博士論文

Ca²⁺/カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素活性化酵素 (CaMKK)の分子薬理学的解析と特異的基質認識機構の解明

2018年3月

藤原 侑哉

岡山大学大学院 自然科学研究科

1. 序論5
1.1 細胞内カルシウム情報伝達機構5
1.2 Calmodulin の構造と機能5
1.3 Ca²+/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)の分類6
1.4 CaM-Kinase Kinase (CaMKK)の分子構造と活性化機構7
1.5 CaM-Kinase I (CaMKI)の分子構造と活性化機構9
1.6 CaM-Kinase IV (CaMKIV)の分子構造と活性化機構10
1.7 5'-AMP activated protein kinase (AMPK)の分子構造と活性化機構12
1.8 CaMKK を介した生理機能調節と疾患との関連13
1.9 CaMKK 選択的阻害剤 STO-60914
2. 第1章17
2.1 要約
2.2 緒言19
2.3 実験材料と方法21
2.4 結果
2.5 考察
3. 第2章
3.1 要約
3.2 緒言
3.2 実験材料と方法

	3.3 結果	43
	3.5 考察	51
4.	謝辞	53
5.	発表論文	55
6.	引用文献	57

1. 序論

1.1 細胞内カルシウム情報伝達機構

真核生物における全ての細胞は物理的・化学的な周囲の環境変化による外部からの刺激 に応答し、細胞内の情報伝達機構を通して、増殖や分化、細胞死などを行うことで環境に 適応する。細胞はこれらの環境変化を感受するために、多様な受容体タンパク質を、細胞 膜もしくは細胞内に保持し、ホルモンや低分子化合物を含め様々なシグナル分子が受容体 タンパク質に結合することで外部からの刺激を感知している。シグナル分子が結合した受 容体は細胞内のエフェクタータンパク質を活性化もしくは不活性化させるほかにも、cyclic adenosine monophosphate (cAMP)やカルシウムイオン(Ca²⁺)などのセカンドメッセンジ ャーの濃度を変化させることで細胞内の情報伝達を引き起こす(1)。細胞内の Ca²⁺濃度は~ 10⁷M と細胞外 Ca²⁺濃度 (~10³M)と比較して、非常に低く保たれており、ホルモンや神経 伝達物質といった様々な刺激により活性化されたイオンチャネルやトランスポーターを通 して、細胞外や小胞体、ミトコンドリアから細胞質に Ca²⁺を流入させることにより~10⁶M まで上昇する(2)。細胞内において濃度上昇した Ca²⁺は Calmodulin や S100 protein、 Troponin C といった様々な Ca²⁺受容タンパク質と結合することで細胞内の情報伝達を引 き起こし、多様な細胞機能を制御している(3)。

1.2 Calmodulin の構造と機能

多数ある Ca²⁺受容タンパク質の中でも Calmodulin (CaM)はその構造と機能がよく解明 されている Ca²⁺受容タンパク質である(4,5)。CaM は 16.7kDa の酸性タンパク質であり、 細胞の全タンパク質の 0.1%程度の量を占めており、Histone や Actin のようにほとんどの 真核生物において進化的に保存されている(4,6)。CaM は N-lobe と C-lobe にそれぞれ 2 つ ずっ Ca²⁺を結合する EF-hand motif と呼ばれる Ca²⁺結合構造を持っており、CaM1 分子に っき 4 つの Ca²⁺が結合した Ca²⁺/CaM 複合体を形成する(7-9)。Ca²⁺/CaM は多様な分子を 標的とし分子間相互作用により結合することで標的分子の活性を制御し、様々な細胞内シ グナル伝達経路に関わっている(4)。CaM が標的分子に結合するメカニズム及び、それによ る活性制御メカニズムは多様であるが(5)、一般的に、CaM は Ca²⁺との結合により構造変化 を引き起こし、疎水性のアミノ酸残基からなるポケットを露出することで、可逆的もしく は不可逆的に標的タンパク質に存在する疎水性残基に結合し、標的分子の活性を制御して いる(4)。多数ある CaM 標的分子の中でも、Ca²⁺/CaM 依存性タンパク質リン酸化酵素群 (CaMK)は CaM による活性制御機構の解明が最も進んでいる Ser/Thr 残基をリン酸化する タンパク質リン酸化酵素である。

1.3 Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)の分類

タンパク質リン酸化酵素(Protein Kinase)は基質となるタンパク質の Ser, Thr もしくは Tyr 残基をリン酸化する酵素であり、ヒトには少なくとも 518 種類ものタンパク質リン酸 化酵素がゲノム上にコードされている(10)。タンパク質リン酸化酵素の 250~300 アミノ酸 残基からなる触媒領域の多くは、アミノ酸残基の欠失や挿入はあるものの、subdomain I ~ XI の保存された領域に分けられる(11,12)。subdomain I, II, VI, VII は ATP が結合する アミノ酸残基を保持しており、subdomain VI, VIII は基質認識に重要であると考えられて いる。Ca²⁺/CaM によりその酵素活性が制御される Ca²⁺/CaM 依存性タンパク質リン酸化酵 素群(Ca²⁺/CaM-dependent protein kinsase: CaMK)には多くの種類があり、基質特異性の 高い dedicated kinase (Phospholyrase kinase: PhK, Myosin light chain kinase: MLCK, CaMKIII, CaMKK)と、基質特性が低く様々なタンパク質をリン酸化する multifunctional kinase (CaMKI, CaMKII, CaMKIV)に分類される(table1)(13,14)。前者の PhK や MLCK, CaMKIII はそれぞれ Glycogen Phospholyrase, myosin light chain, eukaryotic elongation factor 2 (eEF2)のリン酸化を通して、グリコーゲン代謝(15–17)や筋収縮(18)、タンパ ク質合成(19–21)をそれぞれ制御している。後者の multifunctional kinase は様々な基質タ ンパク質をリン酸化することができ、その情報伝達機構及び生理機能の制御は多彩である。 特に CaMKII は神経系に豊富に存在し、学習と記憶に関係していると考えられている長期 記憶増強(LTP: Long-term potentiation)や神経の可塑性などに重要であることから注目さ れている(22)。

Table1:CaMKの分類と特徴

キナーゼ	分類	構成	活性化メカニズム	基質
CaM-KinaeI (CaMKI)	Multifunctional	単量体	Ca2+/CaMとCaMKKによるリン酸化	Synapsin1, CREBなど
CaM-KinaseII (CaMKII)	Multifunctional	12量体	Ca2+/CaMと自己リン酸化	CaMKII, AMPK/NMDA受容体など
CaM-KinaseIV (CaMKIV)	Multifunctional	単量体	Ca2+/CaMとCaMKKによるリン酸化、自己リン酸化	CREB, HDAC4,SRFなど
CaM-Kinase Kinase (CaMKK)	Dedicated	単量体	Ca2+/CaM	CaMKI, CaMKIV, AMPK, PKB
CaM-Kinase III (CaMKIII)	Dedicated	単量体	Ca2+/CaM	Elongation Factor2
Myosin light chain kinase (MLCK)	Dedicated	単量体	Ca2+/CaM	Myosin RLC
Phospholyrase Kinase (PhK)	Dedicated	4量体($\alpha, \beta, \gamma, \delta$)	Ca2+/CaM、PKA	Glycogen Phosphorylase

1.4 CaM-Kinase Kinase (CaMKK)の分子構造と活性化機構

Ca²⁺/CaM-dependent protein Kinase Kinase (CaMKK)は Ser 残基もしく Thr 残基をリ ン酸化するセリンスレオニンキナーゼに分類され、異なる遺伝子領域(CaMKK α : Camkk1, CaMKK β : Camkk2)にコードされる CaMKK α と CaMKK β の 2 種類のアイソフォームが 存在する(23–27)。CaMKK はどの細胞や組織においても低レベルで発現しているが、脳や 脾臓などの抹消組織で特に発現量が高い(24,26)。分子構造上、N 末端側から約 150 アミノ 酸残基 C 末端側に、リン酸化触媒反応を担う触媒領域(rCaMKK α 126-434, rCaMKK β 162-470)を保持し、触媒領域内の subdomain II と III の間には CaMKK 特有の RP domain (Arg-Pro rich domain)と呼ばれる基質認識に重要な領域が存在する(Fig. 1A)。触媒領域よ り数アミノ酸 C 未端側には調節領域(rCaMKK α 438-463, rCaMKK β 474-499)が存在し、 自己抑制領域と Ca²⁺/CaM 結合領域が含まれる(28,29)(Fig. 1A)。低 Ca²⁺濃度条件下の不活 性型では自己抑制領域が触媒部位と結合し、基質が触媒部位に入り込めないコンホメーシ ョンとなっている。細胞内の Ca²⁺濃度の上昇に伴い形成された Ca²⁺/CaM 複合体が CaMKK の Ca²⁺/CaM 結合領域に結合することで自己抑制領域と触媒領域の結合が解離し、触媒領 域が露わになることで基質が触媒部位に入り込める活性型となる(28,30,31)(Fig. 1B)。この ようなメカニズムで CaMKK α は Ca²⁺/CaM 依存性の高いリン酸化酵素であるが、CaMKK β はN 末端制御領域(rCaMKK β 129-151)を持つことで Ca²⁺/CaM 非存在下でも-70%程度 のリン酸化活性(Autonomous activity)をもつ(28)。CaMKK α は基質として CaMKI や CaMKIV, Protein kinase B (PKB)の活性化ループに位置する Thr 残基をリン酸化する (27,32,33)。CaMKK β はこれらの基質に加え、AMPK (AMPK α subunit Thr¹⁷²)をリン酸 化することが報告されており、CaMKK/AMPK 経路の重要性が示唆されている(34-36)。



Figure 1. CaMKKの分子構造と活性化機構

1.5 CaM-Kinase I (CaMKI)の分子構造と活性化機構

CaMKI には異なる遺伝子にコードされる 4 つのアイソフォーム(CaMKI α , CaMKI β , CaMKI γ , CaMKI δ)が存在する(37–40)。一次構造上、4 つのアイソフォームとも N 末端 に短いアミノ酸残基からなる領域をもち、それより C 末端側に CaMKK と同様に触媒領域 と調節領域をもつ(Fig. 2A)。CaMKI も CaMKK と同様に Ca²⁺/CaM により活性化されるが、 CaMKK により活性化ループに存在する特定の Thr 残基がリン酸化されることにより、そ の酵素活性が上昇し、これにより最大活性を示す(Fig. 2B)。CaMKI γ は C 末端側に CAAX モチーフがあり翻訳後修飾(パミルトイル化)により細胞膜に局在することが報告されてい る(41)。CaMKI は基質として Synapsin-1 や cyclic AMP-responsible element-binding

A: rat CaMKK α (505 アミノ酸)とrat CaMKK β (587 アミノ酸)の分子構造を示した。数字はアミノ酸の番号を示す。触媒領域 (Catalytic domain)はrat CaMKK α 126-434, rat CaMKK β 162-470に位置する。触媒領域中にはCaMKK特有のRPドメイン(Arg-Pro rich domain)が含まれる。触媒領域から数アミノ酸C末端側には自己抑制領域(AID: Autoinhibitory domain)とCaM結合領域 (CBD: CaM binding domain)からなる調節領域(rat CaMKK α 438-463, rat CaMKK β 474-499)がある。CaMKK β にはN末端制御 領域(N-terminal Regulatory domainrat, rat CaMKK β 129-151)が存在し、Ca²⁺/CaM非存在下でも~70%程度のリン酸化活性 (Autonomous activity)をもつ。

B: CaMKKの活性化機構を示した。CaMKKの不活性型では自己抑制領域が触媒領域と結合することで、基質が触媒部位に入り込めない形となっている。Ca²⁺/CaMがCaMKKのCaM結合領域に結合することで自己抑制領域と触媒領域の結合が乖離し、触媒領域が露わになることで基質が触媒部位に入り込める活性型となる。

protein (CREB), myosin II regulatory light chain (MRLC), eukaryotic translation initiation factor 4GIII (eIF4G3), protein numb homolog (Numb)をリン酸化する(37,42–46)。



Figure 2. CaMKIの分子構造と活性化機構

A: CaMKI (α , β , δ , γ)の分子構造を示した。数字はアミノ酸の番号を示す。CaMKKにより触媒領域(Catalytic domain)の活性 化ループに位置するThr残基(CaMKKI α Thr¹⁷⁷と CaMKKI β Thr¹⁷¹, CaMKKI δ Thr¹⁸⁰, CaMKKI γ Thr¹⁷⁸)がリン酸化(P)される。触 触媒領域から数アミノ酸C末端側には、自己抑制領域(AID: Autoinhibitory domain)とCaM結合領域(CBD: CaM binding domain) が含まれる調節領域がある。

1.6 CaM-Kinase IV (CaMKIV)の分子構造と活性化機構

CaMKIV をコードする遺伝子は一つのみであるが、スプライシングにより CaMKIV αと

N 末端が 28 アミノ酸残基長い CaMKIV β の 2 つのスプライシングアイソフォームが存在

する(47,48)。一次構造上、CaMKIと同様にN末端に短いアミノ残基からなる領域をもち、

その後触媒領域と調節領域をもつ(Fig. 3A)。CaMKIV も Ca²⁺/CaM により活性化されるが、

CaMKI と同様に活性化ループに存在する特定の Thr 残基(CaMKIV α Thr¹⁹⁶)がリン酸化さ

B: CaMKIの活性化機構を示した。CaMKIはCaMKKと同様に、不活性型では自己抑制領域が触媒領域と結合することで、基質が 触媒部位に入り込めない形となっている。Ca²⁺/CaMがCaMKIのCaM結合領域に結合することで自己抑制領域と触媒領域の結合が 解離し、触媒領域が露わになることで基質が触媒部位に入り込める活性型となる。さらにCaMKKにより活性化ループに位置する Thr残基がリン酸化されると、アロステリック効果により最大活性を示す。

れることによりさらに酵素活性が上昇し、これにより CaMKIV は最大活性を示す。CaMKIV の特徴的な性質として、Thr¹⁹⁶がリン酸化された CaMKIV は Ca²⁺/CaM 非依存的な活性を 発現するようになり、これが一過性の Ca²⁺-シグナルを長期に持続させるメカニズムとして 働いている(49)(Fig. 3B)。CaMKIV は細胞質にも存在するが、主には importin- α により核 内に移行され(50,51)、CREB や serum response factor (SRF)、Histon deacetylase 4 (HDAC 4)などの転写因子をリン酸化し、活性化することで転写調節などの核内の反応を制御する (52–54)。



Figure 3. CaMKIVの分子構造と活性化機構

A: CaMKKIV α と CaMKKIV β の分子構造を示した。数字はアミノ酸の番号を示す。CaMKKにより触媒領域(Catalytic domain)の 活性化ループに位置するThr残基(CaMKKIV α Thr¹⁹⁶ と CaMKKIV β Thr²²⁴)がリン酸化(P)される。触触媒領域から数アミノ酸C末 端側には、自己抑制領域(AID: Autoinhibitory domain:AID)とCaM結合領域(CBD: CaM binding domain)が含まれる調節領域があ る。

B: CaMKIVの活性化機構を示した。CaMKIと同様に、CaMKIVの不活性型では自己抑制領域が触媒部位と結合し、基質が触媒部位に入り込めない形となっている。Ca²⁺/CaMがCaMKIVのCaM結合領域に結合することで自己抑制領域と触媒領域の結合が解離し、触媒領域が露わになることで基質が触媒部位に入り込める活性型となる。さらにCaMKKにより活性化ループに位置するThr残基(CaMKKIV α Thr¹⁹⁶と CaMKKIV β Thr²²⁴)がリン酸化されると、アロステリック効果により最大活性を示す。 一方、CaMKIと異なり、活性化ループに位置するThr残基がリン酸化されたCaMKIVはCa²⁺/CaM非存在下でも活性をもつCa²⁺/CaM非依存活性型となる。

1.7 5'-AMP activated protein kinase (AMPK)の分子構造と活性化機構

代謝調節の最上位の調節因子である AMPK は触媒サブユニット(α subunit)、調節サブ ユニット(β subunit、 γ subunit)のヘテロ 3 量体により構成されている(55–57)。細胞内 の AMP/ATP 比が増加すると AMPK y サブユニットに AMP が結合する。これによるアロ ステリック効果により 10 倍近い活性を持つが、α サブユニットの活性化ループに位置する Thr¹⁷² がリン酸化されるとさらに 100 倍近い活性を持つようになる(58)(Fig. 4)。CaMKI, CaMKIV の活性化リン酸化酵素は CaMKK のみであるのに対し、AMPK α Thr¹⁷² は transforming growth factor β activated-kinase 1 (TAK1), liver kinase B1 (LKB1), CaMKK β によりリン酸化される(35,59,60)。AMPK は幅広い基質特異性を持っており、 acetyl-CoA crboxylase (ACC)や HMG-CoA reductase (HMGR), glycogen syntase (GS)を リン酸化することで、これら酵素を不活性化させ、脂肪酸合成やコレステロール合成、グ リコーゲン合成などを阻害する(61-64)。また HDAC4 や TBC1 domain family number 1 (TBC1D1)、6-phosphofructokinase-2 (PFK2)をリン酸化し、活性化することで facilitated glucose transporter member 4 (Glut4)を介したグルコースの取り込みと解糖系を促進する (65-67)。特に mammalian target of rapamycin (mTOR)の結合分子である regulatoryassociated protein of mTOR (Raptor)のリン酸化などを介した mTOR Complex 1 (mTORC1)の抑制はタンパク質合成の抑制や脂肪酸代謝の調節、食欲促進ペプチドの発現、 オートファジーの促進など多様な代謝機能を調節している(68-70)。この他にも AMPK が標 的とする分子および、制御する生理機能は多数あるが、AMPK はメタボリックスーパーレ ギュレーターとして異化経路を活性化し、同化経路を抑制することが最大の特徴である(71)。



Figure 4. AMPKの活性化機構

A: AMPKは触媒領域(α subunit)と調節領域(β subunit, γ subunit)からなるヘテロ3量体である。 γ subunitにAMPが結合するとアロステリック効果により10倍ほど高い活性を持つ。 α subunitの活性化ループに位置するThr¹⁷²がリン酸化せれると、さらに100 倍近い活性を持つ。

1.8 CaMKK を介した生理機能調節と疾患との関連

前述のように、CaMKK は脳抽出液から cDNA がクローニングされた背景と、脳で特に 発現量が高いため、神経細胞における CaMKK を介した生理機能がよく調べられている。 CaMKK はレプチンや GABA 受容体、AMPA 受容体などを介した Ca²⁺の流入により活性化 され、それぞれ CaMKI y と CaMKI α を介してスパインの形成や軸索伸長、シナプスの可塑 性などを制御している(72-74)。CaMKK/CaMKIV 経路は CREB や SRF をリン酸化するこ とにより活性化することで CRE 依存的、serum response element (SRE)依存的な遺伝子の 発現を調節する(52,53,75)。CaMKK/AMPK 経路はミトコンドリア内における脂肪酸酸化 やグルコースの恒常性、オートファジーといった代謝調節を行なっている(34,35,76,77)。 近年、CaMKK はがんとの関係性について指摘されている。例えば、CaMKK/CaMKIV 経 路の活性化は mTOR/ribosomal protein S6 kinase (S6K)経路を制御し、肝がん細胞の増殖 に重要であることが示唆された(78)。前立腺がん細胞においても、androgen receptor の活 性化により発現量が増加した CaMKK β は CaMKK/AMPK 経路を過剰に活性化している。 また LKB1 を欠損した肺がん細胞においても、過剰なグルタミン分解により増加した α -ケ トグルタミン酸が、CaMKK β に結合することで AMPK を過剰に活性化させている。過剰 に活性化された AMPK を介して、エネルギー代謝が活発になり、これらのがん細胞の増殖 もしくは転移の促進に関与することが報告されている(79,80)。そのため、CaMKK β /AMPK 経路を標的とした分子標的薬において、CaMKK 阻害剤はこれら疾患の治療薬として期待さ れている。また CaMKK カスケードは線虫(*C.elegans*)においても保存されており、*ckk-1* (CaMKK α と CaMKK β)は *cmk-1* (CaMKI と CaMKIV)をリン酸化することで CREB を介 した遺伝子発現を線虫個体においても調節している(23,81,82)。



Figure 5. CaMKKを介した情報伝達機構と生理機能

CaMKKが調節する情報伝達機構と生理機能を示した。CaM: Calmodulin, AMPK: 5'-AMP-Kinase, CaMK: CaM-kinase, CREB: cAMP response element-binding protein, ACC: acetyl CoA carboxylase, β PIX: Pak-interacting exchange factor β , ER: endoplasmic reticulum, P: phosphorylation

1.9 CaMKK 選択的阻害剤 STO-609

私たちの研究グループは、CaMKK 選択的阻害剤である STO-609 (7H-Benzimidazo

[2,1-a]benz[de]isoquinoline-7-one-3-carboxylic acid)を 2002 年に開発することに成功した (83)(Fig. 5)。STO-609 は ATP と拮抗して、CaMKK を選択的に阻害する(83,84)。また細 胞透過性を有することで、生きた細胞内においても CaMKK を阻害でき、現在までに開発 された、唯一の CaMKK 阻害剤であることから幅広く、世界中で CaMKK を介したシグナ ル伝達研究に用いられている。STO-609 は CaMKK α 、CaMKK β ともに阻害するが、その 阻害効率は 5-10 倍程度異なる。また私たちの研究結果によりその差を生み出すアミノ酸残 基が同定され、そのアミノ酸に変異を入れることで、10 倍程度阻害効率が減少することを 報告した(85)。一方で、STO-609 を使用する上で、一般的な酵素阻害剤の使用と同様に、 標的酵素(CaMKK)以外の分子に影響を与える可能性(off-target 効果)を考えなければならな い。これまでに、 STO-609 は CaMKK 以外にも他のリン酸化酵素 (extracellular-signal-regulated kinase8; ERK8, MAPK integrating protein kianse1; MNK1, casein kinase2; CK2, AMPK, provirus integration site for moloney murine leukaemia virus2; PIM2, PIM3, dual-specificity tyrosine-phosphorylated and -regulated kinase2; DYRK2, DYRK3, homeodomain-interacting protein kinase2; HIPK2)を阻害す ることが英国のグループにより報告されていることからも(86)、その薬理学的効果の評価に は十分な検証が必要である。

2. 第1章

Ca²⁺/カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素活性化酵素 (CaMKK)の分子薬理学的解析

2.1 要約

Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase kinase (CaMKK)は、CaMKK α と CaMKK β の二種 類のアイソフォームから構成されている。これまで細胞内における CaMKK を介した情報 伝達機構および生理機能を解明するために、私たちは CaMKK 阻害剤(STO-609)を開発した。 STO-609 は CaMKK α と CaMKK β の両アイソフォームを阻害する。そのため、STO-609 を用いて CaMKK のアイソフォーム特異的な細胞内情報伝達機構および生理機能を解明す ることは困難であった。この問題を解決するために、本研究では CaMKK α の触媒領域に PCR 法によりランダムに変異を導入することで、STO-609 抵抗性を示すアミノ酸変異 (CaMKK α L233F, A292T 及び CaMKK β V269F, A328T)を同定した。さらに、これら STO-609 抵抗性 CaMKK α (L233F, A292T)及び CaMKK β (V269F, A328T)を安定的に発 現するヒト肺胞基底上皮腺がん細胞株(A549 細胞)を遺伝子導入法により樹立した。樹立し た細胞株を用いて CaMKK の標的基質である CaMKIV と AMPK の Thr 残基 (CaMKIV Thr¹⁰⁶及び AMPK α Thr¹⁷²)のリン酸化を評価したところ、細胞内の Ca²⁺濃度の上昇に伴う AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化は CaMKK β のみが、CaMKIV Thr¹⁰⁶のリン酸化は CaMKK α 、 CaMKK β の両 CaMKK アイソフォームが触媒可能であることが明らかとなった。

Ca²⁺/Calmodulin(CaM)複合体によりアロステリックに活性化される CaM-kinase kinase (CaMKK)は CaMK ファミリーに属し、CaMKKα (rCaMKKα: 505 アミノ酸)と CaMKKβ (rCaMKKβ: 587 アミノ酸)の二種類のアイソフォームから構成されている (23-27)。 CaMKK は CaM-kinase I (CaMKI), CaM-kinase IV (CaMKIV), 5'-AMP activated protein kinase (AMPK), Protein kinase B (PKB)の活性化ループに位置する Thr 残基をリ ン酸化することにより、これら標的タンパク質リン酸化酵素を活性化させる(33,87)。 CaMKK はこれら標的酵素のリン酸化を介して神経発生や代謝調節、遺伝子発現,アポトー シス抑制などを調節する(32,33,36,52,77)。このことからも、CaMKK を介した情報伝達機 構は多様な生理機能の調節を行なっていることが示されている。2002 年に、私たちの研究 グループは ATP 拮抗型の CaMKK 阻害剤 STO-609 (7H-Benzimidazo[2,1-a]benz[de] isoquinoline-7-one-3-carboxylic acid)を開発した(83)。STO-609 は細胞透過性を有するため、 生きた細胞を用いて CaMKK を介した情報伝達機構が調節する生理機能を明らかすること を可能とし、これまで培養神経細胞において CaMKK/CaMKI 経路は成長円錐の運動性や軸 索伸長を増加させることや(88)、CaMKK/CaMKI y 経路を介してレプチン誘導性のスパイ ンの形成を調節していること(72)、さらに AMPA 受容体などの Ca²⁺チャネルを通した細胞 内への Ca²⁺流入は CaMKK カスケードを活性化し、樹状突起の発達(89)や軸索伸長(73)、シ ナプスの可塑性などを制御してことなどが明らかとした(74)。また骨芽前駆細胞の分化が STO-609 により抑制されることから CaMKK が骨芽前駆細胞の分化に関係していることが 示されている(90)。近年では、CaMKK/CaMKI, CaMKIV 経路のみならず、HeLa 細胞や A549 細胞にイオノマイシンや A23187 を投与することによる Ca²⁺の細胞内への流入は、 CaMKK を介して AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化することで代謝調節を行うことが STO-609

の使用により示された(34–36)。一方、多くのリン酸化酵素阻害剤と同様に、STO-609 は他 のリン酸化酵素を阻害する可能性(off-target 効果)が示唆されている(86)。さらに STO-609 を用いた細胞内における CaMKK アイソフォーム特異的な情報伝達機構を解析することは、 本阻害剤が CaMKKα/βアイソフォームの酵素活性を阻害することから困難であった。そ のため、これらの問題を解決する手法の確立が必要とされていた。本研究ではその手法と して阻害剤(STO-609)抵抗性 CaMKK 変異体を作成し、用いることにより、STO-609 によ り抑制された効果を回復することで、その効果が CaMKK を阻害したことであることを担 保するとともに、細胞内における CaMKK アイソフォーム特異的な情報伝達機構を解析す る手法を確立した。

2.3 実験材料と方法

実験材料

CaMKK α cDNA (GenBank accession number L42810)/ \sharp rat brain cDNA library b^{3} ら得た(26)。rat CaMKKαまたは rat CaMKKβ組替え体酵素は以前の報告に準じて作製し た(28)。組替え体 rat CaM は pET rat CaM を形質転換した大腸菌(BL-21 (DE3)株)から phenyl-sepharose を用いて以前の報告に準じて作製した(91)。HA-CaMKIV 発現ベクター (pME HA-CaMKIV)は既に作製したものを使用した(83)。GST-rat CaMKIα 1-293, K49E は大腸菌(JM109株)を用いて Glutathione-sepharose を用いた以前の報告に準じて精製し た(30)。抗リン酸化 CaMKIα (Thr¹⁷⁷)抗体、抗リン酸化 CaMKIV (Thr¹⁹⁶)抗体は独自に作製 したものを使用した(49)。抗β-actin 抗体(sc-47778)は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX)から購入した。抗 HA 抗体(12CA5), 抗 FLAG 抗体(clone M2)はそれぞれ Applied Sciences(Indianapolis, IN)と Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)から購入した。抗 AMPK α subunit 抗体(2532)、抗リン酸化 AMPK α subunit (Thr¹⁷²)抗体(2535)は Cell Signaling (Danvers, MA)から購入した。HRP-抗 mouse IgG もしくは HRP-抗 rabbit IgG は GE Healthcare UK, Ltd. (Buckinghamshire, UK)から購入した。GST-rat CaMKK α 触 媒領域変異体(GST-rat CaMKKα 126-434)は以前の報告に準じて発現、精製した(85)。ラ ンダム変異の導入は Diversify PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA)を用いて pGEX-PreS-CaMKK a 126-434 を鋳型に 5' -TCTGTTCCAGGGGCCCATTCTAGAG-3' ¿ 5'-ATTAAGCTTGAGCTCGAGTCGACTA -3'のプライマーを用いて PCR により増幅した。その後 XbaI site と Sall site を切断し、 pGEX-PreS vector の XbaI site と Sall site に組み込んだ。組み込まれた plasmid は大腸菌 (JM109株)に形質転換し、得られたそれぞれのクローンを OD600 の値が 0.6 になるまで

37 ℃で培養した。その後、0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)を加 え、5 時間 37 ℃で培養し、発現誘導を行った。部位特異的アミノ酸変異を導入した pGEX-PreS-CaMKK α 126 – 434, pET-CaMKK α , pcDNA3-FLAG-CaMKK α , pGEX-PreS-CaMKKβ, pcDNA3-FLAG-CaMKKβ のそれぞれのプラスミドは次に示すプ ライマーセットを用いて inverse PCR 法により作製した。(CaMKKα K205E, 5'-CGTGGTCCAGTTCCTTTAAAATGGC-3 ' と 5 ' -TGAATGTAGTCAAGTTGATCGAGG-T-3'; CaMKK α A292T, 5'-CACCAAAGTCGGTGATCTTCACGTG-3' \succeq 5'-TCAG-CAACCAGTTTGAGGGGAATGA-3'; CaMKK α T325S, 5'-AGCTCTGGCCGGAGTCA-GAAATGGC-3' と 5'-TCAGTGGGAAGGCCTTGGATGTATG-3'; CaMKK α D384G, 5' -TTCAGGATCAGGCCTTTGAGTTCCT-3' と 5'-GATGCTAGACAAGAATCCTGAAACA -3'; CaMKK α L405S, 5'-ACCCAAGGGTGTGACTTGATATCAG-3' と 5'-GACCAAGC-ATGGAGAGGAGCCCCTC-3'; CaMKK & A328T, 5'- CACATCAAGATAACCGACTTC-GGCG-3' \succeq 5'-CCCGTCCTCCCCCACTAGGAGGTTG-3') CaMKK α L233F \succeq CaMKK β V269F は以前の報告に準じて作製した(85)。アミノ酸変異の導入は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いた塩基配列決定により確 認した。

細胞培養と遺伝子導入

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞(A549 cell)は 10 % Fatal Bovine Serum(FBS)と 100 units/mL penicillin, 100 units/mL streptomycin を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて 37 ℃, 5% CO₂条件下で培養した。遺伝子導入は 6 well プレー ト上で培養している A549 細胞に 2 µg の pME HA-CaMKIV を Polyethylenimine "MAX" (Polysciences, Inc., Warrington)を用いて製品使用法に従い遺伝子導入した。遺伝子導入 から 20 時間後に FCS が含まれていない DMEM を用いて 37 °C, 5 % CO₂条件下で培養し、 1 µM ionomycin を加え 5 分間, 37 °C, 5 % CO₂条件下で培養した。得られた細胞は western blot にて評価するために、1×SDS-PAGE sample buffer (100 µL)を用いて細胞抽 出液を回収した。CaMKK 活性を測定する際は 10 cm dish で培養したそれぞれの A549 細 胞を、300 µL の氷冷された lysis buffer [150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 % NP-40, 10 % glycerol, 1:1000 protease inhibitor cocktail]を用 いて細胞抽出液を回収し、17,970 g で 10 分間、遠心分離を行い、上清液を回収して活性 測定を行った。western blot により得られたバンドのシグナル強度は Image Jを用いて定 量した(92)。

FLAG-CaMKK アイソフォーム安定発現細胞の作製

FLAG-CaMKK α wild type は pcDNA3 FLAG-CaMKK α wild type の *HindIII* site を切 断した後、blunting kit(Takara Bio Inc., Ohtsu, Japan)を用いて平滑化し、*NotI* site を切 断すること得られた断片を pMSCV 由来のレトロウイルスベクター (pMSCV-MCS-IRES-EGFP)の平滑化された *EcoRI* site と切断された *NotI* site に組み込んだ。 FLAG-CaMKK α L233F/A292T は pcDNA3 FLAG-CaMKK α L233F/A292T を鋳型に 5' -TCCATGTCGACGCCACCATGGACTACAAGGACGACG-3' と 5'-ATAGCGGCCGCTC-AGGATGCAGCCTCATCTT-3'のプライマーを用いて PCR にて増幅し、*Sall/NotI* site を切 断後 pMSCV-MCS-IRES-EGFP の *Sall/NotI* site に組み込んだ。FLAG-CaMKK β wild type と FLAG-CaMKK β V269F/A328T はそれぞれ pcDNA3 FLAG-CaMKK β wild type もし く は FLAG-CaMKK β V269F/A328T を *SpeI* site を切断後、平滑化し、pMSCV-

MCS-IRES-EGFP の平滑化した *EcoRI/BgIII* site に組み込んだ。それぞれのレトロウイル スベクターを PT67 パッケージング細胞(Clontech Laboratories, Inc.)に遺伝子導入後、得 られたレトロウイルスを 16 µg/mL Polybrene (Sigma-Aldrich)を用いて A549 細胞に感染 させた。その後 FACS Array cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて GFP 陽 性細胞(GFP⁺A549 細胞)を single cell sort し、得られたクローンを western blot (抗 FLAG 抗体)にて発現レベルを確認した。

試験管内における CaMKK 活性測定

CaMKK 活性を測定するために 50 mM HEPES pH 7.5, 10 mM Mg(Ac)₂, 1 mM dithiothreitol, 4 mM CaCl₂, CaM, 50–100 μ M ATP もしくは[γ -³²P]ATP が含まれた溶 液を用いて、10 μ g の GST-CaMKI 1– 293, K49E と精製 CaMKK(10 ng)もしくは細胞抽 出液(2.5-5 μ g)を 0-10 μ g/mL STO-609 存在下において 30 °Cで反応させた。細胞抽出液を 酵素とした場合は終濃度 0.5 μ M okadaic acid を加えている。その後、液体シンチレータ ーカウンターもしくは、抗 pCaMKI Thr¹⁷⁷ 抗体を用いた western blot 法により測定した。

統計学的解析

二つの群の間で、統計的に有意に差があることを評価するために、統計解析はStudent's t testsを行なった。p<0.05を有意差ありと判断した。

その他の方法

CaM overlay法は1 mM CaCl₂存在下でビオチン化CaMを用いて行いchemiluminescence reagent (PerkinElmer Life Sciences)により以前の方法に準じて検出した(93)。タン

パク質濃度の測定はウシ血清アルブミンを基準に、Coomassie Brilliant Blue (Bio- Rad)を 用いて測定した。 2.4 結果

<u>STO-609 抵抗性 CaMKK 変異体の作製</u>

STO-609 は CaMKK α 、CaMKK β ともに阻害するがその阻害効率は 5-10 倍程度異なる。 これまでの私たちの研究結果により、その差を生み出すアミノ酸残基(CaMKK α Leu²³³, CaMKKβ Val²⁶⁹)が同定され、そのアミノ酸を大きなアミノ酸(Phe)に置換することで、10 倍程度阻害効率が減少することを報告した(85)。さらなる STO-609 抵抗性を示す CaMKK 変異体を作製することを目的とし、初めに新たな STO-609 に抵抗性を示すアミノ酸残基を 同定することを行なった。PCR 法により CaMKKαの触媒領域にランダムに変異を入れ、 得られた変異体酵素を大腸菌(JM109株)によりタンパク質を発現させた。発現させた CaMKKα触媒領域の変異体酵素を STO-609 (10 μg/mL)存在下もしくは非存在下において その酵素活性を測定した(Fig. 1A)。その結果、Clone 4 のみ STO-609 による CaMKK 活性 の阻害が認められなかった。STO-609抵抗性の変異体酵素(Clone 4)の塩基配列を調べ、導 入されていたアミノ酸置換を同定したところ、5 箇所(K205E、A292T、T325S、D384G、 L405S)のアミノ酸残基の置換が認められた(Fig. 1B)。次に、それぞれのアミノ酸置換につ いて 1 アミノ酸残基のみを変えた CaMKKα触媒領域部位特異的変異体について、同様に STO-609 (10 µg/mL)存在下および非存在下で CaMKK 活性を測定した(Fig. 1C)。その結果 CaMKKα A292T のみが STO-609 による CaMKK 活性の低下が認められないことから、 A292T 変異が CaMKK αの STO-609 抵抗性を生み出すのに重要であることが明らかとなっ た(Fig. 1C)。今回同定された変異(CaMKKα A292T, および相同な変異である CaMKKβ A328T)に、以前の報告で同定された STO-609 抵抗性変異(CaMKKα L233F, CaMKKβ V269F)を導入した STO-609 抵抗性 CaMKK 二重変異体(CaMKKα L233F/A292T 及び CaMKK β V269F/A328T)を作製し、酵素活性を測定した。その結果、CaMKK αでは野生

B)。



Figure 1. STO-609抵抗性CaMKK変異体の作製

A: GST-CaMKK α 触媒領域 (126–434) にPCRによりランダムに変異を導入した。得られたcloneとGST-CaMKK α 触媒領域野生 型のタンパク質を大腸菌(JM109株)により発現させ、10 μ g/mL STO-609 存在下もしくは非存在下の条件でGST-CaMKI α 1–293 K49Eを基質にCaMKK活性を測定した。その後、抗リン酸化CaMKI Thr¹⁷⁷抗体を用いてdot blotにより検出した。図は得られた cloneの一部(1-8)の結果を示している。

B: clone4のCaMKKα 触媒領域 (126-434)内に導入されていた5つのアミノ酸置換(K205E, A292T, T325S, D384G, L405S) を示 した。I-XI; キナーゼドメイン(I-XI)とRP; Arg/Pro-rich insert domainを示す。

C: GST-CaMKK α 触媒領域(126-434)とclone4、clone4に導入されていた1アミノ酸変異体を用いてAと同様の方法を行なった。



Figure 2. STO-609抵抗性CaMKK α と CaMKK β 変異体のSTO-609感受性 A: 大腸菌(BL-21(DE3)株)により発現させ、精製したCaMKK α 野生型(WT, \bullet)もしくは L233F/A292T (AT/LF, \triangle)とGST-CaMKI α 1–293 K49Eを、様々な濃度のSTO-609存在下(0-10 µg/mL)において30 °C で 10 分間反応させ、酵素活性測定した。縦軸の 100 %はSTO-609非存在下のリン酸化強度を100 %とし、相対的に表した。 B: CaMKK β 野生型(WT, \bullet)もしくは V269F/A328T (AT/LF, \triangle)についてAと同様の実験を行なった。

FLAG-CaMKK 安定発現細胞

STO-609 抵抗性 CaMKK 変異体 (CaMKK α L233F/A292T 及び CaMKK β V269F/A328T)を用いて、細胞内における CaMKK アイソフォーム特異的な情報伝達機構 を解析するために、FLAG-CaMKK α , FLAG-CaMKK β wild type もしくは FLAG-CaMKK α , FLAG-CaMKK β STO-609 抵抗性変異体(CaMKK α AT/LF, CaMKK β AT/VF)を安定 的に発現する A549 細胞を、レトロウイルスを用いて作製した。それぞれの FLAG-CaMKK の発現は抗 FLAG 抗体を用いた western blot により確認した(Fig. 3 上段)。CaM overlay 法から発現したそれぞれの FLAG-CaMKK の CaM 結合能力に変化はないことを確認してい る(Fig. 3 中段)。



Figure 3. STO-609抵抗性CaMKKアイソフォーム発現A549細胞

FLAG-CaMKK α 野生型(WT)もしくはA292T/L233F (AT/LF), FLAG-CaMKK β 野生型(WT)もしくはA328T/V269F (AT/VF)の発現量を抗FLAG抗体(上段)を用いたwestern blotにより確認した。CaM結合力はCaM overlay (中段)により評価した。抗 β -actin抗体を用いたwestern blotにより内部標準を確認した。

<u>イオノマイシン刺激による細胞内における AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化</u>

母細胞である A549 細胞はイオノマイシンによる Ca²⁺の流入により AMPK α Thr¹⁷²のリ ン酸化が上昇し、これは STO-609 の濃度依存的に減少した(Fig. 4A)。このことから、イオ ノマイシンによる AMPK α Thr¹⁷² のリン酸化は CaMKK を介していることが分かるが、 CaMKK α / β どちらのアイソフォームが責任酵素であるかは不明である。また FLAG-CaMKK α / β wild type 発現 A549 細胞でも同様にイオノマイシンによる Ca²⁺の流 入により、上昇した AMPK α Thr¹⁷² のリン酸化は STO-609 により減少した。一方、 FLAG-CaMKK α AT/LF 発現 A549 細胞ではイオノマイシン誘導性の AMPK α Thr¹⁷²のリ ン酸化が STO-609 により減少したのに対して(Fig. 4A)、FLAG-CaMKK β AT/VF 発現 A549 細胞ではイオノマイシン誘導性の AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化が STO-609 存在下にお いても抑制されなかった(Fig. 4B)。この結果から、細胞内における CaMKK/AMPK 経路に CaMKK α は関与せず、CaMKK β のみが活性化リン酸化酵素として機能していることが明 らかとなった。



Figure 4. STO-609抵抗性CaMKK変異体発現A549細胞におけるイオノマイシン誘導性のAMPKリン酸化活性 A: A549細胞(-)もしくはFLAG-CaMKK α安定発現A549細胞(WT)、FLAG-CaMKK α A292T/L233F安定発現A549細胞(AT/LF)を STO-609存在下(1または10 μ g/mL)もしくは非存在下(-)で、5分間イオノマイシンにより刺激した(+)。刺激後、抗AMPK α抗体も しくは抗リン酸化AMPK α Thr¹⁷²抗体を用いたwestern blotによりAMPK α Thr¹⁷²のリン酸化量を測定した。 B: A549細胞(-)もしくはFLAG-CaMKK β発現A549細胞(WT)、FLAG-CaMKK β A328T/V269F発現A549細胞(AT/VF)をSTO-609 存在下(1または10 μ g/mL)もしくは非存在下(-)で、5分間イオノマイシンにより刺激した(+)。その後Aと同様の実験を行なった。 それぞれの縦軸はSTO-609非存在下において、イオノマイシン刺激した条件のAMPK α Thr¹⁷²のリン酸化量を100 %とし相対的に 表している。結果はtriplicateの平均値と標準偏差をグラフに表した。統計的な有意差は、次に示す印で表している。STO-609非存 在下において、イオノマイシン刺激した細胞と比較しp<0.05の場合**で表した。未刺激の細胞と比較しp<0.05の場合*で表した。

<u>イオノマイシン刺激による細胞内での CaMKIV Thr¹⁹⁶のリン酸化</u>

A549 細胞は CaMKIV を発現していないか、発現量が著しく低いため、A549 細胞抽曲 液において抗 CaMKIV 抗体を用いた western blot では CaMKIV の発現を検出できなかっ た。そこで、HA-CaMKIV を一過的に発現させ、AMPK と同様に STO-609 非存在下または、 存在下においてイオノマイシン刺激により細胞内 Ca²⁺濃度の上昇を誘導させた後、 CaMKIV Thr¹⁹⁶のリン酸化を定量した。母細胞である A549 細胞ではイオノマイシンによ る細胞内への Ca²⁺の流入により、CaMKIV Thr¹⁹⁶のリン酸化が上昇し、STO-609 により Thr¹⁹⁶ のリン酸化が減少した。しかし FLAG-CaMKK α AT/LF および FLAG-CaMKK β AT/VF 安定発現 A549 細胞はどちらもイオノマイシン誘導性の CaMKIV Thr¹⁹⁶のリン酸化 は STO-609 処理により抑制されることはなかった(Fig. 5)。このことから、細胞内において $CaMKK \alpha / \beta$ の両アイソフォームともに CaMKIV Thr¹⁹⁶をリン酸化可能であることが明ら

かとなった。



Figure 5. STO-609抵抗性CaMKK変異体発現A549細胞におけるイオノマイシン誘導性のCaMKIVリン酸化活性 HA-CaMKIVを一過的に発現させたA549細胞(-)もしくはFLAG-CaMKK α A292T/L233F発現A549細胞(AT/LF)、FLAG-CaMKK β A328T/V269F発現A549細胞(AT/VF)をSTO-609存在下(1または10 μ g/mL)もしくは非存在下(-)で、5 分間イオノマイシンにより刺激した(+)。刺激後、抗HA抗体もしくは抗リン酸化CaMKIV Thr¹⁹⁶抗体を用いたwestern blotによりAMPKのリン酸化量を測定した。縦軸はSTO-609非存在下において、イオノマイシン刺激した条件のAMPKのリン酸化量を100 %とし相対的に表している。結果はtriplicateの平均値と標準偏差をグラフに表した。統計的な有意差は、次に示す印で表している。STO-609非存在下において、イオノマイシン刺激した、ホ刺激の細胞と比較しp<0.05の場合**で表した。未刺激の細胞と比較しp<0.05の場合*で表した。

2.5 考察

現在まで唯一の CaMKK 阻害剤として開発された STO-609 は、CaMKK/CaMKI を介し た神経機能(72-74)や、CaMKK/CaMKIV 経路による cAMP-response element-binding protein (CREB)や serum response factor (SRF)を介した遺伝子発現調節機構の解明に役立 ってきた(52,53,75)。近年では、CaMKK/CaMKIV 経路の活性化が mammalian target of rapamycin (mTOR)/ ribosomal protein S6 kinase (S6K)経路を制御し、肝がん細胞の増殖 に重要であることが示唆されている(78)。また androgen receptor の活性化により発現量 が増加した CaMKKβは CaMKK/AMPK 経路を活性化することで代謝が活発になり、前立 腺がん細胞を増殖させることが報告されている(79)。そのため、CaMKK 阻害剤である STO-609 は分子プローブとしてのみならず、これら疾患の治療薬のリード化合物として期 待されている。一方で、これまでに、STO-609 は CaMKK 以外にも他のリン酸化酵素(ERK8, MNK1, CK2, AMPK, PIM2, PIM3, DYRK2, DYRK3 HIPK2)を阻害することが報告されて いる(86)。また STO-609 による胃がん細胞の増殖阻害は CaMKK 非依存的に起こることも 報告されている(94)。 そのため、 STO-609 を使用する上で、 その他の酵素阻害剤と同様に、 標的酵素(CaMKK)以外の分子機能に影響を与える可能性(off-target 効果)を考えなければな らない。STO-609 と human CaMKK β の結合構造は、結晶構造解析により 2.4 Å の解像度 で明らかにされ、ATP ポケットに STO-609 が結合していることが明らかとなっている(84)。 hCaMKK β Ø N-lobe Ø Ile¹⁷¹, Val¹⁷⁹, Ala¹⁹², Val²⁴⁹, Phe²⁶⁷ と C-lobe Ø Gly²⁷³, Pro²⁷⁴, Leu³¹⁹, Asp³³⁰ が STO-609 と疎水性相互作用している。また Val²⁷⁰と Asp³³⁰は直接、Glu²³⁶は水分 子を介して STO-609 と水素結合している。hCaMKK β Val²⁷⁰に相当する rat CaMKK β Val²⁶⁹はrat CaMKK αではLeu²³³となっており10倍ほどSTO-609感受性が低下する(83)。 そのため、Val 残基をより大きなアミノ酸に置換した CaMKKβ V269F はさらに STO-609

感受性が低下する(85)。今回同定された rat CaMKK α Ala²⁹²、rat CaMKK β Ala³²⁸ は STO-609とCaMKKの結合には直接的に関与していない。しかし、このアミノ酸残基はATP ポケットに存在し、STO-609の近傍に位置する。そのため、Ala を Thr に置換することで 立体障害を引き起こし、STO-609 が CaMKK に結合できなくことが考えられる(Fig. 6)。本 研究では、STO-609 抵抗性 CaMKK 変異体を安定的に発現する A549 細胞を作製し、 STO-609 により阻害されたイオノマイシン誘導性の CaMKK 活性を、STO-609 抵抗性 CaMKK 変異体により AMPK と CaMKIV の活性化ループの Thr 残基のリン酸化を指標に 回復させた。その結果、AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化するのは CaMKK α ではなく、CaMKK βである結果が得られた。これはこれまでの先行研究と一致している(34-36)。このことか ら AMPK に対しては CaMKK アイソフォーム間で異なる基質認識を持っていることが考え られる。一方で、CaMKIV に対しては CaMKK α と CaMKK β の両アイソフォームが CaMKIV Thr¹⁹³をリン酸化した。このことは CaMKIV 認識に重要と考えられる RP-domain を両アイソフォームとも触媒領域内に保有していることと一致している(1. 序論 Fig. 1)。 これらの研究結果より、CaMKK アイソフォームは酵素機能に重複性(redundancy)を持つ とともに、一部の機能において異なる機能と特異性(specificity)を持つものと考えられる。



Figure 5. STO-609とhCaMKKβの結晶構造

Figure 5. STO-609 EnCaMKK β の結晶構造 STO-609(虹色) とhCaMKK β が結合した結合構造を示した。IIe¹⁷¹, Val¹⁷⁹, Ala¹⁹², Val²⁴⁹, Phe²⁶⁷, Gly²⁷³, Pro²⁷⁴, Leu³¹⁹は STO-609 と疎水性相互作用により結合している(黒)。Val²⁷⁰とは直接、Glu²³⁶は水分子を介してSTO-609と水素結合(点線)している (青)。 Asp³³⁰はSTO-609 と水素結合と疎水性相互作用により結合している(青)。 今回同定したrCaMKK β Ala³²⁸ (hCaMKK β Ala³²⁹) (赤)をThrに置換したrCaMKK β A328TはSTO-609に対して立体障害を引き起こすと考えられる。この図は日本蛋白質デー タバンク(PDBj)に登録されたデータ(Kukimoto-Niino M. *et al. 2011 J Biol Chem.* PBD ID: 2ZV2)をもとに作成した。

3. 第2章

Ca²⁺/カルモデュリン依存性タンパク質リン酸化酵素活性化酵素の5'-AMP活性化リン酸化酵素特異的な基質認識機構の解明

3.1 要約

5'-AMP activated protein kinase (AMPK) kinase である Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase kinase (CaMKK) β は、AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化することで、AMPK を活性化さ せる。試験管内において CaMKK β は CaMKK α より効率的に AMPK α Thr¹⁷² リン酸化す る能力を有する。一方、Ca²⁺/Calmodulin-dependent kinase I (CaMKI) Thr¹⁷⁷に対しては CaMKK α, CaMKK β ともに同程度のリン酸化効率を示した。本研究では、様々な CaMKK β / α キメラ変異体と CaMKK $\beta / \alpha / \beta$ キメラ変異体を用い、CaMKK アイソフォーム間で、 AMPK へのリン酸化効率の差を生じる一アミノ酸残基(CaMKK α Ile³²², CaMKK β Leu³⁵⁸) を同定した。さらに、STO-609 抵抗生変異(CaMKK α L233F/A292T)に CaMKK α I322L の変異を導入した CaMKK α L233F/A292T/I322L を作製し、これを遺伝子導入した培養 細胞株を用いて、STO-609により内因性の CaMKK を阻害した状態で、細胞内における遺 伝子導入した CaMKK の AMPK に対するリン酸化活性を測定した。その結果、CaMKKα I322L 変異体は CaMKKβと同様に細胞内においても AMPK をリン酸化することが可能と なった。このことから少なくとも今回同定した一アミノ酸残基(CaMKK α Ile³²², CaMKK β Leu³⁵⁸)が CaMKK アイソフォーム間で異なる AMPK への基質認識の差を生じさせているこ とが明らかとなった。

3.2 緒言

Ca²⁺/Calmodulin (CaM)複合体によりアロステリックに活性化される CaM-kinase kinase (CaMKK)は CaMK ファミリーに属し、CaMKKα (rCaMKKα: 505 アミノ酸)と CaMKKβ (rCaMKKβ: 587 アミノ酸)の二種類のアイソフォームから構成されている (23-27)。 CaMKK は CaM-kinase I (CaMKI), CaM-kinaseIV (CaMKIV), 5'-AMP activated protein kinase (AMPK), Protein kinase B (PKB)の活性化ループに位置する Thr 残基をリ ン酸化することにより、これら基質タンパク質リン酸化酵素を活性化させる。CaMKK はこ れら基質のリン酸化を介して神経発生や代謝調節、遺伝子発現、ポトーシス抑制などを調 節する(32,33,36,52,77)。CaMKK/CaMKIV 経路は cAMP-response element-binding protein (CREB)や serum response factor (SRF)といった転写因子を活性化することで遺伝 子発現を調節している(52,53,75)。CaMKK/CaMKI 経路は成長円錐の運動性や軸索伸長、 レプチン誘導性のスパインの形成を調節している。また Ca²⁺依存的な CaMKK カスケード の活性化は樹状突起の発達や軸索伸長、AMPA 受容体を介したシナプスの可塑性などを制 御している(72–74,88,89)。近年では、CaMKK/CaMKI,CaMKIV 経路のみならず、HeLa 細胞や A549 細胞にイオノマイシンや A23187 などの投与による細胞内への Ca²+の流入は、 CaMKKを介して AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化することでミトコンドリア内における脂肪酸 酸化やグルコースの恒常性、オートファジーの促進といった代謝調節を行なっていること が示されている(34-36,76,77,95)。これまでの研究で、AMPK kinase の一つである liver kinase B1 (LKB1)を欠損した HeLa 細胞を用いて、RNA 干渉や CaMKK 阻害剤 STO-609 を用いた薬理学的解析により CaMKKαではなく CaMKKβが AMPK kinase であること示 された(34–36)。このことから CaMKK 両アイソフォーム間では AMPK に対して異なる基 質認識機構があると考えられる。そのため本研究では CaMKK 両アイソフォーム間で異な

る AMPK 認識機構を分子機構の観点から明らかにすることを目的とした。その結果、触媒 領域中の Subdomain VIII に位置する一アミノ酸残基 (CaMKK α Ile³²², CaMKK β Leu³⁵⁸)が CaMKK アイソフォーム間で異なる AMPK への基質認識の差を生み出すことを見 出した。

3.2 実験材料と方法

実験材料

組替え体 rat CaMKK α 、 rat CaMKK β 野生型、部位特異的変異体(CaMKK α A321S, CaMKK α I322L)は大腸菌(BL-21 (DE3)株)を用いて発現させ、CaM-Sepharose と Q-Sepharose を用いたクロマトグラフィーにより精製した。GST-rat CaMKK α 126-434 と GST-rat CaMKK β 162-470 のプラスミドの作製と、キメラ変異体を含む様々な GST-CaMKK は大腸菌(JM109 株)を用いて以前の報告に準じて精製した(85)。GST-rat CaMKI α 1-293, K49E は大腸菌(JM109 株)を用いて以前の報告に準じて精製した(30)。組 替え体 AMPK α K45R $/\beta/\gamma$ は大腸菌(BL-21 CodonPlus (DE3)株)を用いて以前の報告に 準じて作製した(96)。組替え体 rat CaM は大腸菌(BL-21 (DE3)株)を用いて以前の報告に準 じて作製した(91)。抗 FLAG 抗体 (clone M2)は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)から購入し た。抗 AMPK α subunit 抗体(2532)、抗リン酸化 AMPK α subunit (Thr¹⁷²)抗体(2535)は Cell Signaling (Danvers, MA)から購入した。HRP-抗 mouse もしくは rabbit IgG は GE Healthcare UK, Ltd. (Buckinghamshire, UK)から購入した。

部位特異的 CaMKK 変異体とキメラ CaMKK 変異体のプラスミド作製

GST-CaMKK β / α -1: GST-CaMKK β (162-364)/CaMKK α (329-434)と GST-CaMKK β / α -2: GST-CaMKK β (162-303)/CaMKK α (268-434)は以前作製したものを用いた (85)。GST-CaMKK $\beta / \alpha / \beta$ -2: GST-CaMKK β (162-303)/CaMKK α (268-326)/CaMKK β (363-470)と GST-CaMKK $\beta / \alpha / \beta$ -3: GST-CaMKK β (162-303)/CaMKK α (268-322)/CaMKK β (359-470)、GST-CaMKK $\beta / \alpha / \beta$ -4: GST-CaMKK β (162-303)/CaMKK α (268-311)/CaMKK β (348-470)はGST-CaMKK β / α -2 を鋳型にセ

ンスプライマー(5'-GGTCTAGAGAATCAGTACACGCTG-3')と、それぞれのリン酸化した アンチセンスプライマー(CaMKK $\beta / \alpha / \beta$ -2, 5'-pGCCGGTGTCAGAGATGGCCTC-3'; CaMKK β / α /-3, 5'-pGATGGCCTCCGGGGGCCATGAA-3'; CaMKK β / α / β -4, ; 5'-pTGCCGTACTGGACAGCTGAGC-3')を用いて、N 末端断片を PCR により増幅した。そ の後 Xbal site を切断した。C 末端断片はセンスプライマー (5'-CCGTCGACTAGACCTCCTCTTCGGT-3')と、それぞれのリン酸化したアンチセンスプ ライマー(CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -2, 5'-pAAGATCTTCTCCGGAAAGGCC-3'; CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -3, 5'-pTCAGAGACCCGGAAGATCTTC-3'; CaMKK β / α / β -4, 5'-pGGCACGCCTG-CCTTCATGGCG-3')を用いて、PCRにより増幅し、Sall siteを切断した。得られたN末端 |断片と C 末端断片は pGEX-PreS ベクターの XbaI/SalI site に組み込んだ。GST-CaMKKβ / α / β -1: GST-CaMKK β (162-303)/CaMKK α (268-328)/CaMKK β (365-470) k5'-CCGGCCAGAGCTTCTCCGGAAAGGCCTT-3' と 5'-AGAAGCTCTGGCCGGTGTCA-GAGATGGC-3'のプライマーを用いて GST-CaMKKβ/α/β-2 を鋳型に over lapping PCR 法により作製した。部位特異的 CaMKKαの作製は pET-CaMKKαを鋳型にそれぞれのプラ イマーセット (CaMKK α A321S, 5'-ATGGCCCCGGAGTCCATTTCTGACACC-3', 5'-GAATGCTGGGGTCCCTGCCGTACTGGA-3'; CaMKK α I322L, 5'-ATGGCCCCG-GAGGCCCTTTCTGACACC-3', 5'-GAATGCTGGGGTCCCTGCCGTACTGGA-3')を用いて inverse PCR 法により作製した。FLAG-CaMKK A292T/L233F 変異体発現ウイルスベクタ ー(pMSCV-MCS-IRES-EGFP)は以前作製した(97)。FLAG-CaMKK A292T/L233F/I322L 発 現ウイルスベクター(pMSCV-MCS-IRES-EGFP)は以前作製した pcDNA3 FLAG-CaMKK α A292T/L233Fを鋳型に上記プライマーを用いて以前の方法に準じて作製した。得られたそ

れぞれの CaMKK 変異体は ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて塩基配列を決定し、確認した。

試験管内におけるCaMKK活性測定

それぞれの組替え体CaMKK野生型もしくはCaMKK変異体は50 mM HEPES pH7.5, 10 mM Mg(Ac)₂, 1 m DTT と 200 μ M [γ -³²P] ATP (200-700cpm/pmol) に 4 mM CaCl₂/10.0-16.5 μ M CaMもしくは2 mM EGTAが含まれた溶液を用いて1 μ g/mL CaMKK と0.5 mg/mLのGST-CaMKI 1-293, K49EもしくはAMPK α K45R / β / γ を30 °Cでそれぞ れの時間反応させた。それぞれの反応は [γ -³²P] ATPを入れることで反応を開始し、2× SDS-PAGE sample bufferを加えることで反応を停止させた。 それぞれの基質に対する³²P の取り込みは、切り取られたゲルのCerenkov放射光を測定することで定量した。

<u>A549細胞を用いたAMPK α (Thr¹⁷²)のリン酸化の測定</u>

ヒト肺胞基底上皮腺がん細胞(A549細胞)は10 % Fatal Bovine Serum (FBS)と100 units/mL penicillin, 100 units/mL streptomycinを含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を用いて37 °C, 5 % CO₂条件下で培養した。pVSVGとFLAG-CaMKK変 異体 (A292T/L233F もしくは A292T/L233F/I322L)を組み込んだ pMSCV-MCS-IRES-EGFPを共にGP2-293パッケージング細胞に遺伝子導入し、レトロウイ ルスを作製した。A549細胞にレトロウイルスを感染させ、18時間後にFCSを除いたDMEM を用いて37 °C, 5 % CO₂条件下で培養し、1 μ M ionomycinを加え5 分間, 37 °C, 5 % CO₂ 条件下で培養した。得られた細胞はwestern blotにて評価するために、1×SDS-PAGE

sample buffer (100 μL)を用いて細胞抽出液を回収した。western blotにより得られたバンドのシグナル強度はImage Jを用いて定量した(92)。

統計学的解析

二つの群の間で、統計的に有意に差があることを評価するために、統計解析はStudent's t testsを行なった。p<0.05を有意差ありと判断した。

その他の方法

CaM overlay 法 は 1 mM CaCl₂存在化でビオチン化CaMを用いて行い chemiluminescence reagent (PerkinElmer Life Sciences)により以前と同様に検出した (93)。タンパク質濃度の測定はウシ血清アルブミンを基準に、Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad)を用いて測定した。 3.3 結果

試験管内において CaMKK α より CaMKK β は効率的に AMPK をリン酸化する。

ラット脳から精製された CaMKK β は CaMKK α と比較して AMPK α の Thr¹⁷² を 7 倍ほ ど効率的にリン酸化することが報告されている(35)。このことを確かめるために、大腸菌 (BL-21 (DE3)株)を用いて CaMKK α と CaMKK β を発現、精製した。CaMKK α と CaMKK βは CaM 結合力に差はないと考えられているため(98)、酵素に使用する CaMKK の量は CaM overlay 法によりに同等量であることを確認した。また、活性化した基質酵素である CaMKI は CaMKK をリン酸化することで CaMKK の活性を阻害することが報告されている (99)。そのため、feedback 阻害を防ぐことを目的として、ATP 結合部位に変異を導入した 酵素失活型変異体(AMPKα K45R および CaMKI K49E)を CaMKK のリン酸化基質として 用いた。はじめに AMPK α subunit の活性化ループに位置する Thr¹⁷²と CaMKI 触媒領域 変異体(GST-CaMKI 1-293, K49E)の Thr¹⁷⁷の時間依存的なリン酸化反応を測定した(Fig. 1)。 その結果、CaMKI に対して CaMKK 両アイソフォームのリン酸化効率は同等であるものの (Fig. 1A)、CaMKK α より CaMKK β は AMPK に対して約 14 倍程度、効率的にリン酸化す る結果を得た(Fig. 1B)。次に種々の AMPK 濃度条件下に、CaMKK 両アイソフォームの AMPK に対する親和性(K_m値)を測定した(Fig. 2)。その結果、AMPK に対する K_m値が CaMKK α では 13.1 μ M、CaMKK β では 1.5 μ M であることが示され(Fig. 2A)、CaMKK アイソフォーム間における AMPK に対するリン酸化効率の差は、基質分子に対する親和性 の差に起因することが明らかとなった。これらはラット脳から精製された CaMKK を用い た過去の報告と一致し、AMPK をリン酸化する AMPK kinase は CaMKKαではなく CaMKKβであることとも不都合がない。



Figure 1. 試験管内におけるリコンビナントCaMKKのCaMKI, AMPKリン酸化活性 A: rat CaMKK α野生型とrat CaMKK β野生型をそれぞれ20 ngをCaM overlay法により検出した。左側の数字は分子量(kilodalton: kDa)を示している。

B, C: rat CaMKK α 野生型とCaMKK β 野生型を30 °C cGST-CaMKI α 1-293 K49E (B)もしくはAMPK K45R (C)と [y-³²p] p-ATPを加え反応させた。反応を停止したのちSDS-PAGEしたものをCBB (Coomassie Brilliant Blue)染色し、感光した(矢印)。切り出されたゲルのCerenkov放射光を測定し、 [y-³²p] の取り込み量を求めた。縦軸は [y-³²p] の取り込み量を示している。結果はtriplicateの平均値と標準偏差をグラフに表した。



Figure 2. CaMKK α とCaMKK β 活性の二重逆数プロット

A, B: リコンビナントrat CaMKK α (8 µg/mL)とrat CaMKK β (1 µg/mL)(A), rat CaMKK α I322L (1 µg/mL)(B)を様々な濃度の AMPK K45R (1.9-7.7 µM)と30 °C σ 30 分間、 [γ -³²p] ATPを加え反応させた。反応を停止したのちSDS-PAGEしたものを CBB(Coomassie Brilliant Blue)染色し、感光した。切り出されたゲルのCerenkov放射光を測定し、 [γ -³²p] の取り込み量を求め た。実験はduplicate σ 行い、値を二重逆数プロット(Lineweaver-Burk plot)にして示している。

<u>CaMKK の Subdomain VIII が AMPK の高効率なリン酸化に重要である。</u>

CaMKK アイソフォーム間における AMPK に対するリン酸化効率の差を生み出す分子機 構を明らかにするため、N 末端および調節領域(30)を含む C 末端を欠失した GST-CaMKK 触媒領域変異体(CaMKK α 126-434, CaMKK β 162-470)と CaMKK β 触媒領域の一部を 相同な CaMKK α の領域に置換した様々な GST-CaMKK β / α キメラ変異体を作製した(Fig. 3A)。これらの酵素は調節領域を欠失しているため、Ca²⁺/CaM 非存在下においても活性化 する恒常的活性型変異体である。それぞれの CaMKK 触媒領域変異体の AMPK に対するリ ン酸化活性を比較する為に、リン酸化基質である GST-CaMKI 1-293, K49E に対して比活 性の等しい酵素量(Fig. 3B)を用いて GST-CaMKK α 126-434 と GST-CaMKK β 162-470、 様々な GST-CaMKK β/αキメラ変異体の AMPK へのリン酸化活性を測定した(Fig. 3C)。 その結果、CaMKK アイソフォーム間における触媒領域のアミノ酸配列の相同性は~70%に も関わらず(23,26,85)、GST-CaMKKα 126-434より GST-CaMKKβ 162-470の AMPK に対するリン酸化活性は 6 倍ほど高い結果を得た(Fig. 3C)。GST-CaMKKβ 162-364/CaMKK α 329-434 変異体(CaMKK β / α-1)は GST-CaMKK β 162-470 と同等の AMPK に対するリン酸化活性を示した。一方で、GST-CaMKK β 162–303/CaMKK α 268-434 変異体(CaMKK β / α-2)は GST-CaMKK β 162-470 と比較して、AMPK に対する リン酸化活性が減少した。また CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -1 でも GST-CaMKK β 162–470 と比較し て AMPK に対するリン酸化活性が減少した(Fig. 3C)。このことから CaMKKβ 304-364 の局所領域が高効率な AMPK のリン酸化活性に重要であることが示唆された。



Figure 3. CaMKK触媒領域変異体の活性測定 A: 作製したCaMKK α もしくは β 触媒領域野生型とそれぞれのCaMKK触媒領域変異体(CaMKK β/α -1, CaMKK β/α -2,

CaMKK β Ser³⁵⁷ もしくは CaMKK β Leu³⁵⁸ が AMPK の高効率なリン酸化に重要である。

CaMKK β 304-364 領域内にある高効率な AMPK リン酸化活性を生み出すアミノ酸残 基を同定するために、さらに領域を絞った様々な GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ 変異体を作製した (Fig. 4A)。(Fig. 3)と同様にそれぞれの GST-CaMKK 触媒領域変異体の AMPK に対するリ ン酸化活性を比較するために、リン酸化基質である GST-CaMKI 1-293, K49E に対して比 活性の等しい酵素量を用いて(Fig. 4B)、GST-CaMKK α 126-434 と様々な GST-CaMKK β / α/β キメラ変異体の AMPK へのリン酸化活性を測定した(Fig. 4C)。GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -2, GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -3 は GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -1 と同等の AMPK リン酸化活性を 示した。一方、GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -3 と比較して GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -4 は高い AMPK リン酸化活性を示した(Fig. 4C)。GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -3 と GST-CaMKK $\beta/\alpha/\beta$ -4 の間で

CaMKK β/α-3, CaMKK β/α/β-1)を模式図で表した。 B: CaMKK触媒領域野生型とそれぞれの触媒領域変異体(CaMKK β/α-1, CaMKK β/α-2, CaMKK β/α-3, CaMKK β/α/β-1)を30 °Cで20 分間、GST-CaMKI α 1-293 K49E (上)もしくはAMPK K45R (下)と [y-³²p] ATPを加え反応させた。反応を停止したのち SDS-PAGEしたものをCBB (Coomassie Brilliant Blue)染色し、感光した。切り出されたゲルのCerenkov放射光を測定し、 [y-³²p] の取り込み量を求めた。縦軸は [y-³²p] の取り込み量を示している。結果はtriplicateの平均値とそれぞれの値をグラフ に表した。統計的な有意差は、次に示す印で表している。CaMKK βと比較しp<0.05の場合**で表した。CaMKK βと比較有意差が ない場合n.s.:not significantで示した。

異なるのは 2 アミノ酸(CaMKK α Ala³²¹/CaMKK β Ser³⁵⁷, CaMKK α Ile³²²/CaMKK β Leu³⁵⁸)のみである。これらの結果から CaMKK β Ser³⁵⁷ もしくは CaMKK β Leu³⁵⁸ のどちら か、もしくは両方のアミノ酸残基が CaMKK β の AMPK に対する高いリン酸化活性を生み 出すのに重要であることが推定された。



Figure 4. CaMKKβのSer³⁵⁷~Leu³⁵⁸のAMPKリン酸化活性への影響

A: 作製したそれぞれの触媒領域変異体(CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -1, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -2, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -3, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -4)を模式図で 表した。

CaMKK β Leu³⁵⁸ が高効率な AMPK のリン酸化に重要である。

CaMKK β Ser³⁵⁷ もしくは CaMKK β Leu³⁵⁸のどちらが AMPK に対する高いリン酸化活 性を生じるために必須であるかを検証するために、rat CaMKK α と rat CaMKK β 、CaMKK α と CaMKK β の相同遺伝子産物である *C.elegans* ckk-1(81)の触媒領域 subdomainVIII の アミン酸配列を比較した(Fig. 5A)。CaMKK α Ala³²¹ もしくは Ile³²²に相当する CaMKK β

B: CaMKK α 触媒領域野生型とそれぞれの触媒領域変異体(CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -1, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -2, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -3, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -3, CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -4)とGST-CaMKI α 1-293 K49E (上)もしくはAMPK K45R (下)を用いてFig. 3. B と同様の実験を行なった。結果はtriplicate の平均値とそれぞれの値をグラフに表した。統計的な有意差は、次に示す印で表している。CaMKK $\alpha/\beta/\alpha$ -3と比較しp<0.01の場合*で表した。

のアミノ酸残基(Ser³⁵⁷もしくは Leu³⁵⁸)に置換した CaMKK α A321S と CaMKK α I322L を作製した。使用する CaMKK の量は CaM overlay 法により同等量であることを確認した (Fig. 5B)。野生型 CaMKK α と野生型 CaMKK β 、CaMKK α A321S、CaMKK α I322L を 用いて CaMKI と AMPK をリン酸化した。CaMKI に対して変異体を含めた全ての CaMKK の比活性は同等であった(Fig. 5C上)。CaMKK α A321S は AMPK に対して CaMKK α 野生 型同様に低いリン酸化活性を示した。それに対し、CaMKK α I322L は野生型 CaMKK β に 類似した高い AMPK リン酸化活性を示した(Fig. 5C 下)。さらに CaMKKα I322Lの AMPK に対する親和性(K_m値)を測定した結果、AMPK に対する K_m値が CaMKK α I322L は 4.9 μM と低下した(Fig. 2B)。このことは I322L のアミノ酸置換により、CaMKK βの酵素学的な性 質に近づいていると考えられる。一方、細胞内においても、試験管内と同様に CaMKKα I322L は CaMKK β と同様に AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化する能力を有するか検証した(Fig. 6)。STO-609 抵抗生変異(CaMKK α L233F/A292T)に CaMKK α I322L の変異を導入した FLAG-CaMKKα L233F/A292T/I322L もしくは、CaMKKα L233F/A292T を発現する A549 細胞をレトロウイルスにより作製し、STO-609 により内因性の CaMKK を阻害した 状態で、細胞内における遺伝子導入した CaMKK の AMPK リン酸化活性を測定した。その 結果、細胞内において FLAG-CaMKKα L233F/A292T 発現 A549 細胞ではイオノマイシ ンにより AMPK α Thr¹⁷² のリン酸化は上昇したが、STO-609 添加により AMPK α Thr¹⁷² のリン酸化は検出できなかった(Fig. 6)。このことから FLAG-CaMKK α L233F/A292T は 細胞内において AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化できないことが示唆される。これは以前の結果 と一致している(97)。これとは対照的に I322L 変異を導入した FLAG-CaMKK α L233F/A292T/I322L 発現 A549 細胞はイオノマイシンにより AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化 は上昇し、STO-609 添加した場合においても AMPK α Thr¹⁷²のリン酸化が検出された(Fig.

6)。このリン酸化の強度は FLAG-CaMKK α L233F/A292T 発現 A549 細胞と比較しても 顕著に増加している。そのため CaMKK α I322L は細胞内においても CaMKK β 同様に AMPK α Thr¹⁷² をリン酸化することが可能であることが明らかとなった。これまでの結果 より、CaMKK アイソフォーム間における異なる AMPK 認識およびリン酸化活性の差は少 なくとも 1 アミノ酸(CaMKK α Ile³²²: CaMKK β Leu³⁵⁸)の違いによるものであることが、 試験管内と細胞内において示すことができた。



Figure 5. 高効率なAMPKリン酸化活性に重要なCaMKKβ Leu³⁵⁸の同定

A: CaMKK α とCaMKK β 、*C.elegans* ckk-1の触媒領域subdomain VIII (rat CaMKK α 312-323, rat CaMKK β 348-359, *C.elengans* ckk-1 313-324)のアミノ酸配列を比較した。*はCaMKK β Leu³⁵⁸と相同なアミノ酸残基の場所を示す。

B: rat CaMKK α 野生型(CaMKK α WT)とrat CaMKK β 野生型(CaMKK β WT)、ratCaMKK α A321S、rat CaMKK α I322Lをそれ ぞれ20 ngをCaM overlay法により検出した。左側の数字は分子量(kilo-dalton: kDa)を示している。

C: rat CaMKK α 野生型(CaMKK α WT)とrat CaMKK β 野生型(CaMKK β WT)、rat CaMKK α A321S、rat CaMKK α I322L (1 µg/mL)をそれぞれ30 °Cで30 分間、GST-CaMKI α 1-293 K49E (上)もしくはAMPK K45R (下)と [γ -32p] ATPを加え、反応させた。反応を停止したのちSDS-PAGEしたものをCBB (Coomassie Brilliant Blue)染色し、感光した。切り出されたゲルのCerenkov 放射光を測定し、 [γ -32p] の取り込み量を求めた。縦軸は [γ -32p] の取り込み量を示している。結果はtriplicateの平均値と標準 偏差をグラフに表した。CaMKK α と比較しp<0.001の場合*で表した。CaMKK α と比較有意差がない場合、n.s.; not significantで示した。



Figure 6. CaMKK α I322LはA549細胞内においてAMPKをリン酸化する。 FLAG-CaMKK α A292T/L322F (FLAG-CaMKK α AT/LF)もしくはFLAG-CaMKK α A292T/L322F/I322L (FLAG-CaMKK α AT/LF)もしくはFLAG-CaMKK α AT/LF)もしくはFLAG-CaMKK α AT/LF) AT/LF/IL)をレトロウイルスを用いてA549細胞に発現させた。その後、STO-609 (10 μg/mL)存在下もしくは非存在下(-)でイオノマ イシンを5 分間添加(+)し、刺激した。controlはSTO-609、イオノマイシンの両方がない細胞を用意した。その後、抗AMPKα抗体、 抗リン酸化AMPK α Thr¹⁷²抗体を用いたwestern blotによりAMPKのリン酸化量を定量した。FLAG-CaMKKの発現は抗FLAG抗体 を用いたwestern blotにより発現を確認した。グラフの縦軸はSTO-609非存在下において、イオノマイシン刺激した条件のAMPK のリン酸化量を100%とし相対的に表している。結果はtriplicateの平均値とそれぞれの値をグラフに表した。統計的な有意差は、 次に示す印で表している。controlと比較してp<0.05の場合*で表した。STO-609と非存在下において、イオノマイシン刺激した細 胞と比較しp<0.05の場合**で表した。control細胞と比較しp<0.05の場合***で表した。

3.5 考察

90年代半ばに CaMKKαと CaMKKβは CaMKI および CaMKIV の活性化リン酸化酵素 として同定された(23-27)。CaMKK の触媒領域(rat CaMKK α 126-434, rat CaMKK β 162-470)内には、CaMKK 特有の RP domain (Arg-Pro rich domain)が存在する。この RP domain を欠損した CaMKK は CaMKI や CaMKIV をリン酸化できなくなる。一方、合成 ペプチドのリン酸化や自己リン酸化は行えることから、RP domain は CaMKI と CaMKIV 特異的な基質認識に重要であると考えられる(100)。これまで、Ca²+/CaM による CaMKK の活性化メカニズム(28,30,31)や、CaMKKβ特有の N 末端制御領域(129-151)による Ca²⁺/CaM 非存在下におけるリン酸化活性(Autonomous activity)メカニズム(28)などは明 らかにされてきたが、CaMKK による基質認識機構については未解明な点が多い。一方これ までの先行研究より、AMPK α Thr¹⁷²をリン酸化するのは CaMKK α ではなく、CaMKK β であると考えられている(34–36)。CaMKKαとCaMKKβの両アイソフォームが CaMKI や CaMKIV をリン酸化するのに対し、AMPK に対しては CaMKK アイソフォーム間で異なる 基質認識を持っていることから、CaMKK アイソフォームは酵素機能に重複性(redundancy) を持つが、一部の機能において異なる特異的活性化機能(specificity)を持つと考えられる。 さらに、この CaMKK アイソフォーム間で異なる AMPK 認識は、CaMKK β と AMPK が安 定的な複合体を形成するためであると報告されたが(101)、この認識に安定的な複合体は形 成しないという報告もある(102)。本研究において CaMKKβによるアイソフォーム間にお ける AMPK 認識の差は AMPK に対する 9 倍近い親和性の差であることが示された(Fig. 2 A)。また様々な CaMKK キメラ変異体を用いて AMPK へのリン酸化活性を測定することで、 CaMKK β による AMPK 認識には CaMKK β Lue³⁵⁸ が AMPK に対する高い親和性に重要で あることを示した(Fig. 2B)。このLeu³⁵⁸残基は多くの哺乳類のCaMKKβで保存されており、

線虫における CaMKK α と CaMKK β の相同遺伝子産物である ckk-1 においても、この Lue 残基が保存されている。このことは ckk-1/akk (AMPK)経路は線虫にまで保存されているの かもしれない(81,82)。また本研究の結果と同様に、subdomain VIII 内のこのアミノ酸残基 は MAPK/ERK kinase1 (MEKK1)の基質に対する親和性に重要であることが示されている ことから(103)、基質認識に重要な領域と考えられる。最近の研究から CaMKK β /AMPK 経 路の破綻(CaMKK β の過剰発現による過度な AMPK シグナル伝達機構の活性化)はエネルギ ー代謝異常を引き起こすことで、エネルギー消費を大量に必要とするがん細胞増殖への関 与が示唆されている(79,104)。そのため、CaMKK による AMPK 認識機構の分子レベルで の解明は、STO-609 に代わる CaMKK β /AMPK 経路を阻害する新たな特異的 CaMKK 阻害 剤の開発、すなわち代謝経路を標的とする抗がん剤の創薬理論の確立に繋がることが期待 される。 4. 謝辞

はじめに、本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導と本論文の主査のみならず、 研究面以外のサポートをしていただきました岡山大学大学院 自然科学研究科 細胞機能 設計学研究室 徳光 浩教授には厚く御礼申し上げます。本論文の副査をして頂いた岡山 大学大学院 自然科学研究科 生体分子工学研究室 大槻 高文 教授ならびに、岡山大 学大学院 自然科学研究科 生体機能分子設計学研究室 世良 貴史教授には本論文の完 遂にあたり、様々なご協力とご指導をしていただきましたことを心より感謝申し上げます。

研究面ならびに研究面以外のサポートと日頃から多くの助言と指導をしていただいた、 岡山大学大学院 自然科学研究科 細胞機能設計学研究室 金山直樹 准教授、曲 正樹 助教には心より感謝申し上げます。また本論文の完遂にあたり様々なご支援とご協力をし て頂いた、平田 裕子 技術職員に深く感謝申し上げます。また多くのご協力とサポート をして頂いた細胞機能設計学研究室の皆様の助けにより、本論文を完遂できましたことを 心より感謝申し上げます。

最後に、長きに渡り、学生生活の支援ならびに本研究の完遂に集中させて頂いた、両親 ならびに家族の皆様に心から感謝申し上げます。

5. 発表論文

- Fujiwara Y, Hiraoka Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H.
 "Analysis of Distinct Roles of CaMKK Isoforms Using STO-609-Resistant Mutants in Living Cells." *Biochemistry.* 2015, 54(25), 3969–77.
- (2) Fujiwara Y, Kawaguchi Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H.
 "Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca2+/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms." *J Biol Chem.* 2016, 291(26), 13802–8.
- (3) Nakanishi A, Hatano N, Fujiwara Y, Sha'ri A, Takabatake S, Akano H, Kanayama N, Magari M, Nozaki N, Tokumitsu H."AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the

Ca²⁺/calmodulin (CaM) dependence of Ca²⁺/CaM-dependent protein kinase kinase β ." *J Biol Chem.* 2017, 292(48), 19804–13.

6. 引用文献

- Rasmussen H. "Cell Communication, Calcium Ion, and Cyclic Adenosine Monophosphate." *Science*. 1970, 170(3956), 404–12.
- Bagur R, Hajnóczky G. "Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling." *Mol Cell.* 2017, 66(6), 780–8.
- Carafoli E, Krebs J. "Why calcium? How calcium became the best communicator." J Biol Chem. 2016, 291(40), 20849–57.
- Tidow H, Nissen P. "Structural diversity of calmodulin binding to its target sites." *FEBS J.* 2013, 280(21), 5551–65.
- 5. Hoeflich KP, Ikura M. "Calmodulin in action: Diversity in target recognition and activation mechanisms." *Cell.* 2002, 108(6), 739–42.
- Copley RR, Schultz J, Ponting CP, Bork P. "Protein families in multicellular organisms." *Curr Opin Struct Biol.* 1999, 9(3), 408–15.
- Babu YS, Sack JS, Greenhough TJ, Bugg CE, Means AR, Cook WJ.
 "Three-dimensional structure of calmodulin." *Nature*. 1985, 315(6014), 37–40.
- 8. Chattopadhyaya R, Meador WE, Means AR, Quiocho FA. "Calmodulin structure refined at 1.7 A resolution." *J Mol Biol.* 1992, 228(4), 1177–92.
- Babu YS, Bugg CE, Cook WJ. "Structure of calmodulin refined at 2.2 A resolution." *J Mol Biol.* 1988, 204(1), 191–204.
- Manning G. "The Protein Kinase Complement of the Human Genome." *Science*. 2002, 298(5600), 1912–34.
- 11. Hanks SK, Hunter T. "The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domam structure and classification." *FASEB J.* 1995, 9(8), 576–96.
- 12. Hanks S, Quinn A, Hunter T. "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." *Science*. 1988, 241(4861), 42–52.
- Soderling TR, Stull JT. "Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases." *Chem Rev.* 2001, 101(8), 2341–52.
- Swulius MT, Waxham MN. "Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinases." *Cell Mol Life Sci*. 2008, 65(17), 2637–57.
- Fischer EH, Krebs EG. "Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts." *J Biol Chem.* 1955, 216(1), 121–32.

- 16. Krebs EG, Fischer EH. "The phosphorylase b to a converting enzyme of rabbit skeletal muscle." *Biochim Biophys Acta*. 1956, 20(1), 150–7.
- Cohen P, Burchell A, Foulkes JG, Cohen PT, Vanaman TC, Nairn C. "Identification of the Ca²⁺-dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase." *FEBS Lett.* 1978, 92(2), 287–93.
- Kamm KE, Stull JT. "Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions." *J Biol Chem*. 2001, 276(7), 4527–30.
- Palfrey HC. "Presence in many mammalian tissues of an identical major cytosolic substrate (Mr 100 000) for calmodulin-dependent protein kinase." *FEBS Lett.* 1983, 157(1), 183–90.
- Nairn AC, Bhagat B, Palfrey HC. "Identification of calmodulin-dependent protein kinase III and its major Mr 100,000 substrate in mammalian tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985, 82(23), 7939–43.
- Nairn AC, Palfrey HC. "Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2." *J Biol Chem*. 1987, 262(36), 17299–303.
- Giese KP, Fedorov NB, Filipkowski RK, Silva AJ. "Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning." *Science*. 1998, 279(5352), 870–3.
- Anderson KA, Means RL, Huang QH, Kemp BE, Goldstein EG, Selbert MA, Edelman AM, Fremeau RT, Means AR. "Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β." *J Biol Chem*. 1998, 273(48), 31880–9.
- 24. Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. "Molecular cloning of $Ca^{2+}/calmodulin-dependent$ protein kinase kinase β ." *J Biochem*. 1997, 122(1), 243–50.
- 25. Tokumitsu H, Brickey DA, Glod J, Hidaka H, Sikela J, Soderling TR. "Activation mechanisms for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Identification of a brain CaM-kinase IV kinase." *J Biol Chem.* 1994, 269(46), 28640–7.
- Tokumitsu H, Enslen H, Soderling TR. "Characterization of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning and expression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase." *J Biol Chem*. 1995, 270(33), 19320–4.

- Lee JC, Edelman AM. "Activation of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator." *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, 210(2), 631–7.
- Tokumitsu H, Iwabu M, Ishikawa Y, Kobayashi R. "Differential regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase isoforms." *Biochemistry*. 2001, 40(46), 13925–32.
- 29. Tokumitsu H, Wayman GA, Muramatsu M, Soderling TR.
 "Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase: identification of regulatory domains." *Biochemistry*. 1997, 36(42), 12823–7.
- Tokumitsu H, Muramatsu M a, Ikura M, Kobayashi R. "Regulatory mechanism of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase." *J Biol Chem*. 2000, 275(26), 20090–5.
- 31. Tokumitsu H, Soderling TR. "Requirements for calcium and calmodulin in the calmodulin kinase activation cascade." *J Biol Chem*. 1996, 271(10), 5617–22.
- 32. Selbert MA, Anderson KA, Huang QH, Goldstein EG, Means AR, Edelman AM.
 "Phosphorylation and activation of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV by Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase Ia kinase. Phosphorylation of threonine 196 is essential for activation." *J Biol Chem.* 1995, 270(29), 17616–21.
- 33. Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR. "Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway." *Nature*. 1998, 396(6711), 584–7.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong S-P, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab.* 2005, 2(1), 21–33.
- 35. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." *Cell Metab.* 2005, 2(1), 9–19.
- Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR, Witters LA. "The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases." *J Biol Chem.* 2005, 280(32), 29060–6.
- 37. Nairn AC, Greengard P. "Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I from bovine brain." *J Biol Chem*. 1987, 262(15), 7273–81.

- Yokokura H, Terada O, Naito Y, Hidaka H. "Isolation and comparison of rat cDNAs encoding Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I isoforms." *Biochim Biophys Acta*. 1997, 1338(1), 8–12.
- Takemoto-Kimura S, Terai H, Takamoto M, Ohmae S, Kikumura S, Segi E, Arakawa Y, Furuyashiki T, Narumiya S, Bito H. "Molecular cloning and characterization of CLICK-III/CaMKI y, a novel membrane-anchored neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK)." *J Biol Chem*. 2003, 278(20), 18597–605.
- 40. Ishikawa Y, Tokumitsu H, Inuzuka H, Murata-Hori M, Hosoya H, Kobayashi R.
 "Identification and characterization of novel components of a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade in HeLa cells." *FEBS Lett.* 2003, 550(1–3), 57–63.
- 41. Takemoto-Kimura S, Ageta-Ishihara N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, Bito H. "Regulation of dendritogenesis via a lipid-raft-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI γ ." *Neuron*. 2007, 54(5), 755–70.
- 42. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME. "CREB: a Ca²⁺-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases." *Science*. 1991, 252(5011), 1427–30.
- 43. Qin H, Raught B, Sonenberg N, Goldstein EG, Edelman AM. "Phosphorylation Screening Identifies Translational Initiation Factor 4GII as an Intracellular Target of Ca²⁺ /Calmodulin-dependent Protein Kinase I." *J Biol Chem*. 2003, 278(49), 48570–9.
- 44. Suizu F, Fukuta Y, Ueda K, Iwasaki T, Tokumitsu H, Hosoya H. "Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I as a myosin II regulatory light chain kinase in vitro and in vivo." *Biochem J*. 2002, 367(Pt 2), 335–45.
- 45. Tokumitsu H, Hatano N, Inuzuka H, Sueyoshi Y, Yokokura S, Ichimura T, Nozaki N, Kobayashi R. "Phosphorylation of Numb family proteins. Possible involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases." *J Biol Chem*. 2005, 280(42), 35108–18.

- 46. Tokumitsu H, Hatano N, Yokokura S, Sueyoshi Y, Nozaki N, Kobayashi R.
 "Phosphorylation of Numb regulates its interaction with the clathrin-associated adaptor AP-2." *FEBS Lett.* 2006, 580(24), 5797–801.
- 47. Sakagami H, Kondo H. "Cloning and sequencing of a gene encoding the beta polypeptide of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV and its expression confined to the mature cerebellar granule cells." *Brain Res Mol Brain Res.* 1993, 19(3), 215–8.
- Ohmstede CA, Jensen KF, Sahyoun NE. "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase enriched in cerebellar granule cells. Identification of a novel neuronal calmodulin-dependent protein kinase." *J Biol Chem*. 1989, 264(10), 5866–75.
- 49. Tokumitsu H, Hatano N, Inuzuka H, Yokokura S, Nozaki N, Kobayashi R.
 "Mechanism of the generation of autonomous activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV." *J Biol Chem*. 2004, 279(39), 40296–302.
- 50. Kotera I, Sekimoto T, Miyamoto Y, Saiwaki T, Nagoshi E, Sakagami H, Kondo H, Yoneda Y. "Importin α transports CaMKIV to the nucleus without utilizing importin β ." *EMBO J.* 2005, 24(5), 942–51.
- 51. Nakamura Y, Okuno S, Sato F, Fujisawa H. "An immunohistochemical study of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV in the rat central nervous system: light and electron microscopic observations." *Neuroscience*. 1995, 68(1), 181–94.
- 52. Enslen H, Sun P, Brickey D, Soderling SH, Klamo E, Soderling TR. "Characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation." *J Biol Chem.* 1994, 269(22), 15520–7.
- 53. Miranti CK, Ginty DD, Huang G, Chatila T, Greenberg ME. "Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase." *Mol Cell Biol.* 1995, 15(7), 3672–84.
- 54. Miska EA, Langley E, Wolf D, Karlsson C, Pines J, Kouzarides T. "Differential localization of HDAC4 orchestrates muscle differentiation." *Nucleic Acids Res.* 2001, 29(16), 3439–47.
- 55. Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. "Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure." *Eur J Biochem*. 1994, 223(2), 351–7.

- 56. Stapleton D, Gao G, Michell BJ, Widmer J, Mitchelhill K, Teh T, House CM, Witters LA, Kemp BE. "Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase." *J Biol Chem*. 1994, 269(47), 29343–6.
- 57. Carling D, Aguan K, Woods A, Verhoeven AJ, Beri RK, Brennan CH, Sidebottom C, Davison MD, Scott J. "Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism." *J Biol Chem.* 1994, 269(15), 11442–8.
- Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. "Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase." *J Biol Chem.* 2006, 281(43), 32207–16.
- 59. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. "Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade." *J Biol.* 2003, 2(4), 28.
- Momcilovic M, Hong S-P, Carlson M. "Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro." *J Biol Chem.* 2006, 281(35), 25336–43.
- Davies SP, Sim ATR, Hardie DG. "Location and function of three sites phosphorylated on rat acetyl-CoA carboxylase by the AMP-activated protein kinase." *Eur J Biochem*. 1990, 187(1), 183–90.
- 62. Ha J, Daniel S, Broyles SS, Kim KH. "Critical phosphorylation sites for acetyl-CoA carboxylase activity." *J Biol Chem.* 1994, 269(35), 22162–8.
- Clarke PR, Hardie DG. "Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver." *EMBO J.* 1990, 9(8), 2439–46.
- 64. Carling D, Hardie DG. "The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase."
 Biochim Biophys Acta. 1989, 1012(1), 81–6.
- McGee SL, van Denderen BJW, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. "AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5." *Diabetes*. 2008, 57(4), 860–7.

- 66. Chavez JA, Roach WG, Keller SR, Lane WS, Lienhard GE. "Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation." *J Biol Chem.* 2008, 283(14), 9187–95.
- 67. Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D, Hue L. "Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia." *Curr Biol*. 2000, 10(20), 1247–55.
- Aguilar V, Alliouachene S, Sotiropoulos A, Sobering A, Athea Y, Djouadi F, Miraux S, Thiaudière E, Foretz M, Viollet B, Diolez P, Bastin J, Benit P, Rustin P, Carling D, Sandri M, Ventura-Clapier R, Pende M. "S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase." *Cell Metab*. 2007, 5(6), 476–87.
- 69. Cota D, Proulx K, Smith KAB, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ.
 "Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake." *Science*. 2006, 312(5775), 927–30.
- Wong P-M, Feng Y, Wang J, Shi R, Jiang X. "Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A." *Nat Commun*. 2015, 6(1), 8048.
- Steinberg GR, Kemp BE. "AMPK in Health and Disease." *Physiol Rev.* 2009, 89(3), 1025–78.
- 72. Dhar M, Wayman GA, Zhu M, Lambert TJ, Davare MA, Appleyard SM.
 "Leptin-induced spine formation requires TrpC channels and the CaM kinase cascade in the hippocampus." *J Neurosci*. 2014, 34(30), 10022–33.
- 73. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H. "Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade." *J Neurosci*. 2009, 29(43), 13720–9.
- Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR. "Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I." *J Neurosci.* 2010, 30(35), 11565–75.

- 75. Bito H, Deisseroth K, Tsien RW. "CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression." *Cell*. 1996, 87(7), 1203–14.
- 76. Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E. "Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β)." *J Biol Chem.* 2012, 287(46), 38625–36.
- 77. Anderson KA, Ribar TJ, Lin F, Noeldner PK, Green MF, Muehlbauer MJ, Witters LA, Kemp BE, Means AR. "Hypothalamic CaMKK2 contributes to the regulation of energy balance." *Cell Metab.* 2008, 7(5), 377–88.
- 78. Lin F, Marcelo KL, Rajapakshe K, Coarfa C, Dean A, Wilganowski N, Robinson H, Sevick E, Bissig K-D, Goldie LC, Means AR, York B. "The camKK2/camKIV relay is an essential regulator of hepatic cancer." *Hepatology*. 2015, 62(2), 505–20.
- 79. Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, Warren A, Scott H, Madhu B, Sharma N, Bon H, Zecchini V, Smith D-M, DeNicola GM, Mathews N, Osborne M, Hadfield J, MacArthur S, Adryan B, Lyons SK, Brindle KM, Griffiths J, Gleave ME, Rennie PS, Neal DE, Mills IG. "The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis." *EMBO J*. 2011, 30(13), 2719–33.
- 80. Jin L, Chun J, Pan C, Kumar A, Zhang G, Ha Y, Li D, Alesi GN, Kang Y, Zhou L, Yu W-M, Magliocca KR, Khuri FR, Qu C-K, Metallo C, Owonikoko TK, Kang S. "The PLAG1-GDH1 Axis Promotes Anoikis Resistance and Tumor Metastasis through CamKK2-AMPK Signaling in LKB1-Deficient Lung Cancer." *Mol Cell*. 2018, 69(1), 87–99.e7.
- 81. Eto K, Takahashi N, Kimura Y, Masuho Y, Arai K, Muramatsu MA, Tokumitsu H.
 "Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase cascade in Caenorhabditis elegans.
 Implication in transcriptional activation." *J Biol Chem*. 1999, 274(32), 22556–62.
- Kimura Y, Corcoran EE, Eto K, Gengyo-Ando K, Muramatsu M-A, Kobayashi R, Freedman JH, Mitani S, Hagiwara M, Means AR, Tokumitsu H. "A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of Caenorhabditis elegans." *EMBO Rep.* 2002, 3(10), 962–6.
- Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Ikeda M, Saji I, Kobayashi R. "STO-609, a specific inhibitor of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase." *J Biol Chem*. 2002, 277(18), 15813–8.

- 84. Kukimoto-Niino M, Yoshikawa S, Takagi T, Ohsawa N, Tomabechi Y, Terada T, Shirouzu M, Suzuki A, Lee S, Yamauchi T, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Kadowaki T, Minokoshi Y, Yokoyama S. "Crystal structure of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase in complex with the inhibitor STO-609." *J Biol Chem*. 2011, 286(25), 22570–9.
- 85. Tokumitsu H, Inuzuka H, Ishikawa Y, Kobayashi R. "A Single Amino Acid Difference between α and β Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Dictates Sensitivity to the Specific Inhibitor, STO-609." *J Biol Chem*. 2003, 278(13), 10908–13.
- Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie CJ, McLauchlan H, Klevernic I, Arthur JSC, Alessi DR, Cohen P. "The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update." *Biochem J.* 2007, 408(3), 297–315.
- 87. Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG. "5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms." *J Biol Chem*. 1995, 270(45), 27186–91.
- Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR. "Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I." *J Neurosci*. 2004, 24(15), 3786–94.
- Saneyoshi T, Wayman G, Fortin D, Davare M, Hoshi N, Nozaki N, Natsume T, Soderling TR. "Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/β PIX signaling complex." *Neuron*. 2008, 57(1), 94–107.
- 90. Sato K, Suematsu A, Nakashima T, Takemoto-Kimura S, Aoki K, Morishita Y, Asahara H, Ohya K, Yamaguchi A, Takai T, Kodama T, Chatila TA, Bito H, Takayanagi H. "Regulation of osteoclast differentiation and function by the CaMK-CREB pathway." *Nat Med.* 2006, 12(12), 1410–6.
- 91. Hayashi N, Matsubara M, Takasaki A, Titani K, Taniguchi H. "An expression system of rat calmodulin using T7 phage promoter in Escherichia coli." *Protein Expr Purif.* 1998, 12(1), 25–8.
- 92. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." *Nat Methods.* 2012, 9(7), 671–5.

- 93. Tokumitsu H, Hatano N, Tsuchiya M, Yurimoto S, Fujimoto T, Ohara N, Kobayashi R, Sakagami H. "Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein." *Biochem J.* 2010, 431(1), 81–91.
- 94. Ma Z, Wen D, Wang X, Yang L, Liu T, Liu J, Zhu J. "Growth inhibition of human gastric adenocarcinoma cells in vitro by STO-609 is independent of calcium / calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta and adenosine monophosphate-activated protein kinase." 2016, 8(2), 1164–71.
- 95. Yamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H. "Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase-β." *Mol Endocrinol.* 2008, 22(4), 893–903.
- 96. Neumann D, Woods A, Carling D, Wallimann T, Schlattner U. "Mammalian AMP-activated protein kinase: functional, heterotrimeric complexes by co-expression of subunits in Escherichia coli." *Protein Expr Purif.* 2003, 30(2), 230–7.
- 97. Fujiwara Y, Hiraoka Y, Fujimoto T, Kanayama N, Magari M, Tokumitsu H. "Analysis of Distinct Roles of CaMKK Isoforms Using STO-609-Resistant Mutants in Living Cells." *Biochemistry*. 2015, 54(25), 3969–77.
- 98. Osawa M, Tokumitsu H, Swindells MB, Kurihara H, Orita M, Shibanuma T, Furuya T, Ikura M. "A novel target recognition revealed by calmodulin in complex with Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase kinase." *Nat Struct Biol.* 1999, 6(9), 819–24.
- 99. Matsushita M, Nairn AC. "Inhibition of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I cascade by cAMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem*. 1999, 274(15), 10086–93.
- 100. Tokumitsu H, Takahashi N, Eto K, Yano S, Soderling TR, Muramatsu M. "Substrate recognition by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. Role of the arg-pro-rich insert domain." *J Biol Chem.* 1999, 274(22), 15803–10.
- 101. Green MF, Anderson KA, Means AR. "Characterization of the CaMKKβ-AMPK signaling complex." *Cell Signal*. 2011, 23(12), 2005–12.
- 102. Fogarty S, Hawley SA, Green KA, Saner N, Mustard KJ, Hardie DG.
 "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca²⁺ and AMP." *Biochem J*. 2010, 426(1), 109–18.

- Tu Z, Lee FS. "Subdomain VIII is a specificity-determining region in MEKK1." *J Biol Chem.* 2003, 278(48), 48498–505.
- 104. O'Brien MT, Oakhill JS, Ling NXY, Langendorf CG, Hoque A, Dite TA, Means AR, Kemp BE, Scott JW. "Impact of Genetic Variation on Human CaMKK2 Regulation by Ca²⁺-Calmodulin and Multisite Phosphorylation." *Sci Rep.* 2017, 7(September 2016), 43264.