

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6月1日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510226

研究課題名（和文） プロテインキナーゼを網羅的に検出する抗体の新しい活用法とその
応用研究研究課題名（英文） Application of Multi-PK antibody that detects a wide variety of
protein kinases

研究代表者

亀下 勇 (KAMESHITA ISAMU)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：60127941

研究成果の概要（和文）：

プロテインキナーゼを網羅的に検出する抗体（マルチ PK 抗体）の様々な利用法を検討した。キノコ、植物、ゼブラフィッシュなどを材料として、発現スクリーニングを行い、取得した新規プロテインキナーゼの解析を行った。また、マルチ PK 抗体を利用した新しいプロテインキナーゼ解析法を確立し、その手法を用いて糖尿病の発症と密接に関わるプロテインキナーゼを同定した。これらの研究から、マルチ PK 抗体が様々なプロテインキナーゼの研究に利用できる有用なツールとなることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We attempted to apply the Multi-PK antibodies for the analysis of various protein kinases. By expression screening of protein kinases using the Multi-PK antibodies, we obtained various novel protein kinases from mushroom, plant, and zebrafish, and characterized them. We also developed a new technology to identify protein kinases using the Multi-PK antibodies, and identified a protein kinase responsible for glucotoxicity in diabetes. Our present study revealed that the Multi-PK antibodies can be used as the useful tools for the analysis of various protein kinases.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物分子科学、生物分子科学

キーワード：生体機能関連物質、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ（PK）は細胞内情報伝達系における巧妙な分子スイッチとして機能しており、様々な生命現象に関与することが知られている。そのため動物には500種

類以上の、また植物には1000種類以上のPKが存在すると言われており (Manning et al. *Trend. Biochem. Sci.* **27**. 514 (2002))、状況に応じて各組織での発現量や細胞内局在が刻々と変化している。従って細胞内でのPK

の動態変化を知ることは、生命現象の基本メカニズムの解明や疾病の原因究明などにおいて非常に重要な意味を持っている。しかし、多様な PK を網羅的に解析する技術の開発が遅れていたため、細胞内に発現する PK の全体像に関する研究は、当時ほとんど行われていなかった。そのような状況の中、我々は細胞内の多様な PK をまとめて検出する抗体の作製に取り組んできた。その結果、Ser/Thr キナーゼを検出する M1C と M8C (Kameshita et al. *Anal. Biochem.* **322**, 215 (2003)) ならびに Tyr キナーゼを検出する YK34 (Sugiyama et al. *Anal. Biochem.* **347**, 112 (2005)) の取得に成功した。このようにマルチ PK 抗体の作製には、成功したものの、十分な活用例がない状況で本研究はスタートした。

2. 研究の目的

我々は、セリン・スレオニン PK に対する抗体ならびにチロシン PK を認識するモノクローナル抗体を作製し (特許の項目参照)、それらがそれぞれの PK を幅広く検出できる抗体であることを明らかにした。しかし、これらの抗体は PK 解析用のツールとしてまだ十分に活用されておらず、その可能性についても十分検討がなされていない。そこで、本研究課題では、これらマルチ PK 抗体の新しい活用法を検討するとともに、これらの抗体を用いて新たに見出した新規 PK の解析を進めることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

マルチ PK 抗体を用いた発現クローニング法については、すでに確立している手法を用いた (Kameshita et al. *Anal. Biochem.* **322**, 215, (2003))。この手法を用いて、様々な生物材料をから PK の発現スクリーニングを行った。材料としては、担子菌キノコ *Coprinopsis cinerea*、ミヤコグサ *Lotus japonicus*、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* から調製した cDNA を用い、取得した PK の中で特に興味深い酵素については、大腸菌で発現精製を行い、詳細な解析を行った。

マルチ PK 抗体の応用例のひとつとして、CNBr 分解二次元泳動法 (Sugiyama et al. *Anal. Biochem.* **373**, 173 (2008)) を確立し、糖尿病の糖毒性に深く関わる PK を同定した。

その他様々な生命現象と関連のある PK については、マルチ PK 抗体を用いたウェスタンブロッティングによりその変動を調べ、注目する PK については、質量分析法あるいは上に示した新規解析法を利用して PK を決定した。同定した PK については、さらに関連する生命現象における分子メカニズムについて詳細に検討を行った。

4. 研究成果

(1) DNAメチル基転移酵素 (Dnmt1) に結合してリン酸化するSer/Thrキナーゼ

Dnmt1 は、DNA メチル化模様の維持に関与する酵素と考えられており、遺伝子発現において重要な役割を果たしている。この Dnmt1 の N 末端領域は、酵素の調節部位と考えられているが、その部位に結合する PK はこれまで報告されていない。我々は、マルチ PK 抗体の M8C を用いることにより、110 kDa の PK がこの部位に結合し、Dnmt1 をリン酸化することを見出した。この PK については、質量分析法により、Cyclin-dependent kinase like 5 (CDKL5) であることを明らかにした。また、Dnmt1 の N 末端領域には、CDKL5 以外にも CK1 が結合し、Dnmt1 をリン酸化することを明らかにした。さらに CK1 によりリン酸化された Dnmt1 は、リン酸化に伴い DNA 結合能が低下することを見出した。

(2) インスリン分泌と関連して発現するSer/Thrキナーゼ

ラットインスリノーマ INS-1 細胞を様々なグルコース濃度下で培養した時の細胞内 PK 発現パターンをマルチ PK 抗体 (M8C) で調べてみたところ、図 1B のような PK 発現パターンが観察された。特に顕著な変化としては、矢印で示す 63 kDa のバンドがインスリン分泌と連動して増減していることである。この PK が INS-1 細胞におけるインスリン分泌のカギを握っている可能性を考え、同定を試みた。ここでは、質量分析を用いずに、マルチ PK 抗体を用いる同定法を試してみた。63 kDa の PK について CNBr 分解二次元泳動法を行ったところ、サブドメイン VIB 配列を含む断片サイズが 19 kDa であることが明らかになった。また、この PK の等電点が 4.8 であったことから、これらの条件に合致する PK として CaMKIV が候補として挙げられた。この可能性は、CaMKIV に対し厳密な特異性を示す特異的抗体を用いて確認された (図 1C)。さらに CaMKIV の活性発現に応じてインスリンプロ

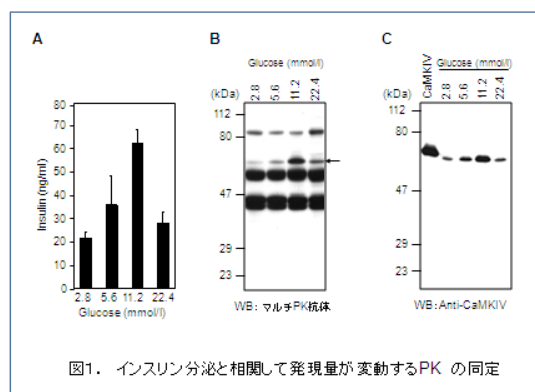


図1. インスリン分泌と関連して発現量が変動するPK の同定

モーターが ON/OFF 制御を受けることが明らかになり、CaMKIV が INS-1 におけるインスリン合成に密接に関わっていることが示された。また、糖尿病モデルラット OLETF とそのコントロールラットから膵島細胞を調製し、CaMKIV 発現レベルを比較したところ、OLETF ではコントロールラットに比較して、40%にまで低下していることが判明した。これらの結果から、インスリン合成・分泌において CaMKIV がきわめて重要な役割を果たしていることが示された。

(3) 潰瘍性大腸炎の病態に関わるチロシンキナーゼ

潰瘍性大腸炎の病態と関係のある PK に関して、チロシンキナーゼを検出するマルチ PK 抗体 (YK34) を用いて、解析を行った。オキサゾロンを投与することにより腸炎を誘発したマウスの腸上皮抽出試料を二次元電気泳動ならびに YK34 抗体を用いたウエスタンブロットで分析し、コントロールマウスと比較した。その結果、分子サイズが 120 kDa で等電点が 6.3 のスポットが腸炎の誘発に相関して顕著に発現増大するのが観察された。このタンパク質が focal adhesion kinase (FAK) であることが、FAK に対する特異的抗体との反応により確認された。また、炎症の重症度と FAK の発現量に相関関係があることも明らかになった。

(4) 各種生物材料から発現スクリーニングにより取得された新規PKの解析

ゼブラフィッシュの初期胚から得られた cDNA ライブラリーを用いた発現スクリーニングを行い、zCaMKI δ ならびに Doublecortin like protein kinase (zDCLK) などの新規 PK を取得したので、これらについて解析を行った。

zCaMKI δ をクローニングしたところ、2種類のスプライスバリエント zCaMKI δ -L と zCaMKI δ -S が得られた。さらに、これらとは異なる遺伝子座にコードされる zCaMKI δ -LL を見出し、その詳細な性質について比較解析を行った。これらのアイソフォームは、酵素学的な性質においては、大きな差は見られなかったが、その発現時期や発現組織に関して特徴がみられた。zCaMKI δ -S は、脳に特異的に発現していたが、zCaMKI δ -L は、脳以外の組織にも発現しており、特に筋肉に豊富に検出された。これに対し、zCaMKI δ -LL は、興味深いことに、ヒレに多く発現することが明らかになった。これらの zCaMKI δ に関してアンチセンスモルフォリノオリゴを用いたノックダウン実験を行ったところ、胚発生に異常が見られたことから、これらの PK はゼブラフィッシュの胚発生において非常に重要な役割を果たす PK であることが示された。

zDCLK は、N 末端の微小管結合ドメインと C 末端側の Ser/Thr キナーゼドメインならびにそれらのドメインに挟まれた Ser/Pro 残基が豊富な SP ドメインからなる PK である。この SP ドメインの存在意義については、これまで不明であったが、様々な zDCLK 変異体酵素を作製することにより、このドメインが微小管結合能を調節する働きを持つことを明らかにした。また、DCLK は、脳に豊富に存在する PK であるが、そのターゲットである生理的な基質については、これまで不明であった。今回の我々が開発した MicroRotor を利用した基質の探索法を用いることにより、Synapsin II が zDCLK の非常に良好な基質になることを明らかにした。

また、担子菌キノコの菌糸体を用いた発現スクリーニングを行い、Ser/Thr キナーゼである CoPK12 と CoPK32 を取得した。本研究では、これら CoPK について、酵素的な性質を詳細に調べた。

CoPK12 は、そのアミノ酸配列の相同性から *C. cinerea* の CaM キナーゼであることが判明した。CoPK12 は、他の真核生物の CaM キナーゼと異なり、Activation loop 内のリン酸化される Thr 残基が存在せず、その位置に Glu 残基が存在することが判明した。この酵素は、活性化された CaM キナーゼをミミックしたような性質を示し、他の CaM キナーゼと異なり上流の CaMKK による活性化を受けないユニークな CaM キナーゼであることが判明した。この酵素は、菌糸の特に活発に成長している部分に、CaM とともに特に豊富に発現していることから、菌糸成長に深くかかわる酵素であることが示唆された。

また CoPK32 は、そのアミノ酸配列の相同性から動物の MAPKAPK に相当するキナーゼであることが推測された。この酵素は、NaCl やマンニトールなどの浸透圧刺激に反応して、発現量ならびに活性が上昇した。このような結果から、CoPK32 は、キノコのストレス応答性の PK であると考えられた。

植物の PK として、ミヤコグサの PKL01 をクローニングし、詳細な解析を行った。この酵素の特徴的なアミノ酸配列から、PKL01 は Ndr キナーゼのミヤコグサホモログと推測された。PKL01 は、動物の Ndr キナーゼと異なり、活性発現に MOB のような活性化因子を必要とせず、恒常的に活性を発現できる酵素であることが判明した。また、基質タンパク質の探索を行ったところ、ヒストンを含め塩基性のタンパク質を好んでリン酸化する基質特異性を示す酵素であることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 17 件)

- (1) Senga, Y., Nagamine, T., Kameshita, I., Sueyoshi, N. : Knockdown of two splice variants of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase I δ causes developmental abnormalities in zebrafish, *Danio rerio*. *Arch. Biochem. Biophys.* **517**, 71-82 (2012).
- (2) Senga, Y., Nagamine, T., Sekiguchi, M., Kaneko, K., Sueyoshi, N., Kameshita, I. : Detection of protein kinase substrates in tissue extracts after separation by isoelectric focusing. *Anal. Biochem.* **408**, 345-347 (2011).
- (3) Sugiyama, Y., Muraio, K., Imachi, H., Sueyoshi, N., Ishida, T., Kameshita, I. : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV involvement in the pathophysiology of glucotoxicity in rat pancreatic beta-cells. *Metabolism.* **60**, 145-153 (2011).
- (4) Kaneko, K., Sugiyama, Y., Yamada, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, A., Asada, Y., Ishida, A., Kameshita, I. : CoPK32 is a novel stress-responsive protein kinase in the mushroom *Coprinopsis cinerea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1810**, 620-629, (2011).
- (5) Nagamine, T., Shimomura, S., Sueyoshi, N., Kameshita, I. : Influence of Ser/Pro-rich domain and kinase domain of doublecortin-like protein kinase on microtubule-binding activity. *J. Biochem.* **149**, 619-627 (2011).
- (6) Sugiyama, Y., Hatano, N., Sueyoshi, N., Suetake, I., Tajima, S., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Kameshita, I. : The DNA-binding activity of mouse DNA methyltransferase 1 is regulated by phosphorylation with casein kinase I δ /epsilon. *Biochem. J.* **427**, 489-497 (2010).
- (7) Nimura, T., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., Shigeri, Y., Ishida, A., Kameshita, I. : A minimum size homologue of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV naturally occurring in zebrafish. *J. Biochem.* **147**, 857-865 (2010).
- (8) Kameshita, I., Shimomura, S., Nishio, K., Sueyoshi, N., Nishida, T., Nomura, M., Tajima, S. : Expression and characterization of PKL01, an Ndr kinase homologue in *Lotus japonicus*. *J. Biochem.* **147**, 799-807 (2010).
- (9) Shimomura, S., Nagamine, T., Hatano, N., Sueyoshi, N., Kameshita, I. : Identification of an endogenous substrate of zebrafish doublecortin-like protein kinase using a highly active truncation mutant. *J. Biochem.* **147**, 711-722 (2010).
- (10) Ma, Y., Semba, S., Takeuchi, M., Kameshita, I., Ishida, A., Kato, S., Katoh, T., Liu, Y., Taniguchi, T. : Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model. *FEBS Lett.* **584**, 3949-3954 (2010).
- (11) Kaneko, K., Yamada, Y., Sueyoshi, N., Watanabe, A., Asada, Y., Kameshita, I. : Novel Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase expressed in actively growing mycelia of the basidiomycetous mushroom *Coprinus cinereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**, 71-79 (2009).

〔学会発表〕(計 34 件)

千賀由佳子、吉岡慶子、末吉紀行、亀下勇 : $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼ I δ -LL (CaMKI δ -LL)の生化学的諸性質の解析と遺伝子ノックダウン. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜

永峰賢、末吉紀行、亀下勇 : Doublecortin-like protein kinase 2の微小管結合とキナーゼ領域の核移行. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜

杉山康憲、広瀬健太郎、吉種光、亀下勇、深田吉孝 : マウス脳においてタンパク質レベルと細胞内局在が日内変動するプロテインキナーゼの探索. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、横浜

杉山康憲、広瀬健太郎、吉種光、亀下勇、深田吉孝 : マウス全脳の様々な細胞内画分において発現量が日内変動するプロテインキナーゼの探索. 第18回日本時間生物学会、2011年11月24日、名古屋

金子啓祐、杉山康憲、山田祐介、末吉紀行、渡邊彰、麻田恭彦、石田敦彦、亀下勇 : 担子菌キノコにおける新規ストレス応答性プロテインキナーゼの機能解析. 第84回日本生化学会大会、2011年9月22日、京都

片山将一、杉山康憲、末吉紀行、寺地徹、亀下勇 : 植物NdrキナーゼのTyrリン酸化活性. 平成23年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会、2011年9月16日、宮崎

千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀行、亀下勇 : $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI-delta)はゼブラフィッシュの正常な胚発生に重要である. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会合同大会、2010年12月10日、神戸

片山将一、杉山康憲、末吉紀行、寺地徹、亀下勇 : 植物Ndrキナーゼの自己チロシンリン酸化活性. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月10日、神戸

杉山康憲、広瀬健太郎、吉種光、亀下勇、深田吉孝 : マウス脳におけるプロテインキナーゼの発現と細胞内局在の日内変動 第83回日本生化学会大会 合同大会、2010年12月10日、神戸

千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀行、亀下勇 : ゼブラフィッシュの初期胚発生における $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性プロテインキナーゼ I delta (CaMKIdelta)の役割. 第51回日本生化学会中国・四国支部例会、2010年5月14日、山口

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)の活性型変異体を用いた内在性基質の探索ならびに同定. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜

千賀由佳子、永峰賢、二村貴樹、末吉紀行、亀下勇 : CaMKId はゼブラフィッシュの正常な胚発生に不可欠である. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9日、横浜

永峰賢、下村幸子、末吉紀行、亀下勇 : Doublecortin-like protein kinase と Doublecortin の微小管結合力の違いは SP 領域に起因する. 第82回日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸

杉山康憲、関口茉莉、末吉紀行、波多野直哉、木下英司、木下恵美子、小池透、末武勲、田嶋正二、亀下勇：

マウス DNA メチルトランスフェラーゼ 1 の DNA 結合活性はカゼインキナーゼ 1 によるリン酸化によって制御される。

第 8 2 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日、神戸

金子啓祐、杉山康憲、末吉紀行、亀下勇：
担子菌キノコに発現する浸透圧応答性プロテインキナーゼの解析

第 5 0 回 日本生化学会 中国・四国支部例会、2009 年 5 月 16 日、鳥取

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

名称：セリン-トレオニンタンパク質リン酸化酵素を認識するモノクローナル抗体
発明者：茂里康、達吉郎、湯元昇、石田敦彦、柘植敏之、岡崎勝一郎、亀下勇
権利者：香川大学、産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特許第 4 3 4 0 7 4 9 号
取得年月日：平成 21 年 7 月 17 日
国内外の別：国内

名称：抗チロシンキナーゼ抗体及びその利用
発明者：杉山康憲、末吉紀行、亀下勇、茂里康、達吉郎、湯元昇、石田敦彦、谷口隆信
権利者：香川大学、産業技術総合研究所
種類：特許
番号：特許第 4 9 5 6 8 1 6 号
取得年月日：平成 24 年 3 月 30 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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