

## 高活性かつ安定型 CaMKI $\delta$ の 大腸菌発現系を用いた大量調製

SATテクノロジー・ショーケース2017

### ■ はじめに

現在、動物細胞中のタンパク質の1/3以上がリン酸化による制御を受けているとされている。そのため、タンパク質を幅広くリン酸化できる“リン酸化試薬”としてのプロテインキナーゼは、リン酸化タンパク質の機能解析を行う上で非常に有用なツールとなる。しかし、これまでタンパク質の“リン酸化試薬”として、取り扱いが容易かつ簡単に入手できるものは Protein kinase A の触媒サブユニット (PKAc) のみであり、基質特異性の異なる別の多機能性プロテインキナーゼについても同様の“試薬”としての開発が強く望まれている。そこで本研究では、当研究室で以前ゼブラフィッシュ胚発生過程において重要な役割を担う酵素として同定したCa<sup>2+</sup>/calmodulin依存性プロテインキナーゼI  $\delta$  (CaMKI  $\delta$ ) について“リン酸化試薬”としての開発を試みた。

### ■ 活動内容

#### 1. CaMKI $\delta$ の活性断片の作製

CaMKI  $\delta$  はC末に調節領域が存在していることから、調節領域を欠損させた変異体CaMKI  $\delta$  (1-299)を作製した。

#### 2. CaMKI $\delta$ (1-299)の性質の評価 (表)

作製したCaMKI  $\delta$  (1-299)を大腸菌で発現させ、収量、比活性、熱安定性および基質特異性について調べた。比較対象としては、一般に販売・利用されている“リン酸化試薬”であるPKAcを用いた。

##### ●収量

大腸菌1 Lより220 mgと、簡便かつ大量に取得できた。

##### ●比活性

CaMKI  $\delta$  (1-299)の方が高い比活性を示した。

##### ●酵素の安定性

CaMKI  $\delta$  (1-299)は熱・凍結融解に対して安定だった。

##### ●基質特異性

PKAcがリン酸化しないタンパク質をリン酸化した。

### 3. まとめ

CaMKI  $\delta$  (1-299)、PKAcの特徴をまとめてみたところ、本研究で作製したCaMKI  $\delta$  (1-299)は、PKAcと比較して簡便かつ大量に精製でき、比活性も安定性も高い、取り扱いやすい“リン酸化試薬”となることが示された(表)。また、CaMKI  $\delta$  (1-299)はPKAcとは異なる基質をリン酸化できることから、PKAcと相補的に、または組み合わせて用いることで、より様々なタンパク質をリン酸化できると考えられる。

### ■ 関連情報等(特許関係、施設)

#### ・特許関係

香川大 (秋月一駿、片山 将一、末吉 紀行、亀下 勇)、  
広島大 (石田 敦彦)、産総研 (千賀 由佳子、茂里 康)  
の共同出願、「カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化  
酵素 I 由来ポリペプチド、リン酸化剤、および製造方法」  
特願 2016-095770

#### ・施設等

香川大学  
産総研四国センター

表. CaMKI $\delta$ (1-299)とPKAcの比較

	収量 (mg/L)	安定性	比活性 (nmol/min/mg)	基質特異性 (等電点)
CaMKI $\delta$ (1-299)	220	凍結融解: ○ 40°C: ○	3.59	塩基性 (9-10)
PKAc	10	凍結融解: △ 40°C: x	0.78	酸性~中性 (2-6)

↑ 大量に取れる    ↑ 凍結融解・熱に安定    ↑ 高活性    ↑ PKAcとは異なる基質特異性

代表発表者 **秋月 一駿 (あきづき かずとし)**  
所 属 **香川大学大学院  
機能生化学(末吉)研究室**  
問合せ先 **〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393  
TEL:087-891-3114 FAX:087-891-3114  
香川大学大学院 農学研究科**

■キーワード: (1)タンパク質リン酸化  
(2)プロテインキナーゼ  
(3)大腸菌発現系  
■共同研究者: 茂里 康 (産総研・健康工学)  
末吉 紀行 (香川大・農)