（第５号様式）

学位論文審査の結果の要旨

氏　　　名	千　賀　　由　佳　子
審　査　委　員	主査　末吉　紀行 副査　亀下　勇 副査　柿沼　喜己 副査　永田　信治 副査　田淵　光昭

論　　文　　名　　CaMKIδ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

審査結果の要旨

Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase I (CaMKI)はCa^{2+}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CaMKIδアイソフォーム(zCaMKIδ-S, zCaMKIδ-L, zCaMKIδ-LL)を同定した。先行研究ではCaMKIδ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CaMKIδ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。そこで本研究では、ゼブラフィッシュをモデル動物として、CaMKIδの個体レベルでの解析、内在性基質の探索、およびCaMKIδのみに見られる活性制御機構の解析を行った。

第1章ではzCaMKIδ-LとzCaMKIδ-Sの2種類のスプライスバリアントについて、胚発生過程での機能を明らかにするためにまず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zCaMKIδの役割を解明した。抗zCaMKIδ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、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、zCaMKIδ-Sは受精後60時間以降で発現していたのに対し、zCaMKIδ-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zCaMKIδ-Lは脳、眼、卵巣、骨格筋に分布していたのに対し、zCaMKIδ-Sは脳に特異的に発現しているという違いが見られた。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zCaMKIδ-LおよびzCaMKIδ-SをAS-MOと同時にインジェクションしたところ、奇形率の減少が見られたが、特にzCaMKIδ-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、zCaMKIδ-LとzCaMKIδ-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zCaMKIδ-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CaMKIδアイソフォームであるzCaMKIδ-LLをクローニングし、zCaMKIδ-LLの生物学的な重要性を*in vitro*および*in vivo*で調べた。zCaMKIδ-LLは、zCaMKIδ-LおよびzCaMKIδ-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。zCaMKIδ-LおよびzCaMKIδ-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。zCaMKIδ-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zCaMKIδ-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たところ、受精後60時間から発現しており、成魚では脳、眼、ヒレに発現していた。zCaMKIδ-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CaMKIδ-L、CaMKIδ-Sと同様にレスキューされなかった。このことから、CaMKIδ-L、

CaMKIδ-SのみならずCaMKIδ-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CaMKIδ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zCaMKIδ-LLに注目した。zCaMKIδ-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CaMKIδ結合タンパク質として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ゼブラフィッシュDistal-less homeobox 1 (zDlx1)を同定した。293T細胞にzCaMKIδ-LLとzDlx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zCaMKIδ-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、zCaMKIδ-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を明らかにした。以上のことから、zCaMKIδ-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、CaMKIδ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、CaMKIαはCa^{2+}刺激がない状態では全くリン酸化されないが、CaMKIδ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、CaMKIδ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、CaMKIα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、CaMKIδはCaMKIαよりもCaMKKによるリン酸化を受けやすいのではなく、CaMKIδがホスファターゼ抵抗性となることで無刺激でもリン酸化状態が維持され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CaMKIδのN末領域をCaMKIαと入れ替えたキメラ変異体を作製したところ、CaMKIδのN末領域が重要であることを明らかとなった。このCaMKIαとのN末領域の一次構造の違いによってCaMKIδはホスファターゼ抵抗性になっており、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。
　以上のように、本研究ではこれまで不明な点が多かったCaMKIδに関して、胚発生過程での役割、および新規内在性基質の同定を介して骨形成メカニズムに関与していることを示した。さらに、CaMKIδがCaMKIαとは異なる活性調節機構を有していることを明らかにした。本論文に記載された研究成果は、学術的に価値の高いものであり、当該分野において大きな貢献を果たしたと評価できる。本論文に関する公開審査会は、平成27年2月7日に開催されたが、本論文の内容は博士（農学）の学位を授与するに値すると審査委員全員一致して判定した。