

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570231

研究課題名(和文)新規に同定したERK基質群のリン酸化による制御メカニズムの包括的解明

研究課題名(英文)Analysis of regulatory mechanisms of newly identified ERK substrates

研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO, Hidetaka)

徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・教授

研究者番号：10291171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物に普遍的に存在するERK/MAPキナーゼは、様々な基質をリン酸化することによって細胞内で多彩かつ重要な役割を果たしている。本研究では、独自のリン酸化プロテオーム解析法によって研究代表者らが新たに同定した複数のERK基質について、ERKによるリン酸化部位を同定した後、リン酸化による機能制御を生化学的に検討した。さらにERKによる細胞機能の制御における、それぞれのERK基質の役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ERK/MAP kinase is evolutionally conserved in eukaryotes and plays multiple and important roles in cells by phosphorylating various substrates. We have recently identified new ERK substrates by developing a phosphoproteomic approach. In this study, we identified phosphorylation sites of several of these ERK substrates and biochemically analyzed phosphorylation-dependent regulation of their functions. Furthermore, each ERK substrate was shown to be involved in ERK-mediated regulation of cellular functions.

研究分野：生物学

キーワード：ERK MAPキナーゼ リン酸化 細胞内情報伝達 細胞運動 抗リン酸化抗体 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

Raf/MAPKKK-MEK/MAPKK-ERK/MAPK からなる古典的 MAP キナーゼカスケードは進化的に高度に保存されており、増殖・癌化・分化・運動・生存・寿命・体内時計などの様々な細胞内情報伝達において中心的な役割を果たしている。国内外の多数のグループによる精力的な研究によって、ERK 経路の時空間的な活性調節機構や多数の相互作用因子及び標的基質が既に明らかにされている。しかしながら ERK 経路の多彩な役割を考慮すると未だ同定されていない標的基質の存在が推測され、さらにこれら未知の基質を介して新たな細胞機能を ERK が制御している可能性が考えられる。これまでに研究代表者らは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーによるリン酸化タンパク質の精製と蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) を組み合わせた新たなリン酸化プロテオーム解析法を開発してきた (Ueda, Kosako *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2004)。そしてごく最近、リン酸化モチーフ抗体をこの手法に導入して新規 ERK 基質を多数同定することに成功し、中でも核膜孔複合体構成因子のリン酸化による核-細胞質間輸送の制御機構を明らかにした (Kosako *et al.*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, 2009)。核膜孔複合体構成因子の他に新たに同定した ERK 基質の幾つかについても機能解析を進めてきており、アクチン架橋タンパク質の一つである EPLIN のリン酸化を介した細胞運動の調節機構を既に報告済みである (Han, Kosako *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 2007)。本研究では現在解析中である複数の新規 ERK 基質群に対し、ERK 経路が制御する種々の細胞機能における役割を包括的に解明することを目指す。特に EPLIN や癌の浸潤に關与する Fam129b、及び細胞質ダイニンの中間鎖 Dync1i2 に注目し、ERK によるリン酸化制御とその生理的意義を詳細に検討する予定である。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでに同定した複数の新規 ERK 基質について、リン酸化による分子機能の制御メカニズムを見出し、細胞内での ERK シグナル伝達経路における位置づけを行う。具体的には、

(1) 質量分析法とアラニン変異体の作製により、*in vivo*でのリン酸化部位を決定する。そして抗リン酸化抗体を作製して ERK の生理的な基質であることを確認する。

(2) 新規 ERK 基質と相互作用する細胞内因子をプロテオミクス技術によって検索する系を構築し、リン酸化によって相互作用が変動する因子を同定する。

(3) 各々の新規 ERK 基質を RNAi によってノックダウンし、ERK 経路に依存した細胞の増殖・癌化・運動などへの影響を比較・検討する。そしてノックダウンの効果が顕著に認められた場合には野生型とリン酸化部位の変異体によるレスキュー実験を行い、当該基質のリン酸化の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 同定された基質群が生理的な ERK 基質であることの検証

これまでに EPLIN、Nup50、Fam129b、Rpt5、Dync1i2、Dync1i1、eIF4B、Dynamin1、BAF155、KAP1、ST11、SGT、LOC67726 の 13 種類を *in vitro* で ERK がリン酸化できる基質として見出した。そこで Phos-tag ウェスタンブロット法により、細胞内でこれらの基質が ERK によって stoichiometric にリン酸化されるか検討する。さらに ERK による *in vivo*でのリン酸化部位を質量分析法によって決定する。それぞれの部位に対する抗リン酸化抗体を作製し、ERK 活性を操作した細胞に対するウェスタンブロットと免疫染色により、ERK に依存して内在性の基質が当該部位にてリン酸化されるかどうか時空間的に調べる。

(2) 新規 ERK 基質との相互作用がリン酸化によって変動する細胞内因子の同定

Dync1i2、Nup50、Fam129b、SGT に対し、GST との融合タンパク質を調製後、ビーズに固相化し、全細胞抽出液とインキュベートしてプルダウンされる結合因子を検索する。そして ERK によるリン酸化によって親和性が変化する結合因子に注目して質量分析法による同定を行う。

(3) 新規 ERK 基質の包括的な RNAi ノックダウンによる様々な細胞応答における役割の検討

EPLIN、Fam129b 及び Dync1i2 に対し、マウス繊維芽細胞などにおいて siRNA によるノックダウンを個々に行い、ERK が関与する種々の細胞応答への影響を比較する。具体的には ERK 依存的な増殖、癌化、運動への影響を BrdU の取り込み、軟寒天コロニー形成、Boyden チャンバー法の各アッセイによって検討する。そしてノックダウンの効果が顕著に認められた場合には野生型とリン酸化部位の変異体 (アラニン及び酸性アミノ酸に置換する) によるレスキュー実験を行い、当該基質の ERK によるリン酸化の役割を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 血清飢餓状態のマウス NIH3T3 細胞に対し、無刺激、PDGF 刺激、MEK 阻害剤 U0126

処理後に PDGF 刺激、を行った後、細胞抽出液を調製した。得られた抽出液に対し、それぞれの ERK 基質を特異的に認識する抗体を用いて Phos-tag ウェスタンブロットを行った。その結果、Nup50、Dync1i2、EPLIN、Fam129b、Rpt5、Dync1i1、SGT が ERK の活性化に依存して stoichiometric にリン酸化されることが明らかになった (図 1)。質量分析法によって同定された Dync1i2 と Fam129b のリン酸化部位に対する抗リン酸化抗体を作製し、上記の細胞抽出液に対するウェスタンブロットを行うことにより、内在性の Dync1i2 と Fam129b が PDGF 刺激後に ERK 活性が減衰してからも長時間リン酸化され続けることを見出した。また、運動中の NIH3T3 細胞の進行方向の先端部に位置する leading edge にリン酸化型 Dync1i2 が集積することが免疫染色によって判明した。さらに Dync1i2 は細胞分裂期に同一部位において ERK 非依存的にリン酸化されることも見出した。

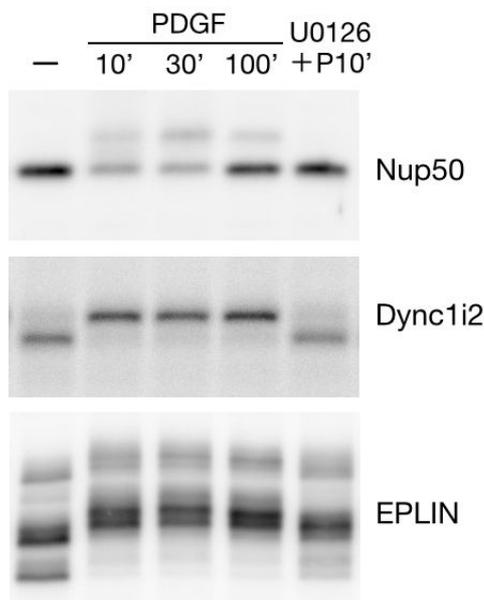


図 1. ERK 基質に対する特異抗体を用いた Phos-tag ウェスタンブロット

(2) Dync1i2、Nup50、Fam129b、SGT に対し、GST との融合タンパク質を調製後、グルタチオンビーズに固相化し、HEK293T 細胞抽出液とインキュベートしてプルダウンされる結合因子を検索した。ERK によってあらかじめ上記の基質がリン酸化された場合に結合量が変化する因子に注目して質量分析を行ったところ、p150Glued が非リン酸化型 Dync1i2 とより強く相互作用する因子として同定された。そして Dync1i2 が ERK によってリン酸化されると p150Glued との結合のカイネティクスが変化するを BLI (バイオレイヤー干渉) 法を用いた定量解析によって明らかにした。

(3) マウス繊維芽細胞 NIH3T3 およびマウ

ス腎髄質内層集合管細胞 mIMCD-3 において、EPLIN、Fam129b 及び Dync1i2 に対する siRNA を用いてノックダウンを個々に行った。その結果、BrdU の取り込み及び軟寒天コロニー形成にはいずれも siRNA 処理による大きな影響は認められなかった。一方、wound healing 法及び Boyden チャンバー法による細胞運動アッセイでは 3 種類とも有意な効果が認められた。EPLIN については、アラニン変異体でなく野生型 EPLIN によってのみレスキューされることを確認した。そこでさらなる機能解析を行い、以下の知見を得た。

アクチン架橋タンパク質の一つであり、がんの悪性化に伴って発現量が低下する EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) は腎臓系球体内のメサンギウム細胞に高発現しており、ヒト初代培養メサンギウム細胞において接着班に局在する paxillin と細胞辺縁部で相互作用することを *in situ* PLA (proximity ligation assay) 法によって明らかにした (図 2)。さらにこの EPLIN と paxillin の相互作用は MEK/ERK 経路の活性化によって抑制されることを見出した。

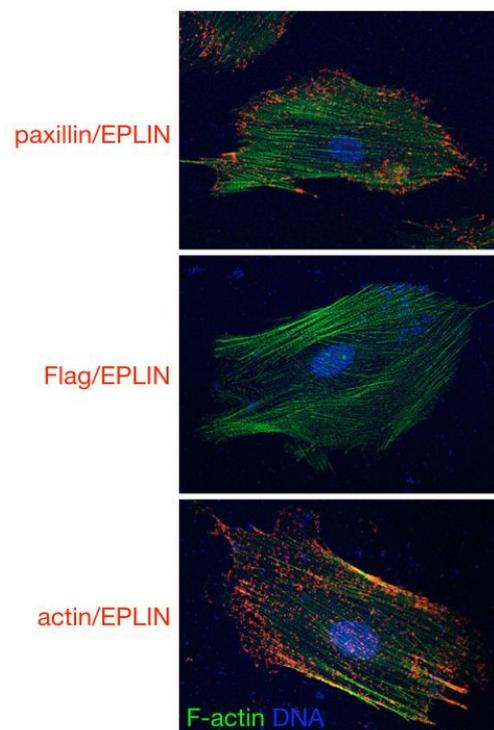


図 2. PLA (proximity ligation assay) 法による内在性 EPLIN と paxillin との相互作用の検出

がん細胞の浸潤やアポトーシスに関与する PH ドメインタンパク質である Fam129b (Minerva と呼ばれる) は NIH3T3 細胞において細胞間接着部位に濃縮して局在することを明らかにした (図 3)。Fam129b の ERK による複数のリン酸化部位は C 末端側に集中しており、N 末端側の PH ドメインとの分子内相互作用がリン酸化によって制御される可能

性を検討中である。

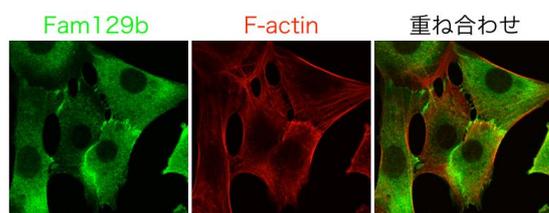


図 3. Fam129b は細胞間接着部位に濃縮する

(4) 以上のように、研究代表者らが ERK 基質として新たに同定した EPLIN、Fam129b 及び Dync1i2 がいずれも細胞運動に関与することが明らかになった。新規 ERK 基質のリン酸化による新たな細胞機能制御に関する報告は現在も続いており、さらなる ERK 基質の同定とその機能解析は今後も重要な課題であると考えられる。また本研究により、Phos-tag ウェスタンブロット法、質量分析計を用いたリン酸化部位の同定と定量、BLI 法などを用いた相互作用の定量解析など、ERK のみならず様々なキナーゼによる基質タンパク質のリン酸化の生理的・病理的意義の解明において重要な解析技術を確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., Endo, T., Fon, E.A., Trempe, J.-F., Saeki, Y., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate Parkin. *Nature*, 査読有, **510**, 162-166. doi: 10.1038/nature13392.

Tsurumi, H., Harita, Y., Kurihara, H., Kosako, H., Hayashi, K., Matsunaga, A., Kajiho, Y., Kanda, S., Miura, K., Sekine, T., Oka, A., Ishizuka, K., Horita, S., Hattori, M., Hattori, S. and Igarashi, T. (2014) Epithelial protein lost in neoplasm modulates platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney Int.*, 査読有, **86**, 548-557. doi: 10.1038/ki.2014.85.

Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., Kimura, M., Suzuki, N., Uchiyama, S., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2013)

Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 査読有, **288**, 22019-22032. doi: 10.1074/jbc.M113.467530.

Nakaya, M., Tajima, M., Kosako, H., Nakaya, T., Hashimoto, A., Watari, K., Nishihara, H., Ohba, M., Komiya, S., Tani, N., Nishida, M., Taniguchi, H., Sato, Y., Matsumoto, M., Tsuda, M., Kuroda, M., Inoue, K. and Kurose, K. (2013) GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Commun.*, 査読有, **4**(1532). doi: 10.1038/ncomms2540.

Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., Shiba-Fukushima, K., Sato, S., Shimizu, H., Fukunaga, Y., Taniguchi, H., Komatsu, M., Hattori, N., Mihara, K., Tanaka, K. and Matsuda, N. (2012) PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria. *Nature Commun.*, 査読有, **3**(1016). doi: 10.1038/ncomms2016.

小迫英尊 (2011) リン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の大規模解析. *生化学*, 査読無, **83**(12), 1122-1127.

〔学会発表〕(計 5 件)

Kosako, Hidetaka, Identification and functional analysis of protein kinase substrates using various proteomic technologies, Keystone Symposia "The Biological Code of Cell Signaling: A Tribute to Tony Pawson", 2015 年 1 月 13 日, スチームボートスプリングス (米国)

小迫 英尊, リン酸化プロテオミクスによるキナーゼ基質の同定と機能解析, 日本プロテオーム学会 2014 年会, 2014 年 7 月 17 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

小迫 英尊, リン酸化プロテオミクスを用いたキナーゼターゲットの同定と機能解析, 第 2 回 JHUP0 サテライトジョイントシンポジウム, 2013 年 6 月 7 日, 愛媛大学総合情報メディアセンター (愛媛県)

松山市)

Kosako, H., Tani, N., Yoshimura, S.H., Kose, S., Taniguchi, H. and Imamoto, N., Multisite phosphorylation of FG nucleoporins by MAP kinases is involved in the regulation of nucleocytoplasmic transport, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Dynamic Organization of Nuclear Function", 2012年9月28日, コールドスプリングハーバー(米国)

小迫 英尊, 蛍光標識二次元ディフレーションゲル電気泳動 2D-DIGE から得られた知見と展望, 第 63 回日本電気泳動学会総会, 2012年8月21日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

[その他]

ホームページ等

http://www.fujii.tokushima-u.ac.jp/cell_signaling/

6. 研究組織

(1)研究代表者

小迫 英尊 (KOSAKO, Hidetaka)
徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・教授
研究者番号: 10291171

(2)研究分担者

(3)連携研究者

斉藤 寿仁 (SAITOH, Hisato)
熊本大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号: 50211925

津本 浩平 (TSUMOTO, Kouhei)
東京大学・大学院工学系研究科・教授
研究者番号: 90271866