

## 研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		CaM キナーゼの不活性化に関わるCaMキナーゼホスファターゼファミリーの機能解析			
研究テーマ (欧文) AZ		Functional analysis of CaM kinase phosphatase family			
研究氏 代 表 名 者	カナ字 CC	姓)イシダ	名)アツヒコ	研究期間 B	2007 ~ 2008 年
	漢字 CB	石田	敦彦	報告年度 YR	2009 年
	ローマ字 CZ	ISHIDA	ATSUHIKO	研究機関名	広島大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		広島大学大学院総合科学研究科・准教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>CaM キナーゼは Ca<sup>2+</sup>を介する細胞内情報伝達系において中心的役割を担っている一群の酵素である。本研究では 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プロテインホスファターゼの単離・精製・クローニングに成功し、これをCaMキナーゼホスファターゼ (CaMKP)と命名した。更に CaMKP と相同性が高く、細胞内局在性の異なる CaMKP-Nを見出したが、PP2C など従来の PPM ファミリーホスファターゼとは別のサブファミリーに属することから、これらを CaMKP ファミリーと呼んだ。この CaMKP ファミリーの生理機能を解明するため、ゼブラフィッシュをモデル動物として、個体レベルで CaMKP の機能解析を行った。</p> <p>まずゼブラフィッシュ CaMKP の cDNA を PCR によって取得し、これを大腸菌で発現させて、その酵素学的性質を調べたところ、ゼブラフィッシュ CaMKP はラット CaMKP と似通った酵素学的性質を示し、培養細胞に発現させると、共発現した CaM キナーゼ I や CaM キナーゼ II のリン酸化を顕著に抑制した。次にゼブラフィッシュ胚を用いたアンチセンスノックダウン実験をおこなった。CaMKP をノックダウンした胚から発生したゼブラフィッシュは、全身に異常なアポトーシスを伴う著しい奇形を生じており、この発生異常はアンチセンス RNA とともに、CaMKP タンパク質を同時注入することでレスキューされた。ホスファターゼ活性を示さない変異酵素では、このようなレスキュー効果がなかったことから、CaMKP のホスファターゼ活性が、胚発生における細胞の生死の制御を通じて、正常な胚発生に必須の役割を果たしていることが強く示唆された。</p> <p>また、この研究過程で作製した CaM キナーゼ II の活性断片と CaM キナーゼ I の融合タンパクが、通常はセリン/スレオニン残基のリン酸化しか触媒しない筈であるのに、驚くべき事に、チロシン残基の自己リン酸化を引き起こすことを偶然見出した。そこで、この現象についても詳しい検討をおこない、典型的なセリン/スレオニンキナーゼであっても、条件次第ではチロシンキナーゼ活性を示すことがあり得ることを証明した。</p>					
キーワード FA	CaM キナーゼ	プロテインホスファターゼ	アンチセンスノックダウン	胚発生	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Tyrosine kinase activity of a Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II catalytic fragment							
	著者名 <sup>GA</sup>	Sugiyama, Y. et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	Bichem. Biophys. Res. Commun.					
	ページ <sup>GF</sup>	648～652	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	0	8	巻号 <sup>GD</sup>	377
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Negative regulation of multifunctional Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinases: physiological and pharmacological significance of protein phosphatases.							
	著者名 <sup>GA</sup>	Ishida, A. et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	Br. J. Pharmacol.					
	ページ <sup>GF</sup>	729～740	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	0	8	巻号 <sup>GD</sup>	154
雑誌	論文標題 <sup>GB</sup>	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) is indispensable for normal embryogenesis in zebrafish, <i>Danio rerio</i>							
	著者名 <sup>GA</sup>	Sueyoshi, N. et al.	雑誌名 <sup>GC</sup>	Arch. Biochem. Biophys.					
	ページ <sup>GF</sup>	48～59	発行年 <sup>GE</sup>	2	0	0	9	巻号 <sup>GD</sup>	488
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	
図書	著者名 <sup>HA</sup>								
	書名 <sup>HC</sup>								
	出版者 <sup>HB</sup>		発行年 <sup>HD</sup>					総ページ <sup>HE</sup>	

#### 欧文概要

Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP) dephosphorylates and regulates multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs). However, the biological functions of this enzyme have not been clarified *in vivo*. To investigate the biological significance of CaMKP during zebrafish embryogenesis, we cloned and characterized zebrafish CaMKP (zCaMKP). The recombinant zCaMKP required Mg<sup>2+</sup> rather than Mn<sup>2+</sup> for activity. Furthermore, zCaMKP dephosphorylated CaMKIV but not phosphorylase  $\alpha$ ,  $\alpha$ -casein, or extracellular signal-regulating kinase (ERK). Cotransfection of zCaMKP with mammalian CaMKI significantly decreased phospho-CaMKI in ionomycin-stimulated 293T cells. During embryogenesis, the expression of zCaMKP increased gradually after 48 h post-fertilization, as demonstrated by Western blotting using an anti-zCaMKP antibody. The knockdown of the zCaMKP gene with morpholino-based antisense oligonucleotides resulted in an increased incidence of embryos with severe morphological and cellular abnormalities, *i.e.* a significant increase in the number of round-shaped embryos and apoptotic cells in the whole body. Embryonic death was rescued by coinjection with recombinant rat CaMKP but not with phosphatase-dead mutant (D194A). These results clearly show the significance of zCaMKP during zebrafish embryogenesis.

During the course of this study, we produced a chimeric enzyme of 30K-CaMKII (designated CX<sub>40</sub>-30K-CaMKII), in which the N-terminal 40 amino acids of *Xenopus* Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I (CX<sub>40</sub>) were fused to the N-terminal end of 30K-CaMKII. Although CX<sub>40</sub>-30K-CaMKII exhibited essentially the same substrate specificity as 30K-CaMKII, it underwent significant autophosphorylation. Surprisingly, its autophosphorylation site was found to be Tyr-18 within the N-terminal CX<sub>40</sub> region of the fusion protein, although it did not show any Tyr kinase activity toward exogenous substrates. Several lines of evidence suggested that the autophosphorylation occurred via an intramolecular mechanism. These data suggest that even typical Ser/Thr kinases such as 30K-CaMKII can phosphorylate Tyr residues under certain conditions.