

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19570139

研究課題名（和文） 細胞内シグナルネットワークにおけるミリスチル化蛋白質の機能調節機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the functional regulation of myristoylated proteins in intracellular signaling network.

研究代表者

松原 守 (MATSUBARA MAMORU)

京都学園大学・バイオ環境学部・准教授

研究者番号：90288481

研究成果の概要： 細胞内シグナルネットワークにおけるミリスチル化蛋白質の機能調節機構を理解するために、NAP-22についてミリスチル化依存的に結合する蛋白質の同定を行った。その結果、従来知られているカルモジュリン以外にPKC やERK1,2などのプロテインキナーゼが同定された。ERK1とNAP22が直接結合すると同時に、直接リン酸化することも分かった。更に、リン酸化部位同定法を新たに開発し、これらERK1でリン酸化される部位を正確に同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ミリスチル化、翻訳後修飾、細胞内シグナル伝達、リン酸化、プロテオーム解析  
プロテインキナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高等動物においては、遺伝子配列に基づいて合成された蛋白質がそのまま機能を発揮することは稀で、リン酸化、糖鎖、ユビキチン化や脂質など様々な翻訳後修飾を受けることではじめてその機能を発揮する。その中で脂質による翻訳後修飾は細胞内シグナル伝達系に関わる多くの蛋白質に見られ、蛋白質と細胞膜との結合や、蛋白質の機能調節などにおいて極めて重要な役割を担っている。

(2) 脂質修飾の中の一つであるミリスチル化

は、これまで蛋白質と細胞膜との結合に深く関わるというのが主要な機能であると言われていたが、我々は、このミリスチル化の機能以外に、新たな機能として蛋白質間相互作用にミリスチル化が重要であることを分子レベルで明らかにしている。

(3) 神経特異的なミリスチル化蛋白質である NAP-22 のミリスチル化においては、そのターゲット蛋白質であるカルモジュリンとの相互作用に直接関わっていた。従って、ミリスチル化は、細胞膜との結合だけでなく、蛋白質

間相互作用にも関与することで、細胞内シグナルネットワークにおいて重要な役割を担っていることが推察される。そのため、NAP-22などのミリスチル化蛋白質が、ミリスチル化依存的にどのような蛋白質と結合するのかを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

蛋白質のミリスチル化は細胞膜との結合だけでなく、蛋白質間相互作用にも深く関わることが明らかになっている。また、ミリスチル化蛋白質の多くは、細胞膜はもちろんのこと、細胞膜上のラフトと呼ばれるシグナル伝達蛋白質が数多く集積する細胞膜画分に存在することが分かっており、このラフト画分で他の蛋白質と相互作用しているものと考えられている。また、これらの蛋白質は、リン酸化によって細胞膜から細胞質へ移行することが知られているが、蛋白質間相互作用にリン酸化がどのように関わっているかは不明である。

本研究では、特に細胞内シグナルネットワークにおけるミリスチル化蛋白質の機能を明らかにするために、蛋白質間相互作用に関わるミリスチル化蛋白質の同定ならびにリン酸化によるミリスチル化蛋白質の機能変化を探索する。更に、ミリスチル化による蛋白質間相互作用を分子レベルで議論する。

## 3. 研究の方法

(1) NAP-22についてミリスチル化されているものとされていない蛋白質を用い、細胞の中からミリスチル化されている時だけに結合する蛋白質についてプロテオミクス的手法を用いて同定した。

(2) 得られた結果から、NAP-22 と ERK1 が結合することが分かったので、その結合が細胞内でも結合するかどうかを、Native Page ゲル中での複合体形成実験で確かめた。

(3) ミリスチル化蛋白質が関与するシグナル伝達系の理解のためには、細胞内でのこれらの蛋白質のリン酸化解析も必要である。リン酸化解析を効率よく行うシステムとして Phos-tag アクリルアミドゲルを用いることにより、個々のリン酸化部位に対応したバンドを分離し、それに対応するリン酸化部位を同定するシステムを構築した。

## 4. 研究成果

(1) NAP-22 について、ミリスチル化依存的に結合する蛋白質の同定を行った。大腸菌で発現させたミリスチル化されている NAP-22 とミリスチル化されていない NAP-22 を精製し、

ミリスチル化されている時に結合する蛋白質を質量分析で解析した。その結果、NAP-22 ではカルモジュリン以外に PKC や ERK1,2 などのプロテインキナーゼが同定された。

(2) ERK1 と NAP-22 が直接結合するかどうかを検討するために、NAP-22 と ERK1 の結合を Native Page による複合体の有無を調べた。その結果、Native Page 条件化で NAP-22 と ERK1 の複合体が検出された。現在、BIACORE の系でその結合定数を求める予定である。

(3) ERK1 が NAP-22 をリン酸化するかどうかを調べた結果、NAP-22 を直接リン酸化することが分かった。現在、その生理的な意味を、細胞を用いた系で検討している。

(4) リン酸化解析を効率よく行うシステムとして Phos-tag アクリルアミドゲルを用いることにより、個々のリン酸化部位に対応したバンドを分離し、それに対応するリン酸化部位を同定するシステムを構築した。具体的なリン酸化解析の例として、アルツハイマー病の原因タンパク質の一つと考えられている Tau タンパク質を用いた。Tau タンパク質をそれぞれチロシンキナーゼ (タンパク質のチロシン残基をリン酸化するプロテインキナーゼ) である Abl, Met, Fyn でリン酸化し、これを通常の SDS-PAGE およびアクリルアミド化 Phos-tag SDS-PAGE (Phos-tag SDS-PAGE) で分離した。Fig.1 から、通常の SDS-PAGE では、それぞれのチロシンキナーゼでリン酸化された Tau は分離できないが、Phos-tag SDS-PAGE を用いたほうでは、Abl, Met でリン酸化された Tau が分離されていた。このことから、Phos-tag SDS-PAGE は、一次元電気泳動上で難しいとされていたリン酸化タンパク質の分離を可能にする方法であることが明らかになった。

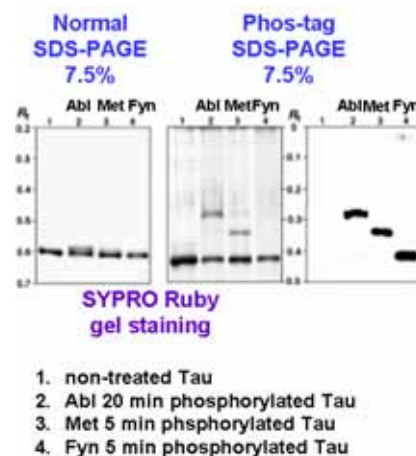


Fig.1 Phos-tag SDS-PAGE を用いたリン酸化 Tau の分離

(5) 上記システムを用いることにより、NAP-22のERK1によるリン酸化部位を解析したところNAP-22 (rat) のThr180番目がリン酸化されていた。この部分は、ヒト、マウス、ラットにおいて保存されている領域であることから、重要なリン酸化部位であることが推定された (Fig.2)。更に、他のMAPキナーゼによってもリン酸化されるかどうかを検討したところ、p38やJNK1によってもThr180がリン酸化されることが分かった。

(6) 細胞内でのこのリン酸化部位の生理的な意義を明らかにするために、このリン酸化部位に対するポリクローナル抗体の作成を試みたが、現在までに力価の高い抗体ができていない。Thr180のリン酸化による、カルモジュリン結合の影響を検討した結果、リン酸化による結合能の差は出なかった。これは、カルモジュリン結合部位から離れているためと考えられた。

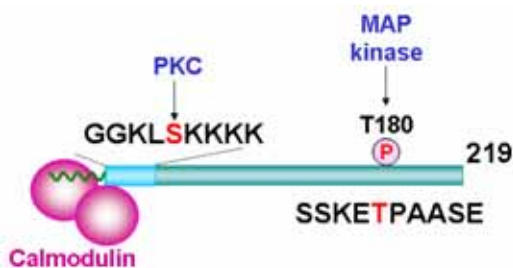


Fig.2 NAP-22 のリン酸化部位

(7) 以上、ミリスチル化蛋白質である NAP-22 に関して、新たに ERK1 などの MAP キナーゼがミリスチル化依存的に結合することが分かった。従って、蛋白質相互作用にミリスチル化が深く関わるという現象は、様々な蛋白質において存在する可能性があり、大変意義深い結果である。今後、NAP-22 以外のミリスチル化蛋白質にも広げて研究することで、特にラフトなどでの細胞内シグナルネットワークにおけるミリスチル化蛋白質の機能制御を明らかに出来るものと考えている。更に、リン酸化というダイナミックな翻訳後修飾も関与しているので、その解析法の更なる発展も含めて、ミリスチル化蛋白質のリン酸化の意義についても深く追求していきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Uno, T., Nakada, T., Okamoto, S., Nakamura, M., Matsubara, M., Imaishi, H., Yamagata, H., Kanamaru, K. and Takagi, M. Determination of phosphorylated amino acid residues of Rab8 from *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 66, 89-97 (2007), 査読有

2. Matsubara, M., Hunter, C. and Tsuchiya, F. Dynamic site-specific phosphorylation analysis by LC/MS/MS. *Chemistry Today* 25, 92-94 (2007), 査読有

3. 松原 守  
プロテオミクスによる環境応答シグナル伝達機構の解明  
京都学園大学総合研究所所報 9, 59-63 (2007), 査読無

4. Yagi, H., Nakagawa, M., Takahashi, N., Kondo, S., Matsubara, M. and Kato, K. Neural complex-specific expression of xylosyl N-glycan in *Ciona intestinalis*. *Glycobiology* 18, 145-151 (2008), 査読有

5. Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, Matsubara, M., Yamada, S., Nakamura, H., Shiro, Y. Aoki, Y., Okita, K. and Koike, T. Separation of phosphoproteins isotypes having the same number phosphate groups using phosphate-affinity SDS-PAGE. *Proteomics* 15, 2994-3003 (2008), 査読有

6. Kinoshita, T., Yoshida, I., Nakase, S., Okita, K., Gouda, M., Matsubara, M., Yokota, K., Ishiguro, H. and Tada, T. Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 1123-1127 (2008), 査読有

7. Alev, C., Urschel, S., Sonntag, S., Zoidl, G., Fort, A., Hoher, T., Matsubara, M., Willecke, K., Spray, D. and Dermietzel, R. The neuronal connexin36 interacts with and is phosphorylated by CaMKII in a way similar to CaMKII interaction with glutamate receptors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 20964-20969 (2008), 査読有

8. Uno, T., Morikawa T., Nakamura, M., Matsubara, M., Yamagata, H., Kanamaru, K. and Takagi, M.

Biochemical characterization of Rab proteins from *Bombyx mori*.

*Arch. Insect Biochem. Physiol.* 70, 77-89 (2009), 査読有

9. Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E., Matsubara, M., Aoki Y., Ohie, S., Mouri, Y. and Koike T.

Two-dimensional phosphate-affinity gel electrophoresis for the analysis of phosphoprotein isotypes.

*Electrophoresis* 30, 550-559 (2009), 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

1. 大家志織、松原守、青木悠里、木下英司、木下恵美子、小池透

リン酸化プロテオーム研究に向けた新しいリン酸アフィニティー2次元ゲル電気泳動法の開発

日本薬学会第127年会

2007年3月29日(富山)

2. Tsuchiya, F., Hunter, C. and Matsubara, M.

Monitoring of temporal changes in phosphorylation states of proteins using mass spectrometry and a chemical labeling strategy.

ABRF2007 -Creating the Biological Roadmap - 2007 March 31-April 3 (Tampa, Florida)

3. 木下英司、木下恵美子、大家志織、松原守、小池透

リン酸化結合ナノ分子を利用した新しい2次元電気泳動法の開発

第48回日本生化学会中国・四国支部例会

2007年5月20日(高知)

4. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Yuri Aoki, Shiori Ohie, Yuka Mouri, Mamoru Matsubara, and Tohru Koike

Phosphate affinity 2-D gel electrophoresis for the analysis of Phosphoproteins.

BMB2007

2007年12月13日(横浜)

5. 松原守

「質量分析計を用いたリン酸化ネットワークの解析」

第3回(2007) 島津製作所MALDIユーザ

ーズミーティング 基調講演

2007年7月27日(大阪)

6. 吉田育代、木下誉富、合田正貴、横田耕一、松原守、石黒啓司、多田俊治

ヒトERK1/Iodotubercidin複合体の構造学的研究

日本薬学会第128年会

2008年3月26日(横浜)

7. 矢木宏和、中川将司、近藤幸子、高橋禮子、松原守、加藤晃一

カタユレイボヤの神経複合体におけるキシロース含有N型糖鎖の特異的発現

日本薬学会第128年会

2008年3月28日(横浜)

8. 矢木宏和、中川将司、高橋禮子、金子琢磨、近藤幸子、松原守、加藤晃一

カタユレイボヤにおける神経複合体特異的なキシロース含有N型糖鎖の発現

BMB2008

2008年12月9日(神戸)

9. 前田紀子、徳誠吉、内藤康仁、松原守、山本秀幸

リボソームタンパク質S19のリン酸化とS19結合タンパク質との相互作用

BMB2008

2008年12月12日(神戸)

10. Eiji Kinoshita, Emiko Kinoshita-Kikuta, Mamoru Matsubara, Seiji Yamada, Hiro Nakamura, Yoshitsugu, Shiro, Yuri Aoki, Kouki, Tohru Koike

Separation of phosphoprotein isotypes with the same phosphate stoichiometry using phosphate-affinity SDS-PAGE.

BMB2008

2008年12月12日(神戸)

〔図書〕(計 0件)

〔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.kyotogakuen.ac.jp/~molbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松原守(MATSUBARA MAMORU)

京都学園大学 バイオ環境学部・准教授

研究者番号: 90288481