

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	秋月一駿
審査委員	主査 末吉紀行 副査 田淵光昭 副査 永田信治 副査 西甲介 副査 石田敦彦

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

### 審査結果の要旨

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、リン酸化状態のタンパク質の機能解析は、生命現象を理解する上で必要不可欠である。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、様々な基質タンパク質を幅広くリン酸化する多機能性キナーゼであるカゼインキナーゼ1 (CK1)や、Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)は、それらの性質上、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、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“リン酸化試薬”として、様々なタンパク質のリン酸化のみならず、それらを基質とする脱リン酸化酵素(プロテインホスファターゼ)の研究にも利用できる。そこで本研究では、まずCK1と、CaMKIIと同じ多機能性CaMKであるCaMKI  $\delta$  について、大腸菌発現系による高活性型酵素の調製法の開発を試みた。

CK1は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Ser/Thrキナーゼであり、真核生物において高度に保存されている。しかし、大腸菌発現系で取得したリコンビナントCK1は、大腸菌内で自己リン酸化を介して不活性化しているため、活性型CK1の取得は困難であった。そこで第1章では、 $\lambda$ 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を非リン酸化型/活性型酵素として簡便かつ大量に調製することが出来た。BL21(DE3)p $\lambda$  PP株を用いて調製したCK1は、既存のBL21(DE3)株から取得した酵素、あるいは、*in vitro*で $\lambda$  PPaseで脱リン酸化するというやや煩雑な従来法によって調製した酵素と比べて、著しく高いキナーゼ活性を示した。以上の結果より、BL21(DE3)p $\lambda$  PP株は高活性型CK1の簡便な調製に有用であることが示された。また、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が困難な他のタンパク質への応用も期待できる。

2章では、新たな“リン酸化試薬”として、CaMKI  $\delta$  の自己阻害ドメインを欠損させた恒常的活性断片CaMKI  $\delta$  (1-299)を作製した。本酵素は大腸菌粗抽出液の可溶性画分から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)で取得できた。また、対応するCaMKI  $\alpha$  の断片CaMKI  $\alpha$  (1-294)とは異なり、CaMKI  $\delta$  (1-299)は活性化処理なしで、CaMKキナーゼ(CaMKK)で活性化したCaMKI  $\delta$  (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、CaMKI  $\delta$  (1-299)はCaMKI  $\delta$  (WT)と同様の幅広い基質特異性を示し、かつこれはPKAの触媒サブユニット(PKAc)のそれと相補的であった。加えて、CaMKI  $\delta$  (1-299)のキナーゼ活性は、PKAcやCX-30K-CaMKII (CaMKIIの触媒領域にXenopus CaMKIのN末領域を融合させたもの)と比較して高いことが明らかになった。また、CaMKI  $\delta$  (1-299)は、熱や凍結融解に対して非常に安定であることが判明した。以上の結果から、CaMKI  $\delta$  (1-299)は取り扱いが容易で高性能な“リン酸化試薬”として、単独もしくはPKAcと組み合わせることで、広範なタンパク質のリン酸化／脱リン酸化の実験に利用できることが期待できる。

CaMKIIは、上流の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。しかし2章において、CaMKI  $\alpha$  (1-294)とは異なり、大腸菌から調製したCaMKI  $\delta$  (1-299)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。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、3章ではリコンビナントCaMKI  $\delta$  (1-299)とCaMKI  $\alpha$  (1-294)を用いて、*in vitro*における比較解析を行った。不活性型CaMKI  $\delta$  (1-299)と $\lambda$  PPase共発現系を用いた実験から、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-296であることが明らかになった。さらに、全長のCaMKI  $\delta$ におけるSer-296のリン酸化ミミック変異は、CaMKKで完全に活性化したCaMKIよりも高いキナーゼ活性を示すことを明らかにした。これらの結果は、CaMKI  $\delta$ がSer-296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、このことはCaMKI  $\delta$ アイソフォームの生理的な役割を理解するうえでの重要な手がかりになる可能性がある。

4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*の解析で見出し、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。リコンビナントmCaMKI  $\delta$  -a, b, c, dはいずれも*in vitro*においてCaMKKによってリン酸化されるものの、mCaMKI  $\delta$  -a, cのみが基質タンパク質(MBP)に対するリン酸化活性や自己リン酸化活性を示した。加えて、Neuro 2a細胞から調製したmCaMKI  $\delta$  -a, cはCREBに対してCa<sup>2+</sup>/CaM依存的なリン酸化活性を持つことが示された。また*in vitro*では、mCaMKI  $\delta$  -a, cは両酵素ともに自己リン酸化したが、興味深いことに293T細胞内では、mCaMKI  $\delta$  -aの自己リン酸化は見られなかったのに対し、mCaMKI  $\delta$  -cでは顕著な自己リン酸化が認められた。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-349 (isoform c)であることが明らかにされた。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、それぞれ組織局在やキナーゼ活性、自己リン酸化や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、生体内で異なる役割を担うことが示唆された。

以上のように、本論文は新たに明らかになった科学的成果を多く含み、また、提示した成果は、今後の当該分野の研究の進展に大きく貢献していくと考えられ、学位論文として十分に評価できる。

本論文に関する公開審査会は、令和2年2月8日に愛媛大学農学部において開催され、申請者による口頭発表と適切な質疑応答が行われた。引き続き開催された学位審査委員会で本論文を慎重に審査し、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。