

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770110
 研究課題名（和文）
 脊椎動物胚発生におけるCaMKキナーゼカスケードの分子解析
 研究課題名（英文） Molecular analysis of CaM kinase cascade in vertebrate embryogenesis

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

研究成果の概要：多機能性CaMKキナーゼを脱リン酸化して負に制御するCaMKPとCaMKP-Nをなくしたゼブラフィッシュ胚では、両酵素の発現部位と一致してアポトーシス（細胞の自殺）が観察された。このことは、脊椎動物の胚発生において、CaMKキナーゼによるシグナル伝達経路が重要な役割を持つことを示す。CaMKPは基質であるCaMKキナーゼによってリン酸化され、活性化された。一方でCaMKP-NはプロテアーゼによってC末を分解されることによって活性化された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：CaMKP, CaMKP-N, apoptosis, zebrafish, CaM kinase

1. 研究開始当初の背景

（1）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、この過程もリン酸化を介したシグナル伝達機構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、どの分子種のPKが器官形成に関与しているかはあまり分かっていない。その理由は、約500種類あると言われていたPKの発現量を簡便かつ網羅的に検出する手段が存

在しないからである。

そこで申請者らは、PK間で高度に保存された触媒領域に着目し、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、キナーゼに特化したプロテオーム解析を可能にした。マルチPK抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、受精後96時間までに発現量の変動する複数のPKのバンドを検出し、CaMKIとCaMKIVの新規アイソフォームを含む4種類のPKを同定した。

(2) これまでCaMKsの研究はリン酸化による活性化(スイッチオン)のメカニズムに力点が置かれ、脱リン酸化による不活性化(スイッチオフ)の機構にはあまり目が向けられて来なかった。しかし、CaMKsの制御系やその破綻の分子機構を理解するためには、スイッチオフのメカニズム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、CaMKsに特異的に作用するプロテインホスファターゼとしてCaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)と、その核局在型であるCaMKP-Nを同定した。

2. 研究の目的

本研究では、「胚発生時のCaMキナーゼの役割を明らかにする」とことと、「CaMKP, CaMKP-Nの活性制御機構を解明する」ことを目標とした。

3. 研究の方法

ゼブラフィッシュをモデル動物として、CaMKP, CaMKP-Nおよび、それらの基質となるCaMキナーゼをノックダウンする事で胚発生に及ぼす影響を評価した。また、CaMキナーゼによるCaMKPのリン酸化や、プロテアーゼによるCaMKP-NのC末端の分解に着目し、CaMKPとCaMKP-Nの活性調節機構の解明を試みた。

4. 研究成果

(1) 核局在型CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP-N)は多機能性CaMキナーゼを特異的に脱リン酸化し、不活性化するプロテインホスファターゼである。CaMKP-Nは、主に中枢神経細胞に存在しており、細胞内では核に局在する。ゼブラフィッシュにおいてCaMKP-Nをノックダウンすると、発現部位に一致してアポトーシスが観察された。これまでラットならびにゼブラフィッシュのCaMKP-NのC末端領域に核局在シグナル(NLS)が存在することが報告されている。また、ラット脳内においてはC末端領域で分解を受けた分解断片が存在し、この分解断片はNLSを失っているため細胞質にも局在することが知られている。今回、我々はCaMKP-NのC末端領域が分解を受けた場合、脱リン酸化活性にどのような影響を及ぼすかについて調べた。リン酸化CaMKIIペプチド(pp10)を基質にしてホスファターゼ活性を調べたところ、C末端領域の186個のアミノ酸を欠損させたゼブラフィッシュCaMKP-N変異体[zCaMKP-N(1-447)]はWTに比べ6倍程度の高い脱リン酸化活性を示した。また、リン酸化CaMKIVを基質にした場合でもC末端欠損変異体はWTに比べて高い脱リン酸化活性を示した。ゼブラフィッシュ脳から調製した組織抽出液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、約70kDaのCaMKP-N

の分解断片と思われる分子種が検出されたが、認識部位が異なるCaMKP-N特異的抗体で解析した結果、この分解断片はC末端領域が分解されていることが判明した。そこで、この分解断片を免疫沈降により取得し脱リン酸化アッセイを行ったところ、Mn²⁺とCaMKP-Nの活性化因子であるpoly-L-Lys存在下においてCaMKIVを顕著に脱リン酸化する活性を示した。以上の結果から、脳内におけるCaMKP-Nの分解は、その細胞内局在に影響を及ぼすだけでなく、脱リン酸化活性の制御にも関与する重要な細胞内プロセッシングである可能性が示唆された。

(2) CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)は広く脊椎動物に存在するSer/Thrプロテインホスファターゼで、CaMKI, CaMKII, CaMKIV等の多機能性CaMキナーゼに特異的に作用して、脱リン酸化することでCaMKカスケードを負に調節していると考えられている。しかし、その活性調節機構は明らかにされていない。そこでまず、基質であるCaMKsによってCaMKPがリン酸化され、活性制御されている可能性を検討した。CaMKIIによってCaMKPをリン酸化するとCaMKPの活性が上昇したが、C末欠損変異体であるCaMKP(1-412)はリン酸化を受けなかった。このことよりCaMKPのC末端413-450の間にリン酸化部位が存在する事が推測されたので、この領域のSer/Thr残基をAlaに置換した変異体を用いてSer432が主要なリン酸化部位である事を突き止めた。さらにCaMKPはCaMKIによっても同様にリン酸化を受けたが、そのリン酸化部位はSer440, Ser447, Thr437, Thr446であった。

一方、CaMKPノックダウン時のゼブラフィッシュ胚では、発現部位と一致してアポトーシスが起るが、CaMKI, II, IVのどの分子種のスイッチオフが解除されることでアポトーシスが起きているのかは明らかではない。そこでどの分子種のCaMKのリン酸化が亢進しているのかを確かめるために、まずゼブラフィッシュの各種CaMKsのクローニングを行い、CaMKI deltaとCaMKIVを取得した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計16件)

- ① Kaneko, K., Yamada, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, A., Asada, Y., Kameshita, I. "Novel Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase expressed in actively growing mycelia of the basidiomycetous mushroom *Coprinus cinereus*." *Biochim. Biophys. Acta.* 1790, 71-79 (2009) 査読有
- ② Inoue, T., Okino, N., Kakuta, Y., Hijikata, A.,

- Okano, H., Goda, H.M., Tani, M., Sueyoshi, N., Kambayashi, K., Matsumura, H., Kai, Y., Ito, M. "Mechanistic insights into the hydrolysis and synthesis of ceramide by neutral ceramidase." *J. Biol. Chem.* 284, 9566-9577 (2009) 査読有
- ③ Ishida, A., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Kameshita, I. "Negative regulation of multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases : physiological and pharmacological significance of protein phosphatases." *Br. J. Pharmacol.* 154, 729-740 (2008) 査読有
- ④ Sugiyama, Y., Ishida, A., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Tyrosine kinase activity of a Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II catalytic fragment." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 648-652 (2008) 査読有
- ⑤ Kameshita, I., Sekiguchi, M., Hamasaki, D., Sugiyama, Y., Hatano, N., Suetake, I., Tajima, S., Sueyoshi, N. "Cyclin-dependent kinase-like 5 binds and phosphorylates DNA methyltransferase 1." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1162-1167 (2008) 査読有
- ⑥ Fujimoto, T., Yurimoto, S., Hatano, N., Nozaki, N., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Mizutani, A., Mikoshiba, K., Kobayashi, R., Tokumitsu, H. "Activation of SAD kinase by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase." *Biochemistry.* 47, 4151-4159 (2008) 査読有
- ⑦ Sugiyama, Y., Shimomura, S., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Two-dimensional gel electrophoretic analysis of cyanogen bromide fragments containing subdomain VIB of protein kinases using a Multi-PK antibody." *Anal. Biochem.* 373, 173-175 (2008) 査読有
- ⑧ 茂里康、石田敦彦、末吉紀行、亀下勇 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼによるシグナル伝達 —スイッチオン/オフの制御機構と疾患とのかかわり— 蛋白質核酸酵素 53, 1360-1367 (2008) 査読有
- ⑨ Nimura, T., Sueyoshi, N., Ishida, A., Yoshimura, Y., Ito, M., Tokumitsu, H., Shigeri, Y., Nozaki, N., and Kameshita, I. "Knockdown of nuclear Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase causes developmental abnormalities in zebrafish." *Arch. Biochem. Biophys.* 457, 205-216 (2007) 査読有
- ⑩ Horibata, Y., Sueyoshi, N., Ito, M. "Expression of a functional sphingomyelinase of *Pseudomonas* sp. TK4 in mammalian cells" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 603-606 (2007) 査読有
- ⑪ Ishida, A., Kameshita, I., Sueyoshi, N., Taniguchi, T., and Shigeri, Y. "Recent advances in technologies for analyzing protein kinases" *J. Pharmacol. Sci.* 103, 5-11 (2007) 査読有
- ⑫ Sueyoshi, N., Takao, T., Nimura, T., Sugiyama, Y., Numano, T., Shigeri, Y., Taniguchi, T., Kameshita, I., Ishida, A. "Inhibitors of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase family (CaMKP and CaMKP-N)" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 715-721 (2007) 査読有
- ⑬ Kameshita, I., Yamada, Y., Nishida, T., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, A., Asada, Y. "Involvement of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases in mycelial growth of the basidiomycetous mushroom, *Coprinus cinereus*" *Biochim. Biophys. Acta.* 1770, 1395-1403 (2007) 査読有
- ⑭ Shimomura, S., Nagamine, T., Nimura, T., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Kameshita, I. "Expression, characterization, and gene knockdown of zebrafish doublecortin-like protein kinase" *Arch. Biochem. Biophys.* 463, 218-230 (2007) 査読有
- ⑮ Sugiyama, Y., Shimomura, S., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Two-dimensional gel electrophoretic analysis of cyanogen bromide fragments containing subdomain VIB of protein kinases using Multi-PK antibody" *Anal. Biochem.* 373, 173-175 (2007). 査読有
- ⑯ 末吉紀行、二村貴樹、亀下勇 「カルモジュリンキナーゼに特異的に作用するホスファターゼ」 バイオサイエンスとインダストリー 65, 244-245 (2007) 査読無

[学会発表] (計 27 件)

- ① 沖野望, 井上豪, 角田佳充, 土方敦司, 岡野浩幸, 上林浩二, 合田(問註所)初美, 谷元洋, 末吉紀行, 松村浩由, 甲斐泰, 伊東信 「緑膿菌由来の中性セラミダーゼのX線結晶構造解析と反応機構の解明」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9-12日 神戸
- ② 下村幸子, 永峰賢, 波多野直哉, 末吉紀行, 亀下勇 「ゼブラフィッシュ Doublecortin-like protein kinase (zDCLK) の活性化機構と活性化型zDCLKを用いた内在性基質の探索」第31回日本

- 分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ③ 永峰賢, 下村幸子, 末吉紀行, 亀下勇「各種変異体を用いたゼブラフィッシュ Doublecortin-like protein kinaseの微小管結合状態の解析」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ④ 金子啓祐, 末吉紀行, 渡邊彰, 麻田泰彦, 亀下勇「担子菌Coprinus cinereusに発現するCoPK032の発現クローニングと機能解析」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ⑤ 西尾和士, 下村幸子, 西田哲之, 末吉紀行, 野村美加, 田島茂行, 亀下勇「ミヤコグサに発現するプロテインキナーゼ PKL01」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ⑥ 杉山康憲, 石田敦彦, 末吉紀行, 亀下勇「Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II触媒断片のチロシンキナーゼ活性」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ⑦ 二村貴樹, 末吉紀行, 亀下勇「ゼブラフィッシュ脳における核局在型CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP-N)の分解断片の解析」第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 合同大会, 2008年12月9~12日 神戸
- ⑧ Sueyoshi, N., Ishida, A., Kameshita, I. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, Danio rerio." 8th International Conference on Protein Phosphatases. 2008年11月12日 Gunma
- ⑨ Shimomura, S., Nagamine, T., Nimura, T., Sueyoshi, N., Kameshita, I. "Catalytic properties of zebrafish doublecortin-like protein kinase (zDCLK)." 11th IUBMB Conference, 2008年7月1日 Athens, Greece
- ⑩ Sugiyama, Y., Murao, K., Imachi, H., Sueyoshi, N., Ishida, I., Kameshita, I. "Calmodulin-dependent protein kinase IV regulates insulin secretion under the glucotoxic condition in INS-1 rat insulinoma cell line." 11th IUBMB Conference, 2008年7月1日 Athens, Greece
- ⑪ 金子啓祐, 山田裕介, 末吉紀行, 渡邊彰, 麻田恭彦, 亀下勇「担子菌C. cinereusの生長菌糸に発現するCa²⁺/calmodulin依存性プロテインキナーゼ」第49回日本生化学会中国・四国支部例会, 2008年5月16日 高松
- ⑫ 沖野望, 井上豪, 岡野浩幸, 上林浩二, 合田(問註所)初美, 谷元洋, 末吉紀行, 角田佳充, 伊東信「緑膿菌セラミダーゼの構造と機能の解析」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑬ 杉山康憲, 村尾孝児, 井町仁美, 末吉紀行, 石田俊彦, 亀下勇「糖毒性状態のINS-1細胞においてCaMKIVがインスリン分泌を制御する」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑭ 下村幸子, 二村貴樹, 末吉紀行, 亀下勇「Catalytic properties of zebrafish Doublecortin-like protein kinase (zDCLK)」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑮ 小池克英, 嶋本聖子, 末吉紀行, 亀下勇, 徳光浩, 小林良二「S100タンパク質によるHsp70/Hsp90分子シャペロン複合体の形成調節」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑯ 濱崎大介, 関口茉莉, 大下幸助, 波多野直哉, 徳田雅明, 末吉紀行, 末武勲, 田嶋正二, 亀下勇「DNA methyltransferase 1 (Dnmt1)のN末端領域には Cyclin-dependent protein kinase like 5 (CDKL5)が結合する」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑰ 沼野琢旬, 末吉紀行, 高尾俊彦, 石田敦彦, 谷口隆信, 二村貴樹, 杉山康憲, 茂里康, 亀下勇「Ca²⁺/CaM依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP)阻害剤のスクリーニング」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ⑱ 堀佑希, 吉村征浩, 末吉紀行, 沖野望, 伊東信「ゼブラフィッシュ初期発生系を用いた酸性スフィンゴミエリナーゼの解析」第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜

- ①⑨ 藤本智仁, 榑本沙紀, 波多野直哉, 野崎直仁, 末吉紀行, 亀下勇, 小林良二, 徳光浩 「SAD-BのCaM-KKによるリン酸化と活性化」 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- ②⑩ 関口菜里, 末吉紀行, 亀下勇 「ゼブラフィッシュCyclin-dependent protein kinase like 5 (zCDKL5)のcDNAクローニングとノックダウン」 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会, 2007年12月11~15日 横浜
- 21 杉山康憲, 下村幸子, 末吉紀行, 亀下勇, 村尾孝児 「マルチPK抗体を用いたプロテインキナーゼ同定法の確立とその応用」 第58回日本電気泳動学会総会, 2007年11月7, 8日 山口
- 22 金子啓祐, 山田裕介, 杉山康憲, 末吉紀行, 渡邊彰, 麻田恭彦, 亀下勇 「担子菌*Coprinus cinereus*の菌糸に発現する新規プロテインキナーゼの発現クローニングとその解析」 2007年度 日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会, 2007年9月14, 15日 山口
- 23 Nimura, T., Sueyoshi, N., Ishida, A., Kameshita, I. “Knockdown of nuclear calcium/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase causes developmental abnormalities in zebrafish” EuroPhosphatases 2007 “Protein Phosphatases in Health and Disease”, 2007年7月24~28日 Aveiro, Portugal
- 24 末吉紀行, 亀下勇 「CaMキナーゼホスファターゼの特異的阻害剤」 国際バイオEXPO&国際バイオフィォーラム 2007, 2007年6月21日 東京
- 25 関口菜里, 濱崎大介, 波多野直哉, 末吉紀行, 大下幸介, 末武勲, 田嶋正二, 亀下勇 「DNAメチルトランスフェラーゼ1(Dnmt1)のN末端領域に結合するプロテインキナーゼの同定と解析」 日本生化学会中四国支部会, 2007年5月19, 20日 高知
- 26 沼野琢旬, 多田幸代, 末吉紀行, 石田敦彦, 亀下勇 「Ca²⁺/CaM依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP) の各種変異体を用いた機能解析」 日本生化学会中四国支部会, 2007年5月19, 20日 高知
- 27 山田裕介, 西田哲之, 杉山康憲, 末吉紀行, 渡邊彰, 麻田恭彦, 亀下勇 「*Coprinus cinereus*のカルモデュリン依存性プロテインキナーゼの検出と遺伝子クローニング」 日本農芸化学会 2007年度大会, 2007年4月1日 東京

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