

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850244

研究課題名(和文) 限定分解とリン酸化を介したCaMKP-Nのダイナミックな制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of CaMKP-N

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CaMKIVとAMPKは2型糖尿病における鍵分子であり、両者のリン酸化を促進して活性化することは糖尿病の治療において有効な戦略であるとされる。本研究で申請者らは、これら2つのキナーゼに特異的に作用するホスファターゼであるCaMKPとCaMKP-Nの活性調節機構の解明を目的とし、両者に結合するタンパク質としてPcdh-gc5を見出した。Pcdh-gc5はホスファターゼと基質タンパク質間の橋渡しをする足場タンパク質として機能し、CaMKPとCaMKIによるCaMKキナーゼの脱リン酸化を促進した。

研究成果の概要(英文)：Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) is a Ser/Thr protein phosphatase that belongs to the PPM family. In this study, we identified CaMKP binding proteins, including protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdh- C5), that interacted with the N-terminal region of CaMKP using E. coli two-hybrid system. To identify the responsible region of interaction, we prepared deletion mutants of CaMKP and Pcdh- C5. GST-pull down assay with Pcdh- C5(715-944), a cytoplasmic tail of Pcdh- C5, revealed that CaMKP(1-98) is responsible for the interaction. Although Pcdh- C5(715-944) itself did not affect on the phosphatase activity of CaMKP, dephosphorylation of Phospho-CaMKI by CaMKP was found to be significantly promoted in the presence of Pcdh- C5 (715-944) both in vitro and in cells. Taken together, these results strongly suggest that Pcdh- C5(715-944) can act as a scaffold for CaMKP and CaMKI to regulate CaMKP activity.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Pcdh-gc5 CaMKP CaMKP-N phosphorylation dephosphorylation

1. 研究開始当初の背景

2 型糖尿病は糖尿病患者の 90% 以上を占める重要疾患で、高血糖状態でインスリン分泌が抑制されるという糖毒性によって深刻化するが、そのメカニズムは分かっていない。申請者らは、平成 21-22 年度若手研究 B「糖尿病の糖毒性に関するリン酸化制御分子の解析」において、多機能性 CaM キナーゼ (以下 CaMK) の核局在型である CaMKIV が、糖毒性時にカルパインによって分解され、インスリン分泌が低下するが、恒常的活性型 CaMKIV をトランスフェクトすることでインスリン分泌が回復することを見出した。(Sugiyama et al. Metabolism, 2011)。

一方 Voss らは、CaMK 特異的ホスファターゼとして発見された CaMKP と CaMKP-N が、ポリユビキチン化された AMP-activated protein kinase (AMPK) に結合し、Thr-172 を脱リン酸化することを見出した (Voss et al. Cell Signaling, 2011)。AMPK はエネルギー代謝センサーとして機能しており、2 型糖尿病に対して効果があるメトフォルミンやフェンフォルミンなどの薬剤は、AMPK を活性化することで糖代謝を改善することが知られている。しかしこのような薬剤は、乳酸アシドーシスのような重篤な副作用を引き起こすことが分かっており、多くの国で販売停止になっている。

以上のように、CaMKIV と AMPK は 2 型糖尿病における鍵分子であり、両者を活性化 (= リン酸化を促進) させることが糖尿病に対するひとつの戦略として考えられる。つまり、CaMKIV と AMPK に作用するホスファターゼの活性を阻害し、相対的に CaMKIV と AMPK のリン酸化レベルを上昇させることで糖尿病の改善が期待される。従って、CaMKIV と AMPK を特異的に脱リン酸化して不活性化する CaMKP と CaMKP-N の活性調節機構の解明は大変重要である。

2. 研究の目的

CaMKIV と AMPK は 2 型糖尿病における鍵分子であり、両者のリン酸化を促進して活性化することは糖尿病の治療において有効な戦略であるとされる。申請者らはこれら 2 つのキナーゼに特異的なホスファターゼ CaMKP と CaMKP-N を見出した。CaMKP-N は核移行シグナルを有するため、核に局在する CaMKIV のみを脱リン酸化すると考えられてきた。しかし最近の研究で、CaMKP-N はプロテアソームで限定分解を受けて活性化し、細胞質へと移行後、CaMKI と CaMKII によってリン酸化されることを明らかにした。そこで本研究では、CaMKP と CaMKP-N の活性調節機構を明らかにすることを目的とし

た。最終的には CaMKP と CaMKP-N の活性制御を通じ、2 型糖尿病の治療に繋がるような基礎的知見の蓄積を目指す。

3. 研究の方法

CaMKs による CaMKP のリン酸化については、推定リン酸化部位のアミノ酸をアラニンに置換した変異体を用いて同定した。CaMKP と CaMKP-N の制御タンパクについては、CaMKP の N 末端領域をベイトとした大腸菌ツーハイブリッドシステムにより、ラット脳 cDNA ライブラリーから CaMKP に結合するタンパク質をスクリーニングした。得られたクローンについては、GST-pull down によってタンパク質同士でも結合するかを確認した上で、CaMKP と CaMKP-N の活性、基質特異性、局在等に及ぼす影響を *in vitro*、*in vivo* の両面で検討した。

4. 研究成果

(1) CaMKP/PPM1F とその核局在型である CaMKP-N/PPM1E は、多機能性 CaM キナーゼを特異的に脱リン酸化するプロテインホスファターゼとして見出されたが、近年では PAK や AMPK 等にも作用することが報告され、癌細胞の浸潤や 2 型糖尿病などとも関連して注目を集めている。CaMKP-N は核に局在することから、同じく核に存在する CaMKIV を主に脱リン酸化していると考えられてきたが、近年の我々の研究で、CaMKP-N はユビキチン-プロテアソーム系により限定分解を受けて脱リン酸化活性が上昇し、さらに核から細胞質へと局在を変化させ、CaMKI や CaMKII を脱リン酸化するようになることが明らかにされた。細胞質に局在する CaMKP の場合、CaMKII にリン酸化されることで脱リン酸化活性が上昇することが報告されている。そこで、限定分解を受け細胞質に移行する CaMKP-N にも同様の活性化機構が存在するのかを調べた。大腸菌で発現させた CaMKP-N を基質として *in vitro* でリン酸化実験を行ったところ、CaMKI と CaMKII によってリン酸化された。このうち、CaMKI によるリン酸化サイトは Ser480 であることが点変異体を用いた実験により判明した。次に、このリン酸化の意義を調べるため Ser480 を Asp もしくは Glu に置換したリン酸化ミミック変異体 (S480D, S480E) のホスファターゼ活性を調べた。基質としてリン酸化 CaMKI を用いたところ、WT と比べて S480D と S480E の方が高い脱リン酸化活性を示した。Neuro2a 細胞に CaMKP-N 各種変異体と CaMKII を共発現させてイオノマイシン刺激すると、CaMKII の自己リン酸化は CaMKP-N の WT もしくは S480A と共発現させた場合に比べ、S480D または S480E と共発現させた場合に顕著に減少した。以上の結果より、CaMKP-N は限定分解を受けて C 末の核移行シグナルと自己阻害領域が除去されると細胞質へと移行して活性化される

が、CaMKI からのリン酸化によってさらに活性化されるという、これまで知られていなかった新しい制御メカニズムの存在が強く示唆された。

(2) 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 (poly E 配列) が存在する。CaMKP は poly(Lys) によって活性化され、可逆的な酸化修飾によって活性が負に制御されるが、poly E 配列を含む CaMKP の N 末端領域が poly(Lys) による活性化において重要な役割を果たすことが明らかにされた。しかし、poly(Lys) は生体内に存在しておらず、CaMKP の内在性の活性化因子や活性化機構については未だ不明な点が多い。そこで今回の研究では、大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いて CaMKP の N 末端と相互作用する因子の特定を試みた結果、protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdhy-C5) を含む様々な因子が同定された。Pcdhgc5 は N 末端側が細胞外に存在し、C 末端側が細胞質に存在する膜貫通型タンパク質である。Pcdhy-C5 が poly(Lys) と同様に CaMKP による脱リン酸化に影響するのかを調べるために、様々な基質を用いて脱リン酸化アッセイを行った。その結果、poly(Lys) と同様に、Pcdhgc5 存在下ではタンパク質基質であるリン酸化 CaMKI がより効率よく CaMKP によって脱リン酸化された。また、細胞内でも同様に CaMKP による脱リン酸化に影響が見られるかどうかを調べる目的で、Neuro2a 細胞に CaMKP、CaMKI、Pcdhy-C5(715-944) を共発現させたところ、CaMKP の単独発現に比べて、Pcdhy-C5(715-944) と CaMKP を共発現させた場合では、リン酸化 CaMKI が顕著に脱リン酸化された。以上の結果より、Pcdhy-C5 は CaMKP の内在性のポジティブレギュレーター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 10 件)

Senga, Y., Ishida, A., Shigeri, Y., Kameshita, I., Sueyoshi, N. The phosphatase-resistant isoform of CaMKI, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ), remains in its 'Primed' form without Ca²⁺-stimulation. *Biochemistry* in press (2015). 査読有

Katayama, S., Sueyoshi, N., Kameshita, I.

Critical determinants of substrate recognition by cyclin-dependent protein kinase-like 5 (CDKL5). *Biochemistry* 54: 2975-2987 (2015). 査読有

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 . *電気泳動* 58: 56-58 (2014). 査読有

Kameshita, I., Yamashita, S., Katayama, S., Senga, Y., Sueyoshi, N. TandemMBP: Generation of a unique protein substrate for protein kinase assays. *J. Biochem.* 156: 147-154 (2014). 査読有

Kaneko, K., Tabuchi, M., Sueyoshi, N., Ishida, A., Utsumi, T., Kameshita, I. Cellular localization of CoPK12, a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom *Coprinopsis cinerea*, is regulated by N-myristoylation. *J. Biochem.* 156: 51-61 (2014). 査読有

Nagamine T., Nomada, S., Onouchi, T., Kameshita, I., Sueyoshi, N. Nuclear translocation of doublecortin-like protein kinase and phosphorylation of a transcription factor JDP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 73-78 (2014). 査読有

Senga, Y., Yoshioka, K., Kameshita, I., Sueyoshi, N. Expression and gene knockdown of zebrafish Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase Iδ-LL. *Arch. Biochem. Biophys.* 540, 41-52 (2013). 査読有

Ishida, A., Tsumura, K., Oue, M., Takenaka, Y., Shigeri, Y., Goshima, N., Ishihara, Y., Hirano, T., Baba, H., Sueyoshi, N., Kameshita, I., Yamazaki, T. An active C-terminally truncated form of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase-N (CaMKP-N/PPM1E).

Biomed. Res. Int. 2013;2013:134813. doi: 10.1155/2013/134813. 査読有

Kaneko, K., Sueyoshi, N., Kameshita, I., 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). 査読有

Sekiguchi, M., Katayama, S., Hatano, N., Shigeri, Y., Sueyoshi, N., 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). 査読有

〔学会発表〕(計27件)

Onouchi, T., Baba, H., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. Regulatory mechanism of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F), 11th International Conference on Protein Phosphatase, 2014年11月, Sendai (Japan)

千賀 由佳子、杉山 康憲、亀下 勇、末吉 紀行 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent protein kinase $\text{I}\delta$ (CaMKI δ)による Distal-less homeobox 1 (Dlx1)を介した骨形成メカニズム、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

片山 将一、千賀 由佳子、大井 愛海、三木 洋祐、杉山 康憲、末吉 紀行、亀下 勇 ゼブラフィッシュに存在する2種類の Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)のスプライスバリエーションの比較解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

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、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) 馬場 裕美、末吉 紀行、亀下 勇 $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ 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、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Onouchi, T., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. Identification of physiological regulator for $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F), The 15th IUBMB-24th-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei (Taiwan)

Senga, Y., Sugiyama, Y., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent protein kinase $\text{I}\delta$ (CaMKI δ) regulates Distal-less homeobox 1 (Dlx1) during osteogenic signaling, The 15th IUBMB-24th-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei (Taiwan)

Baba, H., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. Redox regulation of $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependent protein phosphatases (PPMs), The 15th IUBMB-24th-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei (Taiwan)

Katayama, S., Sueyoshi, N., and Kameshita, I. Exploration of an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorders, The 15th IUBMB-24th-FAOBMB-TSBMB Conference, 2014年10月, Taipei (Taiwan)

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、京都国際会議場(京都・京都市)

千賀 由佳子、石田 敦彦、茂里 康、亀下 勇、末吉 紀行 カルシウムがなくても潜在的活性化状態にあるホスファターゼ抵抗性 CaM キナーゼ I アイソフォーム、CaMKI δ 、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月、京都国際会議場(京都・京都市)

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、横浜情報文化センター(神奈川・横浜市)
澄田 智美、末吉 紀行、伊東 信、横山 茂之 ガングリオシド/糖脂質に作用する新規グリコシダーゼ群の構造と機能、第 33 回日本糖質学会年会、2014 年 7 月、名古屋大学(愛知・名古屋市)

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、愛媛大学(愛媛・松山市)

小野内 貴士、馬場 裕美、亀下 勇、末吉 紀行 Ca²⁺/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、愛媛大学(愛媛・松山市)

小野内 貴士、馬場 裕美、亀下 勇、末吉 紀行 Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP)の新規活性化機構の解析、第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2014 年 2 月、三重大学(三重・津市)

小野内 貴士、馬場 裕美、亀下 勇、末吉 紀行 Ca²⁺/CaM 依存性プロテイン

キナーゼホスファターゼ(CaMKP/PPM1F)の活性を制御する細胞内タンパク質の探索、日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会(例会)、2014 年 1 月、香川大学(香川・三木町)

千賀 由佳子、亀下 勇、石田 敦彦、末吉 紀行 CaMKI δ は CaMKI α との N 末端領域のアミノ酸の相違によりホスファターゼ抵抗性を有するようになる、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸国際会議場(兵庫・神戸市)

野間田 祥悟、永峰 賢、亀下 勇、末吉 紀行 Doublecortin-like protein kinase (DCLK)の核移行に伴うキナーゼ活性の制御メカニズム、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸国際会議場(兵庫・神戸市)

小野内 貴士、亀下 勇、末吉 紀行 Protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdhgc5)を介した Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP)の活性化メカニズム、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸国際会議場(兵庫・神戸市)

②① 馬場 裕美、末吉 紀行、渡辺 真以、榎村 明理、茂里 康、五島 直樹、亀下 勇 Mg²⁺/Mn²⁺ 依存性プロテインホスファターゼ(PPM)の酸化的修飾による活性制御、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸国際会議場(兵庫・神戸市)

②② 片山 将一、関口 菜里、三木 洋祐、末吉 紀行、亀下 勇 Cyclin-dependent kinase kinase-like 5 による Amphiphysin1 のリン酸化の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

②③ 山下 翔、片山 将一、末吉 紀行、亀下 勇 TandMBP: MBP を超えるプロ

テインキナーゼ用人工基質タンパク質の創製、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)

- ②4 片山 将一、関口 茉里、末吉 紀行、亀下 勇 Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)による Amphiphysin 1 のリン酸化と CDKL5 の基質特異性の解析、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月、パシフィコ横浜(神奈川・横浜市)
- ②5 山下 翔、片山 将一、末吉 紀行、亀下 勇 大腸菌発現系を利用した Myelin basic protein の大量取得法の確立、第 54 回日本生化学会中国・四国支部例会、2013 年 5 月、徳島大学(徳島・徳島市)
- ②6 Syouichi Katayama, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita Identification of amphiphysin 1 as an endogenous substrate for CDKL5, a protein kinase associated with X-linked neurodevelopmental disorders. 45th European Brain and Behaviour Society Meeting, Germany, Munich (Germany) (2013)
- ②7 Takashi Onouchi, Atsuhiko Ishida, Isamu Kameshita, Noriyuki Sueyoshi Regulation of nuclear Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP-N) via functional processing and phosphorylation by CaMKI. 10th International Conference on Protein Phosphatases, Tokyo (Japan) (2013)

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