

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590357

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質Rhoシグナルが関わる疾患の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Involvement of small GTPase Rho family signaling pathways in diseases.

研究代表者

天野 睦紀 (Amano, Mutsuki)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90304170

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)：本研究では低分子量G蛋白質Rhoシグナル、特に創薬標的となりうる下流のリン酸化酵素に焦点を当て、疾患の発症や進行の分子基盤の解明を目指した。まず、インタラクトームを基盤としたリン酸化酵素の基質スクリーニング法の開発を行い、効率良くRho-キナーゼやPKN、aPKC等の基質候補を得ることに成功した。Rho-キナーゼの基質としてがん抑制蛋白質であるScribや、心筋症の原因遺伝子産物であるCARPやMYL2等を得た。リン酸化によってScribやCARPの機能がどのように調節されるかを示した。また、PKAがRho-キナーゼをリン酸化することを見出し、両者の間にクロストークが存在することを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the analysis of protein kinases downstream of Rho family small GTPases as therapeutic targets. We developed the novel substrate screening method based on the interactome analysis. By this method, a number of candidate substrates were identified for several kinases including Rho-kinase, PKN, and aPKC. We identified tumor suppressor protein Scrib and cardiomyopathy-related gene products such as CARP and MYL2 as novel Rho-kinase substrates. We identified phosphorylation sites, and analyzed the modes of action for Scrib and CARP upon the phosphorylation by Rho-kinase. We also found that PKA phosphorylates Rho-kinase, suggesting the crosstalk between PKA and Rho-kinase.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達 リン酸化 キナーゼ プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

蛋白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極めて精緻な制御を行っている。ヒトゲノムには500種以上のキナーゼが存在している。これらキナーゼの多くは様々なシグナル経路とリンクしながら、複数の基質蛋白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と考えられる。一方でその制御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。例えば、受容体型チロシンキナーゼをターゲットとした数多くの分子標的薬がすでに抗がん剤として使用されている。それ以外にも多数の非受容体型チロシンキナーゼやセリン/トレオニンキナーゼが、循環器疾患やがん、代謝疾患、アレルギー、神経変性疾患等の疾患の発症や進行に寄与している。

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。最近のリン酸化プロテオミクス技術の進歩により生体内のリン酸化蛋白質の検出感度が格段に向上し、報告されるリン酸化部位の数が漸増している。ヒトゲノムにコードされているキナーゼの数(約500)から考えても、各々のキナーゼについて未同定の基質が多数存在することが示唆される。疾患と疾患に関連するキナーゼの役割を包括的に理解するためには基質の網羅的解析が必須であるが、特定のキナーゼの基質を同定する方法は長らく確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では細胞内シグナル伝達に中心的な役割を果たす蛋白質リン酸化に焦点をあて、ヒト疾患(循環器疾患、がん、精神・神経疾患等)の発症や進行におけ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。低分子量G蛋白質Rhoファミリーの下流のキナーゼや疾患に関連が示唆されるキナーゼを中心に、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網羅的な基質同定・解析を行い、キナーゼを中心としたリン酸化シグナルネットワークを明らかにすることで、疾患の発症・進行の分子メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)キナーゼ基質スクリーニング法の開発

インタラクトームによるキナーゼの基質スクリーニング法の開発・最適化を目指す。具体的には、キナーゼの触媒領域を用いたアフィニティカラムクロマトグラフィーにより、触媒領域と相互作用する蛋白質を得た後、ショットガン LC-MS/MS による相互作用蛋白質の同定を試みる。キナーゼの特性に応じて

諸条件の最適化を図る。

(2)疾患関連キナーゼの基質スクリーニング

上述の方法を用いて、Rhoファミリーに関連のある疾患関連キナーゼ(Rho-キナーゼ、PKN、aPKC、PAKなど)の基質のスクリーニングを行う。スクリーニングで得られた基質候補蛋白質とそのリン酸化部位情報は、リン酸化シグナルネットワークの一次情報として蓄積する。この情報を用いて *in silico* にてパスウェイ解析を行い、キナーゼとその基質がどのようなシグナルネットワークに帰属するか検討する。

(3)疾患関連キナーゼ基質の機能解析

スクリーニングによって得られた個々の基質とキナーゼのシグナルカスケードについてその生理機能の解析を行う。具体的には、*in vitro* でリン酸化反応を行い基質に機能変化が起こるかを生化学的に解析し、また同定したリン酸化部位について変異体やリン酸化抗体を作製して細胞レベルあるいは組織レベルでのリン酸化の意義や動態を解析する。さらに、疾患との関連について検討する。

4. 研究成果

(1)キナーゼ基質スクリーニング法の開発

本研究では、インタラクトームとリン酸化プロテオミクス技術を基盤とした Kinase-interacting substrate screening (KISS)法(図1)の開発・最適化を行い、Rho-キナーゼについて効率良く基質をスクリーニングすることに成功した。この方法により、ラット脳ライセートから140種類の基質候補蛋白質(既知の基質である MYPT1, MLC, Adducin, CRMP2, p190A RhoGAP 等を含む)356箇所リン酸化部位を見出した。得られたリン酸化部位は Rho-キナーゼのリン酸化コンセンサスとよく一致した(図2)。また、ラット心臓ライセートを用いることで、心臓における Rho-キナーゼの基質候補を得ることが出来た。一連の解析により Scribe や CARP (ANKRD1)を含む多数の新規基質候補蛋白質を得た(後述)。

図1: インタラクトームを基盤としたキナーゼ基質スクリーニング

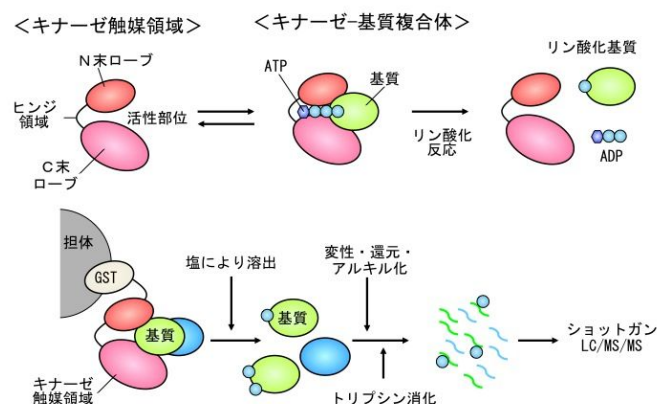
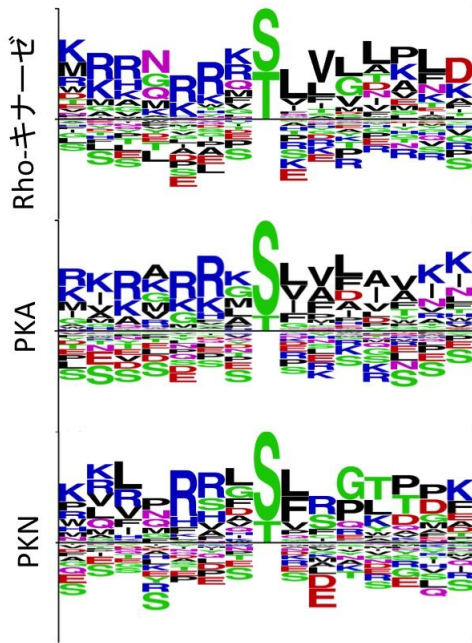


図2: KISS法により得られたキナーゼ基質のリン酸化配列

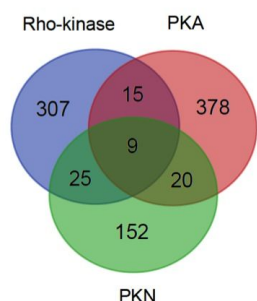


(2)疾患関連キナーゼの基質スクリーニング

Rho-キナーゼは、高血圧や血管攣縮、動脈硬化、心筋症、がん細胞の浸潤など、多数の疾患との関連が報告されており、創薬標的としても注目されている。一方で、それぞれの疾患において Rho-キナーゼの下流でどのような基質のリン酸化が重要な役割を果たしているかについては、未だ不明の部分も多い。前述のように、Scrib を含む極性蛋白質、Spectrin を含む細胞膜裏打ち蛋白質、CARP を含む心筋症関連蛋白質のクラスターが得られた。

更に、PKN, PAK, aPKC, PKA, MAPK, CaMK1, LYN, FYN, AKT, GSK3 等のキナーゼについてもスクリーニングを行った結果、それぞれに既知の基質を含む多数の基質候補蛋白質が得られた。PKN や PKA は Rho-キナーゼと同様にリン酸化部位の-2、-3 部位に塩基性アミノ酸を有することが知られており、実際にスクリーニングで得られた配列にはいずれもその傾向が認められた(図2)。一方でこれら3種のキナーゼの基質候補蛋白質を比較したところ、図3のようにそれぞれのキナーゼに特異的基質が得られた。以上のことより、KISS法により広範なキナーゼの基質スクリーニングが可能であることが示唆された。

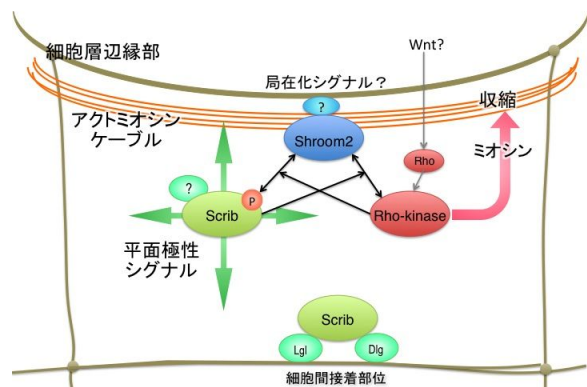
図3: KISS法により得られたキナーゼ基質候補の比較



(3)疾患関連キナーゼ基質の機能解析

Scrib は癌抑制遺伝子、および平面極性(Planar cell polarity: PCP)制御因子として知られており、Scrib 変異マウスでは発生過程における神経管閉鎖不全や心臓、腎臓の形成不全等が観察される。これまでに Rho/Rho-キナーゼシグナル経路が PCP の制御に関与することが示唆されてきたが、その分子機序については不明の点も多く残されていた。Rho-キナーゼによる Scrib のリン酸化部位を同定してリン酸化抗体を作製し、細胞内で Rho-キナーゼ依存的な Scrib のリン酸化を確認した。さらに、Scrib 結合蛋白質の探索を行ったところ、Shroom2 がリン酸化 Scrib に対してより高い結合性を示すことを見出した。Shroom2 はこれまでに Rho-キナーゼと相互作用し、Rho-キナーゼを介して細胞の収縮能を調節することが示唆されていた。本研究で Shroom2 が PCP 制御因子である Scrib と Rho-キナーゼ依存的に結合することが示唆されたことから、発生過程における組織形成や、がん細胞と正常細胞の間の細胞競合の分子基盤の一端が明らかになることが期待される(図4)。

図4: Scrib/Shroom2/Rho-kinaseによる局所的細胞収縮機構(モデル)



心臓の Rho-キナーゼ基質候補として特異性心筋症関連遺伝子産物が複数得られており、このうち CARP, MYL2, CSRFP3, BAG3 については in vitro におけるリン酸化を確認した。特に心保護効果を持つ転写補助因子と考えられている CARP については、Rho-キナーゼによるリン酸化依存的に 14-3-3 に結合すること、またその結果、核から細胞質に移行することを示した。Rho/Rho-キナーゼシグナルが圧負荷やアンジオテンシン依存的な心肥大に関わっていることは既に報告されているが、その下流の分子基盤についてはほとんど明らかではなかった。Rho-キナーゼが CARP やその他の心筋症関連蛋白質をリン酸化することが心肥大の発症・進行に重要な役割を持つ可能性が考えられる。

また、リン酸化モチーフ抗体を用いた解析より、PKA が Rho-キナーゼをリン酸化することも示し、PKA と Rho-キナーゼの間にクロストークが存在することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計7件)

Amano, M., Hamaguchi, T., Shohag, M.H., Kozawa, K., Kato, K., Zhang, X., Yura, Y., Matsuura, Y., Kataoka, C., Nishioka, T., and Kaibuchi, K. Kinase-interacting substrate screening (KISS) is a novel method to identify kinase substrate. *J Cell Biol*, 査読有, 2015, in press

Hamaguchi, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., Takano, T., Nishioka, T., Shohag, M. H., Yura, Y., Kaibuchi, K., and Amano, M. In vivo Screening for Substrates of Protein Kinase A Using a Combination of Proteomic Approaches and Pharmacological Modulation of Kinase Activity. *Cell Struct Funct*, 査読有, 40, 2015, 1-12

DOI: 10.1247/csf.14014

Nishioka, T., Shohag, M. H., Amano, M., and Kaibuchi, K. Developing novel methods to search for substrates of protein kinases such as Rho-kinase. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, 2015, in press

DOI: 10.1016/j.bbapap.2015.03.001

Ito, Y., Asada, A., Kobayashi, H., Takano, T., Sharma, G., Saito, T., Ohta, Y., Amano, M., Kaibuchi, K., and Hisanaga, S. Preferential targeting of p39-activated Cdk5 to Rac1-induced lamellipodia. *Mol Cell Neurosci*, 査読有, 61, 2014, 34-45

DOI: 10.1016/j.mcn.2014.05.006

Iizuka, M., Kimura, K., Wang, S., Kato, K., Amano, M., Kaibuchi, K., and Mizoguchi, A. Distinct distribution and localization of Rho-kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. *Cell Struct Funct*, 査読有, 37, 2012, 155-175

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986902>

Kato, K., Yazawa, T., Taki, K., Mori, K., Wang, S., Nishioka, T., Hamaguchi, T., Itoh, T., Takenawa, T., Kataoka, C., Matsuura, Y., Amano, M., Murohara, T., and Kaibuchi, K. The inositol 5-phosphatase SHIP2 is an effector of RhoA and is involved in cell polarity and migration. *Mol Biol Cell*, 査読有, 23, 2012, 2593-2604

DOI: 10.1091/mbc.E11-11-0958

Nishioka, T., Nakayama, M., Amano, M., and Kaibuchi, K. Proteomic screening for Rho-kinase substrates by combining kinase and phosphatase inhibitors with 14-3-3zeta affinity chromatography. *Cell Struct Funct*, 査読有, 37, 2012, 39-48

URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22251793>

(学会発表)(計8件)

天野睦紀、リン酸化プロテオミクスによるモノアミンシグナルの解明、第88回日本薬理学会年会、2015年3月20日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Amano, M., Systematic Substrate Screening of Protein Kinases using a Functional Proteomic Approach. 8th International Conference Inhibitors of Protein Kinases (IPK2014), 2014年9月23日、Warsaw (Poland)

Amano, M., Protein phosphorylation remains a black box in signal transduction: Developing a new method to search for substrates of polarity kinases including Rho-kinase. The 4th Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference, 2014年5月18日、Jeju (Korea)

天野睦紀、神経関連キナーゼの基質の網羅的解析、第27回日本医用マススペクトル学会東海支部講演会、2013年7月27日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)

天野睦紀、神経関連キナーゼの基質の網羅的解析、第13回日本蛋白質科学学会年会、2013年6月14日、とりぎん文化会館(鳥取県・鳥取市)

天野睦紀、神経関連キナーゼの基質の網羅的解析、第85回日本生化学会大会、2012年12月16日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

天野睦紀、Systematic Substrate Screening of Protein kinases in brain by a proteomic approach. 第35回日本神経科学大会、2012年9月20日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

天野睦紀、蛋白質相互作用を利用したキナーゼ基質の網羅的解析、日本プロテオーム学会2011年大会、2011年7月29日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

(その他)

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 睦紀 (AMANO, Mutsuki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 90304170

(2) 研究分担者

貝淵 弘三 (Kozo Kaibuchi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 00169377