

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

氏名： 秋月 一駿  
Name

学位論文題目： 大腸菌発現系を用いた高活性型CK1/CaMKIの調製法の開発と  
Title of Dissertation CaMKI $\delta$ アイソフォームに関する生化学的研究

学位論文要約：  
Dissertation Summary

### 序論

生命現象の主役である多くのタンパク質・酵素は、リン酸化修飾を受けることでそれらの活性や局在、寿命（安定性）などが調節されており、リン酸化状態のタンパク質の機能解析が生命現象の理解には必要不可欠である。よって、試験管内でタンパク質をリン酸化できる活性型のプロテインキナーゼの調製は、そのキナーゼ自体をはじめ、基質タンパク質のリン酸化の意義を解析するうえで肝要であるが、プロテインキナーゼの中には活性型酵素の調製法が確立されていないものも多い。例えば、多機能性キナーゼ（様々なタンパク質をリン酸化するキナーゼ）であるカゼインキナーゼ 1 (CK1) や  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) は、大腸菌発現系を用いた高活性型酵素の取得がそれらキナーゼの性質上困難であった。一方でこれら多機能性キナーゼは、その基質特異性の広さから幅広いリン酸化タンパク質の調製に利用できる汎用性の高い“リン酸化試薬”としての利用も期待できる(1)。そこで第 1 章では、概日リズムやアポトーシス等に重要なカゼインキナーゼ 1 (CK1) について、第 2 章では  $\text{Ca}^{2+}$ /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ  $\delta$  (CaMKI $\delta$ ) について、大腸菌発現系を用いた高活性型酵素の調製法の開発を試みた。

CaMKI $\delta$  は、以前の当研究室における研究で、ゼブラフィッシュの胚発生に重要なキナーゼとして単離・同定された Ser/Thr キナーゼである(2, 3)。CaMKI の完全な活性化には、 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM の結合と CaMK キナーゼ (CaMKK) による活性化ループ内の Thr のリン酸化が必須であると考えられているが(4-6)、第 2 章の研究から、CaM 結合領域を欠いた C 末欠損変異体 CaMKI $\delta$ (1-299)は、 $\text{Ca}^{2+}$ /CaM のみならず CaMKK によるリン酸化を受けなくてもほぼ完全な活性を示すことが判明した。このことは、CaMKI $\delta$  には CaMKK に依存しない新規活性化メカニズムが存在することを示唆しており、第 3 章では、さらに詳細な酵素学的解析を行うことで CaMKI $\delta$  の未知の活性化メカニズムの解明に取り組んだ。

当研究室では以前、ゼブラフィッシュ CaMKI $\delta$  (zCaMKI $\delta$ ) には zCaMKI $\delta$ -S, L, LL (S と L は同じ遺伝子に、LL は別の遺伝子にコードされる) の 3 つのアイソフォームをクローニングし、それぞれの比較解析を行ってきた(2, 3)。一方、哺乳動物のマウスでは、CaMKI $\delta$  遺伝子 (*Camk1d*) は 1 種類しか存在しないも

この1遺伝子から mCaMKI $\delta$ -a, b, c, d の4種類のスプライシングアイソフォームが作られることを *in silico* の解析から見出した。このうち mCaMKI $\delta$ -c (別名: mCKLiK $\beta$ ) に関しては培養細胞における解析例があるものの(7), *in vitro* における酵素学的な解析はこれまで行われておらず, また mCaMKI $\delta$ -b, d に至ってはタンパク質レベルでの解析例は皆無である。そこで第4章では, mCaMKI $\delta$  に存在する各アイソフォームについて試験管内での実験や培養細胞系を用いた詳細な比較解析を行い, さらに本章で明らかにされた各アイソフォームの性質からそれらの存在意義について考察した。

## 第1章

### 大腸菌発現系を用いた高活性型カゼインキナーゼ1の簡便な調製法の開発 (8)

カゼインキナーゼ1 (CK1) は, 真核生物において高度に保存された Ser/Thr キナーゼであり, 概日リズムやアポトーシスなど, 様々な細胞プロセスに関与する重要なキナーゼである(9-11)。従って, 高活性型 CK1 を調製し, その酵素学的諸性質を *in vitro* において詳細に解析することは, CK1 の機能を理解する上で重要な意味を持つ。しかし, 大腸菌発現系で取得したリコンビナント CK1 は, 大腸菌内での自己リン酸化を介して不活性化してしまうため, リン酸化型/不活性型 CK1 しか取得できないという問題があった。本章ではこれを解決するため,  $\lambda$  プロテインホスファターゼ ( $\lambda$ PPase) を恒常的に発現する大腸菌株 BL21(DE3)p $\lambda$ PP 株を開発し, これを用いたタンパク質発現システムを確立した。本発現系を用いることで, リコンビナント CK1 の各アイソフォーム ( $\alpha, \delta, \epsilon$ ) を非リン酸化型酵素として簡便に調製することができた。また, BL21(DE3)p $\lambda$ PP 株を用いて調製した CK1s ( $\alpha, \delta, \epsilon$ ) は, 既存の BL21(DE3)から取得した酵素と比べて著しく高いキナーゼ活性を示すことが明らかになった。最後に, リコンビナント CK1 を  $\lambda$ PPase を用いて *in vitro* で脱リン酸化するというやや煩雑なステップが必要な従来の活性型 CK1 の調製法と比較したところ, BL21(DE3)p $\lambda$ PP から簡単に調製した CK1 の方が高いキナーゼ活性を示すことが判明した。以上から, BL21(DE3)p $\lambda$ PP 株を用いた簡便な手法は, 高活性型 CK1 の調製に有用であることが示された。本発現系は CK1 に限らず, 大腸菌内でのリン酸化が原因で調製の難しい他のキナーゼへの応用も期待できる。

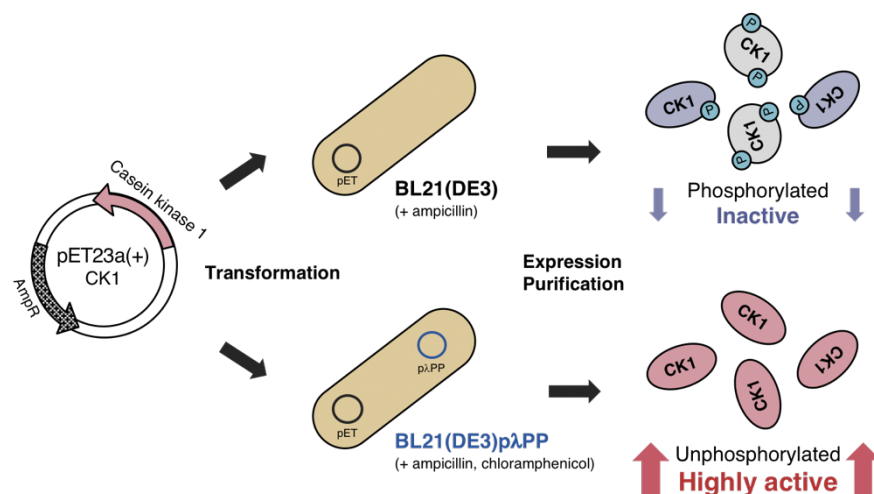


図1. BL21(DE3)p $\lambda$ PP 株を用いた高活性型 CK1 の調製法

## 第2章

### タンパク質の“リン酸化試薬”として有用な“High-performance CaMKI $\delta$ ”の開発 (12)

本章では、ゼブラフィッシュ Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I $\delta$  (zCaMKI $\delta$ ) の自己阻害ドメインを欠損させた恒常的活性断片 zCaMKI $\delta$ (1-299)を作製し、その発現精製と特徴付けを行った。本酵素は大腸菌粗抽出液の可溶性画分を用いた簡便なワンステップの精製により、高い収量 (大腸菌 1 L 培養あたり 220 mg) での精製が可能であった。また、対応する CaMKI $\alpha$  の断片である CaMKI $\alpha$ (1-294)とは異なり、zCaMKI $\delta$ (1-299)は活性化処理をせずとも、CaMKK で活性化した zCaMKI $\delta$ (WT)に匹敵する高いキナーゼ活性を示すことが明らかになった。さらに、zCaMKI $\delta$ (1-299)は zCaMKI $\delta$ (WT)と同様の幅広い基質特異性を示し、これはプロテインキナーゼ A の触媒サブユニット (PKAc) のそれと相補的であった。加えて zCaMKI $\delta$ (1-299)のキナーゼ活性は、PKAc や CX-30K-CaMKII (13) (CaMKII に *Xenopus* CaMKI の N 末領域を融合させたもの) と比較しても高いことが明らかになった。さらに本キナーゼ活性は、熱による不活性化処理や凍結融解の繰り返しに対して非常に安定であることも示された。以上から、本章で作製した zCaMKI $\delta$ (1-299)は取り扱いが容易で高性能な“リン酸化試薬”として、様々なタンパク質のリン酸化/脱リン酸化実験への利用が期待される。

表1. CaMKI $\delta$ (1-299)とCX-30-CaMKII及びPKAcとの比較

	精製の簡便さ	大腸菌 1 liter あたりの取得量	比活性 (基質: MBP)	温度
CaMKI $\delta$ (1-299)	◎	220 mg	3.59 (nmol/min/mg)	◎
CX-30K -CaMKII	△	21 mg	CaMKI $\delta$ (1-299)の 1/10以下	×
PKAc	◎	10 mg (文献値)	0.784 (nmol/min/mg)	30°C: ◎ 40°C: ×

## 第3章

### C 末欠損型 CaMKI $\delta$ で見出された

#### CaMKK 非依存的な自己リン酸化を介した自己活性化メカニズム (14)

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I アイソフォーム (CaMKI $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) は、真核生物における Ca<sup>2+</sup>シグナリングで重要な役割を果たすキナーゼであり、CaMKK によってアクチベーションループの Thr 残基がリン酸化されることで活性化する(4-6)。しかし我々は、ラット CaMKI $\alpha$ (rCaMKI $\alpha$ ) とは異なり、大腸菌から調製したゼブラフィッシュ及びマウス CaMKI $\delta$  の C 末欠損変異体 [zCaMKI $\delta$ (1-299)と mCaMKI $\delta$ (1-297)] は CaMKK 非存在下でもほぼ完全な活性を示すことを見出した (第2章) (12)。CaMKI $\delta$  の CaMKK 非依存的な活性化メカニズムを明らかにするため、本研究ではリコンビナント zCaMKI $\delta$ (1-299) と rCaMKI $\alpha$ (1-294)を用いて、*in vitro* における比較解析を行った。不活性型 zCaMKI $\delta$ (1-299)と  $\lambda$ Pase 共発

現系を用いた実験から、 $\alpha$ CaMKI $\delta$ (1-299)のみが大腸菌の培養過程で高度に自己リン酸化/活性化することが判明した。また質量分析と部位特異的変異体を用いた解析から、キナーゼを活性化させる主要な自己リン酸化サイトはSer<sup>296</sup>であることが明らかになった。さらに、全長の $\alpha$ CaMKI $\delta$ におけるSer<sup>296</sup>のリン酸化ミミック変異体は、CaMKKで完全に活性化したCaMKIよりもさらに高いキナーゼ活性を示すことが判明した。これらの結果は、CaMKI $\delta$ がSer<sup>296</sup>のリン酸化によってCaMKK非依存的様式で活性化するという初めての証拠を提供し、これはCaMKI $\delta$ アイソフォームの生理的な役割を理解するうえで重要な手がかりになる可能性がある。

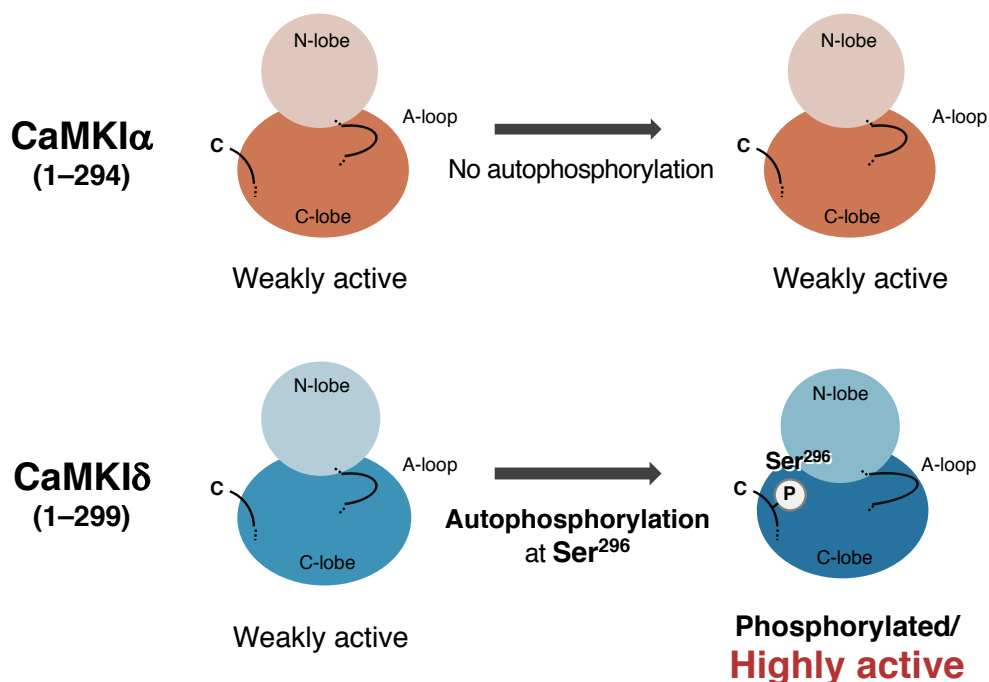


図2. CaMKI $\delta$ (1-299)の活性化モデル (模式図)

## 第4章

### マウス CaMKI $\delta$ に存在する各種スプライシングアイソフォームの比較解析

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I $\delta$ (CaMKI $\delta$ ) は、Ca<sup>2+</sup>シグナリングで機能する Ser/Thr キナーゼであり、Ca<sup>2+</sup>/CaM の結合と CaMKK によるリン酸化を受けて活性化する(4-6)。本章では、マウス *Camk1d* 遺伝子に由来する4つのスプライシングアイソフォーム (mCaMKI $\delta$ -a, b, c, d) を *in silico* で見出し、これらについて酵素学的な比較解析を行った。まず、マウス各臓器を用いて RT-PCR を行ったところ、mCaMKI $\delta$ -a, c, b, d はそれぞれ異なる発現パターンを示すことが判明した (mCaMKI $\delta$ -d は肝臓にて顕著な発現を示した)。次に、大腸菌を用いてリコンビナント mCaMKI $\delta$ -a, b, c, d を取得し、*in vitro* におけるキナーゼ活性を評価した。その結果、どのアイソフォームも CaMKK によってリン酸化されるものの、mCaMKI $\delta$ -a, c のみが基質 (MBP: ミエリン塩基性タンパク質) に対するリン酸化活性や自己リン酸化活性を示すことが明らかになった。加えて、Neuro 2a 細胞から調製した mCaMKI $\delta$ -a, c は CREB (cAMP 応答配列結合タン

## (様式5) (Style5)

パク質) に対して  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  依存的なリン酸化活性を持つことが示された。また興味深いことに、*in vitro* では mCaMKI $\delta$ -a, c は両酵素ともに自己リン酸化活性を示したが、293T 細胞内においては、mCaMKI $\delta$ -c でのみ顕著な自己リン酸化活性が認められた。また点変異体を用いた解析から、mCaMKI $\delta$ -c の自己リン酸化部位は mCaMKI $\delta$ -b, c のみが有する C 末端側の Ser<sup>349</sup> (isoform c) であることが明らかになった。さらに興味深いことに、この自己リン酸化サイトは PKAc によってより効率的にリン酸化されることが *in vitro* および培養細胞系における実験から示された。以上から、mCaMKI $\delta$  に存在する各種スプライシングアイソフォームは、組織局在や、キナーゼ活性、自己リン酸化活性や PKAc によるリン酸化の有無といった様々な相違点が認められ、生体内ではこれらの差異に基づく異なった役割を担うことが示唆された。

## 総括

本研究によって大腸菌を用いた高活性型酵素の調製法が確立された CK1/CaMKI については、今後これらのキナーゼ活性をはじめとする各種パラメータの詳細な解析や、未知の基質探索といった様々な機能解析が容易となり、これらキナーゼの生理機能の解明がこれまで以上に加速されると思われる。また、これら高活性型 CK1/CaMKI $\delta$  と既存の“リン酸化試薬”である PKAc を組み合わせることでより幅広いリン酸化タンパク質が簡便に調製でき、これにより様々なリン酸化タンパク質の機能解析や、リン酸化の逆反応を司る各種ホスファターゼの同定およびそのキネティクスのための良好な基質調製が可能になると考えられる。

また、第 2・3 章で示唆された CaMKI $\delta$  の Ser<sup>296</sup> のリン酸化を介した新規活性化メカニズムや、各種 mCaMKI $\delta$  アイソフォームで見出されたそれぞれに特徴的な性質は、これまであまり明らかにされていなかった CaMKI アイソフォーム間における CaMKI $\delta$  特異的な機能を理解する上で重要な知見になると考えられる。将来的には、CaMKI $\delta$  の関与が示唆されるアルツハイマー病や、乳がん、免疫疾患などにおいて、本研究により見出された CaMKI $\delta$  の基本性質が創薬の開発過程や分子病理の理解における価値のある情報源となると期待している。

## 引用文献

- (1) MacKintosh, C., Moorhead, G. (1999) Assay and purification of protein (serine/threonine) phosphatases, in: Hardie, D. G. (Ed.), *Protein Phosphorylation: A Practical Approach*, **second ed.**, 153–181
- (2) Senga, Y., Nagamine, T., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. (2012) Knockdown of two splice variants of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase I $\delta$  causes developmental abnormalities in zebrafish, *Danio rerio*. *Arch. Biochem. Biophys.* **517**, 71–82
- (3) Senga, Y., Yoshioka, K., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. (2013) Expression and gene knockdown of zebrafish  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase I $\delta$ -LL. *Arch. Biochem. Biophys.* **540**, 41–52
- (4) Soderling, T. R. (1999) The  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein kinase cascade. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 232–

- (5) Hook, S. S., and Means, A. R. (2001)  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent kinases: From activation to function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 471–505
- (6) Wayman, G. A., Lee, Y. S., Tokumitsu, H., Silva, A., and Soderling, T. R. (2008) Calmodulin-kinases: Modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* **59**, 914–931
- (7) Yamada, T., Suzuki, M., Satoh, H., Kihara-Negishi, F., Nakano, H., and Oikawa, T. (2004) Effects of PU.1-induced mouse calcium-calmodulin-dependent kinase I-like kinase (CKLiK) on apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.* **294**, 39–50
- (8) Akizuki, K., Toyama, T., Yamashita, M., Sugiyama, Y., Ishida, A., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. (2018) Facile preparation of highly active casein kinase 1 using *Escherichia coli* constitutively expressing lambda phosphatase. *Anal. Biochem.* **549**, 99–106
- (9) Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., and Stöter, M. (2005) The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.* **17**, 675–689
- (10) Gross, S. D., and Anderson, R. A. (1998) Casein kinase I: spatial organization and positioning of a multifunctional protein kinase family. *Cell. Signal.* **10**, 699–711
- (11) Schitteck, B., and Sinnberg, T. (2014) Biological functions of casein kinase 1 isoforms and putative roles in tumorigenesis. *Mol. Cancer* **13**, 231
- (12) Senga, Y., Akizuki, K., Katayama, S., Shigeri, Y., Kameshita, I., Ishida, A., and Sueyoshi, N. (2016) High-performance CaMKI: A highly active and stable form of CaMKI $\delta$  produced by high-level soluble expression in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **475**, 277–282
- (13) Shoji, H., Sueyoshi, N., Ishida, A., and Kameshita, I. (2005) High-level expression and preparation of autonomous  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **138**, 605–611
- (14) Akizuki, K., Kinumi, T., Ono, A., Senga, Y., Osawa, J., Shigeri, Y., Ishida, A., Kameshita, I., and Sueyoshi, N. (2019) Autoactivation of C-terminally truncated  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) I $\delta$  via CaMK kinase-independent autophosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **668**, 29–38