影響

細胞は、CaMKIV を多く発現しているヒト白血病 T 細胞 (Jurkat)、ラット小脳顆粒細胞 (CGC) 初代培養系および CaMKIV 過剰発現ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa) を用いた。CaMKIV 活性化は、細胞へのカルシウム刺激により行い、Thr¹⁹⁶ リン酸化を検出することで評価した。

4. 研究成果

(1) 活性酸素による CaMKIV 活性制御機構の解明

精製した CaMK を H₂O₂ で前処置し、CaMKK で活性化させたところ、CaMK 活性およびリン酸化の阻害がみられた。これらの阻害は還元剤であるジチオスレイトールの処置により回復したことから、可逆的な酸化修飾であることが示唆された。次に、H₂O₂ による CaMK 酸化修飾部位を明らかにするために、活性中心近傍の Cys¹⁹⁸ を Val に点変異させた変異体 (C198V) を作成し検討したところ、野生型でみられた CaMK 活性阻害およびリン酸化阻害は C198V ではみられなかった。さらに、CaMKIV の残り 7 つのシステインのそれぞれをセリン残基に置換した変異体 C9S、C14S、C59S、C204、C212S、C232S、および C253S を作成し、H₂O₂ による影響を検討した結果、Cys¹⁹⁸ 変異体を除くすべての変異体の活性は阻害された。したがって、H₂O₂ による CaMKIV の活性阻害は、活性部位の Cys¹⁹⁸ 残基の酸化修飾を介することが明らかになった。また、グルタチオンなどの小さなチオール含有分子やタンパク質の露出したシステイン残基の酸化剤であるジアミド (Diamide) を用いて検討した。Diamide の処置により野生型 CaMKIV の酵素活性とリン酸化の阻害がみられたのに対し、C198V 変異体はこの阻害に抵抗性を示した。

(2) 活性酸素による CaMKIV 活性制御の細胞での影響

HeLa 細胞に野生型 CaMK および C198V を過剰発現させ、カルシウムイオノフォアによる CaMK リン酸化に対する H₂O₂ 処置の影響を検討したところ、野生型 CaMK のリン酸化と活性は H₂O₂ 濃度依存的に低下したが、C198V のリン酸化と活性は変化しなかった。細胞内における CaMKIV の酸化の有無を確認するために、CaMKIV 過剰発現 HeLa 細胞を H₂O₂ で処置した後、細胞抽出物を N-エチルマレイミド (NEM) に曝して遊離のチオール基をブロックし、CaMKIV 抗体でイムノブロット分析を行った。細胞を H₂O₂ に曝露すると、NEM の存在下で移動度の高い (酸化された) 形態の CaMKIV が出現する一方で、CaMKIV C198V 過剰発現細胞では酸化型は検出されないことから、Cys¹⁹⁸ の酸化が CaMKIV の移動度シフトの原因であることが示された。

CaMK は小脳顆粒細胞および T 細胞に非常に強く発現していることから、ラット小脳顆粒細胞 (CGC) 初代培養系および Jurkat 細胞を用いて内在性 CaMK への H₂O₂ の影響を検討した。CGC および Jurkat を H₂O₂ で処置すると、カルシウム刺激による CaMK リン酸化の阻害がみられた。また、CaMKIV のよく知られている核内標的分子である cAMP 応答要素結合タンパク質 (CREB) のリン酸化 (Ser¹³³) も CaMKIV と同様の挙動を示した。一方、脂質、糖質代謝調節を担う AMP キナーゼの Thr¹⁷² リン酸化は、H₂O₂ 処置により増加した。同部位は CaMKK によりリン酸化されることか

ら、 H_2O_2 による酸化ストレス下では CaMKK-AMP キナーゼシグナルは活性化されているが、CaMKIV の Cys¹⁹⁸ が可逆的に酸化修飾されることで CaMKIV-CREB 信号系が阻害されると考えられる。

以上の結果から、CaMKIV の酸化ストレスによる活性阻害が神経可塑性や記憶・学習の制御、T 細胞の成熟に障害をきたす可能性が示唆された。将来的には、CaMKIV の酸化を抑制する/あるいは酸化した CaMKIV を還元するような抗酸化薬を見出すことができれば、神経変性疾患の予防や治療に貢献するものと期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Doka E., Ida T., Dagnell M., Abiko Y., Luong N. C., Balog N., Takata T., Espinosa B., Nishimura A., Cheng Q., Funato Y., Miki H., Fukuto J. M., Prigge J. R., Schmidt E. E., Arner E. S. J., Kumagai Y., Akaike T., Nagy P.	4. 巻 6
2. 論文標題 Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax8358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax8358	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 Takata Tsuyoshi, Tsukuda Ayaka, Tsuchiya Yukihiro, Akaike Takaaki, Watanabe Yasuo	4. 巻 86
2. 論文標題 The active-site cysteine residue of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase I is protected from irreversible modification via generation of polysulfidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 68 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2019.02.008	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 Araki Shoma, Takata Tsuyoshi, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 508
2. 論文標題 Reactive sulfur species impair Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II via polysulfidation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 550 ~ 555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.134	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 Takata Tsuyoshi, Kimura Jun, Ihara Hideshi, Hatano Naoya, Tsuchiya Yukihiro, Watanabe Yasuo	4. 巻 130
2. 論文標題 Redox regulation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV via oxidation of its active-site cysteine residue	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.440	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田剛、井田智章、松永哲郎、守田匡伸、土屋幸弘、渡邊泰男、住本英樹、赤池孝章
2. 発表標題 NADPH酸化還元酵素による新規活性硫黄代謝機構の解明
3. 学会等名 第19回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田剛、土屋幸弘、赤池孝章、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼ群の活性イオウ分子応答性の差異
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田剛、佃彩華、土屋幸弘、赤池孝章、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼIのポリスルフィド化とその意義
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田剛、居原秀、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 過酸化水素によるカルモデュリンキナーゼIVの活性制御
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会・第18回日本NO学会合同学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田剛、土屋幸弘、渡邊泰男
2. 発表標題 カルモデュリンキナーゼIの活性イオウ分子応答性の解明
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 Takata T., Ihara H., Tsuchiya Y., Watanabe Y.
2. 発表標題 REGULATION OF CALCIUM ION/CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE I BY S-POLYSULFIDATION
3. 学会等名 The 10th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric Oxide (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高田剛、松永哲郎、赤池孝章	4. 発行年 2019年
2. 出版社 再生医療	5. 総ページ数 407-413
3. 書名 硫黄呼吸は幹細胞のエネルギー代謝を担っているか？	

1. 著者名 高田剛・土屋幸弘・渡邊泰男	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 442-443
3. 書名 生体の科学 増大特集 タンパク質・核酸の分子修飾 酸化還元状態 S-グルタチオニル化	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ：<http://www.toxicosci.med.tohoku.ac.jp/index.html>
リサーチマップ：https://researchmap.jp/Takata_T

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
--	---------------------------	-----------------------	----