

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440046

研究課題名(和文) ダウン症病因キナーゼDYRK1A - WDR68複合体の生理的機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological function of the complex between the Down syndrome kinase DYRK1A and WDR68

研究代表者

宮田 愛彦 (Miyata, Yoshihiko)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70209914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：種間でよく保存されたWD40リピートタンパク質であるWDR68と結合する細胞内タンパク質を単離した。質量分析による網羅的解析から、主要な分子シャペロンであるTRiC/CCTがWDR68と結合することを明らかにした。同時に、リン酸化プロテオーム解析によりWDR68およびTRiC/CCT上のリン酸化部位を新たに決定した。更にコンピューターモデリングによってWDR68が7つのプロペラから成るリング構造を取ることを明らかにした。また、分子シャペロンTRiC/CCTがWDR68のフォルディングと機能及び局在を支配する重要な因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：WDR68 (Trp-Asp repeat protein 68) is an evolutionarily conserved WD40-repeat protein with multiple physiological functions. However, the biochemical basis and regulatory mechanism of WDR68 activity remain unknown. We have isolated and identified cellular WDR68-binding partners using a phospho-proteomic approach. Eight TCP1 subunits comprising the molecular chaperone TRiC/CCT were identified as major WDR68-binding proteins, and phosphorylation sites in WDR68 and TRiC/CCT were identified. Computer-aided structural analysis suggested that WDR68 forms a 7-bladed beta-propeller ring. Knockdown of cellular TRiC/CCT by siRNA caused an abnormal WDR68 structure and led to reduction of its DYRK1A-binding activity. Concomitantly, nuclear accumulation and cellular solubility of WDR68 was suppressed in TRiC/CCT-deficient cells. Altogether, our results demonstrate that the molecular chaperone TRiC/CCT is essential for correct protein folding, DYRK1A-binding, and nuclear accumulation of WDR68.

研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：DYRK1A WDR68 TRiC/CCT WD40ドメイン 分子シャペロン タンパク質キナーゼ シグナル伝達 タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(a) DYRK1Aは脳神経系の発生・機能に重要なキナーゼで、ダウン症候群の原因の一つである。

*Minibrain*は、脳のサイズが小さく学習能力の低下した*Drosophila*変異体の原因遺伝子として同定されたタンパク質キナーゼである (Tejedor, F. *et al. Neuron* 14:287-301, 1995)。DYRK1Aは*Minibrain*のヒトオルソログであり、トリソミーによってダウン症候群を引き起こすクロモソーム21番のクリティカル領域21q32にマップされた。また、DYRK1Aの過剰発現が同症候群の先天性神経症状や発達異常の原因の一つであることが示された。従って、*Minibrain*/DYRK1Aは種を超えて生物個体の脳神経系の発生・機能に重要であり、その機能解明は重要な課題である。

(b) WDR68はDYRK1Aの細胞内特異的結合タンパク質である。

研究代表者はDYRK1Aの細胞内特異的結合タンパク質としてWD40リピートタンパク質であるWDR68を同定した(Miyata, Y. and Nishida, E. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1813:1728-1739, 2011)。WDR68はペチュニアの花の色素(アントシアニン)形成の異常を示す変異体の原因遺伝子として同定されたAN11の哺乳類オルソログで、そのアミノ酸配列は植物からヒトまで非常に良く保存されている。しかし、哺乳類ではアントシアニンが合成されないことから、WDR68は植物からヒトにいたる生物に共通なものと根源的な機能を持つと予想される。

(c) DYRK1A及びWDR68のいずれもその生理的機能・制御機構は未解明である。

DYRK1AはMAPキナーゼと配列が近縁であり何らかのシグナル伝達にかかわることが示唆される (Miyata, Y. and Nishida, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:291-295, 1999)。しかし、DYRK1Aが細胞内で果たす生理的機能の詳細や活性制御機構は不明である。一方、WDR68は他の多くのWD40タンパク質と同様に複数の重要なタンパク質と相互作用するアダプターとして機能すると考えられるが、その生化学的及び細胞内機能の詳細は明らかにされていない。

(d) DYRK1A-WDR68 複合体の機能を明らかにすることがダウン症候群の分子的理解につな

がる。

上記の学術的背景から、WDR68はDYRK1Aを含む複数のタンパク質と同時に結合することで、DYRK1Aと他のタンパク質との会合を引き起こす「場」として働いていると考えられる。従って、WDR68を介してDYRK1Aがどのような因子と相互作用するかを解明することが、DYRK1Aによるシグナル伝達系を明らかにする上で必須である。得られる研究成果は、DYRK1Aが関与するダウン症候群の分子基盤の理解と治療の可能性をもたらす、重要なものとなると期待される。更に、植物からヒトまで共通するWDR68の生理的機能の本質が解明できると予想される。

2. 研究の目的

本研究はDYRK1A-WDR68複合体が、細胞内でどのように機能を果たし、かつコントロールされているのかを明らかにすることを目的とする。特にWDR68の5つのWD40リピートを介してDYRK1Aが上流の制御因子や基質と会合する可能性に注目し、以下の2つのテーマを重点に研究を進める。

A) WDR68の細胞内結合タンパク質の同定と解析

WDR68を足場としてDYRK1Aと相互作用するタンパク質を明らかにするため、WDR68と物理的に結合する細胞内タンパク質を網羅的に同定する。得られた結合タンパク質のリストから、複合体形成によってDYRK1Aのキナーゼ活性に影響を及ぼすものがないか探索・解析する。更に結合タンパク質の中にDYRK1Aによってリン酸化されて機能制御される基質が存在するかどうかを解明する。得られた結果から、DYRK1AおよびWDR68がどのようなシグナル伝達経路上にあり、どのような生理的機能を持つかを明らかにする。

B) リン酸化によるDYRK1A-WDR68複合体の制御機構の解析

DYRK1A-WDR68複合体の生成・解離や機能がリン酸化によって制御される可能性を考え、まずDYRK1AおよびWDR68が細胞内でリン酸化されるか解析する。またそのリン酸化が分子内のどの残基で起こりどのキナーゼが担うのかを同定する。さらに、リン酸化によってWDR68と

DYRK1A 他 の 結 合 タ ン パ ク 質 と の 複 合 体 形 成 が ど の よ う な 調 節 を 受 け る か を 解 明 す る 。 特 に、(A) で 得 ら れ た WDR68 結 合 タ ン パ ク 質 の リ ス ト に 含 ま れ る キ ナ ー ゼ や フ ォ ス フ ザ ー ゼ が DYRK1A 及 び WDR68 の リ ン 酸 化 状 態 や 機 能 を 制 御 す る か を 明 ら か に す る。

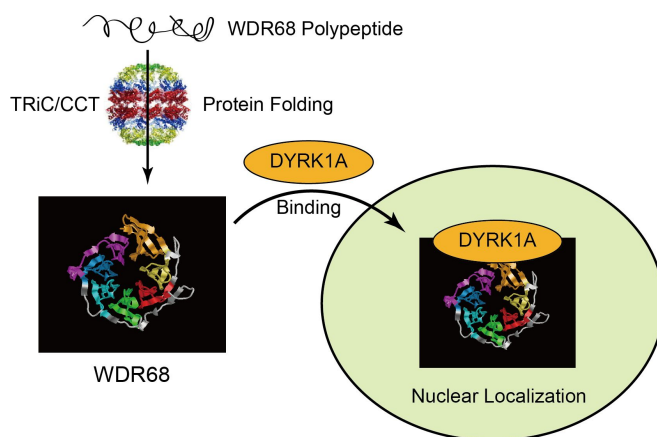
3. 研究の方法

WDR68 を 培 養 細 胞 に 発 現 し、特 異 的 に 結 合 す る タ ン パ ク 質 を タ グ ア フ ィ ニ テ ィ ー 精 製 し た 後 に マ ス ス ペ ク ト ル 解 析 に よ り 網 羅 的 に 同 定 す る。同 定 し た WDR68 結 合 タ ン パ ク 質 が DYRK1A の 活 性 を 制 御 す る か を 解 析 す る。ま た WDR68 結 合 タ ン パ ク 質 の 中 か ら、DYRK1A 依 存 的 な リ ン 酸 化 に よ っ て 機 能 制 御 さ れ る 基 質 を 同 定 す る。更 に、WDR68 と 結 合 タ ン パ ク 質 と の 複 合 体 形 成 が リ ン 酸 化 に よ り 制 御 さ れ る か 解 析 す る。DYRK1A-WDR68 複 合 体 の 細 胞 内 リ ン 酸 化 サ イ ト を 変 異 体 作 成・マ ス ス ペ ク ト ル 解 析・リ ン 酸 化 特 異 的 抗 体 を 用 い て 決 定 す る。次 い で、同 リ ン 酸 化 を 担 う 責 任 キ ナ ー ゼ を 同 定 し、複 合 体 の 生 成・解 離 が リ ン 酸 化 に よ り 制 御 さ れ る か 解 明 す る。以 上 の WDR68 を 介 す る 複 合 体 形 成 の 解 析 に よ り、DYRK1A が ど の よ う な 細 胞 内 シ グ ナ ル 伝 達 経 路 に 位 置 す る か を 解 明 し、DYRK1A-WDR68 複 合 体 の 細 胞 内 機 能 と 制 御 機 構 を 明 ら か に す る。

4. 研究成果

DYRK1A は ヒ ト ク ロ モ ソ ム 21 番 の ダ ウ ン 症 ク リ テ ィ カ ル 領 域 に コ ー ド さ れ た セ リ ン・ス レ オ ニ ン キ ナ ー ゼ で、そ の 3 倍 化 は ダ ウ ン 症 の 多 彩 な 症 状 の 一 部 の 原 因 と な る。こ れ ま で に 我 々 は DYRK1A の 主 要 な 細 胞 内 結 合 タ ン パ ク 質 と し て WDR68 を 同 定 し た。WDR68 の 生 理 的 機 能 を 知 る た め、WDR68 の 細 胞 内 結 合 タ ン パ ク 質 を 網 羅 的 リ ン 酸 化 プ ロ テ オ ー ム に よ っ て 解 析 し た。そ の 結 果、分 子 シ ャ ペ ロ ン T Ri C / C C T を 構 成 す る 8 つ の T C P I サ ブ ユ ニ ッ ト が 主 要 な WDR68 結 合 タ ン パ ク 質 と 同 定 さ れ た。ま た 共 免 疫 沈 降 実 験

に よ っ て T Ri C / C C T と WDR68 と の 結 合 が 確 認 さ れ た。同 時 に T Ri C / C C T の 各 サ ブ ユ ニ ッ ト の リ ン 酸 化 サ イ ト を 決 定 し た。コ ン プ ュ ー タ ー に よ る 構 造 解 析 に よ っ て、WDR68 は 5 つ の W D 4 0 リ ピ ー ト に 加 え て N 末 端 及 び C 末 端 領 域 を 含 め た 7 枚 の プ レ ー ド (羽 根) か ら 成 る ベ ー タ プ ロ ペ ラ 構 造 を 取 る こ と が 示 唆 さ れ た。各 種 欠 失 変 異 体 を 用 い た 実 験 か ら、こ の 中 そ の 位 置 に 関 わ ら ず WDR68 の 3 枚 の プ レ ー ド が T Ri C / C C T と の 結 合 に 必 要 で あ る こ と が 判 っ た。siRNA に よ っ て T Ri C / C C T を ノ ッ ク ダ ウ ン し た 細 胞 で は、WDR68 の フ ォ ル デ ィ ン グ が 異 常 に な り、WDR68 の DYRK1A 結 合 能 が 著 し く 減 弱 し た。ま た そ れ に 伴 っ て DYRK1A と の 複 合 体 形 成 に 起 因 す る WDR68 の 核 へ の 集 積 が 起 こ ら な く な っ た。更 に、過 剰 発 現 し た WDR68 は T Ri C / C C T が 無 い と 細 胞 質 に 大 き な タ ン パ ク 質 凝 集 体 を 形 成 し た。こ れ ら の 結 果 は、分 子 シ ャ ペ ロ ン T Ri C / C C T が W D 4 0 リ ピ ー ト タ ン パ ク 質 WDR68 の プ ロ ペ ラ 構 造 形 成・DYRK1A 結 合・正 し い 細 胞 内 局 在 に 必 須 の 因 子 で あ る こ と を 示 し て い る。



DYRK1A の 各 種 欠 失 変 異 体 と WDR68 と の 結 合 の 解 析 か ら、DYRK1A の N 末 端 領 域 が WDR68 と の 結 合 に 必 須 で あ る こ と が 判 明 し た。こ の 領 域 は DYRK1A と 類 似 の キ ナ ー ゼ で あ る DYRK1B と 相 同 性 が 高 く、実 際 DYRK1B も WDR68 と 結 合 す る 事 が 明 ら か に な っ た。特 に DYRK1A の ア ミ ノ 酸 81-121 が WDR68 と の 結 合 に 必 要 充 分 で あ り、WDR68 が 短 い ア ミ ノ 酸 モ チ ー フ を 特 異 的 に 認 識 す る 可 能 性 が 考 え ら れ る。

WDR68 と結合する他のキナーゼとして MEKK1 および HIP2K を同定したが、単純なアミノ酸配列の比較によってはこれらのキナーゼに共通する WDR68 結合モチーフは明らかでない。今後、WDR68 のターゲット認識モチーフを決定し、ヒトゲノムにコードされるタンパク質の中から WDR68 と結合するタンパク質を抽出する作業を進めたい。

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 4 件)

1. Marmioli, S., Fabbro, D., Miyata, Y., Pierobon, M., and Ruzzene, M.
Phosphorylation, signaling, and cancer: Targets and targeting.
Biomed. Res. Int. **2015**:601543, 2015. (doi: 10.1155/2015/601543) (査読有)
2. Guerra, B., Rasmussen, T., Schnitzler, A., Jensen, H., Boldyreff, B., Miyata, Y., Marcussen, N., Niefind, K., and Issinger, O.G.
Protein kinase CK2 inhibition is associated with the destabilization of HIF-1 α in human cancer cells.
Cancer Letters, 356:751-761, 2015.
(doi:10.1016/j.canlet.2014.10.026) (査読有)
3. Miyata, Y., Shibata, T., Aoshima, M., Tsubata, T., and Nishida, E.
The Molecular Chaperone TRiC/CCT Binds to the Trp-Asp (WD) 40-repeat Protein WDR68 and Promotes Its Folding, Protein Kinase DYRK1A-binding, and Nuclear Accumulation.
J. Biol. Chem., **289**:33320-33332, 2014.
(doi:10.1074/jbc.M114.586115) (査読有)
4. Miyata, Y., Nakamoto, H., and Neckers, L.

The therapeutic target Hsp90 and cancer hallmarks.

Current Pharmaceutical Design, **19**:347-365, 2013. (査読有)

[学会発表等] (計 9 件)

1. 宮田愛彦, 柴田猛, 青島理人, 津幡卓一, 西田栄介
"TRiC/CCT は WD40 リピートタンパク質 WDR68 の高次構造形成・DYRK1A 結合・核局在に必須の分子シャペロンである (Essential role of TRiC/CCT chaperone in folding and function of a DYRK1A-binding WD40-repeat protein WDR68)"
BMB2015 (第 38 回 日本分子生物学会年会, 第 88 回 日本生化学会大会) (神戸), 2015 年 12 月 03 日
2. Miyata, Y.
"Interaction of Hsp90 and Cdc37 with specific members of the DYRK/Minibrain family protein kinases"
Seminar in Semmelweis University, Department of Medical Chemistry (Budapest, Hungary), 2015 年 10 月 07 日
3. Miyata, Y.
"The Pivotal Role of A Molecular Chaperone Hsp90 for Cellular Signaling Protein Kinases"
Seminar in Hungarian Academy of Sciences, Biological Research Center, Institute of Biochemistry (Szeged, Hungary), 2015 年 10 月 05 日
4. Miyata, Y., Shibata, T., Aoshima, M., Tsubata, T., and Nishida, E.
"Essential role of TRiC/CCT in folding and function of a DYRK1A-binding WD40-repeat protein WDR68"
Gordon Research Conference on "Stress Proteins in Growth, Development and Disease" (Lucca-Barga, Italy), 2015 年 07 月 05-10 日
5. Miyata, Y.

"The Pivotal Role of A Molecular Chaperone Hsp90 for Cellular Signaling Protein Kinases"
The 17th symposium, Graduate School of Biostudies, Kyoto University (第17回 京都大学・大学院生命科学研究科 シンポジウム) (京都)、2015年07月02日

6. **宮田愛彦**

"DYRK ファミリーキナーゼとキナーゼシグナルを媒介する WDR68"
蛋白研セミナー「キナーゼ・シグナリング研究の進展」(大阪)、2014年03月14日

7. **宮田愛彦**、西田栄介

"DYRK ファミリーキナーゼの細胞内結合タンパク質による機能制御"
第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ「キナーゼ・シグナルから生理機能へ」(神戸)、2013年12月03日

8. **Miyata, Y.**, and Nishida, E.

"Functional regulation of DYRK family protein kinases by cellular binding partners"
7th International Conference on Protein Kinase CK2 (Lublin, Poland), 2013年09月12日

9. **Miyata, Y.**, and Nishida, E.

"Functional regulation of DYRK family protein kinases by cellular binding partners"
The 15th symposium, Graduate School of Biostudies, Kyoto University (第15回 京都大学・大学院生命科学研究科 シンポジウム) (京都)、2013年07月04日

(図書) (計2件)

1. **Miyata, Y.**

CK2 Inhibitors and the DYRK Family Protein Kinases.
In "Protein Kinase CK2 Cellular Function in Normal and Disease States",
Eds. K. Ahmed, O.-G. Issinger, and R. Szyska,
Advances in Biochemistry in Health and Disease (Springer International Publishing Switzerland),

12:341-359, 2015.

(doi:10.1007/978-3-319-14544-0_19)

2. **Miyata, Y.**

The pivotal role of CK2 in the kinome-targeting Hsp90 chaperone machinery.
"The Wiley-IUBMB Series on Biochemistry and Molecular Biology: Protein Kinase CK2", ed. L.A.Pinna, Wiley-Blackwell Publishing (John Wiley & Sons, Inc., Publication), pp.205-238, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ

<http://www.y-miyata.lif.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 愛彦(MIYATA, Yoshihiko)
京都大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号: 70209914

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし