

学位論文要旨 Dissertation Abstract

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
Title of Dissertation とCaMKI δ アイソフォームに関する生化学的研究

学位論文要旨：
Dissertation Abstract

生体内で働くタンパク質の多くは、プロテインキナーゼによるリン酸化修飾を受けてその機能が調節されている。そのため、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、そのキナーゼの機能をはじめ、基質タンパク質のリン酸化の影響を理解する上で重要なステップである。しかし、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できていないものも多い。例えば、多機能性キナーゼであるカゼインキナーゼ1 (CK1) や Ca^{2+} /カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ II (CaMKII) はそれらキナーゼの性質上、大腸菌発現系を用いた高活性型酵素の調製が困難であった。一方で、これら多機能性キナーゼは幅広いリン酸化タンパク質の調製に利用できるため、高活性型酵素の調製法が確立されれば、様々なタンパク質のリン酸化・脱リン酸化実験に有用な“リン酸化試薬”にもなる。そこで本研究では、概日リズムやアポトーシスに重要なカゼインキナーゼ1 (CK1) と、以前に当研究室で同定し、CaMKIIと同じ多機能性 CaMK である Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ I δ (CaMKI δ) 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。

まず、自己リン酸化によって不活性化するという性質から高活性型酵素の調製が困難であった CK1について、 λ ホスファターゼを恒常的に発現する大腸菌 BL21(DE3)p λ PP 株の開発を行い、これを発現用の菌株として用いることで非リン酸化/高活性型 CK1の簡便な調製に成功した。次に、高活性型 CaMKI δ の調製法の開発を試みた。CaMKI は本来、活性化に Ca^{2+} /CaM の結合と CaMK キナーゼ (CaMKK) によるリン酸化を必要とするが、CaMKI δ の C 末欠損変異体 [CaMKI δ (1-299)] は、 Ca^{2+} /CaM や CaMKK がなくてもほぼ完全な活性を示すこと

を見出した。また、CaMKI δ (1-299)は既存の“リン酸化試薬”であるプロテインキナーゼAの触媒サブユニット(PKAc)と比べて、比活性、熱安定性、収量の点で優っており、さらにPKAcと相補的な基質特異性を持つことが判明した。このことからCaMKI δ (1-299)は、PKAcと相補的もしくは代替的に利用可能な“リン酸化試薬”となることが示された。

CaMKI δ (1-299)はCaMKKによるリン酸化を受けなくても完全な活性を示すことが明らかになったが、CaMKI δ と最もよく似たアイソフォームであるCaMKI α (1-294)では、このような活性化は見られないことが判明した。このことからCaMKI δ アイソフォームには、CaMKKに依存しない新規活性化メカニズムが存在することが示唆された。そこで、CaMKI α (1-294)との比較解析とCaMKI δ の自己リン酸化に着目した一連の解析を行った結果、CaMKI δ (1-299)はSer²⁹⁶の自己リン酸化によって自己活性化するユニークな活性化メカニズムを持つことが明らかになった。

最後に、マウスのCaMKI δ (mCaMKI δ)に存在する、報告がほぼ皆無な4種類のスプライシングアイソフォーム (mCaMKI δ -a, b, c, d)の比較解析とその特徴付けを行った。その結果、mCaMKI δ -a, b, c, dはそれぞれ異なる組織で発現していることや、mCaMKI δ -b, dは不活性型であること、さらにmCaMKI δ -cでは自己リン酸化やPKAcによってSer³⁴⁹がリン酸化されることが明らかになった。このことから、マウスでは性質の異なるCaMKI δ が発現しており、それぞれに特異的な機能を有する可能性が示された。

本研究で確立された高活性型CK1/CaMKIの調製法により、これらキナーゼの生理機能の解明がこれまで以上に急速に進むものと思われる。また、高活性型CK1, CaMKI δ (1-299), 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調製でき、多くのタンパク質のリン酸化の意義やそれを基質とするホスファターゼの機能を明らかにできる可能性がある。加えて、本研究から示唆されたCaMKI δ のSer²⁹⁶のリン酸化を介した活性化メカニズムや各種mCaMKI δ アイソフォームに特徴的な性質は、未だ明らかになっていないCaMKI δ に特異的な機能を理解する上で重要な知見になるとと思われる。