

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06573

研究課題名(和文) PP1を介したRaf-1シグナルのロバストネス制御の動作原理とその生物学的意義

研究課題名(英文) Regulation of Raf-1 kinase through PP1 signaling

研究代表者

江藤 真澄 (Eto, Masumi)

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：20232960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は、動物細胞内で主要なSer/ThrホスファターゼであるPP1の調節タンパク質であるPHI-1の機能とその細胞内での役割を理解することです。PHI-1はPP1と関連し、細胞内のプロセスやシグナル伝達に重要な役割を果たすことが示唆されていましたが、その機能や相互作用はほとんど分かっていませんでした。本研究では、PHI-1の発現解析、遺伝子ノックダウン、EGFシグナル伝達経路との関連性、PHI-1によるRaf-1調節機構の解析などの実験を行い、PHI-1の機能とその細胞内での役割に関する新たな知見を提供しました。加えて、新たな未知キナーゼ検出方法を開発しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、PP1調節タンパク質であるPHI-1の機能解明に貢献しました。PHI-1の細胞内での役割が明らかになることで、PP1を介した細胞のシグナル伝達や病理学的な変化に関与するメカニズムを理解する上で重要な情報となります。さらに、PHI-1が関与する細胞増殖やアポトーシス制御などの生理的プロセスの理解は、がんや他の疾患の発症や進行に関連することが示唆されました。したがって、本研究の成果は、細胞生物学や病態生理学の研究分野において新たな知識を提供し、将来的には新しい治療法や治療標的の開発につながる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study was to understand the function of PHI-1, a regulatory protein of PP1, the major Ser/Thr phosphatase, and its role in the cell. PHI-1 has been suggested to play important roles in cellular processes and signal transduction, although the function was largely unknown. In this study, we performed experiments including expression analysis of PHI-1, gene knockdown, association with the EGF signaling pathway, and analysis of Raf-1 regulation by PHI-1, providing new insights into the function of PHI-1 and its intracellular role. In addition, we developed a new unknown kinase detection method.

研究分野：Molecular physiology

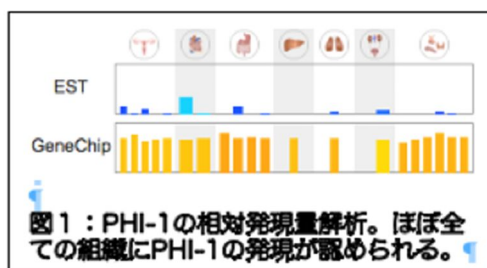
キーワード：Cell signaling

1. 研究開始当初の背景

PP1 研究の意義：プロテインホスファターゼシグナルの不全が細胞の病的変化を引き起こす証拠が集積してきている状況でした。PP1 は構造・機能が酵母からヒトまで保存されていて、その細胞内発現量が 2 番目に多い Ser/Thr ホスファターゼです。細胞内において PP1 は、およそ 100 種類ほど報告されている PP1 調節タンパク質と会合し、様々な複合体や細胞内小器官の一部に組み込まれて特定の機能を制御しています。従って、細胞内の PP1 シグナルを理解し、それらが関与する病気の原因を突き止めその有効な治療方法を開発するためには、PP1 調節タンパク質の細胞機能を明らかにする必要があります。しかしながら、現在までに解析が進んでいる PP1 調節タンパク質は、DARRP32, Inhibitor-2, MYPT1, GADD34, PNUT, CPI-17 などに限られているのが現状でした。

PHI-1 とは？：我々は PP1 に属するミオシンホスファターゼを制御する新しい調節タンパク質 CPI-17 を発見しました(Eto et al 1995, 1997)。現在までに、CPI-17 は平滑筋と神経細胞に発現し、アゴニスト刺激に応じた PKC と ROCK 活性化をミオシンホスファターゼ阻害へと伝達し、血圧調節や小脳運動記憶に働いていることが明らかとなっています(総説：Eto 2009, Eto & Brautigam 2014, Eto & Kitazawa 2017)。

PHI-1 は最初に同定された CPI-17 のアナログです(Eto et al 1999)。しかし、PHI-1 のミオシンホスファターゼに対する阻害活性は限定的で、その生理的な機能は CPI-17 とは区別できません(Kitazawa, Eto et al 2004)。ディープトランスクリプトームの結果、PHI-1 は HeLa 細胞において最も発現量の多い PP1 調節タンパク質であることが報告されました(Nagaraj et al 2011)。また、その一次構造は脊椎動物間で保存されており、発現はこれまで調べたほぼ全ての組織・細胞に認められます(図 1)。従って、PHI-1 の細胞内機能を理解することで、脊椎動物細胞にプログラムされた PP1 シグナルの中心的な役割を決定できると期待されます。しかし、PHI-1 の構造・機能解析は十分に進んでおらず、細胞内標的は全くわかっていませんでした。



2. 研究の目的

「なぜ、PHI-1 は全ての動物細胞に必要なのだろうか？」この点を明らかにするために、我々は予備実験として PHI-1 をノックダウンした細胞のホスホプロテオーム解析を行いました。その結果、PHI-1 の発現量を抑えると ERK1/2 のリン酸化(21 倍)、Raf-1 の発現量増加(7 倍) (、とそれに伴う EGF 刺激に対する細胞感受性上昇が観測されました。一方、Raf-1 mRNA 量の亢進は認められません。以上の結果より、「PP1・PHI-1 シグナルが Raf-1 合成・分解(Proteostasis)を調節し、Raf-1 シグナルの強度(Robustness)を定義している」のではないかと考えました。

Raf-1 は EGF などの細胞増殖因子刺激を受けて細胞増殖を調節するだけでなく、ROCK や ASK、BRAF との相互作用を介して細胞運動や細胞死シグナルを制御する多機能キナーゼです。本研究では、未知の PP1・PHI-1 シグナルが Raf-1 proteostasis を介していかに細胞機能の調節に関わっているのかを明らかにすることで、動物細胞において PP1 シグナルが担う大事な役割の一つを分子・細胞レベルで理解することを目的としました。

本研究は以下の点に特に独自性・創造性があると考えています。

- 機能未知のタンパク質 PHI-1 シグナルを研究の切り口にして、新規のホスファターゼシグナルを解明できる点。
- これまで行ってきた CPI-17 研究の経験と予備実験結果より設計された、未発表の機能改変変異体などを用いた実験方法。
- 予想される研究成果より、全く新しいタイプの Raf-1 シグナル制御機構が明らかになるであろう点。

3. 研究の方法

PHI-1 の発現解析と機能解析：

- HEK293 細胞を用いた PHI-1 の発現解析と発現レベルの評価
- RNA 干渉による PHI-1 の発現抑制とその機能変化の調査
- 細胞増殖とアポトーシス制御の評価と caspase-3 の活性測定

EGF シグナル伝達経路との関連性の研究：

- PHI-1 発現抑制下での EGF による ERK1/2 のリン酸化状態の解析
- Western blotting 法を用いた EG シグナル伝達経路の関連タンパク質の変化の検討

PHI-1 と Raf-1 の相互作用解析：

- PHI-1 と Raf-1 の結合の有無と機能的意義の解析
- 免疫沈降や共免疫染色法を用いた相互作用解析
- PHI-1 の発現レベルが Raf-1 の発現に与える影響の評価

4. 研究成果

1) HEK293 細胞における PHI-1 の発現解析を行いました。qRT-PCR を使用して PHI-1 の発現レベルを測定した結果、HEK293 細胞での PHI-1 の発現が比較的高いことが明らかになりました。これは、PHI-1 が特定の細胞タイプで重要な役割を果たしている可能性を示唆しています。遺伝子データベースを用いて PHI-1 遺伝子の種間の相同性を調べたところ、調べた全ての哺乳類・魚類・両生類には PHI-1 の遺伝子が確認できましたが、鳥類において限られた種にのみ PHI-1 遺伝子が見つかり、鳥類では何らかの補償が行われていることが推測されました(右図)。

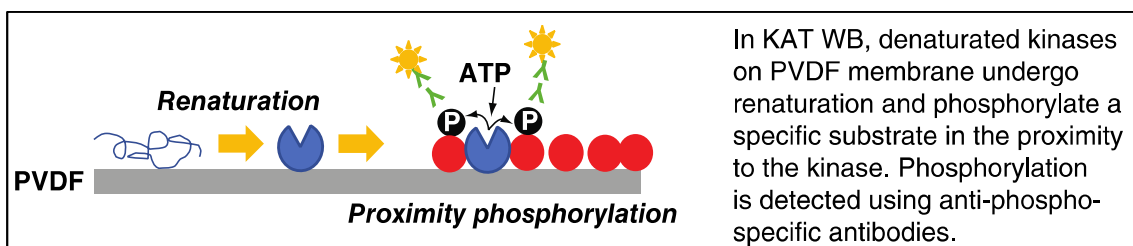
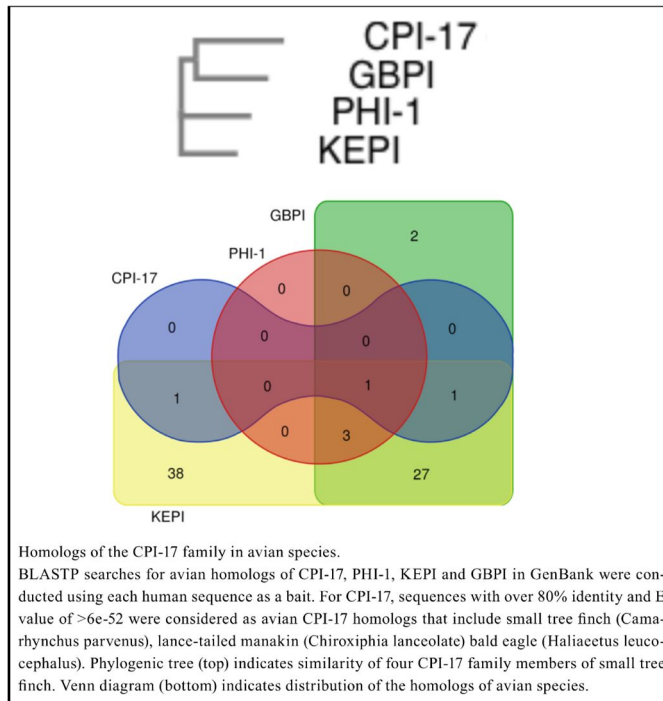
2) PHI-1 の機能解明に向けた遺伝子ノックダウン実験を行いました。HEK293 細胞において PHI-1 の発現を抑制することで、細胞増殖が促進されることが明らかになりました。また、caspase-3 の活性が抑制されることも観察されました。これらの結果から、PHI-1 が細胞の増殖とアポトーシス制御に関与している可能性が示唆されました。

3) EGF シグナル伝達経路における PHI-1 の役割解明を試みました。PHI-1 の発現抑制下での ERK1/2 のリン酸化の変化を観察しました。その結果、PHI-1 の発現抑制により、EGF による ERK1/2 のリン酸化が増強されることが明らかになりました。また、Raf-1 の上昇と MEK1/2 のリン酸化の変化も PHI-1 と関連付けられました。これらの結果から、PHI-1 が EGF シグナル伝達経路において重要な役割を果たしている可能性が示唆されました。

4) PHI-1 と PP1 の相互作用について検討しました。リン酸化部位と PP1 結合モチーフに変異を入れたりコンピナント PHI-1 を用いた PullDown 実験の結果、PHI-1 の Thr57 のリン酸化が PP1 との結合を亢進するのに対し、N 末端領域の PP1 結合モチーフは PP1 結合に寄与しないことがわかりました。

5) Raf-1 の調節についても解析しました。PHI-1 の発現抑制により、Raf-1 のタンパク質安定性が上昇し、逆に PHI-1 の存在下では Raf-1 が不安定化されることが明らかになりました。この相互作用は、PHI-1 と Raf-1 の間で重要な制御機構が存在することを示唆しています。

6) この研究において、PHI-1 を活性化するキナーゼを検証するために「Kinase Activity-Tagged westernblot 法」を開発しました(下図)。



以上の研究成果から、PHI-1 が細胞増殖、アポトーシス制御、EGF シグナル伝達経路、および Raf-1 との相互作用に関与していることが明らかになりました。これらの結果は、PHI-1 ががんや他の疾患の病態生理学において重要な役割を果たしている可能性を示唆しています。さらなる研究により、PHI-1 の機能の解明とその応用の可能性について更なる知識が得られることが期待されます。

引用文献

1. Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem.* 1995 Dec;118(6):1104-7.
2. Senba S, Eto M, Yazawa M. Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC-potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle. *J Biochem.* 1999 Feb;125(2):354-62.
3. Eto M, Karginov A, Brautigam DL. A novel phosphoprotein inhibitor of protein type-1 phosphatase holoenzymes. *Biochemistry.* 1999 Dec 21;38(51):16952-7.
4. Eto M. Regulation of cellular protein phosphatase-1 (PP1) by phosphorylation

- of the CPI-17 family, C-kinase-activated PP1 inhibitors. *J Biol Chem.* 2009 Dec 18;284(51):35273-7.
5. Nagaraj N, Wisniewski JR, Geiger T, Cox J, Kircher M, Kelso J, Pääbo S, Mann M. Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line. *Mol Syst Biol.* 2011 Nov 8;7:548.
 6. Eto M, Brautigan DL. Endogenous inhibitor proteins that connect Ser/Thr kinases and phosphatases in cell signaling. *IUBMB Life.* 2012 Sep;64(9):732-9.
 7. Eto M, Kitazawa T. Diversity and plasticity in signaling pathways that regulate smooth muscle responsiveness: Paradigms and paradoxes for the myosin phosphatase, the master regulator of smooth muscle contraction. *J Smooth Muscle Res.* 2017;53(0):1-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eto M, Katsuki S, Ohashi M, Miyagawa Y, Tanaka Y, Takeya K, Kitazawa T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Possible roles of N- and C-terminal unstructured tails of CPI-17 in regulating Ca ²⁺ -sensitization force of smooth muscle.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Smooth Muscle Res	6. 最初と最後の頁 22-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1540/jsmr.58.22.	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 Kitazawa T, Matsui T, Katsuki S, Goto A, Akagi K, Hatano N, Tokumitsu H, Takeya K, Eto M.	4. 巻 321
2. 論文標題 A temporal Ca ²⁺ desensitization of myosin light chain kinase in phasic smooth muscles induced by CaMKK /PP2A pathways.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Physiol Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 C549-C558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00136.2021.	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 Eto Masumi, Katsuki Shuichi, Tanaka Yoshinori, Takeya Kosuke	4. 巻 68
2. 論文標題 Kinase activity-tagged western blotting assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 211~213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/btn-2019-0136	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 江藤真澄、北澤俊雄、松井利康、勝木秀一、赤木魁、後藤旭、波多野直哉、竹谷浩介、徳光浩
2. 発表標題 CaMKK b 経路を介した平滑筋MLCKの 一時的なカルシウム脱感作
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江藤真澄
2. 発表標題 Dysmotility of gastrointestinal smooth muscle through Ca ²⁺ -sensitization/desensitization pathways
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masumi Eto, Toshiyasu Matsui, Kosuke Takeya, Kai Akagi, Shuichi Katsuki, Naoya Hatano, Hiroshi Tokumitsu and Toshio Kitazawa
2. 発表標題 Rubratoxin A-sensitive pathways responsible for temporal regulation for balancing kinase/phosphatase activities
3. 学会等名 14th International Conference on Protein Phosphatase（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝木秀一、大橋南海、竹谷浩介、田中良法、北澤俊雄、江藤真澄
2. 発表標題 平滑筋Ca ²⁺ sensitization forceの調節機構 CPI-17 N・C末端領域の生理的役割
3. 学会等名 第62回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masumi Eto, Toshiyasu Matsui, Kosuke Takeya, Akagi, Shuichi Katsuki, Naoya Hatano, Hiroshi Tokumitsu and Toshio Kitazawa
2. 発表標題 New Pathways That Regulate Myosin Light Chain Kinase And Cellular Force Development
3. 学会等名 2019 ASCB-EMBO Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤 真澄、北澤 俊雄、松井 利康、赤木 魁、波多野 直哉、勝木 秀一、竹谷 浩介、徳光 浩
2. 発表標題 平滑筋の興奮収縮連関を調節する新規キナーセカスケートシクナル
3. 学会等名 第61回日本平滑筋学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤 真澄
2. 発表標題 平滑筋の興奮収縮連関を調節する新しい薬理的標的シグナル
3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会（招待講演）
4. 発表年 2019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

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