

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

氏名： 小野内 貴士  
Name

学位論文題目： CaM キナーゼホスファターゼの機能制御に関する分子メカニズム  
Title of Dissertation

学位論文要約：  
Dissertation Summary

### 背景・目的

タンパク質のリン酸化反応は様々な生命現象に関与している。哺乳類の細胞を構成する全タンパク質の30%以上はある特定の時期にリン酸化を受けており、リン酸化を調節する酵素をコードしている遺伝子は全体の5%にも達していることから、タンパク質リン酸化の重要性が示唆される。従って、生命現象をより深く理解するためには、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化を調節するメカニズムの解明が不可欠である。タンパク質のリン酸化レベルは、リン酸化反応を司るプロテインキナーゼと、その逆反応である脱リン酸化反応を司るプロテインホスファターゼとの巧妙な共同作業によって調節されており、これら2種類の酵素の「細胞機能の制御因子」としての重要性はこれまで注目されてきた。カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMK)は、細胞内セカンドメッセンジャーであるCa<sup>2+</sup>とCa<sup>2+</sup>結合性タンパク質であるCaMの複合体Ca<sup>2+</sup>/CaMによって活性化される一群のセリン・スレオニンプロテインキナーゼである。CaMK群の中でも基質特異性が広い多機能性CaMKとしてCaMKI, II, IVの3種類が知られている。細胞質に局在するCaMKIと核に局在するCaMKIVは上流のCaMKKによりリン酸化され活性化する。CaMKIIはCa<sup>2+</sup>/CaMと結合することで自己リン酸化して活性化する。

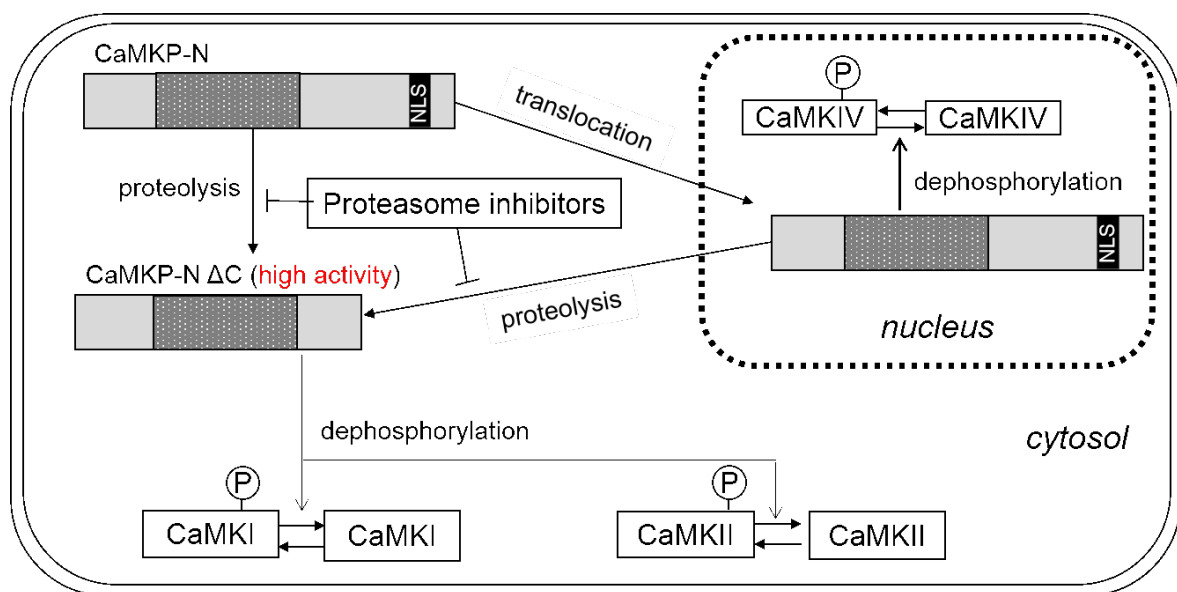
これまでCaMKsの研究は、リン酸化による活性化のメカニズムに重点が置かれ、脱リン酸化による不活性化の機構にはあまり目が向けられてこなかった。しかし、CaMKsの制御系やその破綻の分子メカニズムを理解するためには、脱リン酸化酵素の活性制御機構についても詳細な解析が必要である。*In vitro*においてこの多機能性CaMKを脱リン酸化し不活性化する事が確かめられているプロテインホスファターゼとしてPP1, PP2A, PP2Cが知られている。しかしながら、これらプロテインホスファターゼは基質特異性が広く、多機能性CaMK以外にも脱リン酸化できるタンパク質基質が数多く存在する。そこで、新たに*in vitro*で多機能性CaMK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CaMKホスファターゼ(CaMKP)が発見された。CaMKPは細胞質に局在しているが、これまでにCaMKPのホモログとして核局在型のNuclear CaMKP(CaMKP-N)が発見された。CaMKPに関しては、これまでに以下の活性化機構が明らかにされてきた。一つ目の活性化機構として、触媒領域のN末端側に存在するポリグルタミン酸(poly E)配列にポリカチオンが結合する事で活性化され

る。二つ目の活性化機構としては、CaMKII によるリン酸化により活性化されることが報告された。しかし、CaMKP のホモログである CaMKP-N に関して不明な点が多かった。よって、CaMKs によるリン酸化シグナルを総合的に理解するためには、CaMKP や CaMKP-N のより詳細な解析が不可欠であり、本研究ではそれぞれの機能制御に関する分子メカニズムの解明を行った。

## 結果・考察

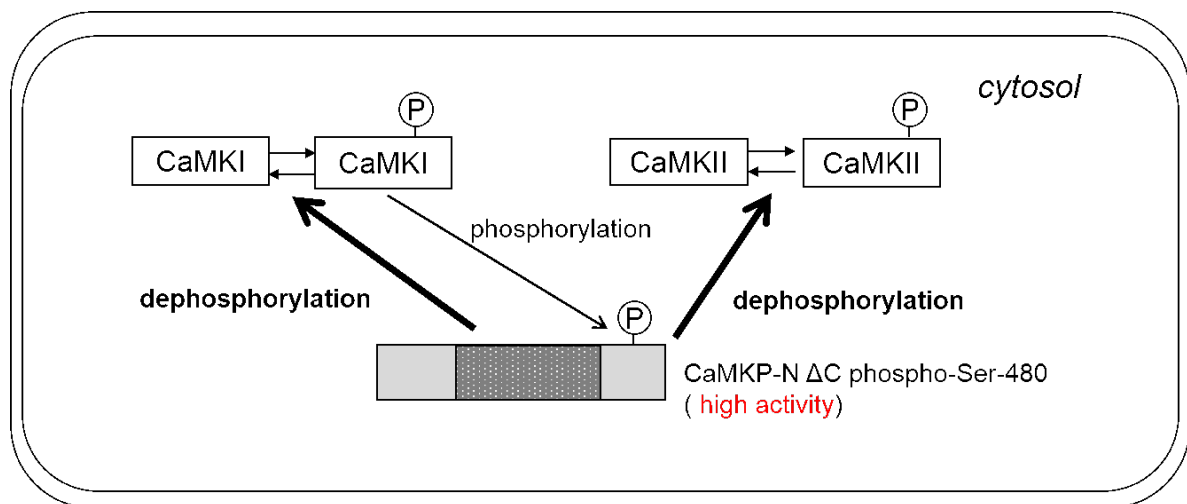
### 1. 細胞内プロセッシングを介したCaMKP-Nの活性制御機構

ラット脳に存在する CaMKP-N の大部分は 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はない。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明を行った。Neuro2a 細胞に zCaMKP-N を発現させると C 末領域は限定分解されるが、プロテアソーム阻害剤でこの限定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-N(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した。また、これまでは CaMKP-N は核のみに存在し同じく核に局在する CaMKIV のみを基質にすると考えられていた。しかし、細胞質に移行することで CaMKIV だけでなく CaMKI も脱リン酸化するようになり、C 末端の限定分解によるユニークな制御メカニズムの一部を解き明かした。



## 2. CaMKIによるリン酸化を介したCaMKP-Nの活性制御機構

先行研究ではCaMKPがCaMKIIによってリン酸化されるという知見があることから、細胞質へと局在が変化したCaMKP-Nも細胞質に局在するCaMKsによってリン酸化され活性が制御されるのではないかと考えた。今回の研究で、CaMKIによって $\alpha$ CaMKP-NのSer-480がリン酸化されることを明らかにした。そこで、 $\alpha$ CaMKP-NのSer-480をアスパラギン酸またはグルタミン酸に置換したリン酸化ミミック変異体であるS480DまたはS480E変異体の脱リン酸化活性は、WTやS480A変異体と比べ高い活性を示した。以上のことより、CaMKIによるSer-480のリン酸化で活性化した $\alpha$ CaMKP-Nは、CaMKsなどの基質を速やかに脱リン酸化する負のフィードバック機構として機能することが示唆された。

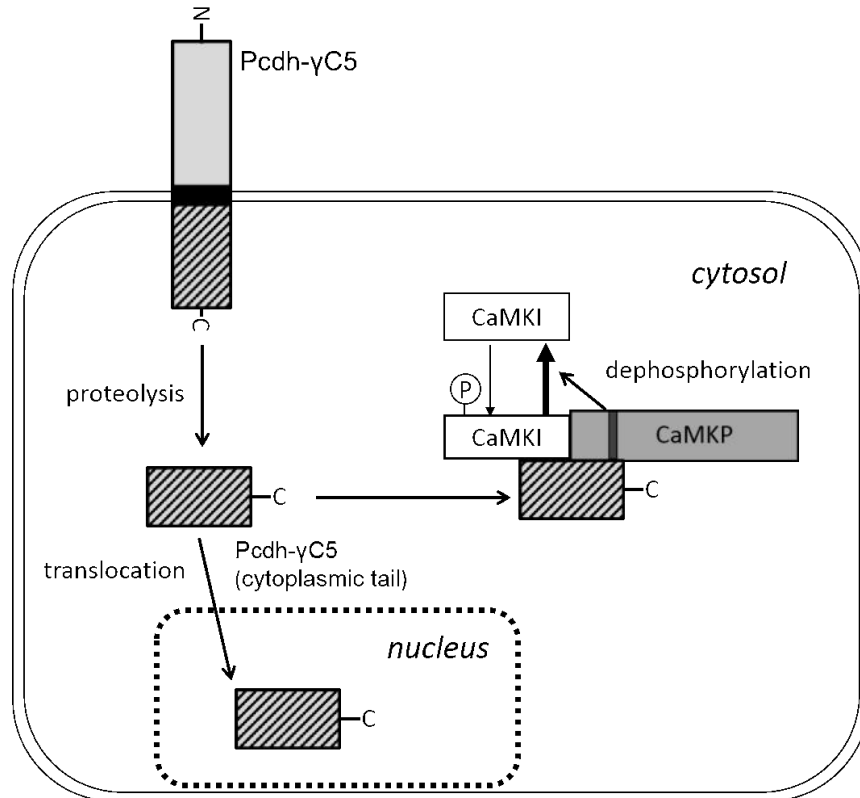


## 3. Protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdh- $\gamma$ C5)を介したCaMKPの制御機構

先行研究ではCaMKPにpoly-L-Lysine (poly(Lys))が結合することによって基質との複合体を形成することが明らかとなり、CaMKPはより基質を脱リン酸化するようになることが*in vitro*において示された。しかしながら、*in vivo*においてpoly(Lys)と同様の機能を持つCaMKPの活性調節因子はまだ見つからない。そこで、大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いてCaMKPのN末端に結合する因子の同定を行った。その結果、CaMKPの結合因子としてPcdh- $\gamma$ C5を同定した。さらに細胞質領域だけのコンストラクトであるPcdh- $\gamma$ C5(715-944)とCaMKPは相互作用し、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)の細胞内局在を制御することを明らかにした。また、リン酸化CaMKIを基質に脱リン酸化アッセイを行ったところ、*in vitro*および*in vivo*においてPcdh- $\gamma$ C5(715-944)の結合によりCaMKPは顕著にリン酸化CaMKIを脱リン酸化した。GSTプルダウンにより、CaMKP, CaMKIとPcdh- $\gamma$ C5(715-944)は三者複合体を形成し

(様式5) (Style5)

たことから、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)は足場の役割を果たしCaMKPの活性制御に寄与する可能性が考えられた。これらの結果より、Pcdh- $\gamma$ C5(715-944)はCaMKPの内在性のpositive regulatorであることが強く示唆された。



(注) 要約の分量は、学位論文の分量の約10分の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