

学位論文全文に代わる要約 Extended Summary in Lieu of Dissertation

氏名： 千賀 由佳子
Name

学位論文題目： CaMKI δ の胚発生過程における機能解析および活性調節機構の解明
Title of Dissertation

学位論文要約：
Dissertation Summary

<研究の背景と目的>

生体内で起こる様々な生命現象は、細胞内情報伝達機構によって巧みな制御を受けている。この情報伝達機構で重要な役割を果たしているのが、プロテインキナーゼによるタンパク質リン酸化反応である。プロテインキナーゼはタンパク質のリン酸化を介して細胞分裂、発生、分化、ストレス応答、物質代謝、遺伝子発現などの重要な生命現象に深く関与すると考えられているが、プロテインキナーゼの機能に関しては、まだ明らかにされていない点が多い。そこで、当研究室で得られたプロテインキナーゼ特異的モノクローナル抗体 (マルチ PK 抗体) を活用し、胚発生に関与するプロテインキナーゼの同定を行い、ゼブラフィッシュ Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I δ (CaMKI δ) を取得した。

CaMKIはCa²⁺シグナル系で中心的な役割を果たしている Ser/Thr プロテインキナーゼであり、 α , β , γ , δ の4つのアイソフォームが存在する。これまでに、マルチ PK 抗体を利用したスクリーニングでゼブラフィッシュの初期発生時に重要な役割を果たすプロテインキナーゼとして、3種類の CaMKI δ アイソフォーム (zCaMKI δ -S, zCaMKI δ -L, zCaMKI δ -LL) を同定した。先行研究では CaMKI δ は海馬に多く発現し、神経機能において重要な役割を果たすと考えられているが、これまでに CaMKI δ の胚発生過程における役割や他のアイソフォームとの機能的相違点に関する報告は非常に少ない。そこでまず、これら3つのアイソフォームの役割分担を明らかにするために、ゼブラフィッシュにおける発現時期および発現組織を調べるとともに、初期胚における遺伝子ノックダウンを行うことにした。次に、大腸菌ツーハイブリッド法を用いた結合タンパク質および内在性基質タンパク質の探索を行い、同定した標的分子に対して zCaMKI δ がどのような影響を及ぼすのかを調べた。さらに、CaMKIを細胞で発現させると、CaMKI δ は Ca²⁺刺激がない状態でも有意にリン酸化されていたのに対し、CaMKI δ は全くリン酸化されていないという現象を見出した。この CaMKI δ に見られる独特の活性調節機構を明らかにするために、CaMKI δ の様々な変異体を作製して解析を行った。

<結果と考察>

第1章では、zCaMKI δ -L と zCaMKI δ -S の2種類のスプライスバリエントについて、胚発生過程での機能を明らかにするために、酵素学的諸性質を解析し、アンチセンスモリフォリノオリゴ(AS-MO)を用いた遺伝子ノックダウンを行うことで胚発生における zCaMKI δ の役割を解明した。まず、抗 zCaMKI δ 抗体を用いたウェスタンブロットングにより、ゼブラフィッシュ胚発生時における発現時期を調べたところ、zCaMKI δ -S は受精後 60 時間以降で発現していたのに対し、zCaMKI δ -L は受精後 36 時間以降から発現が見られた。成魚において zCaMKI δ -L は脳、眼、卵巣、骨格筋に分布していたのに対し、zCaMKI δ -S は脳に特異的に発現しているという違いが見られた。AS-MO を用いた遺伝子ノックダウンを行ったところ、網膜と前脳が正常に発達しない奇形が高い頻度で観察された。さらに、大腸菌で発現させたリコンビナント zCaMKI δ -L および zCaMKI δ -S を AS-MO と同時にインジェ

(様式5) (Style5)

クシオンしたところ、奇形率の減少が見られたが、特に zCaMKI δ -L とのコインジェクションで9割以上がレスキューされた。一方、キナーゼ活性を持たない変異体には、これらの表現型を軽減するような効果は認められなかった。以上の結果より、zCaMKI δ -L と zCaMKI δ -S は胚発生段階や組織によって分布が異なっており、初期の発生には特に zCaMKI δ -L が重要な役割を担っていることが示唆された。

2章では、新規 CaMKI δ アイソフォームである zCaMKI δ -LL をクローニングし、zCaMKI δ -LL の生物学的な重要性を *in vitro* および *in vivo* で調べた。zCaMKI δ -LL は、zCaMKI δ -L および zCaMKI δ -S よりも C 末端領域が 100 残基以上長く、異なる染色体上に位置するアイソフォームである。zCaMKI δ -L および zCaMKI δ -S の触媒領域と比較して、アミノ酸レベルで 86% の相同性を示した。zCaMKI δ -LL の初期胚発生過程での発現時期を調べるために、RT-PCR 法を用いてゼブラフィッシュ胚発生における mRNA レベルでの発現量を調べたところ、受精後 48 時間以降から発現していた。また、抗 zCaMKI δ -LL 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより発現時期を調べると受精後 60 時間から検出され、成魚においては脳、眼、ヒレに発現していた。zCaMKI δ -LL がどの器官形成に関与しているのかを調べるために AS-MO を用いた遺伝子ノックダウンを行ったところ、胸ビレや頭部の軟骨組織の形成異常が見られた。これらの奇形は、精製酵素を AS-MO と同時にインジェクションすることで、6割以上がレスキューされたが、キナーゼ活性を持たない変異体タンパク質では zCaMKI δ -L、zCaMKI δ -S と同様にレスキューされなかった。このことから、zCaMKI δ -L、zCaMKI δ -S のみならず zCaMKI δ -LL もゼブラフィッシュの初期発生に重要であることが示された。

3章では哺乳動物の CaMKI δ と最も相同性が高く、軟骨形成に関与していると考えられる zCaMKI δ -LL に注目した。zCaMKI δ -LL の結合因子を探索するため、大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いて相互作用する因子の特定を試みた。スクリーニングの結果、新規の CaMKI δ 結合タンパク質として DNA 結合領域を持つ転写因子であり神経系や骨形成に関与しているゼブラフィッシュ Distal-less homeobox 1 (Dlx1) を同定した。293T 細胞に zCaMKI δ -LL と zDlx1 を共発現させて細胞内局在を観察したところ、両者を共発現させた場合には核で共局在することが明らかになった。また *in vitro* キナーゼアッセイにおいて、zCaMKI δ -LL は zDlx1 の Ser-206 を直接リン酸化することを明らかにした。さらに zCaMKI δ -LL が zDlx1 の転写活性にどのような影響を及ぼすのかを調べたところ、zDlx1 の Ser206 が転写活性化に寄与することが明らかになった。以上のことから、zCaMKI δ -LL は zDlx1 が調節している骨形成に関与している可能性が示唆された。

最後に4章では、CaMKI δ に独特な活性調節機構について解析を行った。CaMKI を細胞で発現させると、CaMKI α は Ca²⁺ 刺激がない状態では全くリン酸化されないが、CaMKI δ は有意にリン酸化されていた。さらに、内在性 CaMKI のリン酸化状態を比較したところ、CaMKI δ は Ca²⁺ 刺激がない状態でもリン酸化されていたのに対し、CaMKI α は全くリン酸化されていなかった。このメカニズムについて明らかにするために、CaMKI の様々な変異体を用いて *in vitro* および 293T 細胞において解析を進めた結果、CaMKI δ は CaMKI α よりも CaMKK によるリン酸化を受けやすいのではなく、CaMKI δ がホスファターゼ抵抗性となることで起こることを明らかにした。また、ホスファターゼ抵抗性に重要な領域を決定するために、CaMKI δ の N 末領域を CaMKI α と入れ替えたキメラ変異体を作製したところ、CaMKI δ の N 末領域が重要であることを明らかにした。この CaMKI α との N 末領域の一次構造の違いによって CaMKI δ はホスファターゼ抵抗性になっており、低 Ca²⁺ 状態でも脱リン酸化されることなく、リン酸化状態を維持していることが示唆された。

(注) 要約の分量は、学位論文の分量の約 10% の 1 として下さい。図表や写真を含めても構いません。
(Note) The Summary should be about 10% of the entire dissertation and may include illustrations