

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

氏名： 馬場 裕美  
Name

学位論文題目： 新規in-gel phosphatase assay法の開発とCaMキナーゼホスファターゼ  
Title of Dissertation (CaMKP)の活性制御機構の解析

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細胞内情報伝達において中心的役割を担っており、様々な生命現象の制御に関与している。従って、生命現象のメカニズムを解明するためには、細胞内に存在するキナーゼとホスファターゼの活性を検出する方法が非常に重要な解析手段となる。ホスファターゼの活性検出法としてin-gel phosphatase assay法が開発された。この手法は細胞に発現するホスファターゼの活性検出法として有効である。しかし、従来の手法は放射性同位元素である<sup>32</sup>P-ATPを使用するため、専用の施設を利用する必要があることや、<sup>32</sup>P-ATPの半減期(14日間)を考慮に入れて実験する必要があるなど難点があった。そこで本研究では、放射線同位元素を用いない簡便なin-gel phosphatase assay法の開発を試みた。さらに、従来のin-gel phosphatase assay法を用いた解析により、見出されたCaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP)の活性制御メカニズムについても解析を行った。CaMキナーゼはCa<sup>2+</sup>/カルモジュリンによって活性化されるプロテインキナーゼの総称である。このうちCaMKI, II, IVは多機能性CaMキナーゼ(CaMKs)として知られ、神経伝達物質の合成や分泌、転写制御などを介して、記憶をはじめとする高次神経機能の制御に重要な役割を担っている。CaMKPはCaMKsに対し高い特異性を示すSer/Thrホスファターゼである。CaMKPの酵素学的諸性質はこれまでの研究で明らかにされてきたが、本酵素の詳細な活性制御機構については未だ不明な点が多い。近年、酸化的条件下においてCa<sup>2+</sup>の流入が起こらないにもかかわらずCaMKsが活性化されることが報告された。しかし、その分子メカニズムは不明なままである。そこで本研究ではCaMKsの負の制御因子であるCaMKPが酸化還元によって活性制御を受ける可能性を検討し、解析を行った。

### 結果・考察

#### 1. 新規in-gel phosphatase assay法の開発

蛍光発生源質(MUP)を用いたin-gel phosphatase assay法の開発を試み、Native-PAGEで分離したタンパク質の簡便なホスファターゼ活性検出法を確立した。Native-PAGEは酵素活性を保った状態での泳動が可能のため、泳動後のゲルに直接MUPを反応させた。その結果、CaMKPなど多くのホスファターゼ活性を蛍光を発するバンドとして検出することが可能であった。また、ラット臓器抽出液をNative-PAGEで分離した後に、MUPを基質としてin-gel phosphatase assayを行うと複数の活性バンドを検出することができた。さらに、等電点電気泳動とNative-PAGEを組み合わせることにより、二次元in-gel phosphatase assayが可能か検討した。一次元目の等電点泳動として、尿素存在下に溶液中で組

織抽出液を分離するMicroRotorを用いたが、この分離サンプルをそのまま二次元目のNative-PAGEで分析してもホスファターゼ活性はほとんど検出されなかった。しかし、二次元目の泳動バッファーに2-メルカプトエタノールを添加することにより、活性バンドをクリアに検出できるようになった。このようにNative-PAGEを利用した蛍光発生基質によるin-gel phosphatase assayは、様々な生物や病態組織におけるホスファターゼ活性のプロファイリングや培養細胞を用いた刺激応答などにおけるホスファターゼの動態解析において、有効な解析手段となることが期待される。

## 2. CaMKPの活性制御機構の解析

本研究ではCaMKPの新たな活性制御機構として、CaMKPが酸化・還元によって活性制御を受けることを見出した。まず、CaMKPをH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理した後にホスファターゼ活性を調べたところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度依存的にCaMKPの活性が低下し、還元剤を加えることによって活性は回復した。また、CaMKPはヨードアセトアミドによりCys残基をアルキル化することによっても活性が低下することが判明した。このため、CaMKPはCys残基の酸化修飾によって活性が制御されていることが示唆された。hCaMKP分子には3カ所のCys残基が存在するが、これらは種間で高度に保存されている。このCys残基をSer残基に置換した点変異体を作製し、点変異体のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性を調べた。3カ所のCys残基のうち、Cys-359をSer残基に置換した点変異体のみがH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に非感受性であった。また、hCaMKPがどのような様式で酸化されるかを決定するため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理したhCaMKPを非還元状態のSDS-PAGEを用いて分析した。その結果、hCaMKPは分子内ジスルフィド結合を形成することによって不活性化するのではないかと考えられた。さらに本研究では、CaMKPを含め、PPMファミリーホスファターゼの酸化還元による活性制御についても解析を行った。まず、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で処理したPPMファミリーのホスファターゼ活性を調べた。その結果、CaMKP、CaMKP-N、PPM1A, B, GはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度依存的に活性が低下した。このようにCaMKP、CaMKP-N、PPM1A, B, Gは酸化修飾を受けることにより活性が低下することが示されたのに対し、PPM1D, HはH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理をしても活性の減少は見られなかった。これらのアミノ酸配列を比較したところ、PPMファミリーで保存されている金属イオン配位部位であるAsp残基のN末端側にCys残基が存在するが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に非感受性のPPM1D, HではそれぞれSer残基とThr残基であることが判明した。そこで、このCys残基をSer残基に置換した各PPMの点変異体を作製し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>感受性を調べた結果、これらの変異体はH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に非感受性であった。以上の結果から、CaMKP、CaMKP-N、PPM1A, B, Gは金属イオン配位部位のN末端側に存在するCys残基の酸化・還元によって活性が制御されることが明らかとなった。

(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