

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	木 谷 隆 子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Molecular Cloning of Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Phosphatase (カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼのCDNAクローニング)</p> <p>共 著 者 名 石 田 敦 彦 奥 野 幸 子 竹 内 昌 之 亀 下 勇 藤 澤 仁</p> <p>J. Biochem. 125, 1022-1028(1999)</p> <p>研 究 目 的</p> <p>カルシウムイオンは脳の働きに重要な役割を演じているが、その多くはカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼI (CaMキナーゼI)、II、IVなどの多機能性CaMキナーゼを介していると考えられている。これらのCaMキナーゼのうちCaMキナーゼIIは自己リン酸化によりN末端から286番目のスレオニン残基が、CaMキナーゼIやIVは上流の酵素のCaMキナーゼキナーゼによりそれぞれ177、196番目のスレオニン残基がリン酸化されて活性化される(1)。最近我々はこれらのリン酸化された多機能性CaMキナーゼを特異的に脱リン酸化し、不活性化する新規のホスファターゼ(CaMキナーゼフォスファターゼ)を見出した(2)。この新規ホスファターゼのカルシウムシグナル伝達系での役割を解明するために、このホスファターゼのクローニングを試みた。</p> <p>材 料 ・ 方 法</p> <p>1. 蛋白の調製: CaMキナーゼホスファターゼは以前に報告した精製法で精製した(3)。リコンビナントのラットCaMキナーゼIV (K71R) (ATP結合部位であるN末端から71番目のリジンをアルギニンに変換してATPが結合できなくしたCaMキナーゼIV) はSf9細胞で発現し精製した。リコンビナントのCaMキナーゼキナーゼαは大腸菌で発現し精製した。カルモデュリンは大腸菌で発現し精製した。</p> <p>2. クローニング: 精製したCaMキナーゼホスファターゼ約10μgを10%アクリルアミドゲルのSDS-PAGE後、酵素の蛋白バンドを切り取り、トリプシン消化し、得られたペプチドをHPLCで精製し、ペプチドシーケンサーでそのアミノ酸配列を決めた。得られたアミノ酸配列からヌクレオチドプ</p>			

ローブを作り、 λ ZapIIシステムでラット脳幹のmRNAから作ったcDNAライブラリーからのクローニングを行った。

3. ノーザンブロット：MTNメンブレン(Clontech)を用いラットの各臓器におけるmRNAの発現量を調べた。

4. 大腸菌での発現：クローニングしたホスファターゼのcDNAを大腸菌の発現ベクターに入れ発現した。

5. 抗体の作製：CaMキナーゼホスファターゼのC末端の19アミノ酸からなる合成ペプチドでウサギを免疫し、得られた血清から抗原ペプチドを固定化したアフィニティカラムで抗体を精製した。

6. ウェスタンブロット：ラットの各臓器の粗抽出液を7.5%のアクリルアミドゲルでSDS-PAGE後PVDF膜にトランスファーし、膜をCaMキナーゼホスファターゼ抗体と反応した後、HRPラベルしたウサギ抗体と反応させジアミノベンジジンで発色した。

7. ホスファターゼの活性測定：CaMキナーゼIVは強い自己リン酸化活性を持つので、ATP結合部位に変異を入れ自己リン酸化能を欠失させたCaMキナーゼIV(K71R)を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPとCaMキナーゼキナーゼ α でリン酸化し基質を作製し、脱リン酸化活性を測定した(2)。

8. 蛍光抗体法：PC12細胞をコラーゲンコートしたカバーガラス上で培養後ホルマリンで固定し、CaMキナーゼホスファターゼ抗体とFITCラベルしたウサギ抗体で反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

成 績

1. ノーザンブロット解析：精製CaMキナーゼホスファターゼのペプチドシーケンスを元にして作製したヌクレオチドプローブを用い、MTNメンブレンでノーザンブロットを行った。約4.5KbのmRNAのバンドがほとんどすべてのラットの臓器で観察され広い組織分布を示したが、肺が1番濃く、次に脳、心臓が同じくらいであった。

2. 塩基配列及びアミノ酸配列の解析：ラット脳幹のmRNAより λ ZapのcDNAライブラリーを作製した。約70万個のプラークをCaMキナーゼホスファターゼのヌクレオチドプローブでスクリーニングし、約3.5-4.5Kbの陽性クローンが8個得られた。これらのcDNAをジデオキシ法により塩基配列を解析しこれらのcDNAは450個のアミノ酸からなる分子量49,165の蛋白質をコードしていることが明らかになった。

3. 大腸菌での発現：得られたcDNAを大腸菌の発現ベクターに入れ、大腸菌BL21(DE3)で発現させ、そのSDS-PAGEを行った。分子量約5万のところにラット脳幹から精製したCaMキナーゼホスファターゼと同じ位置に発現蛋白のバンドが見られた。

4. ホスファターゼ活性の測定：大腸菌で発現したリコンビナントの酵素を用いてホスファターゼ活性を測定した。リコンビナントの酵素は反応液中にポリリジンを加えると活性が約85倍上昇した。

5. ウェスタンブロット解析：CaMキナーゼホスファターゼのC末端19アミノ酸残基を認識する抗体を用いて、ラット各臓器やPC12細胞のウェスタンブロット解析を行った。CaMキナーゼホスファターゼはすべての組織、PC12細胞に認められたが、副腎が1番濃く、肺、胸腺、脳、脾臓、子宮、膵臓が比較的濃かった。

6. 細胞内局在の解析：PC12細胞を固定後、CaMキナーゼホスファターゼ抗体と反応させ、FITCラベルした2次抗体と反応させた結果、CaMキナーゼホスファターゼは細胞質に局在することが明らかになった。

考 案

ラットCaMキナーゼホスファターゼの一次構造解析からプロテインホスファターゼ2 Cモチーフ(YFAVFDGHG)の存在が明らかになった。ホモロジーサーチの結果ヒトの遺伝子解析(KG-1細胞)からその存在が予告されている機能の不明なcDNAクローンが検出され、翻訳部位でのヌクレオチドとアミノ酸の相同性はそれぞれ82%、79%と非常に高く、ヒトのCaMキナーゼホスファターゼの存在が考えられた。

クローニングから得れたCaMキナーゼホスファターゼのcDNAを大腸菌で発現し、SDS-PAGEにかけると、ラットの脳幹からの精製酵素と同じ分子量5万近くに蛋白バンドが確認された。CaMキナーゼキナーゼ α でリン酸化したCaMキナーゼIV(K71R)を基質にして、リコンビナントのCaMキナーゼホスファターゼの活性をポリリジン有無で測定すると、ポリリジンによる85倍の活性の上昇が見られ、自己リン酸化型CaMキナーゼIIを基質にした場合の90倍(3)とほぼ同様の値が得られた。以上の結果から今回クローニングしたcDNAから作成したリコンビナントのCaMキナーゼホスファターゼはラット脳幹の精製酵素と同様の性質を持つことが確認された。

ノーザンブロット解析、ウエスタンブロット解析の結果からCaMキナーゼホスファターゼはmRNAおよび蛋白レベルであらゆる臓器に広い組織分布を示した。CaMキナーゼIは広い組織分布を示しこのホスファターゼと分布が一致するが、CaMキナーゼIVは脳や胸腺にしか存在せず、一致しない。CaMキナーゼIIの分布は α 、 β アイソフォームは脳に多く分布し、量的に少ない γ 、 δ アイソフォームは比較的広い組織分布を示す。またCaMキナーゼIとIVを特異的にリン酸化(キナーゼIはThr¹⁷⁷、キナーゼIVはThr¹⁹⁶)するCaMキナーゼキナーゼ α や β は脳やレチナにしか検出されていない。基質特異性からはCaMキナーゼホスファターゼはリン酸化されて活性型に変換したCaMキナーゼI、II、IVを脱リン酸化し、脱活性化することでCaMキナーゼ活性の調節を行っていると考えられるが、今回の組織分布の結果はこれとは一致せず、今後の課題を残した。

PC12細胞でCaMキナーゼホスファターゼの細胞内局在を免疫組織化学的に調べた結果、酵素は核にはなく細胞質に分布していることが明らかになった。CaMキナーゼIやCaMキナーゼキナーゼ β は細胞質に、CaMキナーゼIIは細胞質と細胞膜に分布しているが、CaMキナーゼIVやCaMキナーゼキナーゼ α は細胞質にはなく核に局在するので核には別のホスファターゼが存在する可能性が考えられた。最近我々はCaMキナーゼホスファターゼのアミノ酸配列と相同性の高い核に局在するホスファターゼを見い出しており、研究を進めている。

結 論

1. ラット脳のcDNAライブラリーからリン酸化CaMキナーゼを特異的に脱リン酸化する新規のCaMキナーゼホスファターゼをクローニングした。ヌクレオチド配列の結果から酵素は450個のアミノ酸から成る分子量は49,165のタンパク質であると考えられる。
2. ウエスタンブロットの解析からCaMキナーゼホスファターゼはラットの組織に広く分布していた。
3. 培養細胞を用いた免疫組織化学的な解析から、CaMキナーゼホスファターゼは細胞の核外に均一に分布していた。

引用文献

- 1) Okuno, S., and Fujisawa, H. (1993) J. Biochem. 114, 167-170
- 2) Ishida, A., Okuno, S., Kitani, T., Kameshita, H., and Fujisawa, H. (1998) Biochem. Biophys. Res. Commun. 253, 159-163
- 3) Ishida, A., Kameshita, I., and Fujisawa, H. (1998) J. Biol. Chem. 273, 1904-1910

参考文献

- 1) Okuno, S., Kitani, T., and Fujisawa, H. (1994) J. Biochem. 116, 923-930
- 2) Takeuchi, M., Ishida, A., Kameshita, I., Kitani, T., Okuno, S., and Fujisawa, H. (2001) J. Biochem. 130, 833-840

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	木 谷 隆 子
審査委員長 鈴 木 裕 ⑩ 審査委員 吉 田 成 孝 ⑩ 審査委員 若 宮 伸 隆 ⑩			
学 位 論 文 題 目 Molecular Cloning of Ca ²⁺ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Phosphatase (カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼホスファターゼの CDNA クローニング)			
<p>カルシウムイオン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、その主要なカスケードの一つは多機能性カルシウム/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) を介するものである。これらの CaM キナーゼは、脳においてもその機能調節に必須な役割を担う。CaM キナーゼ II は Thr286 が自己リン酸化されることにより、他方 CaM キナーゼ I 及び IV はそれぞれ Thr177 及び Thr196 が上流酵素 (CaM キナーゼキナーゼ) によりリン酸化されることにより活性化する。論文提出者らは最近、これらリン酸化した CaM キナーゼを特異的に脱リン酸化して不活性化する新規のホスファターゼ (CaM キナーゼホスファターゼ) をラット脳より見出した。本論文では、カルシウムシグナル伝達系におけるこのホス</p>			

ス

ファクターゼの役割を理解するため、そのクローニングを行ない、さらに特性および組織・細胞内分布を明らかにすることを目的とした。

本論文ではまず、ラット脳幹から精製した CaM キナーゼホスファターゼのアミノ酸配列に基づいたヌクレオチドプローブを作成し、ラット脳幹の cDNA ライブラリーからのクローニングを行なった。そして得られた陽性クローンについての塩基配列解析の結果、cDNA は 450 個のアミノ酸からなる分子量 49,165 の蛋白質をコードしていることを明らかとした。そしてこの cDNA を発現ベクターに組み込み大腸菌に transfect して発現させた蛋白は、脳幹から精製した CaM キナーゼホスファターゼと同様の分子量（約 5 万）と酵素学的特性を保持していることを確認した。ノーザンブロット及びウエスタンブロットによる解析の結果、本酵素 mRNA 及び蛋白はほとんどすべてのラット臓器で発現し広い組織分布を示すことが明らかとなった。さらに、PC12 細胞を用いた蛍光抗体法による免疫組織化学的検討の結果、本ホスファターゼは細胞質に局在することが明らかとなった。

以上のように本論文は、CaM キナーゼ特異的な CaM キナーゼホスファターゼのクローニングに成功し、そのアミノ酸配列・酵素学的特性ならびに組織・細胞内局在を明らかにすることにより、CaM キナーゼカスケードによる細胞機能のカルシウム制御の機構を理解するために必須な知見を与えている。さらに本論文提出者らは、CaM キナーゼ I、II、IV、及び CaM キナーゼキナーゼ α 、 β の細胞内局在から、核に存在する CaM キナーゼ IV を脱リン酸化するための核局在性ホスファターゼの存在を予想している。実際、本論文提出者らは、本論文で明らかとなったホスファターゼと相同性の高い核局在性のホスファターゼを現在見出し、研究を展開している。また、ホモロジーサーチからは、本酵素と極めて高い相同性を持つが機能不明であるヒト cDNA クローンを検出し、ヒトの CaM ホスファターゼの存在を予想している。

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。