

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 16 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350978

研究課題名(和文)改良型二次元インゲルホスファターゼアッセイの確立とホスファターゼ研究の新展開

研究課題名(英文)Development of a new two-dimensional in-gel phosphatase assay and its application to protein phosphatase research

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、以下の2つの課題：(1)ユニークな二次元インゲルホスファターゼアッセイ法の確立とその応用、ならびに(2)CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)を始めとしてPPMファミリーホスファターゼの活性制御メカニズムの解明、を中心にして研究を進めた。まず、蛍光発生基質を用いた新しい二次元インゲルホスファターゼアッセイ法を確立し、実用化までこぎつけることができた。また、これまではCaMKPと核局在型のCaMKP-Nに関して、細胞内での活性制御機構や局在変化について不明の点が多かったが、本研究課題を通してこれらのホスファターゼの活性制御機構に関する多くの知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Two major objectives of this research project are as follows. (1) Development of a new two-dimensional in-gel phosphatase assay. (2) Elucidation of the regulatory mechanisms of PPM family phosphatases including CaM-kinase phosphatase (CaMKP) and nuclear CaMKP (CaMKP-N). In this project, we have successfully developed a unique two-dimensional in-gel phosphatase assay using fluorogenic substrate, 4-methylumbelliferyl phosphate (MUP). Furthermore, we clarified the regulatory mechanisms of cellular localization of CaMKP-N through proteolytic processing and found a new anchoring protein, protocadherin gamma subfamily C5, that regulate CaMKP activity in vivo.

研究分野：生物化学

キーワード：細胞内情報伝達 タンパク質リン酸化 プロテインホスファターゼ カルモジュリンキナーゼ 翻訳後修飾 プロテインキナーゼカスケード

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化反応は細胞内情報伝達において中心的な役割を担っており、様々な生命現象の制御に関与している。このリン酸化反応はプロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸化の巧妙なバランスの上に成り立っており、状況に応じて組織や細胞におけるこれらの酵素の発現量や活性が刻々と変化することが知られている。従って、様々な生命現象の分子機序を知るためには、キナーゼだけでなくホスファターゼの研究を同時に進める必要がある。しかし、従来キナーゼの研究に取り組む研究者が圧倒的に多く、着実に発展してきたのに対し、ホスファターゼ研究は遅れをとってきた。そのような状況下においてホスファターゼの研究に取り組む研究者が増え、キナーゼと並行して研究を進めるべきとの国内外の機運が高まりつつある状況の中で、本研究プロジェクトはスタートした。

### 2. 研究の目的

我々はこれまで、タンパク質リン酸化反応に関わる酵素のうち主にプロテインキナーゼを検出し、解析するための独自の技術開発に取り組み、着実に成果を上げてきた。プロテインホスファターゼに関しては、1997年に<sup>32</sup>Pで標識した基質を用いるインゲルホスファターゼアッセイ法を開発し、その手法を用いてCaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)を発見した(Kameshita et al. *Anal. Biochem.* **245**, 149 (1997))。その後、2010年に<sup>32</sup>P-ATPの代わりに蛍光発生基質である4-methylumbelliferyl phosphate (MUP)を利用した新しいインゲルホスファターゼアッセイ法を開発した(Kameshita et al. *Anal. Biochem.* **400**, 118 (2010))。

本研究では、(1)MUPを用いたインゲルホスファターゼアッセイを二次元泳動法で行い、様々なホスファターゼの活性の動態解析に利用すること、ならびに(2)CaMKPと関連するPPMホスファターゼファミリーのホスファターゼの活性制御メカニズムを解明すること、を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

二次元インゲルアッセイ法に関しては、既にMUPを用いた方法を確立していたので、二次元泳動後なるべく多くのホスファターゼ活性を検出するための条件検討を行った。また、このインゲルアッセイ法をCaMKPの酸化還元状態の解析に用いることにした。

CaMKP結合タンパク質のスクリーニングには、CaMKPのN末端領域配列をベイトにして、大腸菌ツーハイブリッドスクリーニングを行ない、CaMKP結合タンパク質を同定した。

また、核局在型のCaMKPとしてCaMKP-Nが知られている。本研究では、

CaMKPだけでなく、CaMKP-Nについてもその活性制御メカニズムの解析を行った。CaMKP-NがC末端領域の限定分解を受けることにより細胞内局在が変化するかどうかを免疫染色法を用いて調べた。また、CaMKP-NがCaMキナーゼI(CaMKI)によりリン酸化されることを見出したが、そのリン酸化部位の同定とリン酸化の影響を調べるとともに、このリン酸化による活性制御が実際の細胞内でも起こっているのかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

#### (1)多様なホスファターゼをまとめて検出する二次元インゲルホスファターゼの確立

なるべく多くのホスファターゼを検出する最適条件の検討と、その手法の応用を試みた。蛍光発生基質として、MUP以外にはDiFMUPなどの基質も検討してみたが、バックグラウンドが少ないこと、またシグナルが強いことなどからMUPが、調べた基質の中では最も優れていることが判明した。また、中性バッファーを用いて反応するホスファターゼを検出した後に、同じゲルをpH3のクエン酸バッファーに移すことにより、酸性ホスファターゼの活性も同時に検出できることを見出した。この二次元インゲルホスファターゼアッセイ法を用いて、ゼブラフィッシュの胚発生過程におけるホスファターゼの発現パターンの変化を観察してみた。24 hpf, 48 hpf, 96 hpfと胚発生が進むにしたがって、検出されるホスファターゼの種類と活性が顕著に増大する傾向がみられた。このように実際の組織サンプルを用いて、様々なホスファターゼの活性変動を同時に追跡する手法として利用できることが確認された。

#### (2)細胞内プロセッシングを介したCaMKP-Nの活性制御機構

ラット脳に存在するCaMKP-Nの大部分は、核移行シグナル(NLS)を含むC末端部分が欠損しており、主に細胞質に存在している。しかしながら、限定分解される分子メカニズムや生産された分解産物の機能に関しては明らかでなかった。そこでゼブラフィッシュCaMKP-N(zCaMKP-N)をNeuro2a細胞に発現させ、その詳細な分子メカニズムの解析を行った。Neuro2a細胞にzCaMKP-Nを発現させるとC末端領域は限定分解されるが、プロテアソーム阻害剤の添加によりこの分解は顕著に阻害された。さらに、CaMKP-Nが限定分解される意義を調べるために、分解産物の細胞内局在や脱リン酸化活性を調べた。Neuro2a細胞に発現させたzCaMKP(FL)は核に局在するが、分解産物は細胞質に局在した。また、CaMKP-NのC末端が自己阻害領域であり、C末端の限定分解により活性が最大で約6倍になることを明らかになった。また、これまではCaMKP-Nは核のみに存在し、同じく核に存在するCaMKIVのみを基質とすると考えられてい

た。しかし、細胞質に移行することにより、CaMKIVだけでなくCaMKIも脱リン酸化するようになった。このように、CaMKP-NはそのC末端領域の限定分解を介してユニークな制御を受けることが、本研究から明らかになった。

### (3)CaMKI によるリン酸化を介したCaMKP-Nの活性制御機構

以前の研究から、CaMKPがCaMKIIによりリン酸化されるということが知られている。また、本研究からCaMKP-NはC末端領域の限定分解により細胞質に移行することが明らかにされた。これらの結果から、CaMKP-Nも細胞質に存在するCaMKによりリン酸化される可能性が考えられた。そこでzCaMKP-Nのリン酸化について調べてみたところ、CaMKIにより顕著にリン酸化を受けることがわかった。また、アミノ酸変異体を用いた実験からそのリン酸化部位がSer-480であることが判明した。リン酸化ミミック変異体であるzCaMKP-N(S480D)とzCaMKP-N(S480E)は様々な基質を用いた脱リン酸化アッセイにおいてzCaMKP-NやzCaMKP-N(S480A)に比べてより高い脱リン酸化活性を示した。さらにイオノマイシン処理後に誘導されるCaMKIIの自己リン酸化は、Neuro2a細胞にzCaMKP-N(S480D)やzCaMKP-N(S480E)を共発現させた場合には顕著に減少した。これらの結果は、CaMKIによるzCaMKP-NのSer-480のリン酸化がCaMKP-N活性を増大させ、細胞質の多機能性CaMKまたはAMPKを負に制御する新しいメカニズムの存在が示唆された。

### (4)Pcdh- $\gamma$ C5を介したCaMKPの制御機構

CaMKPのN末端領域には、グルタミン酸の連なった特徴的なクラスター配列が存在しており、この部位がポリカチオンによる活性化に関与すると考えられている。しかし、細胞内にCaMKPの内在性活性化因子が存在するのかどうかについては、未だ明らかにされていない。そこで細胞内におけるCaMKPの結合タンパク質を探索する目的で、大腸菌ツーハイブリッドスクリーニングを行った。その結果、数種類の結合タンパク質が取得されたが、その一つとしてprotocadherin gamma subfamily C5 (Pcdh- $\gamma$ C5)が同定された。細胞質領域だけのコンストラクトであるPcdh- $\gamma$ C5(715-944)はGSTプルダウンによってCaMKPと相互作用した。しかし、CaMKPはprotocadherinのひとつであるPcdh- $\beta$ 9と結合しなかったことから、Pcdh- $\gamma$ C5とは特異的な相互作用であると考えられた。また、CaMKPへのPcdh- $\gamma$ C5の結合がCaMKPの脱リン酸化に影響するのか、様々な基質を用いて調べた。その結果、Pcdh- $\gamma$ C5が結合することでCaMKPはタンパク質基質をより効率的に脱リン酸化した。また、細胞内でも同様の現象が起きるか調べ

るために、Neuro2a細胞にCaMKP、CaMKI、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)を共発現させた。CaMKPとCaMKIの共発現によるリン酸化CaMKIの脱リン酸化に比べて、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)と共発現させた場合には、CaMKPはリン酸化CaMKIをさらに強く脱リン酸化した。このメカニズムは、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)が足場タンパク質として機能し、CaMKPと基質の三者複合体を形成することで、CaMKPによる脱リン酸化を増強することがGSTプルダウン実験から示された。これらのことから、Pcdh- $\gamma$ C5はCaMKPの内在性の“positive regulator”として機能する可能性が強く示唆された。

## 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 17件)

- 1) Senga, Y., Yoshioka, K., Kameshita, I. and Sueyoshi, N.: Expression and gene knockdown of zebrafish Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I $\delta$ -LL. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 41-52 (2013).
- 2) Ishida, A., Tsumura, K., Oue, M., Takenaka, Y., Shigeri, Y., Goshima, N., Ishihara, Y., Hirano, T., Baba, H., Sueyoshi, N., Kameshita, I. and Yamazaki T.: An active C-terminally truncated form of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-N (CaMKP-N/PPM1E). *Biomed. Res. Int.* doi: 10.1155/2013/134813 (2013).
- 3) Kaneko, K., Sueyoshi, N., Kameshita, I. and Ishida, A.: Ink-native electrophoresis: an alternative to blue-native electrophoresis more suitable for in-gel detection of enzymatic activity. *Anal. Biochem.* **440**, 142-144 (2013).
- 4) Sekiguchi, M., Katayama, S., Hatano, N.,

- Shigeri, Y., Sueyoshi, N. and Kameshita, I.: Identification of amphiphysin 1 as an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorder. *Arch. Biochem. Biophys.* **535**, 257-267 (2013).
- 5) Sakamoto, T., Honda, Y., Kameshita, I., Suzuki, K. and Irie, T.: Isolation and heterologous expression of the *Phanerochaete chrysosporium* calmodulin gene. *Mycoscience* **54**, 241-246 (2013).
- 6) Kameshita, I., Yamashita, S., Katayama, S., Senga, Y. and Sueyoshi, N.: TandemMBP: generation of a unique protein substrate for protein kinase assays. *J. Biochem.* **156**, 147-154 (2014).
- 7) Kaneko, K., Tabuchi, M., Sueyoshi, N., Ishida, A., Utsumi, T. and Kameshita, I.: Cellular localization of CoPK12, a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom *Coprinopsis cinerea*, is regulated by N-myristoylation. *J. Biochem.* **156**, 51-61 (2014).
- 8) Nagamine, T., Nomada, S., Onouchi, T., Kameshita, I. and Sueyoshi, N.: Nuclear translocation of doublecortin-like protein kinase and phosphorylation of a transcription factor JDP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446** 73-78 (2014).
- 9) Kon, N., Yoshikawa, T., Honma, S., Yamagata, Y., Hara, C., Shimizu, K., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I., Honma, K. and Fukada, Y.: CaMKII is essential for cellular clock and coupling between morning and evening behavioral rhythms. *Genes Dev.* **28**, 1101-1110 (2014).
- 10) Suetomi, T., Sakamoto, T., Tokunaga, Y., Kameyama, T., Honda, Y., Kamitsuji, H., Kameshita, I., Izumitsu, K., Suzuki, K. and Irie, T.: Effects of calmodulin on expression of lignin-modifying Enzyme in *Pleurotus ostreatus*. *Curr. Genet.* **61**, 127-140 (2015).
- 11) Katayama, S., Sueyoshi, N. and Kameshita, I.: Critical determinants of substrate recognition by cyclin-dependent protein kinase-like 5 (CDKL5). *Biochemistry* **54**, 2975-2987 (2015).
- 12) Senga, Y., Ishida, A., Shigeri, Y., Kameshita, I. and Sueyoshi, N.: The phosphatase-resistant isoform of CaMKI, Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I-delta (CaMKI-delta), remains in its 'Primed' form without Ca<sup>2+</sup>-stimulation. *Biochemistry* **54**, 3617-3630 (2015).
- 13) Onouchi, T., Kishino-Kaneko, Y., Kameshita, I., Ishida, A. and Sueyoshi, N.: Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) by protocadherin- $\gamma$ C5 (Pcdh- $\gamma$ C5). *Arch. Biochem. Biophys.* **585**, 109-120 (2015).
- 14) Kon, N., Sugiyama, Y., Yoshitane, H., Kameshita, I. and Fukada, Y.: Cell-based

inhibitor screening identifies multiple protein kinases important for circadian clock oscillations. *Commun. Integr. Biol.* **8(4)** e982405 (2015).

15) Sugiyama, Y., Katayama, S., Kameshita, I., Morisawa, K., Higuchi, T., Todaka, H., Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., Taniguchi, T. and Sakamoto, S.: Expression and phosphorylation state analysis of intracellular protein kinases using Multi-PK antibody and Phos-tag SDS-PAGE. *MethodsX* **2**, 469-474 (2015).

16) Katayama, S., Senga, Y., Oi, A., Miki, Y., Sugiyama, Y., Sueyoshi, N., and Kameshita, I.: Expression analysis of splice variants of zebrafish cyclin-dependent kinase-like 5 and its substrate, amphiphysin 1. *Gene* **583**, 15-23 (2016).

〔学会発表〕(計 41件)

榎村明理、渡辺真以、馬場裕美、小野内貴士、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 1B (PPM1B)各アイソフォームの比較解析、第55回日本生化学会中国・四国支部例会、2014年6月、松山

小野内貴士、馬場裕美、亀下勇、末吉紀行：Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP)の機能解析、第55回日本生化学会中国・四国支部例会、2014年6月、松山

朝波彰、小野内貴士、馬場裕美、末吉紀行、

亀下勇：大腸菌発現系を用いた高活性型CaMKP-N (PPM1E)の取得とその利用、第87回日本生化学会大会、2014年10月、京都

小野内貴士、亀下勇、末吉紀行：Protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdhy-C5)を介したCaMK phosphatases (PPM1E, PPM1F)の制御メカニズム、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月、横浜

馬場裕美、末吉紀行、亀下勇：Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>依存性プロテインホスファターゼ(PPM)は金属配位部位に隣接するCys残基の酸化還元によって活性制御を受ける、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月、横浜

Onouchi, T., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. : Identification of physiological regulator for Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F), The 15<sup>th</sup> IUBMB-24<sup>th</sup>-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei

Senga, Y., Sugiyama, Y., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. : Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ) regulates Distal-less homeobox 1 (Dlx1) during osteogenic signaling, The 15<sup>th</sup> IUBMB-24<sup>th</sup>-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei

Baba, H., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. : Redox regulation of Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-dependent

protein phosphatases (PPMs), The 15<sup>th</sup> IUBMB-24<sup>th</sup>-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014 年 10 月, Taipei

杉山康憲、片山将一、馬場裕美、末吉紀行、亀下勇：液相等電点泳動を用いた二次元泳動法の活用、第 65 回日本電気泳動学会総会、2014 年 10 月、横浜

Onouchi, T., Baba, H., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. : Reguratory mechanizm of Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F), The 11<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, 2014 年 11 月, Sendai

杉山康憲、亀下勇、坂本修士：マルチ PK 抗体と Phos-tag を利用した細胞内リン酸化動態の新規解析法、第 66 回日本電気泳動学会総会、2015 年 10 月、東京

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

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

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

秋月一駿、千賀由佳子、杉山康憲、亀下勇、末吉紀行：Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ) による Distal-less homeobox 1 (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

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

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