

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation 分子メカニズム

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

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おり、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る。しかし、これまでのリン酸化シグナルの研究は、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。先行研究では、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 依存性キナーゼ(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 は細胞質に局在するが、その後 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、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、または 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、CaMK 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 zCaMKP-N の Ser-480 がリン酸化されることを明らかにした。そこで、zCaMKP-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 zCaMKP-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- γ 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っていない。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- γ 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- γ C5(715-944)とCaMKPは相互作用し、Pcdh- γ 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- γ 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- γ C5(715-944)は三者複合体を形成したことから、Pcdh- γ C5(715-944)は足場の役割を果たしCaMKPの活性制御に参与する可能性が考えられた。これらの結果より、Pcdh- γ 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。