

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06548

研究課題名(和文)リン酸化プロテオミクスにより新たに見出したアダプタータンパク質の役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of adaptor proteins newly discovered by phosphoproteomics

研究代表者

小西 博昭 (Konishi, Hiroaki)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：40252811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：EGF(上皮細胞増殖因子)受容体下流で機能し、リン酸化酵素Erkの制御に関与するアダプタータンパク質GAREMについて、2つの新たな知見を見出した。1、脳に多く発現する分子種GAREM2は培養細胞内においてEGF刺激前は細胞質全体に局在するが、刺激後に特徴的な顆粒を形成し、刺激前後で大きな局在変化を伴うことがわかった。その特徴的局在にはGAREM2分子中の比較的アミノ末端に存在するグリシンに富む領域(GRD)が必要であることを明らかにした。2、広範囲の臓器で発現するGAREM1は遺伝子欠損細胞やマウスの解析により、細胞及び動物個体の増殖や成長に必要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳ではいくつかのタンパク質の凝集がアルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患に関与していることが知られている。本研究では、脳特異的に発現するGAREM2のみが細胞増殖因子刺激依存的に凝集するという現象を見出し、それがGAREM2のGRDに依存し、GRDを持たないGAREM1は凝集が起こらないことを明らかにした。神経変性疾患の原因タンパク質間にはアミノ酸配列の共通性がなく、その凝集機構は未だ不明な点が多い。本研究の結果は、GAREM2が神経変性疾患の新たな凝集タンパク質である可能性を提示し、その凝集機構をさらに詳細に解明することで、神経変性疾患治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Two new findings on GAREM, an adaptor protein that functions downstream of the epidermal growth factor (EGF) receptor and is involved in the regulation of the phosphatase Erk, have been reported.

1) GAREM2, a molecular species abundantly expressed in mammalian brain, localizes throughout the cytoplasm before EGF stimulation in cultured cells, but after stimulation, GAREM2 forms characteristic granules that undergo significant localization changes before and after stimulation. GAREM2, a molecular species abundantly expressed in mammalian brain, localizes throughout the cytoplasm before EGF stimulation in cultured cells.

2) GAREM1, which is ubiquitously expressed in mammal, was shown to be required for proliferation and growth of cells and individual animals by analysis of gene-deficient cells and mice.

研究分野：機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達 細胞増殖 タンパク質凝集 アダプタータンパク質 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

申請者らはチロシンリン酸化を指標としたEGF受容体下流タンパク質の網羅的解析（プロテオミクス）により見出した新規タンパク質の研究を行ってきた。その中の一つであるGAREM（Grb2-associated regulator for Erk/MAPK）には2つの分子種GAREM1とGAREM2が存在し、前者は広範な臓器で、後者は脳で発現する。両GAREMは細胞増殖因子刺激によるErkの活性化度合いを制御することを見出した。この研究計画の前に、両GAREM分子種については培養細胞における役割を明らかにしており、動物個体における役割を解析するために両GAREM分子それぞれのノックアウト（KO）マウスを作製した。そして、GAREM2ノックアウト（KO）マウスの表現型について解析を行っていた。

CLPABP（Cardiolipin and phosphatidic acid-binding protein）は培養細胞やKOマウスを用いた解析により、アポトーシスの進行やmRNAの安定性を制御することを明らかにしていた。

WDR54（WD-repeat(WDR)54）は培養細胞における役割を解析し、細胞膜上のEGF受容体の安定性を制御し、細胞のがん化に関与していることを明らかにし、KOマウスを樹立した。

図 1

2. 研究の目的

- A、GAREM2 特異的な細胞内局在機構に関する解析
- B、GAREM1 の KO マウスの解析
- C、GAREM1 及び 2 のダブル KO マウスの作製とその解析
- D、CLPABP のターゲットとなる遺伝子転写物の網羅的同定
- E、WDR54 ノックアウトマウスの作製とその解析

3. 研究の方法

GAREM について

GAREM1、GAREM2 のそれぞれのコンディショナル KO マウス作製は理化学研究所発生・再生科学総合研究センター（理化学研究所）との共同研究により作製した。その後、キメラマウスから F1 ヘテロマウスの作製、マーカー遺伝子除去、Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウス（全身で発現するタイプ）との交配およびホモ KO マウスを作製した。さらに、GAREM1、GAREM2 各分子種の KO マウスを交配し、両分子種遺伝子を欠損したダブル（DKO）マウスも作製した。GAREM2特異的な細胞内局在機構については、GAREM1とGAREM2のキメラタンパク質を遺伝子工学的にGFP融合タンパク質として発現させ、それらの局在を調べ、GAREM2特異的局在に必要な領域を検索した。

CLPABP について

これまでの解析より、CLPABP は摂食量調節ホルモンであるレプチンの mRNA 安定性に関与することで、高齢オスマウスの体重制御に寄与していることを明らかにしている。しかし、レプチンの他に、どのような種類の遺伝子転写産物の安定性が CLPABP の発現により影響を受けるかについては不明であった。そこで、CLPABP の発現の有無により転写量が変化する遺伝子の種類を RNA-seq 解析により網羅的に解析した。野生型及び CLPABP KO マウスの胎児から調整した線維芽細胞（MEF）を 10%血清存在下で 3 日間培養し、それぞれのトータル RNA を抽出した。それをもとにライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによる網羅的配列決定を行った。その結果、野生型と CLPABP KO の MEF 細胞由来の総 RNA 間（約 15000 種）で、発現量が 2 倍以上増減する種類は約 1500 以上であった。その内訳として、野生型に比較し、CLPABP を発現しない細胞で 2 倍以上転写量が増加する RNA が 736 種類に対し、800 種類は 2 倍以上減少した。

本研究では、RNA-seq 解析から得られた情報をもとに、CLPABP 依存的に発現量が変化する転写物の特徴や非翻訳領域構造の共通性を解明し、その生理的意義づけについて解析する。

WDR54 について

WDR54 の KO マウスはがん研究所との共同研究で作製した。マウス WDR54 ゲノム遺伝子は第 6 染色体に存在し、9 つのエクソンからなる。第 2、第 3 エクソンの間と第 4、第 5 エクソンの間のイントロン中に CRISPR/Cas9 で切断されるガイド RNA を設計し、組換え型 Cas9 タンパク質とともにマウス受精卵にインジェクションした。それを仮親に移植し、産出したファウンダーマウスのジェノタイピング解析を行い、目的の個体を選別した。これまでに WDR54 ゲノム遺伝子配列が計画通りに 2 か所の Cas9 切断箇所 で切られ、目的遺伝子部分の欠失が認められた候補個体が得られた。

4 . 研究成果

Aの結果

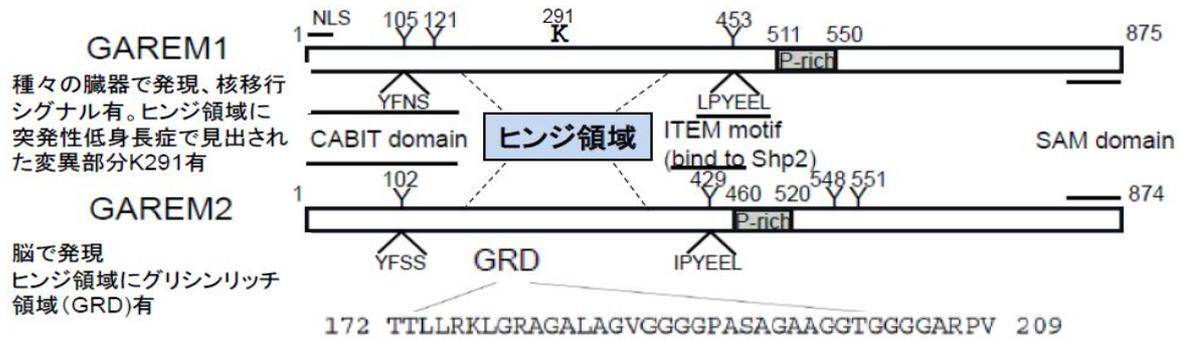
GAREM2特異的に見られるEGF刺激後の顆粒形成機構について詳細に解析した。GAREM1は発現部位の異なるGAREM1とGAREM2の2種類の分子種が存在する。広範な臓器で発現するGAREM1は基本的にEGF刺激前後で大きな局在の変化は見られず、細胞膜及びアクチン繊維の豊富な葉状仮足付近に多く局在する。一方、EGF刺激前は細胞質全体に局在するGAREM2は、刺激後に特徴的な顆粒を形成し、刺激前後で大きな局在変化を伴うことがわかった。また、長時間のEGF刺激では顆粒が肥大化し、凝集することも見出した。GAREM2が特異的に発現する脳ではいくつかのタンパク質の凝集がアルツハイマー病やハンチントン病などの神経変性疾患に関与していることから、GAREM2の細胞増殖因子刺激依存的な凝集形成のメカニズムに興味を抱いた。GAREM1と2は上記の共通の機能を持つために、Grb2結合部位であるプロリンリッチ領域やチロシンリン酸化部位など、多くの共通構造を持つので、全体的にはアミノ酸レベルで約62%の相同性を有する。そこで、GAREM1とGAREM2のキメラタンパク質を遺伝子工学的にGFP融合タンパク質として発現させ、それらの局在を調べ、GAREM2特異的局在に必要な領域を検索した。その結果、比較的アミノ末端(全長874アミノ酸の170 - 210番目付近)に存在するグリシンに富む領域が、GAREM2の顆粒形成に必要なことがわかった。また、その部分は、GAREM2の機能に必須であるチロシンリン酸化にも影響があることも見出した。

Bの結果

GAREM1については、エクソーム解析により特発性低身長症の原因として見出された遺伝子群の中にGAREM1が含まれ、その変異はアミノ酸置換を伴い、291番目のリジン(K)残基が、アルギニン(R)に変化するものであった(GAREM1(K291R))(Hum Genet (2012)131:471)。その変異タンパク質を人工的に発現し、野生型との性質を比較することで、GAREM1の機能と特発性低身長症との関連を解明する目的で行った。

GAREM1(K291R)は野生型に比較して細胞内の局在に大きな変化は見られないが、EGF刺激後の安定性及びErkの活性化能が低いことがわかった。ゲノム編集により作製したGAREM1 KO細胞は増殖が遅くなり、GAREM1 KOマウスは野生型よりで小型になることから、GAREM1(K291R)はドミナントネガティブ変異体として働き、GAREM1の機能の低下が生体内での低身長に起因する可能性があることを見出した。K291はこれまで着目してきたGAREMの機能領域部分ではなく、GAREMがN末のCABITドメインとC末のSAMドメインが分子内結合する場合の“ヒンジ”領域に位置し(下図)、その部分のアミノ酸組成や長さがGAREMの機能に重要であることが示唆された。現在、“ヒンジ”領域にあらためて着目し、この部位の役割について、分子内結合の強度や14-3-3やIntersectinなど、

これまで明らかにしてきたGAREM結合タンパク質との親和性など、生化学的なウェットの解析のみならず、シミュレーションなども利用した構造学的解析を行っている。



C~Eは現在進行中

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nishino T, Oshika T, Kyan M, Konishi H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of the glycine-rich domain in GAREM2 on its unique subcellular localization upon EGF stimulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Mol Biol Lett.	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s11658-021-00260-1.	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 Nishino T, Abe T, Kaneko M, Yokohira M, Yamakawa K, Imaida K, Konishi H	4. 巻 628
2. 論文標題 GAREM1 is involved in controlling body mass in mice and humans	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BBRC	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.08.058.	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 傳保聖太郎、福原光海、小西博昭、八木俊樹、菅裕
2. 発表標題 基底膜の起源 単細胞ホロゾアのラミニン様遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会 PA-81
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日野礼仁、小野真実、小西博昭、八木俊樹、菅裕
2. 発表標題 単細胞ホロゾア解析を通じた動物の細胞間連絡の起源解明
3. 学会等名 日本進化学会第22回オンライン大会（2020年） PA-96
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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