

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	小野内 貴士
審査委員	主査 末吉 紀行 副査 亀下 勇 副査 永田 信治 副査 西 甲介 副査 石田 敦彦

論文名 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

### 審査結果の要旨

カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 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種類が知られており、基質のリン酸化を通して様々な生命現象に関わる。これまでに、*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、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。先行研究ではCaMKPに関して以下の活性化機構が明らかにされてきた。すなわち、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CaMKPは活性化される。また、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に関しては不明な点が多かった。そこで、CaMKsによるリン酸化シグナルを総合的に理解するために、CaMKPやCaMKP-Nのより詳細な機能制御機構の解析を行った。

1章では、CaMKP-Nにおける限定分解の意義と、そのメカニズムの解析について解析を行った。ラット脳に存在するCaMKP-Nの大部分は核局在化シグナルを含む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不明であった。そこで、CaMKP-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。一般的にプロテアソームでの分解は完全分解として知られているが、CaMKP-Nは特定の分子量の分解産物のみが検出された。このことから、CaMKP-Nは直接ユビキチン化されるわけではなく、ユビキチン化される何らかのタンパク質と結合しており、そのタンパク質によってプロテアーゼ等による分解から保護されている可能性が考えられた。そこで、尿素を用いた変性条件下でのプルダウンにより、CaMKP-N自身がユビキチン化されるわけではなく、ユビキチン化されるタンパク質と結合して保護されていることが強く示唆された。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CaMKP-N (FL)は核に局在するが、分解産物は細胞質に局在することを見出した。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、発見当初は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が、実際は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るという、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章では、CaMKP-Nのリン酸化を介した活性調節機構について調べた。前述の通り、CaMKP-NはC末端の限定分解によって核から細胞質へと局在が変化した。さらに、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、CaMKPだけでなく、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可能性が考えられた。*In vitro*における実験で、CaMKIによってCaMKP-NのSer-480がリン酸化されることを明らかにした。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変異体は、WTやS480A変異体と比べ高い活性を示した。キネティック解析の結果、リン酸化ミミック変異体は基質との反応サイクルの速さを示すKcat値が2倍以上に上昇していた。CaMKP-NはCaMKIによってSer-480がリン酸化されることで、時間当たりの基質との反応速度が2倍以上速くなることで、基質をより脱リン酸化するようになることが明らかとなった。以上の結果より、CaMKIによるSer-480のリン酸化で活性化したCaMKP-Nは、CaMKsを速やかに脱リン酸化して不活性化する負のフィードバック機構の一因子として機能すると考えられた。

第3章では、CaMKPの内在性の機能制御因子を探索し、結合タンパク質によるCaMKPの制御機構について解明した。先行研究では、CaMKPにポリリシンが結合することによって基質との複合体の形成が促進され、CaMKPはより効率よく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、*in vivo*においてポリリシンと同様の機能を持つCaMKPの機能調節因子は見つかっていなかった。そこで、大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いてCaMKPの内在性の機能制御因子の探索を試みた。その結果、Protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdh- $\gamma$  C5)のC末領域が同定された。CaMKPはPcdh- $\gamma$  C5の細胞質領域だけのコンストラクトであるPcdh- $\gamma$  C5(715-944)と相互作用し、Pcdh- $\gamma$  C5(715-944)の細胞内局在を変化させることが明らかにされた。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*または*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プルダウンアッセイにより、CaMKP、CaMKIとPcdh- $\gamma$  C5(715-944)は三者複合体を形成したことから、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。

以上のように、本研究ではこれまで不明な点が多かったCaMKPとCaMKP-Nの機能制御に関して、細胞内プロセッシング、CaMKIによるSer-480のリン酸化、およびPcdh- $\gamma$  c5との結合が、細胞内局在や活性の制御などに深く関与していることを示した。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28年2月6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。