

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	奥野幸子
-------	----	----	------

学位論文題目

Regulation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase  $\alpha$  by cAMP-Dependent Protein Kinase: Biochemical Analysis

(cAMP 依存性プロテインキナーゼによるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ  $\alpha$  の制御：生化学的解析)

共著者名 木谷隆子  
藤澤仁

The Journal of Biochemistry 130 巻 503 頁—513 頁  
平成 13 年 10 月

研究目的

カルシウムイオンはサイクリック AMP、ジアシルグリセロールとともに代表的な細胞内セカンドメッセンジャーであり、これらはそれぞれセカンドメッセンジャー応答性の多機能性プロテインキナーゼ、すなわちカルシウムイオンはカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ I、II、IV) cAMP は A キナーゼ、ジアシルグリセロールは C キナーゼを活性化して細胞内シグナル伝達系を作動させる。これらのシグナル伝達系は同一細胞内で共存しており、伝達系間相互の制御機構は細胞の機能の統合を考える上に極めて重要である。著者らはカルシウムイオンシグナル伝達系で CaM キナーゼ II とともに重要な役割を担っていると考えられる CaM キナーゼ IV と I の活性化に働く CaM キナーゼカスケードの上流酵素、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ  $\alpha$  (CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$ ) が A キナーゼによってリン酸化され、活性が変動することを見出したので、この機構の詳細を明らかにしてカルシウムイオンシグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系とのクロストークの可能性を明らかにすることを研究目的とした。

材料・方法

蛋白質の調製—リコンビナント CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$ 、カルモデュリンは cDNA を導入して大腸菌に発現させた蛋白質を、CaM キナーゼキナーゼ  $\beta$ 、CaM キナーゼ IV、CaM キナーゼ I は昆虫細胞 Sf9 に発現させた蛋白質をそれぞれ既報の方法 (1) で精製した。A キナーゼ (触媒サブユニット) はウシ心筋から既報の方法 (2) で精製した。

キナーゼの活性測定法— $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて 30°C でリン酸化反応を行い、合成基質ペプチドへの  $^{32}\text{P}$  の取込み量はホスホセルロース法で、蛋白質基質への取込み量は 3MM 法で測定した。

CaM キナーゼキナーゼのリン酸化部位の決定— $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いてリン酸化した CaM キナーゼキナーゼはカルボキシメチル化した後トリプシン消化を行い、生成した  $^{32}\text{P}$  リン酸化ペプチドを逆相カラムを用いて精製した。精製したリン酸化ペプチドはペプチドシーケンサーを用いてそれぞれのアミノ酸配列を決定した。

## 成 績

カルシウム/カルモデュリン存在下にリン酸化条件で CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  をインキュベートすると反応時間に依存して自己リン酸化が進行し、それに伴って合成基質ペプチドを用いて測定した場合の酵素活性が上昇した。この反応液に A キナーゼを加えると CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  へのリン酸の取込みはさらに促進され、酵素の活性化も促進された。一方、カルシウム/カルモデュリン非存在下に A キナーゼを加えると CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  は急激にリン酸化され活性は逆に急激に低下した。このように CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  はリン酸化によって活性化されたり不活性化されたり、活性が複雑に変動することが明らかになったので、活性化および不活性化に関与するリン酸化部位をそれぞれ特定することを試みた。

リン酸化ペプチドのアミノ酸配列の結果から、CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の N 末端から 24 番目のセリン残基、Ser24 が自己リン酸化される部位であり、Ser52、Ser74、Thr108、Ser458、Ser475 の 5 ヶ所が A キナーゼでリン酸化される部位であることが明らかになった。カルシウム/カルモデュリン存在下、非存在下それぞれで A キナーゼによってリン酸化される部位とそのリン酸の取込み量を調べた結果、いずれの場合も複数の部位が部分的にリン酸化されたが、カルシウム/カルモデュリンが存在すると、非存在下ではほとんどリン酸化されなかった Ser475 へのリン酸化量が増加し、逆に Ser52、Ser74、Thr108、Ser458 へのリン酸化が抑制され、特にカルモデュリン結合部位近傍の Ser458 のリン酸化が著しく抑制された。CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の活性を蛋白質基質である CaM キナーゼ IV のリン酸化で測定すると、ペプチド基質を用いた結果とは異なり、カルシウム/カルモデュリン存在下、非存在下いずれでも A キナーゼでリン酸化すると活性は急激に低下した。CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  のもう 1 つの蛋白質基質である CaM キナーゼ I でも同様の結果が得られた。

A キナーゼによってリン酸化された CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の性質を酵素反応速度論的に解析した結果、ペプチド基質を用いた場合にはカルシウム/カルモデュリン存在下でリン酸化された酵素は最大反応速度が約 3 倍上昇し、非存在下でリン酸化された酵素は ATP に対する親和性が低下した。ペプチド基質に対する親和性はいずれの場合も変化しなかった。また蛋白質基質を用いた場合には、カルシウム/カルモデュリン存在下、非存在下いずれでも A キナーゼでリン酸化されると基質蛋白質および ATP に対する親和性が低下した。

CaM キナーゼキナーゼの  $\beta$  アイソフォームでは自己リン酸化活性は  $\alpha$  アイソフォームより高いが A キナーゼによってはほとんどリン酸化されず、活性変動もほとんど認められなかった。

## 考 案

CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  が A キナーゼによってリン酸化されて活性が変動する際の、活性変動に関与するリン酸化部位を特定することを試みた。カルシウム/カルモデュリン非存在下に A キナーゼでリン酸化すると急激なリン酸の取込みと酵素の不活性化が認められたが、酵素が充分不活性化された状態にある時複数の部位がリン酸化されるが、どの部位も部分的にリン酸化されているにすぎない。この結果は酵素の不活性化への転換が、ある特定の部位のリン酸化によるものというよりむしろ複数の部位がリン酸化されてその結果酵素の高次構造が変化することによるものと考えられる。A キナーゼでリン酸化される 5 ヶ所の部位のうちカルシウム/カルモデュリン非存在下でよりよくリン酸化される Ser458 がカルシウム/カルモデュリン非存在下での不活性化に部分的に関与している可能性が考えられる。

一方カルシウム/カルモデュリン存在下では非存在下に比べてリン酸化速度が抑制され、リン酸化された CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の活性はペプチド基質と蛋白質基質で異なる結果が得られた。CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  にカルモデュリンが結合して高次構造が変化した結果リン酸化が抑えられた可能性が考えられる。ペプチド基質と蛋白質基質で活性の経時変化は大きく異なるが、蛋白質基質を用いた場合にはカルシウム/カルモデュリン存在下、非存在下いずれの場合にも同様な急激な活性低下が認められた。この活性低下にはカルシウム/カルモデュリン存在下、非存在下いずれでもリン酸化される Ser52、Ser74、Thr108 などのリン酸化による高次構造の変化が関与している可能性が推定される。

## 結 論

1. CaM キナーゼカスケードの上流酵素、CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  は A キナーゼによってリン酸化されて活性が変動する。
2. カルシウム/カルモデュリン存在下に A キナーゼでリン酸化した CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の活性はペプチド基質を用いて測定すると上昇し、カルシウム/カルモデュリン非存在下でリン酸化すると活性は低下したが、蛋白基質を用いるといずれも活性は低下した。
3. CaM キナーゼキナーゼ  $\alpha$  の自己リン酸化部位は Ser24 であり、A キナーゼでリン酸化される部位は Ser52、Ser74、Thr108、Ser458、Ser475 の 5 ヶ所である。
4. CaM キナーゼキナーゼのリン酸化による活性変動は、ある特定の 1 ヶ所の部位のリン酸化によるものでなく、複数の部位へのリン酸化によって酵素の高次構造が変化することによるものと推定される。

## 引 用 文 献

1. Kitani, T., Okuno, S., and Fujisawa, H. (1997) Studies on the site of phosphorylation of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) IV by CaM-kinase kinase. J. Biochem. 121, 804-810
2. Okuno, S. and Fujisawa, H. (1990) Stabilization, purification and crystallization of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from bovine heart. Biochim. Biophys. Acta 1038, 204-208

## 参 考 論 文

1. Okuno, S. and Fujisawa, H. (1993) Requirement of brain extract for the activity of brain calmodulin-dependent protein kinase IV expressed in *Escherichia coli*. J. Biochem. 114, 167-170
2. Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. (1994) Purification and characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV kinase from rat brain. J. Biochem. 116, 923-930
3. Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. (1996) Evidence for the existence of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase IV kinase isoforms in rat brain. J. Biochem. 119, 1176-1181
4. Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. (1997) Purification and characterization of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase kinase  $\beta$  from rat cerebellum. J. Biochem. 121, 155-160

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	奥 野 幸 子
<p>審査委員長 鈴木 裕 ㊞</p> <p>審査委員 牛 首 文 隆 ㊞</p> <p>審査委員 若 宮 伸 隆 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Regulation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase <math>\alpha</math> by cAMP-Dependent Protein Kinase: Biochemical Analysis (cAMP 依存性プロテインキナーゼによるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼキナーゼ <math>\alpha</math> の制御：生化学的解析)</p>			
<p>カルシウムイオン、cAMP、ジアシルグリセロールは細胞内情報伝達系において機能する代表的なセカンドメッセンジャーであり、それぞれカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ I、II、IV)、A キナーゼ、C キナーゼを活性化する。これら細胞内情報伝達系相互のクロストークを明らかにすることは、細胞の機能調節機構を理解するために必須である。論文提出者らはすでに、CaM キナーゼ IV と I をリン酸化する CaM キナーゼキナーゼ <math>\alpha</math> が A キナーゼによりリン酸化されることによりその活性が変動することを見出している。本学位論文ではこの CaM キナーゼキナーゼ活性制御の機構の詳細を明らかにして、カルシウムイオンシグナル伝達系と cAMP シグナル伝達系のクロストークの可能性を明らかにすることを目的とし</p>			

ている。

本論文では先ず、CaM キナーゼキナーゼ $\alpha$ の Ser52, Ser74, Thr108, Ser458, Ser475 の5ヶ所がA キナーゼにより部分的にリン酸化されること、カルシウム/カルモデュリン存在下では Ser52, Ser74, Thr108,特に Ser458 のリン酸化は抑制され、非存在下ではほとんどリン酸化されない Ser475 のリン酸化が増加することを観察した。そして、カルシウム/カルモデュリンの存在下で CaM キナーゼキナーゼ $\alpha$ がリン酸化されるとペプチド基質に対する活性は促進され、蛋白基質 (CaM キナーゼIV及びI) に対する活性は抑制されるが、他方、非存在下でリン酸化されるとペプチド基質、CaM キナーゼIV及びI に対する活性は共に抑制されることを観察した。さらにこれら活性変動についての詳細な速度論的検討を行ない、ペプチド基質の場合は、カルシウム/カルモデュリン存在下でのリン酸化により最大活性が増大し、非存在下でのリン酸化により ATP に対する親和性が低下すること、蛋白基質では共に、蛋白基質及びATP に対する親和性が低下することを明らかとした。なお、CaM キナーゼキナーゼの $\beta$ 型アイソフォームはA キナーゼではほとんどリン酸化されず、活性も変動しないことを観察した。

以上の結果は、CaM キナーゼキナーゼ $\alpha$ の複数部位がA キナーゼでリン酸化されることにより、CaM キナーゼIV及びIのリン酸化速度が減少することを示し、さらにこれらの活性化が遅延することを示唆するものである。本論文提出者らは、CaM キナーゼキナーゼ $\alpha$ の活性変動は、特定部位のリン酸化によるものではなく、複数部位のリン酸化により本酵素の高次構造が変化することによるものであると示唆している。

本論文はこのように、複雑な細胞内情報伝達系のクロストークの実体を明らかにし、細胞の機能調節機構を理解するために必須の知見を与えている。論文内容と関連領域についての各審査委員による試問に対して論文提出者からは適切な回答が得られ、本提出者はこの領域において十分な知識を有することが示された。

以上の審査結果から、本審査委員会は、本論文が博士 (医学) の学位に値するものであると判定した。