

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14683

研究課題名（和文）新規ATPアナログによるリン酸化経路選択問題へのアプローチ

研究課題名（英文）Approach to the problem of phosphorylation routing with novel ATP analogs

研究代表者

大出 晃士 (Ode, Koji)

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：40612122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、キナーゼ特異的に進行する多重リン酸化サイトの相互依存性を系統的に解析する実験系を構築することを目的としている。技術的には、ASキナーゼを用いた新規ATPアナログの機能評価には至らず、課題が残った。一方、CaMKIIについては、新しい多重リン酸化サイトやその機能評価を行い、これまでよく理解されていた時間スケールよりも、より長い時間スケールで活性促進・抑制の双方に制御されている可能性を提示することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量分析を始めとした網羅的手法によって、特定の基質にリン酸化サイトが多数見出されている現状を鑑み、本研究では細胞内で特定の基質の多重リン酸化の相互依存性すなわち「経路」を明らかにする試みを通して、タンパク質内の複数のリン酸化サイトが織りなす経路選択問題（routing）を扱う視点を提示した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to establish an experimental system to systematically analyze the interdependence of multiple phosphorylation sites that proceed in a kinase-specific manner. Technically, we were unable to evaluate the function of the novel ATP analogues using AS kinase, which remains a challenge. On the other hand, for CaMKII, we evaluated the new multiple phosphorylation sites and their functions, presenting the possibility that the kinase is regulated by both activity promotion and repression at longer time scales than previously well understood.

研究分野：生化学

キーワード：質量分析 リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

基質タンパク質の多数の残基がリン酸化修飾されるとき(多重リン酸化) この修飾カスケードは多彩な情報処理能力を発揮することがある。とりわけ、CKI, MAPKK, PI3K, GSK-3などに見出される「リン酸化された基質依存的に異なるサイトをリン酸化する様式(ordered/hierarchical phosphorylation)」は、特定の基質局所に多重リン酸化を効率誘導することができ、その反応機構のモデル化や動態解析が盛んに研究されている(Ferrell and Ha, Trends Biochem. Sci. 2014)。研究代表者らは、このような様式での多重リン酸化が、非線形な生化学応答の源泉となり自律振動子や自律空間パターンを形成できることを理論的に示し(Cell Rep. 2012; Cell Rep. 2017) また概日時計の周期長を決定する多重リン酸化サイトを同定してきた(Mol. Cell, 2017; Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2017)。

さらに近年、ある酵素が、基質の複数領域に多重リン酸化修飾を誘導する例も見出されてきている(図1A)。例えば、哺乳類概日時計に関わるCKI δ/ϵ キナーゼは基質PER2タンパク質の異なる2つの領域に多重リン酸化をもたらし、これらの領域のどちらが主に多重リン酸化されるかによって、概日時計周期長が双方性に制御されることが示唆されている(Zhou et al., Mol. Cell 2015)。このように、特定の基質に多重リン酸化が誘導される場合、注目すべきはリン酸化の数のみではなく、多重リン酸化の進行過程と、とり得る経路である(これをリン酸化経路制御: Phosphorylation routing と呼ぶことにする)。例えば、多重リン酸化における特定の順序の有無(図1B)に加えて、途中で分岐する場合(図1C)あるいはどちらかの経路が優勢となる場合などがあるだろう(図1D)。多重リン酸化サイトを有する酵素基質ペアには、何種類のリン酸化経路があり、どのようにその経路選択が行われるのか? これまで主に細胞内の酵素基質カスケードに対して考えられてきたシグナル伝達経路選択の問題を、基質内の多重リン酸化サイトに敷衍する必要がある。

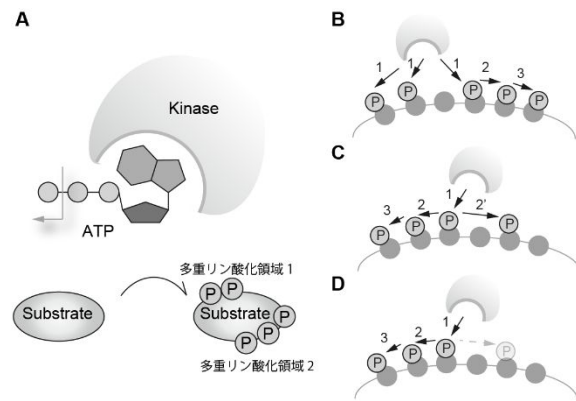


図1. 多重リン酸化と、リン酸化経路制御 (phosphorylation routing)

2. 研究の目的

そこで本研究では特定の基質内における多重リン酸化の経路制御を明らかにする汎用的な実験手法を開発すると共に、モデルキナーゼを用いて実際に多重リン酸化経路を描出することを試みる。このためには多重リン酸化サイトの相互依存関係を明らかにするために、あるキナーゼによって、ランダムにリン酸化されるサイトと特定のリン酸化状態に依存して修飾されるリン酸化サイトを、ステップバイステップに基質全長にわたって決定する測定スキームが必要である。またリン酸化経路アッセイは、細胞内に近い環境で基質の全長タンパク質を用いて行う必要がある。なぜなら、多重リン酸化は天然変性領域等の柔軟性の高いタンパク質領域の制御にしばしば重要であり(Wright and Dyson, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015)。こういった領域は、タンパク質全体の電荷状態や周辺環境によってその構造が大きく変化するためである(これに対応してタンパク質精製が困難であることもしばしばある)。そこで、複数の自己リン酸化を介して活性制御を受け(Baucum et al., ACS Chem. Neurosci. 2015) 未知の多重リン酸化制御の存在が予想されるCaMKII α/β に特に着目してリン酸化経路の描出を試みた。また、多重リン酸化経路を描出する汎用的なツールとしてアナログ感受性(Analog sensitive: AS)キナーゼと新規ATPアナログ基質の組み合わせを利用し、細胞内に近い夾雑リン酸化酵素の存在下でも、どのリン酸化サイトがどのキナーゼによってリン酸化されたのかを正確に判定する手法の開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) AS キナーゼの作製

本研究ではモデルキナーゼとしてCaMKII α/β および、多重リン酸化をうける基質が分かっているCKI δ/ϵ を用いる。CaMKII α/β はシナプス機能制御に深く関与する既知の複数の自己リン酸化サイトに加えて、近年多数の自己リン酸化サイトが同定されている(Baucum et al., ACS Chem. Neurosci. 2015)。CKI δ/ϵ はPERやCRY、およびCKI δ/ϵ 自身のC末端領域を多重リン酸化し概日時計制御を行うが、そのリン酸化経路は十分に明らかでない。ASキナーゼはATPのアデニン側認識側鎖の1アミノ酸を変異させ、アデニン側の構造認識に自由度をもたせたものである。文献情報(Lopez et al., Methods Enzymol. 2014)からCKI δ/ϵ およびCaMKII α/β のASキナーゼを作成する。

(2) 新規細胞透過性ATPアナログ基質の作製

ASキナーゼは通常のキナーゼが触媒出来ないATPアナログを用いてリン酸化を触媒することができる。また、キナーゼはATPの γ 位のリン酸基に厳密な特異性を持たない一方で、リン酸化認識ドメインは一般的に転移された γ 位のリン酸基を認識する。そこで、アデニン側構造と γ 位のリン酸を改変したATPアナログ分子を設計し、細胞透過性のASキナーゼ基質の作製を試

みる。これにより、細胞内環境でも特定のキナーゼによって、どのリン酸化サイトが修飾されたのかを同定することができるかと期待される。

(3) リン酸化経路の描出

特定のキナーゼによって触媒されたリン酸化サイトを検出し、さらに、同定されたリン酸化サイトは、疑似リン酸化変異 (Asp) や疑似非リン酸化変異 (Ala) を系統的に 1 サイトずつ導入することで (疑似) リン酸化状態を固定化し、これを基質として再び特定のキナーゼによってリン酸化されるサイトを同定する。細胞内環境でこのサイクルを繰り返し行うことで、多重リン酸化サイトのリン酸化経路を描出する。

4. 研究成果

(1) AS キナーゼの作製

モデルキナーゼとして用いる CKI δ/ϵ と CaMKII α/β について、予定通り、AS 変異キナーゼを作製した。培養細胞内で基質リン酸化もしくは、自己リン酸化を指標として、既知の AS キナーゼ特異的阻害剤の効果を調べた。その結果、AS キナーゼによるリン酸化は、特異的阻害剤で抑制されることを確認した (図 2)。

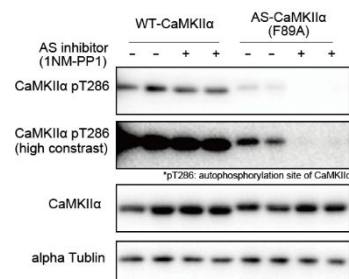


図 2. AS 型キナーゼの作製

(2) 細胞透過性 ATP アナログ基質の作製

細胞透過性の ATP アナログ基質デザインにあたって、まず、細胞透過性を議論せず、基質認識についてのみ評価することを試みた。そこで、CaMKII について細胞抽出液を用いたリン酸化活性測定系を立ち上げた。CaMKII を哺乳類培養細胞に発現させ、この細胞から高濃度の細胞抽出液を調整することで、Ca²⁺/Calmodulin 依存的な基質リン酸化と、CaMKII タンパク質の多重 (自己) リン酸化が生じることを確認した (図 3)。

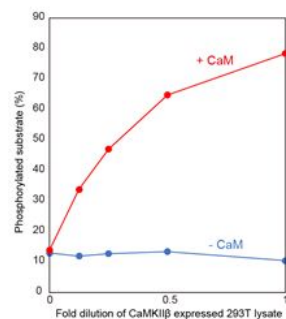
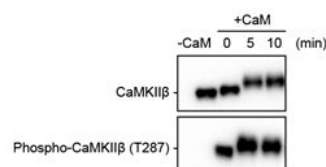


図 3. 細胞抽出液系での CaMKII β による自己およびペプチド基質のリン酸化

この系を用いて、AS キナーゼに対する特異的阻害剤や特異的基質の効果を調べた。しかしながら、CaMKII について細胞抽出液系では特異的阻害剤によるキナーゼ阻害の効果が十分に観察されなかった。細胞抽出液系では Ca²⁺/Calmodulin が十分に供給され、リン酸化活性が強く惹起されており、ATP と競合する作用機序の特異的阻害剤が十分に作用しなかった可能性がある。実際に培養細胞内においても、Calmodulin を共発現し、CaMKII のリン酸化活性をより強く惹起した際には特異的阻害剤の効果があまり得られなかった。

また、AS キナーゼの特異的基質を使用したが、やはり特異的基質によるリン酸化アナログの転位産物は質量分析によって観察することはできなかった。AS キナーゼを作成する際に導入する 1 アミノ酸変異の種類を複数試みたが、やはり特異的阻害剤によるキナーゼ阻害活性は、細胞抽出液系では検出されなかった。さらに、反応液中の ATP 濃度を含め、AS 変異キナーゼに ATP アナログが高効率に基質認識される条件を探索したが、既知の ATP アナログが ATP による通常のリン酸化反応に十分に影響を与える条件を見つけることはできなかった。従って、新規 ATP アナログの機能評価には至らず、課題が残った。

(3) リン酸化経路の描出と in vivo への実験系の応用

上述のように、AS キナーゼ特異的な ATP アナログの使用条件を得ることは困難であったが、並行してリン酸化変異体シリーズを用いて、特に CaMKII α/β の多重自己リン酸化経路の描出に着手した。まず、CaMKII α/β の活性化に伴う構造変化を惹起すると考えられる変異、リン酸化活性に影響を与えると考えられる変異、およびリン酸化ペプチド定量質量分析を組み合わせることで、新規のリン酸化サイトを複数見出した。さらに、リン酸化サイトのうち、新規の自己リン酸化サイトや、これまで自己リン酸化サイトと想定されていたが、実際は構造変化に伴って異なるリン酸化酵素によってリン酸化修飾を受けると考えられるサイトを見出した。

さらに CaMKII の複数の自己リン酸化サイト (新規リン酸化サイトを含む) について、これらサイトが CaMKII を活性化させた際に、どのような時系列でリン酸化されるのかを調べた。また、これらサイトに疑似リン酸化変異を導入した時に CaMKII の活性がどのように変化するのかを、上述した細胞抽出液系を用いて測定した。その結果、CaMKII の活性制御に重要であることが良く知られている既知のリン酸化サイト群と比較して、遅れてリン酸化レベルが上昇するリン酸化サイトがあること、およびこの遅れて上昇するリン酸化サイトの中には、CaMKII 活性を上昇させるものも、抑制するものも含まれることが明らかになった。

すなわち、CaMKII の活性は、多重リン酸化を介して、これまでよく理解されいた時間スケールよりもより長い時間スケールで活性促進・抑制の双方に制御されている可能性を提示することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 大出 晃士, 上田 泰己	4. 巻 37
2. 論文標題 哺乳類概日時計の周期長決定要因を探る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 379-385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 大出 晃士, 上田 泰己	4. 巻 37
2. 論文標題 概日時計と睡眠	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床神経科学	6. 最初と最後の頁 770-773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 7件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 概日リズムを駆動する時計タンパク質の量的変動と質的変動
3. 学会等名 The 45th Biological Mass Spectrometry Conference (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 Structure-guided engineering of mCRY1 to elucidate the protein quality control for the determination of circadian clock speed
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 Structure-guided engineering of mammalian Cryptochrome to elucidate the origin of 24-hour period
3. 学会等名 第25回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 哺乳類CaMKIIの酵素活性依存的な睡眠時間長制御
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 Residue-level characterization of mCRY1-dependent circadian control
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 睡眠時間長制御因子としての哺乳類CaMKII活性
3. 学会等名 日本睡眠学会第44回定期学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大出晃士
2. 発表標題 CaMKIIによる睡眠時間長制御
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会（誌上開催）（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----