

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	馬場裕美
審査委員	主査 亀下 勇 副査 末吉 紀行 副査 菅原 卓也 副査 大西 浩平 副査 田淵 光昭

論文名 新規 in-gel phosphatase assay 法の開発と CaM キナーゼホスファターゼ (CaMKP) の活性制御機構の解析

### 審査結果の要旨

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、以前 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の短い半減期を考慮に入れる必要があった。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 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であり、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PPMファミリーに属し、CaMKsに対し高い特異性を示すSer/Thrホスファターゼである。このCaMKPの活性制御機構については未だ不明な点が多い。近年、細胞内において酸化的条件下で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については未だ不明である。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。

まず初めに、蛍光発生基質(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ホスファターゼ活性を検出する簡便な手法を確立した。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を反応させる方法を思いついた。この手法を用いることにより、CaMKPなど多くのホスファタ

一ゼの活性を蛍光バンドとして検出できることを示した。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を組み合わせたユニークな二次元in-gel phosphatase assayの可能性について検討した。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MicroRotofor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ことを見出した。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。

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。CaMKPは $H_2O_2$ の濃度依存的に活性が低下し、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。ヒトCaMKP(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。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 $H_2O_2$ 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非還元状態のSDS-PAGEを用いて分析したところ、hCaMKPは分子内ジスルフィド結合を形成することが明らかとなった。さらに、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。その結果、CaMKP、CaMKP-N、PPM1A, B, Gは $H_2O_2$ 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 $H_2O_2$ 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、 $H_2O_2$ 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。この部位のCys残基をSer残基に置換した変異体は $H_2O_2$ に非感受性であった。これらの結果から、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になった。

以上のように、本研究ではホスファターゼの活性を簡便に解析する方法として蛍光発生基質を用いたin-gel phosphatase assay法を確立し、その有用性を確認した。また、CaMKPおよびPPMファミリーのホスファターゼが酸化還元によって活性制御を受けるという新たな知見を見出した。これらのことから、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ると評価できる。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で判定した。