

## 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：21570143

研究課題名（和文） 機能プロテオミクスを用いたカルモデュリン標的分子の網羅的同定と情報伝達機構の解明

研究課題名（英文） Comprehensive identification and signal transduction analysis of calmodulin-targets by functional proteomics

研究代表者

徳光 浩（TOKUMITSU HIROSHI）

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：20237077

研究成果の概要（和文）：ラット脳組織よりカルモデュリン-GST 融合タンパク質を用いたカルモデュリン標的分子の網羅的単離法および LC-MS/MS を使用することにより、Wolframín と PRG-1 の二つの新規カルモデュリン標的分子の同定に成功した。さらに、この新規カルモデュリン標的分子の生化学的解析により Wolframín 症候群をきたす遺伝子変異が Wolframín のカルモデュリン結合性を失うことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have identified Wolframín and PRG-1 from rat brain as novel calmodulin binding proteins by functional proteomics using calmodulin-GST fused protein and LC-MS/MS technique. According to the biochemical study, we have demonstrated that some mutations causing Wolframín syndrome disrupt calmodulin-binding ability of wolframín.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000   | 2,470,000 |
| 2010年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2011年度 | 600,000   | 180,000   | 780,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野：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：Wolframín・PRG-1・カルモデュリン・機能プロテオミクス・GST・LC-MS/MS

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内カルシウムイオンは細胞内情報伝達因子として筋収縮、分泌反応、神経伝達物質の放出さらには遺伝子発現調節にいたる様々な生理作用を調節することが知られている。特に、カルシウム受容タンパク質であるカルモデュリン(CaM)は多くのCa<sup>2+</sup>/CaM-依存性酵素の活性化因子として、タンパク質リン酸化酵素群(CaM-キナーゼ)、脱リン酸化酵素(calcineurin)による翻訳後修飾を介した細胞内情報伝達機構やNO合成酵素(NOS)などの代謝調節酵素の活性化といった多様なカルシウムシグナル伝達を支える中心的な情

報変換分子の一つである。近年、研究代表者らによるCaM-キナーゼ活性化リン酸化酵素(CaM-KK)の同定とその遺伝子クローニングにより明らかとなった、2種類の多機能性CaM-キナーゼ(CaM-KIおよびCaM-KIV)がCaM-KKによってリン酸化され活性化調節を受けるCaM-キナーゼカスケードと呼ばれるシグナル伝達経路(Tokumitsu *et al.* *JBC*, 275, 20090, 2000; Tokumitsu *et al.* *JBC*, 279, 40296, 2004)も、新しいCaMを介した細胞内カルシウム情報伝達の一つである。一方、Ca<sup>2+</sup>/CaMにより機能調節を受ける標的分子群は酵素、受容体、細胞骨格分子を

含めても 100 以上同定されていることから CaM の多機能性が示されており、さらに増える事が予想される。歴史的にも CaM、トロポニン C に代表される EF-hand 型カルシウム受容タンパク質は日本において垣内史郎博士、江橋節郎博士によって発見されたものであり、その後の研究が欧米中心に進む中、日本での新しい細胞内カルシウム情報伝達研究の発展が望まれる。研究代表者らは、科学研究費基盤 C (一般) (平成 17-18 年度) 『機能プロテオミクス解析法を用いたカルモデュリン・キナーゼカスケードの生理機能解明』により、タンパク質分子間相互作用と質量分析法を用いて、エフェクター分子に対する網羅的な標的分子を捕らえ同定する手法を独自に開発した (Tokumitsu *et al.* *JBC*, 280, 35108, 2005)。

## 2. 研究の目的

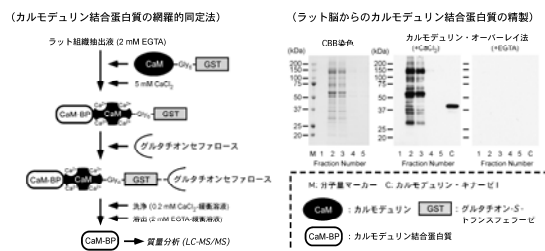
GST-融合型 CaM をリガンドに用いた CaM-標的タンパク質の単離と質量分析による網羅的な同定法 (機能プロテオミクス) を用いる事により、CaM の標的分子の網羅的探索による細胞内カルシウム情報伝達の新たな生理機能とその詳細な分子メカニズムの解明を目的とし、以下の項目について研究を行った。

(1) CaM の新しい標的分子群を網羅的に同定する (2) 同定した新規 CaM 標的分子の CaM-結合領域を決定するとともに、新しい CaM-結合配列を探索および検証する。(3) 予備実験として、すでに得られている新規 CaM-結合分子である PRG-1、Wolfram in については、それぞれ脂質脱リン酸化酵素活性に対する CaM の影響や Wolfram 症候群に関連した遺伝子変異と CaM-結合の関係を明らかにする。(4) 新規の CaM-結合分子の Ca<sup>2+</sup>-結合型 CaM による分子機能調節 (酵素活性の調節、細胞内局在の変化、新たな分子間相互作用の発現や消失等) を試験管内および培養細胞内において明らかにする。(5) これらの研究結果をもとに、CaM を介した新しい細胞内カルシウムシグナル伝達経路を見いだすとともに、その詳細な分子メカニズムを明らかにする。(6) 本研究における機能プロテオミクスを用いた CaM-標的分子の探索法を基盤に他の EF-hand 型カルシウム受容タンパク質の標的分子探索への応用法を開発する。

## 3. 研究の方法

カルモデュリン (CaM) の標的相互作用分子を単離するため、アフィニティー担体のリガンドとしてラット CaM をグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の N-末端に Gly 6 残基をスペーサーとして融合させた GST-融合 CaM 分子をすでに構築し、大量精製している。本研究の CaM-結合タンパク質の網羅的単離

法 (右図) は、まず組織抽出液を EGTA 存在下 (2 mM) に調製し、ここに含まれる内因性 CaM の 5-10 倍量の GST-融合 CaM を加えた後、過剰量 (5 mM) の CaCl<sub>2</sub> を加え組織抽出液中の CaM-結合タンパク質と GST-融合 CaM の複合体を形成させる (市販の CaM を架橋したセファロース担体はリガンド結合量が 0.9 mg/ml セファロース担体と低いため本研究の CaM-結合タンパク質の網羅的単離には適していない)。次いでこの複合体をグルタチオンセファロース担体でトラップした後、低濃度の CaCl<sub>2</sub> (0.2 mM) を含む緩衝液で洗浄後、CaM-結合タンパク質のみを過剰量の EGTA (2 mM) を含む緩衝液により溶出させる。



本手法によりラット脳より得られた CaM-結合タンパク質を SDS-PAGE 後 CaM-オーバーレイ法により解析すると (上図、右パネル) 得られたタンパク質 (CBB 染色) とほぼ等しいパターンの Ca<sup>2+</sup>-依存性の CaM-結合が検出され (中央)、本手法により網羅的にラット組織より CaM-結合タンパク質群の単離が可能であることが明らかとなった。得られた CaM-結合タンパク質群は SDS-PAGE 後に、ゲルを分子量順に 16 当分に切り出しゲル内トリプシン消化を行い、CapLC capillary 逆相液体クロマトグラフィー連結の Micromass Q-ToF2 quadruple/time-of-flight hybrid mass spectrometer に供する。得られたペプチド断片の質量データは Mascot MS/MS Ion Search (Matrix Science) を用いて、データベースに照会することにより CaM-結合タンパク質群を同定する。質量分析を用いた分子同定法は確立している (Tokumitsu *et al.* *JBC*, 280, 35108, 2005)。

## 4. 研究成果

質量分析法を用いた機能プロテオミクスにより Ca<sup>2+</sup>/CaM 複合体の結合標的分子の網羅的同定をラット脳より行った。その結果、既知の 36 種類の CaM-結合タンパク質と新規の CaM-結合タンパク質として Wolfram in を同定した。Wolfram in は若年性糖尿病や進行性両側性視神経萎縮を主徴とする常染色体劣性遺伝病である Wolfram 症候群の原因遺伝子 (WFS1) の遺伝子産物である。すなわちこの WFS1 の様々な遺伝子変異により正常な

Wolfram分子が生体内において発現されないことが、本遺伝子疾患に繋がるものであるが、現在までにWolframの生理機能については細胞内のER膜に存在する事以外、ほとんど明らかとなっていない。本研究によりWolframが試験管内、培養細胞においてもCa<sup>2+</sup>/CaM複合体と相互作用する事が明らかとなり、Wolfram分子が細胞内カルシウムシグナル伝達経路の一端を担う可能性が示された。さらにCa<sup>2+</sup>/CaM複合体が相互作用するWolfram分子内の領域 (Glu90-Trp186) は細胞質内に存在する結果を得た。さらにはWolfram症候群に関連した遺伝子変異のうち、3つの異なる変異 (Ala127Thr, Ala134Thr, Arg178Pro) はそれぞれWolframのCaM-結合を完全に消失させる事から、Ca<sup>2+</sup>/CaM複合体との相互作用を壊すような遺伝子変異がこの遺伝子疾患 (Wolfram症候群) へと繋がる事が明らかとなり、さらにはWolframの正常な機能発現にはCa<sup>2+</sup>/CaM複合体との相互作用が必要である事が推定された。さらに得られた新規CaM-結合タンパク質の候補分子群を解析した結果、PRG-1 (plasticity related gene 1) を新たなCaM-結合タンパク質として同定するに至った。本研究よりPRG-1 が試験管内においてCa<sup>2+</sup>/CaM複合体と高親和性 (Kd=8 nM) に相互作用するのみならず、培養細胞においてもその相互作用が確認された。またCa<sup>2+</sup>/CaM複合体と相互作用する分子内のSer554-Gln588 の領域を特定し、その中でもTrp559とIle578がCa<sup>2+</sup>/CaM複合体との結合に重要であることを変異体を用いたSPR解析や合成ペプチドを用いた蛍光測定により明らかにした。さらにはPRG-1 の免疫染色より、PRG-1 は中枢神経系特に海馬に豊富に存在し、海馬神経細胞の樹状突起のシナプス後膜に局在することが明らかとなり、ポストシナプスにおけるPRG-1 の機能はCa<sup>2+</sup>/CaM複合体との相互作用により制御される事が推定された。

これらカルシウム受容分子によるタンパク質リン酸化、脱リン酸化反応の新たな機能制御についての個別解析を行い、カルシウムシグナル伝達の包括的なシステムバイオロジーの枠組みを明らかにすることを目的とした。本年度は、CaMの標的酵素の一つであるCaM-依存性リン酸化酵素、CaMKKの機能制御について検討した。その結果、CaMKK分子は細胞内において自己リン酸化していることが明らかとなった。また遺伝子改変酵素の解析から、CaMKK分子の自己リン酸化反応は分子間反応ではなく、分子内反応であることが判明した。そこでこの自己リン酸化アミノ酸残基をノーベル賞技術である質量分析法により同定したところ、Thr482であった。このThr482の自己リン酸化の生理的意義を解明する為にThr482をAlaに変異させたところ、

自己抑制機能が強まるという結果を得、CaMKKの分子内自己リン酸化は本酵素の活性化メカニズムに大きく関与している事が明らかとなった。さらには、新しいCaMKKの基質分子探索を目的として、ATP類似化合物をリン酸基供与体として使用できるCaMKK変異体を作成した。この変異体を用いることで新規のCaMKK基質Syndapin Iを同定した。CaMKKは試験管内、培養細胞においてSyndapin IのThr355をリン酸化する事が明らかとなり、CaMKKを介した新しい細胞内カルシウムシグナル伝達経路の存在が示唆された。

#### 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15件)

- ① S100 proteins modulate protein phosphatase 5 function: a link between Ca<sup>2+</sup> signal transduction and protein dephosphorylation. Yamaguchi F, Umeda Y, Shimamoto S, Tsuchiya M, Tokumitsu H, Tokuda M, and Kobayashi R. *J. Biol. Chem.* 掲載確定 (2012)
- ② Exendin-4 regulates GLUT2 expression via the CaMKK/CaMKIV pathway in a pancreatic beta-cell line. Chen K, Yu X, Muraio K, Imachi H, Li J, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, and Tokumitsu H. *Metabolism* **60**, 579-585 (2011)
- ③ Eyal controls cell polarity, spindle orientation, cell fate and Notch signaling in distal embryonic lung epithelium. El-Hashash AH, Turcatel G, Al Alam D, Buckley S, Tokumitsu H, Bellusci S, and Warburton D. *Development* **138**, 1395-1407 (2011)
- ④ Identification of a novel CaMKK substrate. Fujimoto T, Hatano N, Nozaki N, Yurimoto S, Kobayashi R, and Tokumitsu H. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **410**, 45-51 (2011)
- ⑤ Local application of neurotrophins specifies axons through inositol 1,4,5-trisphosphate, calcium, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases. Nakamura S, Funahashi Y, Namba T, Arimura N, Picciotto MR, Tokumitsu H, Soderling TR, Sakakibara A, Miyata T, Kamiguchi H, and Kaibuchi K. *Sci. Signal.* **4**, ra76 (2011)
- ⑥ Generation of Autonomous Activity of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase  $\beta$  by Autophosphorylation.

Tokumitsu H, Hatano N, Fujimoto T, Yurimoto S, and Kobayashi R

*Biochemistry* **50**, 8193-8201 (2011)

⑦ Analysis of CaM-kinase Signaling in Cells. Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, and Soderling TR

*Cell Calcium* **50**, 1-8 (2011)

⑧ Exendin-4 regulates pancreatic ABCA1 transcription via CaMKK/CaMKIV pathway. Li J, Murao K, Imachi H, Masugata H, Iwama H, Tada S, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, and Tokumitsu H

*J. Cell. Mol. Med.* **14**, 1083-1087 (2010)

⑨ S100 proteins regulate the interaction of Hsp90 with Cyclophilin 40 and FKBP52 through their tetratricopeptide repeats. Shimamoto S, Kubota Y, Tokumitsu H, and Kobayashi R

*FEBS Lett.* **584**, 1119-1125 (2010)

⑩ Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I by S-glutathionylation of the active-site cysteine residue.

Kambe T, Song T, Takata T, Hatano N, Miyamoto Y, Nozaki N, Naito Y, Tokumitsu H, and Watanabe Y

*FEBS Lett.* **584**, 2478-2484 (2010)

⑪ Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. Tokumitsu H, Hatano N, Tsuchiya M, Yurimoto S, Fujimoto T, Ohara N, Kobayashi R, and Sakagami H

*Biochem. J.* **431**, 81-91 (2010)

⑫ Regulation of nuclear localization signal-importin · interaction by Ca<sup>2+</sup>/S100A6.

Takata M, Shimamoto S, Yamaguchi F, Tokuda M, Tokumitsu H, and Kobayashi R

*FEBS Lett.* **584**, 4517-4523 (2010).

⑬ Breast cancer cells expressing stem cell markers CD44<sup>+</sup> CD24<sup>lo</sup> are eliminated by Numb-1 peptide-activated T cells.

Mine T, Matsueda S, Li Y, Tokumitsu H, Gao H, Danes C, Wong KK, Wang X, Ferrone S, and Ioannides CG

*Cancer Immunol. Immunother.* **58**, 1185-1194 (2009)

⑭ Identification and characterization of wolframin, the product of the wolfram syndrome gene (WFS1), as a novel calmodulin-binding protein. Yurimoto S, Hatano N, Tsuchiya M, Kato K, Fujimoto T, Masaki T, Kobayashi R, and Tokumitsu H

*Biochemistry* **48**, 3946-3955 (2009)

⑮ Exendin-4 regulates glucokinase expression by CaMKK/CaMKIV pathway in pancreatic beta-cell line.

Murao K, Li J, Imachi H, Muraoka T, Masugata H, Zhang GX, Kobayashi R, Ishida T, and Tokumitsu H

*Diabetes Obes. Metab.* **11**, 939-946 (2009)

[学会発表] (計5件)

① 藤本 智仁, 波多野 直哉, 野崎 直仁, 横倉 (揺本) 沙紀, 小林 良二, 徳光 浩  
Identification of a novel target for Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase kinase by using an ATP analogue  
第84回日本生化学会大会。2011年9月23日 (京都)

② 徳光 浩, 横倉 (揺本) 沙紀, 波多野 直哉, 藤本 智仁, 小林 良二  
Regulatory Mechanism of CaMKK by Autophosphorylation  
第84回日本生化学会大会。2011年9月23日 (京都)

③ 嶋本 聖子, 小林 良二  
S100タンパク質はCHIP (E3) を介したユビキチン化を制御する  
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。2010.12.9 (神戸)

④ 徳光 浩, 波多野 直哉, 土屋光正, 横倉 (揺本) 沙紀, 藤本 智仁, 小原直樹, 小林 良二, 阪上洋行

PRG-1 (plasticity related gene 1), a novel neuronal calmodulin-binding protein  
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。2010.12.9 (神戸)

⑤ 藤本 智仁, 小林 良二, 徳光 浩  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase utilize GTP as a phosphate donor.  
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。2010.12.10 (神戸)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳光 浩 (TOKUMITSU HIROSHI)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：20237077

### (2) 研究分担者

小林 良二 (KOBAYASHI RYOUJI)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号：00020917

### (3) 連携研究者

波多野 直哉 (HATANO NAOYA)  
神戸大学・医学(系)研究科・研究員  
研究者番号：10332280