

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation 活性調節機構の解明

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

<研究の背景と目的>

Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI)はCa²⁺シグナル系で中心的な役割を果たしている Ser/Thr 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った。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 α 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制御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>

1. zCaMKI δ アイソフォームの胚発生過程における機能解析

ゼブラフィッシュ初期胚における発現時期、発現組織をRT-PCR法やそれぞれのアイソフォーム特異的抗体を作製して調べたところ、zCaMKI δ はアイソフォームごとに異なる分布を示した。さらに、アンチセンスモルフォリノオリゴ(AS-MO)を用いた遺伝子ノックダウン実験を行ったところ、異常が見られる部位

が異なっており、 α CaMKI δ -S と α CaMKI δ -L の同時ノックダウンでは網膜と前脳の形成異常と体節の萎縮が、 α CaMKI δ -LL のノックダウンでは頭部の軟骨組織と胸ビレの発達異常が見られた。これらの表現型は、精製タンパク質を AS-MO と同時にインジェクションすることでレスキューされたが、キナーゼ活性のない変異体タンパク質ではレスキューされなかった。

以上の結果より、それぞれの α CaMKI δ アイソフォームは胚発生段階や組織によって分布が異なっているが、正常な胚発生にはこれら α CaMKI δ のキナーゼ活性が重要であることが強く示唆された。

2. α CaMKI δ -LL の内在性基質タンパク質の探索

CaMKI δ に関しては神経機能への影響が注目されているため、頭部の軟骨組織やヒレの形成に関与しているアイソフォーム(α CaMKI δ -LL)に注目し、細胞内での標的分子を同定することにした。今回は、大腸菌ツーハイブリッド法を用いて α CaMKI δ -LL の基質タンパク質の探索を行い、ターゲット候補として Distal-less homeobox 1(Dlx1)を取得した。

Dlx1 は DNA binding domain を持つ転写因子であり、神経系や骨形成に関与していることが報告されている。取得したゼブラフィッシュ Dlx1 は、GST プルダウン法によって α CaMKI δ -LL と相互作用することが確認された。また、293T 細胞に α CaMKI δ -LL と α Dlx1 を共発現させて細胞内局在を観察したところ、 α CaMKI δ -LL を単独発現させると細胞質に観察され、 α Dlx1 を単独発現させると核に局在した。しかし、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。さらに *in vitro* キナーゼアッセイにおいて、 α Dlx1 の Ser-206 は α CaMKI δ -LL によってリン酸化されること、 α Dlx1 の Ser-206 が転写活性化に寄与することを明らかにした。以上の結果より、 α CaMKI δ -LL は α Dlx1 が調節している骨形成メカニズムに関与していることが示唆された。

3. CaMKI δ の活性調節機構の解明

CaMKI を細胞で発現させると、CaMKI α は Ca^{2+} 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基質タンパク質 CREB をリン酸化した。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 Ca^{2+} 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。本研究では、CaMKI α と δ の様々な変異体を用いて研究を行い、この現象が 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いることを明らかにした。つまり、CaMKI δ はホスファターゼ抵抗性を獲得することで、低 Ca^{2+} 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。