

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07383

研究課題名(和文) 蛋白質リン酸化酵素の基質認識・活性調節機構とリン酸化シグナルネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of substrate recognition and regulatory mechanisms for protein kinases.

研究代表者

天野 睦紀 (Amano, Mutsuki)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90304170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、プロテインキナーゼの基質認識機構、活性調節機構の解析を行い、またその生理機能や疾患との関わりを明らかにすることを目的とした。Rho-kinaseとその基質であるMYPT1を用いて、MYPT1のリン酸化部位の周囲にある特定の配列(DM)がリン酸化位置の選択・リン酸化効率に重要な役割を果たすことを見出した。また、15種のキナーゼ基質スクリーニングデータを用いたシミュレーション解析から、長い天然変性領域が有意にリン酸化を受けやすいことを示した。さらに、MAPK-Npas4/MKL2(線条体)、PKN-MKL1(心臓)等のキナーゼ・基質同定、機能解析を行い、疾患との関わりを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質リン酸化は細胞内シグナル伝達に中心的な役割を果たし、生理機能のみならず種々の疾患に深く関わっている。本研究では、独自に開発したキナーゼ基質スクリーニング法(KISS法)より得られたデータを基に、リン酸化シグナルを理解するための分子基盤(キナーゼの基質認識機構)、および種々のキナーゼ・基質シグナルの疾患への関わりについて理解を深めることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed substrate recognition and regulatory mechanisms of protein kinases, as well as physiological and pathological functions. We identified the specific sequences of MYPT1, a substrate for Rho-kinase, as docking motifs (DMs) conferring selectivity and efficiency of phosphorylation by Rho-kinase. We also found that longer intrinsically disordered regions (IDRs) are preferably phosphorylated by stochastic simulation model using our screening dataset for 15 protein kinases. In addition, functional analyses revealed that MAPK-Npas4/MKL2 (mouse striatal neurons) and PKN-MKL1 (mouse heart) signals are involved in dopamine-induced gene expression and stress-induced cardiac dysfunction, respectively.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：リン酸化 プロテインキナーゼ 細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は細胞内において重要なシグナル伝達手段であり、多数のプロテインキナーゼ(以下、キナーゼとする)とホスファターゼがシグナル経路とリンクしながら、複数の基質タンパク質をリン酸化することでシグナルネットワークを形成し、生理機能を遂行する。一方でリン酸化シグナルネットワークの異常が様々な疾患発症や進行に関わる例が多く知られている。細胞外シグナル・受容体から個々のキナーゼに至るまでの細胞内シグナル経路の解析に比べると、キナーゼから下流のシグナル経路についての理解は未だ十分とは言えない。リン酸化プロテオミクス技術の進歩により同定された生体内のリン酸化部位の数は漸増しているものの、いずれのキナーゼがそのリン酸化を担うのかについてはほとんど明らかにされていない。リン酸化シグナルネットワークの解析において、キナーゼと基質タンパク質の紐付けは長らくボトルネックであった。

2. 研究の目的

我々は、タンパク質間相互作用を利用したキナーゼ基質のスクリーニング法(KISS法、KIOSS法; 図1)を開発して複数のキナーゼの基質スクリーニングを行い、得られたデータを独自に構築したリン酸化データベース「KANPHOS」に登録してきた。本研究課題では、ヒト疾患(循環器疾患、がん、精神・神経疾患等)の発症や進行、治療に関連するリン酸化シグナルネットワークの全体像を理解するための分子基盤を構築することを目的とする。疾患に関連するキナーゼについてリン酸化プロテオミクスやバイオインフォマティクスの手法を基盤とした解析を行い、これらの情報を基に、キナーゼが機能を発揮するためのキナーゼの基質認識機構の解析、およびキナーゼの活性調節・モニタリングツールを開発すると共に、疾患モデルにおけるリン酸化シグナルを解析することで、タンパク質リン酸化シグナルネットワークの解明を目指す。

具体的には、(1)キナーゼの基質認識機構の解析、(2)キナーゼの活性調節・モニターツールの開発、(3)キナーゼ-基質シグナルの生理機能解析、を行う。

3. 研究の方法

(1) キナーゼの基質認識機構の解析

キナーゼがどのような基質をリン酸化するか、リン酸化部位周囲の配列(コンセンサス配列)については解析が進んでいるが、一方で複数のキナーゼが類似したコンセンサス配列を持ち、リン酸化部位からその責任キナーゼを予測するのは困難である。実際に、KISS法によって得られたRho-kinase, PKA, PKNのリン酸化配列は非常に似通っていたが(図2)、大半は異なるタンパク質をリン酸化しており、これらのキナーゼはリン酸化部位周辺配列に加えて何らかの他の基質情報を認識していると推察される。MAPKファミリーは触媒領域の活性中心でリン酸化部位(PS)を認識すると共に、ドッキングサイト(DS)と呼ばれる領域でも基質のドッキングモチーフ(DM)と呼ばれる配列を認識することが知られているが、Rho-kinase, PKA, PKNにもこのような機構があると考え、Rho-kinaseとその基質MYPT1をモデルとして、DM様の領域の探索を試みる。また、スクリーニングより得られた「キナーゼ-基質」のデータセットについて*in silico*解析を行い、何らかの共通項・特異性が認められるか検討する。

図1: キナーゼ基質スクリーニング法

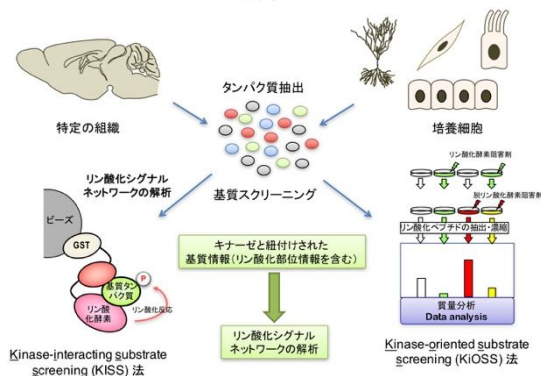
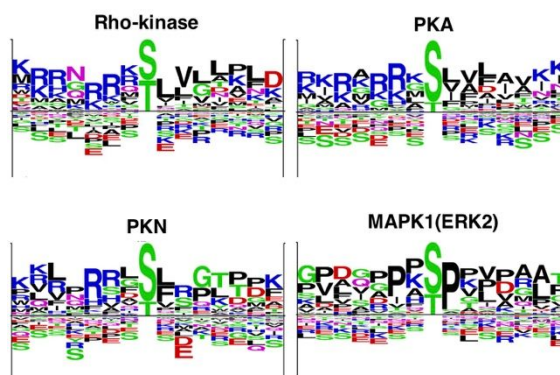


図2: KISS法によって同定されたリン酸化ペプチド配列のアラインメント



(2) キナーゼの活性調節・モニターツールの開発

(1)で得られた情報を基に、キナーゼの活性調節・モニターツールの開発を試みる。

(3) キナーゼ-基質シグナルの生理機能解析

連携研究者、研究協力者とともに疾患モデル系におけるリン酸化シグナル解析を行い、キナーゼ-基質シグナル経路の生理機能・疾患との関わりを調べる。

4. 研究成果

(1) キナーゼの基質認識機構の解析

Rho-kinase とその基質である MYPT1 について、MYPT1 の様々な変異体を作製して Rho-kinase との相互作用を調べたところ、欠失により Rho-kinase との結合が低下する領域を 3箇所見出した (DM1-3: 図3、4)。DM を欠く MYPT1 断片は、*in vitro* で Rho-kinase によるリン酸化が低下した。また DM 欠失 MYPT1 と Rho-kinase を COS 細胞に共発現させると、DM の欠失により近傍の部位のリン酸化が低減することが示された (図4) (投稿準備中)。得られた DM 配列を基に、前橋工科大学の福地博士、名古屋大学の太田博士らと共同で Rho-kinase によるリン酸化部位の予測アルゴリズムの構築を試みたが、DM 同士の類似性が低く (少なくとも 2 種類の DM があると推測)、現時点では予測精度が低かったため、今後予測精度の向上を目指す。

図3: Rho-kinaseによる基質 (MYPT1) の認識機構

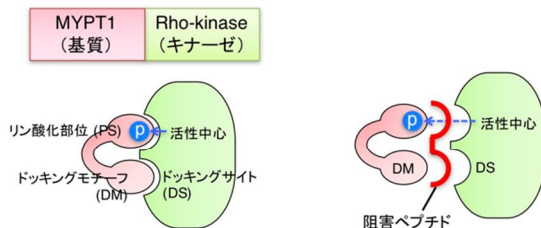
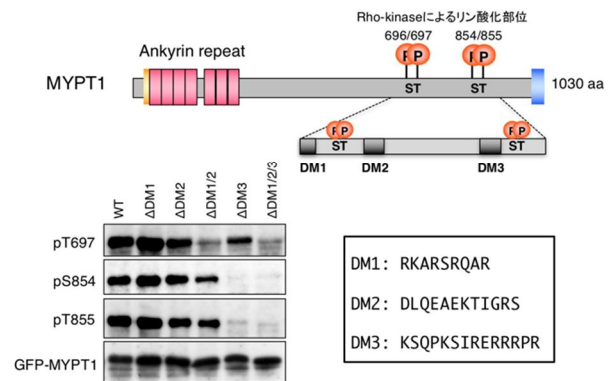


図4: MYPT1のRho-kinaseドッキングモチーフ(DM)



KISS 法を用いて得られた 15 種のキナーゼの基質候補アミノ酸配列情報から、名古屋大学の太田博士らと共同で、主に天然変性領域に注目して情報科学的手法によりその特徴の抽出を試みた。その結果、キナーゼの種類によらず、基質の長い天然変性領域が有意にリン酸化を受けていることを見出し、またシミュレーション解析からもリン酸化がランダムに起こっているのではなく、天然変性領域の長さがリン酸化位置決定のパラメータのひとつであることが強く示唆された (Koike *et al.* Protein Sci, 2019)。

(2) キナーゼの活性調節・モニターツールの開発

(1) の解析より、MYPT1 の PS (リン酸化部位をアラニンに置換)+DM 配列の合成ペプチドが *in vitro* で Rho-kinase の活性を阻害することを見出した (図3)。一方で、PS のみ、DM のみのペプチドでは阻害効果はほとんど認められなかった。今後、PS+DM ペプチドが細胞・組織においても Rho-kinase 阻害効果を呈するか、またこの領域を用いてキナーゼ特異性の高い活性モニターツールに応用できるか、検討する。

(3) キナーゼ-基質シグナルの生理機能解析

名古屋大学貝淵博士らと共同で、線条体神経細胞における MAPK-Npas4/MKL2 シグナル解析を行った。マウス脳線条体において、ドパミン I 型受容体発現中型有棘神経細胞はドパミンの下流で快情動の制御に関わる。ドパミンシグナルの下流で MAPK が転写因子 Npas4 や転写共役因子 MKL2 をリン酸化し、転写共役因子 CBP1 との複合体形成を促進して遺伝子発現を調節することを示し、報酬関連記憶・学習行動への関与が示唆された (Funahashi *et al.* Cell Rep, 2019; Ariza *et al.* J Neurochem, 2021)。

名古屋大学竹藤博士らと共同で、心臓における PKN-MKL1 シグナル解析を行った。転写共役因子 MKL1 が PKN によってリン酸化を受けると結合タンパク質であるアクチンから解離して核内に移行し転写を亢進することを見出した。PKN の遺伝子欠損マウスを用いて、過負荷による心肥大に PKN-MKL1 シグナル経路が重要な役割を果たすことを示した (Sakaguchi *et al.* Circulation, 2019)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sekiguchi Mariko, Sobue Akira, Kushima Itaru, Wang Chenyao, Arioka Yuko, Kato Hidekazu, Kodama Akiko, Kubo Hisako, Ito Norimichi, Sawahata Masahito, Hada Kazuhiro, Ikeda Ryosuke, Shinno Mio, Mizukoshi Chikara, Tsujimura Keita, Yoshimi Akira, Ishizuka Kanako, Takasaki Yuto, Kimura Hiroki, Amano Mutsuki (29番目)、他25名	4. 巻 10
2. 論文標題 ARHGAP10, which encodes Rho GTPase-activating protein 10, is a novel gene for schizophrenia risk	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Psychiatry	6. 最初と最後の頁 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41398-020-00917-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sun Huan, Nishioka Tomoki, Hiramatsu Shun, Kondo Shu, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo, Ichinose Toshiharu, Tanimoto Hiromu	4. 巻 40
2. 論文標題 Dopamine Receptor Dop1R2 Stabilizes Appetitive Olfactory Memory through the Raf/MAPK Pathway in Drosophila	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 2935 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/Jneurosci.1572-19.2020	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ariza Anthony, Funahashi Yasuhiro, Kozawa Sachi, Omar Faruk Md., Nagai Taku, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamic subcellular localization and transcription activity of the SRF cofactor MKL2 in the striatum are regulated by MAPK	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15303	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koike Ryotaro, Amano Mutsuki, Kaibuchi Kozo, Ota Motonori	4. 巻 29
2. 論文標題 Protein kinases phosphorylate long disordered regions in intrinsically disordered proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 564 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.3789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakaguchi Teruhiro, Takefuji Mikito, Wettschureck Nina, Hamaguchi Tomonari, Amano Mutsuki, Kato Katsuhiko, Tsuda Takuma, Eguchi Shunsuke, Ishihama Sohta, Mori Yu, Yura Yoshimitsu, Yoshida Tatsuya, Unno Kazumasa, Okumura Takahiro, Ishii Hideki, Shimizu Yuki, Bando K Yasuko, Ohashi Koji, Ouchi Noriyuki, (他4名)	4. 巻 140
2. 論文標題 Protein Kinase N Promotes Stress-Induced Cardiac Dysfunction Through Phosphorylation of Myocardin-Related Transcription Factor A and Disruption of Its Interaction With Actin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 1737 ~ 1752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakamura Mari, Shiozawa Seiji, Tsuboi Daisuke, Amano Mutsuki, Watanabe Hirotaka, Maeda Sumihiro, Kimura Taeko, Yoshimatsu Sho, Kisa Fumihiko, Karch Celeste M., Miyasaka Tomohiro, Takashima Akihiko, Sahara Naruhiko, Hisanaga Shin-ichi, Ikeuchi Takeshi, Kaibuchi Kozo, Okano Hideyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathological Progression Induced by the Frontotemporal Dementia-Associated R406W Tau Mutation in Patient-Derived iPSCs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 684 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2019.08.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Amano Mutsuki, Nishioka Tomoki, Tsuboi Daisuke, Kuroda Keisuke, Funahashi Yasuhiro, Yamahashi Yukie, Kaibuchi Kozo	4. 巻 165
2. 論文標題 Comprehensive analysis of kinase-oriented phospho-signalling pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 301 ~ 307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funahashi Yasuhiro, Ariza Anthony, Emi Ryosuke, Xu Yifan, Shan Wei, Suzuki Ko, Kozawa Sachi, Ahammad Rijwan Uddin, Wu Mengya, Takano Tetsuya, Yura Yoshimitsu, Kuroda Keisuke, Nagai Taku, Amano Mutsuki, Yamada Kiyofumi, Kaibuchi Kozo	4. 巻 29
2. 論文標題 Phosphorylation of Npas4 by MAPK Regulates Reward-Related Gene Expression and Behaviors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3235 ~ 3252.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zhang XJ, Nagai T, Ahammad RU, Kuroda K, Nakamuta S, Nakano T, Yukinawa N, Funahashi Y, Yamahashi Y, Amano M, Yoshimoto J, Yamada K, and Kaibuchi K.	4. 巻 122
2. 論文標題 Balance between dopamine and adenosine signals regulates the PKA/Rap1 pathway in striatal medium spiny neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 8-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2018.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takano Tetsuya, Wu Mengya, Nakamuta Shinichi, Naoki Honda, Ishizawa Naruki, Namba Takashi, Watanabe Takashi, Xu Chundi, Hamaguchi Tomonari, Yura Yoshimitsu, Amano Mutsuki, Hahn Klaus M., Kaibuchi Kozo	4. 巻 8
2. 論文標題 Discovery of long-range inhibitory signaling to ensure single axon formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-017-00044-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fujita Kyota, Chen Xigui, Homma Hidenori, Tagawa Kazuhiko, Amano Mutsuki, Saito Ayumu, Imoto Seiya, Akatsu Hiroyasu, Hashizume Yoshio, Kaibuchi Kozo, Miyano Satoru, Okazawa Hitoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Targeting Tyro3 ameliorates a model of PGRN-mutant FTLTDP via tau-mediated synaptic pathology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-02821-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 天野睦紀、貝淵弘三
2. 発表標題 インタラクトームを基盤としたタンパク質キナーゼの基質探索
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70回日本電気泳動学会総会 合同大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野睦紀、西岡朋生、吉本潤一郎、観音隆幸、臼井支朗、貝淵弘三
2. 発表標題 KANPHOS Platform: A comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会・第19回日本タンパク質科学学会年会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野睦紀
2. 発表標題 KANPHOS Platform:S comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会 第51回日本発生生物学会合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mutsuki Amano
2. 発表標題 KANPHOS Platform: A comprehensive database for kinase-associated neural phosphorylation signaling
3. 学会等名 WCP2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 天野睦紀、西岡朋生、黒田啓介、吉本潤一郎、観音隆幸、臼井支朗、貝淵弘三
2. 発表標題 KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) Platform 新規リン酸化DBプラットフォーム
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 天野睦紀
2. 発表標題 リン酸化プロテオミクスによるニューロモジュレーターシグナルの解明
3. 学会等名 第39回神経組織培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

KANPHOS (Kinase-Associated Phospho-Signaling) https://kanphos.neuroinf.jp
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	福地 佐斗志 (Fukuchi Satoshi)		
研究協力者	太田 元規 (Ota Motonori)		
研究協力者	竹藤 幹人 (Takefuji Mikito)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	貝淵 弘三 (Kaibuchi Kozo) (00169377)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
連携研究者	西岡 朋生 (Nishioka Tomoki) (70435105)	名古屋大学・医学系研究科・助教 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関