

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570129

研究課題名(和文) DYRKファミリーキナーゼと特異的に相互作用する細胞内タンパク質の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analyses of cellular proteins that specifically interact with DYRK family protein kinases

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

研究成果の概要(和文)：ダウン症の発症に関与するタンパク質リン酸化酵素 DYRK1A と細胞内で結合するタンパク質を探索し、WDR68 を同定した。WDR68 は植物からヒトまで広く存在する機能未知のタンパク質である。ヒトの 5 種類の DYRK ファミリーのうち DYRK1A および DYRK1B のみが WDR68 と結合し、DYRK2, DYRK3, DYRK4 は結合しなかった。WDR68 の細胞内量を減らすと培養細胞は増殖も生存もできなかった。WDR68 は細胞質及び核に存在するが、DYRK1A が存在すると DYRK1A と結合して核に集積するようになった。DYRK1A は WDR68 と結合してその存在様式を変化させることで WDR68 の細胞内機能に影響を及ぼすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：DYRK1A is encoded in the Down's syndrome critical region on human chromosome 21, and plays an important role in the functional regulation of cells. We have identified WDR68, an evolutionarily conserved WD40 protein, as a cellular binding partner of DYRK1A. We showed that WDR68 is indispensable for the optimal proliferation and survival of mammalian cultured cells. DYRK1A and DYRK1B, but not DYRK2, DYRK3, or DYRK4, bound to WDR68. WDR68 was distributed throughout the cell, whereas nuclear accumulation of WDR68 was observed upon co-expression of DYRK1A. Taken together, these results suggest that DYRK1A binds specifically to WDR68 in cells, thereby inducing nuclear translocation of WDR68.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生化学・分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：DYRK1A, WDR68, WD40-repeat, ダウン症候群、核移行、細胞情報伝達

1. 研究開始当初の背景

DYRK ファミリーキナーゼは DYRK1A,

DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4 の 5 つのメンバーからなり、いずれも中央に互いに

配列の類似したキナーゼドメインを持ち、その領域の配列は MAP キナーゼと相溶性が高い。一方でキナーゼドメイン以外の領域には各 DYRK が独自の配列を持っており、組織や細胞内での発現様式・分布も異なっている。これらのことから、DYRK はそれぞれのメンバーが固有の機能を持ち、細胞内で何らかのシグナル伝達に関与していると考えられる。

DYRK ファミリーのうち最も普遍的に存在する DYRK1A はヒトクロモソーム 21 番のダウン症候群クリティカル領域にコードされ、トリソミー形成による DYRK1A の量的変化がダウン症候群の多彩な症状の一部を担うと考えられている。しかし、DYRK1A の細胞内の活性制御機構及び生理作用の詳細やダウン症候群の症状との具体的な関連については詳しく解明されていない。

WDR68 はペチュニアの花の色素形成に異常を持つ変異体の責任遺伝子として初めて同定され、アントシアニンの合成に関わる遺伝子群の転写を制御する。しかし、アントシアニンを合成しない哺乳類にも非常に高い相溶性を示すオルソログが存在することから、WDR68 はより一般的で重要な生理機能を持つことが予想される。WDR68 がタンパク質間相互作用に関わる WD40 リピート配列を含むことを考えあわせると、WDR68 は植物からヒトにいたる幅広い生物種で普遍的で非常に重要な機能を持つと推定されるが、その生化学的・生理的機能の詳細は不明である。

2. 研究の目的

以上のような背景のもとで、DYRK1A が細胞内でどのような因子と相互作用しているのか、またその相互作用によって DYRK1A の活性や機能がどのような影響を受けるのか、更に相互作用する相手因子の機能を DYRK1A がどのように制御するのかを明らかにすることを研究の目的とした。DYRK1A と相互作用する因子の同定を手がかりとしてダウン症候群のさまざまな症状がどのような分子メカニズムで生じるのかを解明し、更に広く DYRK ファミリーキナーゼが細胞内でどのような機能をもちどのように制御されているかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

哺乳類培養細胞株 COS7 に過剰発現した DYRK1A をタグアフィニティー精製により単離し、特異的に結合するタンパク質を SDS-PAGE によって分離し、そのうちの分子量約 42kDa の細胞内タンパク質をマスマススペクトル-PMF 解析を用いて WDR68 と同定した。また WDR68 と DYRK1A の相互作用の詳細について、COS7 細胞への両タンパク質の共発現・共免疫沈降実験によって解析した。

更に、同定された WDR68 の機能を明らかにするため、RNAi 法によってその量を減らしたときに細胞の受ける影響を解析した。また、WDR68 及び DYRK1A の細胞内局在を細胞免疫染色及び GFP 融合タンパク質の蛍光顕微鏡観察によって調べた。

4. 研究成果

DYRK1A と特異的に結合するタンパク質を哺乳類培養細胞から精製し、マスマススペクトルによって同定したところ、WDR68 であった。WDR68 を認識する抗ペプチド特異抗体を作成した。WDR68 に対する特異的 siRNA を細胞に導入したところ、内在性の WDR68 が顕著に減少した。その結果、細胞の増殖はストップし細胞の形態・接着性の変化と細胞死が観察された。このことから、WDR68 が細胞の分裂・増殖・生存維持に必須であることが判った。

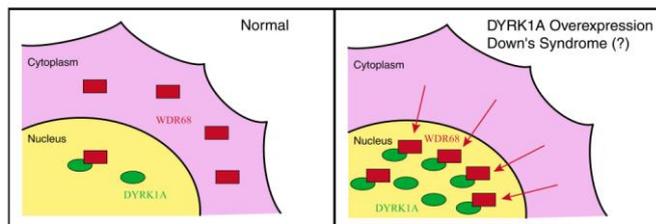
細胞に共発現した DYRK1A と WDR68 は共免疫沈降され、両者が物理的に複合体を形成することが確認された。DYRK ファミリーキナーゼの 5 種類のメンバーについて同様の実験によって WDR68 との結合を調べると、DYRK1A, DYRK1B は結合したが、DYRK2, DYRK3, DYRK4 は結合しなかった。内在性の WDR68 も DYRK ファミリーのうちの DYRK1A と DYRK1B とのみ結合した。

DYRK1A のアミノ酸配列は大きく N 末端領域・中央のキナーゼドメイン・C 末端領域に分けられる。さまざまな欠失変異体と WDR68 との共免疫沈降実験から、DYRK1A の N 末端が WDR68 との結合に必要な充分であることがわかった。一方で WDR68 は 5 つの WD40 リピートを持ち、それ以外に N 末端及び C 末端領域を持つが、5 つの WD40 リピートだけでは DYRK1A との結合には不十分で N 末端及び C 末端領域のいずれもが DYRK1A との結合に必要であった。

細胞内の WDR68 の局在を免疫蛍光染色により調べたところ、細胞全体に存在することがわかった。DYRK1A を発現させると WDR68 は DYRK1A と共に強く核内に局在するようになった。DYRK1A による WDR68 の核内局在化には DYRK1A のキナーゼ活性は不要であった。これらの結果から、DYRK1A は物理的に WDR68 と結合することで WDR68 を核内に局在させ、核内で両者が複合体として存在することが示された。

以上の研究成果により、DYRK1A 及び DYRK1B の生理的作用の一部が WDR68 との結合を介している可能性が示唆される。特に DYRK1A の過剰発現によって WDR68 の核内への集積が引き起こされたことから、WDR68 の細胞質での正常な機能が DYRK1A によって阻害される一方、核内での WDR68 の異常な働きが誘導されることが

予想される。この事が **DYRK1A** の過剰発現を原因とするダウン症候群の多彩な症状を説明する分子メカニズムの一端を形成している可能性が考えられる(図参照)。



加えて、新たにこれまで機能不明であった **WDR68** が細胞の分裂・増殖・生存維持に必須であることが明らかになり、今後 **WDR68** の生化学的・細胞生物学的な機能とその制御機構の解明に結びつくと期待できる。

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. Hong, S.M., Yamashita, J., Mitsunobu, H., Uchino, K., Kobayashi, I., Sezutsu, H., Tamura, T., Nakajima, H., Miyagawa, Y., Lee, J.M., Mon, H., Miyata, Y., Kawaguchi, Y., and Kusakabe, T.
Efficient soluble protein production on transgenic silkworms expressing cytoplasmic chaperones.
Appl. Microbiol. Biotechnol., **87**:2147-2156, 2010. (査読有)
2. Tsuchiya, Y., Akashi, M., Matsuda, M., Goto, K., Miyata, Y., Node, K., and Nishida, E.
Involvement of the protein kinase CK2 in the regulation of mammalian circadian rhythms.

Science Signaling, **2**:ra26, 2009. (査読有)

3. Miyata, Y.

CK2: The kinase controlling the Hsp90 chaperone machinery.

Cell. Mol. Life Sci., **66**:1840-1849, 2009.

(総説) (査読有)

4. Miyata, Y., and Nishida, E.

Evaluating CK2 activity with the antibody specific for the CK2-phosphorylated form of a kinase-targeting cochaperone Cdc37.

Mol. Cell. Biochem., **316**:127-134, 2008.

(査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. 宮田愛彦、西田栄介

"ダウン症候群に関連する **DYRK1A** キナーゼは高度に保存された **WD40** タンパク質 **WDR68** と特異的に結合してその核移行を促進する"

BMB2010 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 (神戸)、2010 年 12 月 10 日 (ポスター発表)

2. Miyata, Y., and Nishida, E.

"A possible role of CK2 in protein nuclear translocation signalling "

6th International Conference on Protein

- Kinase CK2* (Cologne, Germany), 2010
年 9月10日 (招待口演)
3. **宮田愛彦**、西田栄介
"Hsp90 のキナーゼ特異的コシヤペロン Cdc37 に対するリン酸化認識抗体を用いた CK2 活性変動の解析"
第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、
2009年 10月 24日 (ポスター発表及び
口頭発表)
4. **Miyata, Y.**, and Nishida, E.
"An authentic molecular chaperone activity of Hsp90 and Cdc37 for the signaling protein kinases DYRKs"
The 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine
(Sapporo, Japan), 2009年 10月 6-9日
(ワークショップ口頭発表 及び ポスター
発表)
5. **宮田愛彦**
"マス・スペクトルによるシグナル伝
達キナーゼ複合体の網羅的リン酸化
プロテオーム解析"
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会
年会・第 81 回日本生化学会大会 合同
年会 テクニカルセミナー 「網羅的リ
ン酸化解析を可能にする”最先端”質
量分析テクノロジー」(神戸)、2008年
12月 10日 (招待講演)
6. **宮田愛彦**、西田栄介
"キナーゼ特異的 Hsp90 コシヤペロン
Cdc37 の CK2 によるリン酸化ーリン
酸化特異的抗体及びリン酸基アフィ
ニティーゲル電気泳動による解析"
BMB2008 第 31 回日本分子生物学会
年会・第 81 回日本生化学会大会 合同
年会 (神戸)、2008年 12月 10・11日 (ポ
スター発表)
- [図書] (計2件)
1. **宮田愛彦**
シグナル伝達の原理と多様性.
「医学のための細胞生物学」、永田和
宏・塩田浩平 編、南山堂、pp.133-143,
2009.
2. **宮田愛彦**
Hsp90.
蛋白質・核酸・酵素 増刊号「キーワー
ド：蛋白質の一生」(遠藤斗志也・小椋
光・永田和宏・森和俊・田口英樹・吉
田賢右 編)、53:1062, 2008.
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