
多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIVの
リン酸化による活性調節機構

(課題番号：06680570)

平成7年度科学研究費補助金
(一般研究C) 研究成果報告書



平成8年3月

研究代表者 亀下 勇
(旭川医科大学医学部助教授)

はしがき

平成6年度から文部省科学研究費補助金（一般研究C）の助成のもとに行われた「多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIVのリン酸化による活性調節機構」は2年間の研究期間を終了し、ここに研究成果をまとめることになった。

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIV（CaMKキナーゼIV）は、1992年我々がラット小脳から精製し、その性質が明らかにされた酵素である。この酵素は脳に豊富に存在することや様々な基質をリン酸化することなどから、神経細胞における多様な機能を担っているものと考えられ、近年多くの研究者に注目されるようになった。本研究は、CaMKキナーゼIVの活性制御機構、特にリン酸化による活性調節機構を解明することを目標にスタートした。研究期間中に本酵素を活性化するCaMKキナーゼIVキナーゼ（CaMKIVキナーゼ）の存在が明らかにされ、さらにCaMKキナーゼIV分子内の複数のリン酸化部位などが次々に同定された。本酵素のリン酸化による活性調節のメカニズムが次第に明らかになるにつれ、本酵素は当初考えられていた以上に複雑な活性制御下にあることがわかってきた。

また、研究を遂行する過程で、リン酸化反応によるプロテインキナーゼ間のクロストークを解明するための手法として、新しい活性ゲル法を開発することができた。この方法を用いると部位特異的なプロテインキナーゼだけでなくプロテインフォスファターゼを検出することが可能であり、CaMKキナーゼIVやCaMKIVキナーゼを中心としたシグナル伝達のメカニズムを解明するための手段として大いに活用できるものと期待される。CaMKキナーゼIVを中心とした情報伝達の流れに関しては、まだまだこれから取り組むべき重要な課題は数多く残されており、国内外の多くの研究室との競争は今後ますます厳しくなりそうである。この2年間の成果をふまえ、さらに独自のアプローチを取り入れることにより、今後さらに研究を発展させてゆきたいと考えている。

〔研究組織〕

研究代表者： 亀下 勇 （旭川医科大学医学部助教授）

研究分担者： 藤澤 仁 （旭川医科大学医学部教授）

[研究経費]

平成 6 年度	1、000 千円
平成 7 年度	1、200 千円
計	2、200 千円

[研究発表]

(1) 学会誌等

1. 亀下 勇、藤澤 仁：
ラット大脳 C a M キナーゼ IV の酵素化学的性質
神経化学 33 (1994)
2. A. Ishida, I. Kameshita, S. Okuno, T. Kitani, and H. Fujisawa:
A Novel Synthetic Peptide Inhibitor which is Specific for Calmodulin-dependent Protein Kinase II
J. Neurochem. 65 (1995)
3. I. Kameshita and H. Fujisawa:
Preparation and Characterization of Calmodulin-dependent Protein Kinase IV (CaM-Kinase IV) free of CaM-Kinase IV Kinase from Rat Cerebral Cortex
J. Biochem. 117 (1995)
4. 亀下 勇、藤澤 仁：
C a M B P 6 4 の分子的性質とその組織分布
神経化学 34 (1995)
5. A. Ishida, I. Kameshita, S. Okuno, T. Kitani, and H. Fujisawa:
A Novel Highly Specific and Potent Inhibitor of Calmodulin-dependent Protein Kinase II
Biochem. Biophys. Res. Commun. 212 (1995)
6. I. Kameshita and H. Fujisawa:
Detection of Protein Kinase Activity toward Oligopeptide in Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide Gel
Anal. Biochem. in press (1996)

(2) 口頭発表

1. 亀下 勇、石田敦彦、藤澤 仁：

ラット大脳CaMBP64の精製とその性質
日本生化学会 1994年9月 (大阪)

2. 亀下 勇、藤澤 仁：

ラット大脳CaMキナーゼIVの酵素化学的性質
日本神経化学会 1994年10月 (松本)

3. A. Ishida, I. Kameshita, S. Okuno, T. Kitani, and H. Fujisawa:

A Novel Synthetic Peptide Inhibitor which is Specific for Calmodulin-dependent Protein Kinase II

15th International Society of Neurochemistry Meeting, July, 1995 (Kyoto)

4. 亀下 勇、藤澤 仁：

CaMBP64の分子的性質とその組織分布
日本神経化学会 1995年7月 (京都)

5. 石田敦彦、亀下 勇、奥野 幸子、木谷 隆子、藤澤 仁：

CaMキナーゼに特異的な新規合成阻害ペプチドの作製
日本生化学会 1995年9月 (仙台)

6. 亀下 勇、竹内 昌之、藤澤 仁：

CaMBP64の全アミノ酸配列とそのリン酸化部位
日本生化学会 1995年9月 (仙台)

7. I. Kameshita, A. Ishida, and H. Fujisawa :

Phosphorylation of 63 kDa Calmodulin-dependent Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase by cAMP-dependent Protein Kinase

9th International Conference on Second Messenger and Phosphoproteins
October, 1995 (Nashville, USA)

〔研究成果〕

(1) C a MキナーゼIVのリン酸化による活性調節

従来の方法で精製したC a MキナーゼIVを、HPLCカラムにかけたところ、著しい酵素活性の低下がみられた。HPLCカラムで分離された画分を再び酵素に添加するとC a MキナーゼIVの再活性化がみられることから、これまでのC a MキナーゼIV精製標品中には、本酵素のアクチベーターが共存していたことが判明した。このアクチベーターの性質を調べたところ、C a MキナーゼIVをリン酸化して活性化するプロテインキナーゼであること、またこの酵素によるリン酸化にもカルモデュリン (C a M) が必須であることから、この酵素もC a M依存性プロテインキナーゼ (C a M K IVキナーゼ) であることがわかった。C a MキナーゼIV上のリン酸化部位としては、N末端に近い複数のS e r 残基と、T h r¹⁹⁶と、C末端に近いS e r⁴³⁷とが同定されたが、これらのうち、本酵素の活性化に関与する部位は最近の結果では、T h r¹⁹⁶と考えられている。しかし、これ以外のリン酸化部位の意義については現在も明らかにされておらず、さらに解析を進めているところである。

(2) ラット大脳から単離精製されたC a M B P 6 4の解析

ラット大脳からC a MキナーゼIVを精製する過程で新たなC a M結合タンパク質 (C a M B P 6 4) が単離された。このタンパク質は、S D S 電気泳動上6 4 k D aを示すのに対し、ネイティブタンパクの分子量が1 3 3 k D aであることから、二量体タンパク質と考えられた。また、本タンパク質はC a MキナーゼIIならびにc A M P依存性プロテインキナーゼ (Aキナーゼ) によりリン酸化されるが、CキナーゼやC a MキナーゼIVによるリン酸化は受けないことが分かった。C a MキナーゼIVとAキナーゼによる主要リン酸化部位は共通しており、その配列は、S Q P S F Q W R Q P S L D V D V G Dであることがわかった (Sがリン酸化部位)。

次に、C a M B P 6 4の部分アミノ酸配列を決定したのち、その配列をもとにD N Aプローブを合成し、遺伝子クローニングを行なった。得られた3つのポジティブクローンは、いずれも約3 k bのインサートを含み、同様の制限酵素地図を示した。5 3 5の全アミノ酸配列を決定し、ホモロジー検索を行なったところ、C a M B P 6 4は6 3 k D a C a M依存性ホスホジエステラーゼ (C a M-P D E) のラットアイソフォームであることが明らかになった。このラットの酵素は、これまで主に研究されてきたウシの6 3 k D a C a M-P D Eと9 7%の高いホモロジーがみられた。これまでウシの酵素はAキナーゼによるリン酸化を受けないと言われていたが、今回ラットの酵素で、Aキナーゼによるリン酸化を受けること、またその主なリン酸化部位がS e r⁴⁶⁵であることが明らかにされた。

(3) 合成オリゴペプチドを用いたゲル内リン酸化法の開発

1989年に我々は、SDS電気泳動後のゲル内でプロテインキナーゼ活性を検出するゲル内リン酸化法を報告した。その後、この方法は細胞抽出液中の様々なプロテインキナーゼの検出法として広く利用されるようになった。しかし、この方法は基質タンパクをゲル内に添加し固めるため、カゼインやミエリン塩基性タンパク質など多量に得られるタンパク質のリン酸化にその応用が限定されていた。これに対し、合成ペプチドは多量の調製が容易であるが、高分子のタンパク質と異なりゲル内に固定化することが困難であった。そこで、我々は様々な基質ペプチドをポリリジンなどのポリマーに結合した後、ゲル内に固定する方法を開発した。Aキナーゼ、CaMキナーゼII, IVの特異的基質ペプチドのコンジュゲートを用いた時、それぞれをリン酸化するプロテインキナーゼをゲル内でも効率よく検出できることがわかった。特にAキナーゼでは、特異的基質 (Kamptide) を用いると、非常に高い特異性でしかも2.5 pgの酵素までゲル内リン酸化活性を検出することができた。この方法は、溶液中でのプロテインキナーゼの基質特異性がゲル内でも反映されるため、今後適当なペプチド基質をデザインすることにより未知のプロテインキナーゼのスクリーニング等、我々の目指しているプロテインキナーゼカスケードの解明にも大いに活用できるものと考えている。