

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590339

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサー制御の分子メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of regulation of ER stress sensor by protein phosphatases

研究代表者

小林 孝安 (Kobayashi, Takayasu)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：10221970

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)：小胞体ストレスのセンサーであるIRE1が活性化されるためには、小胞体ストレスに応答した二量体化およびそれに伴う分子間自己リン酸化で、Ser724を含む複数の残基がリン酸化されることが必要である。今回、私達は、培養細胞における異所発現系により、小胞体に局在するセリンスレオニンホスファターゼであるPP2C がIRE1のSer724を特異的に脱リン酸化することを見出した。しかしながら、遺伝子発現をsiRNAでノックダウンしてもSer724のリン酸化レベルに変化がなかったことから、IRE1の脱リン酸化にはPP2C を含む複数のプロテインホスファターゼが関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：PPM1L (formerly PP2C) was originally identified as a negative regulator of stress-activated protein kinase signaling pathways, in which PPM1L represses the activity of TGF β -activated kinase 1 (TAK1) and apoptosis regulating kinase 1 (ASK1), two mitogen-activated protein kinase kinase kinases. Recently, I demonstrated that PPM1L is an endoplasmic reticulum (ER)-resident transmembrane protein and obtained the evidence that it is involved in regulation of transfer of ceramide between ER and Golgi. In this project, I examined whether PPM1L was involved in regulation of ER stress response. Overexpression of PPM1L in cells reduced ER-stress dependent phosphorylation of ER stress sensor IRE1. However, knockdown of PPM1L did not affect level of phosphorylation of IRE1. These results suggested that other protein phosphatase(s) may be involved in regulation of ER stress response.

研究分野：生化学

キーワード：プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) PP2C ϵ の細胞内局在と細胞における機能
プロテインホスファターゼ 2C ϵ (PP2C ϵ)は、ストレス応答シグナル伝達経路の制御因子として私達が初めて同定したものである。その後、PP2C ϵ が、膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質で、細胞質側に触媒ドメインを配した形で小胞体膜に局在するという、セリンスレオニンホスファターゼとしては、大変ユニークな存在様式を持っていることを明らかにした。さらに、PP2C ϵ が、セラミド輸送タンパク CERT を小胞体膜上で脱リン酸化し、セラミド輸送を正に制御するという知見を得た。プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの遺伝子数の違いから、プロテインホスファターゼには広い基質特異性を持つ分子種が存在することが予想されていたが、PP2C ϵ がストレス応答のみならず、小胞体における脂質輸送にも関わるという知見は、この分子が固有の分子進化の過程で、多重基質特異性を獲得してきたことを示唆するものであった。

(2) 小胞体ストレスの関知メカニズム

近年、小胞体ストレスが、糖尿病、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの発症や病態進行に関わることが明らかにされている。小胞体ストレスを感知するセンサーのうち、IRE1 と PERK は、膜貫通型のプロテインキナーゼで、活性化に分子間自己リン酸化が必要である。活性化されたこれらのセンサーは、転写因子を介して適応反応を誘導し、小胞体の恒常性を保つよう働く。小胞体ストレス応答経路も、細胞内のすべてのシグナル伝達路と同様、活性化機構と、それに抑制的に働く負の制御機構のバランスによって精緻に調節されていると考えられるが、その詳細 (特に負の制御機構) については不明であった。

2. 研究の目的

小胞体に局在する PP2C ϵ が、小胞体ストレスセンサーである IRE1 の脱リン酸化を介して小胞体ストレスシグナルを制御するとの仮説を、PP2C ϵ ノックアウトマウスや細胞内異所発現系を用いた解析を通して検証し、そのメカニズムを解明していくことを目的とし、以下の研究課題を計画した。

【1】PP2C ϵ による小胞体ストレスのセンサータンパク IRE の制御メカニズムの検討

【2】PP2C ϵ 遺伝子欠損マウスの作製と解析

【3】小胞体ストレスによる PP2C ϵ の機能調節の可能性の検討

3. 研究の方法

(1) PP2C ϵ による IRE1 の制御メカニズム

小胞体ストレスセンサーである IRE1 が活性化されるためには、二量体化およびそれに伴う分子間自己リン酸化で、Ser724 がリン酸化されることが必要である。PP2C ϵ が IRE1 の制御に関わるかを検討するため、以

下の実験を行った。

(i) 培養細胞における異所発現系および siRNA を用いたノックダウンの手法を用いて、PP2C ϵ が IRE1 の Ser724 残基の特異的な脱リン酸化に関わるか検討した。

(ii) PP2C ϵ が小胞体上に存在する scaffold タンパクである VAP-A を介して IRE1 と結合するかどうか検討した。

(iii) 大腸菌で発現させた組換えタンパクを用いた in vitro 脱リン酸化実験を行い、PP2C ϵ が IRE1 を直接脱リン酸化できるか検討した。

(iv) PP2C ファミリー発現ライブラリー (PP2C α , PP2C β , ILKAP, PP2C ϵ) を用いた培養細胞共発現系を利用し、IRE1 の脱リン酸化の特異性を検討した。

(2) PP2C ϵ 遺伝子欠損マウスの作製と解析

個体における PP2C ϵ の機能を明らかにする目的で、PP2C ϵ の欠損マウスを作製した。

(3) PP2C ϵ 会合タンパク質の解析

PP2C ϵ の機能調節の可能性を検討するため、酵母 two hybrid システムで得られた、会合候補タンパクの解析を行った。

(4) PP2C ファミリーの複製後修飾の解析

PP2C ファミリーの機能制御にリン酸化、ユビキチン化、脂質修飾などが関わっていないか検討した。

(i) PP2C ファミリーを細胞に発現させ、様々な刺激を与えた後、phos-tag アクリルアミドを含む SDS-PAGE ゲルで分離し、当該タンパクがリン酸化を受けていないか検討した。

(ii) PP2C ファミリーを細胞に発現させ、プロテオソーム阻害剤で処理した後、タンパクを回収し、ユビキチンに対する抗体でユビキチン化の有無を検討した。

(iii) PP2C ファミリーを細胞に発現させ、 ^{14}C パルミチン酸で細胞を標識した後、タンパクを回収し、SDS-PAGE で分離した後、放射性を測定した。

4. 研究成果

(1) PP2C ϵ による小胞体ストレスのセンサータンパク IRE の制御メカニズムの検討

今回、私達は、培養細胞における異所発現系により、小胞体に局在するセリンスレオニンホスファターゼである PP2C ϵ が IRE1 の Ser724 を特異的に脱リン酸化することを見出した(図 1)。一方、PP2C ファミリーの他のメンバーである、PP2C α 、PP2C β および ILKAP は同様の実験系で IRE1 を脱リン酸化できなかったことから、脱リン酸化の特異性が観察された。しかしながら、PP2C ϵ 遺伝子の発現を siRNA でノックダウンしても Ser724 のリン酸化レベルに変化がなかった。

我々が作製した PP2C ϵ ホモ欠損マウスは、出生直後に大多数が死亡するものの、少数が生き残る。本研究では、生き残ったホモ欠損マウスに代謝性の小胞体ストレスを付加した後、肝臓における IRE1 のリン酸化レベルを検討した。PP2C ϵ 遺伝子欠損マウスの腹腔内に小胞体ストレスを誘導する物質を投与

した後、肝臓の IRE1 の Ser724 のリン酸化レベルを検討したが、野生型と違いが認められなかった。これらのことから、細胞内においては、PP2Cε を含む複数のプロテインホスファターゼが IRE1 の脱リン酸化に関与することが示唆された。

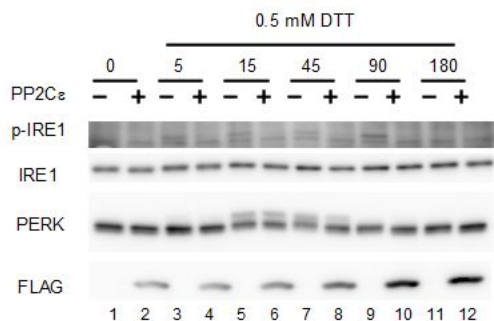


図1 コントロール(奇数レーン)およびPP2Cε-FLAGを安定発現させたHEK293細胞(偶数レーン)をDTTで刺激したのち、タンパク質を回収し、図に示した各タンパク質の抗体でウエスタンブロッティングを行った。

(2) PP2Cε 会合タンパク質の解析

PP2Cε を bait とし、ヒト脳 cDNA ライブラリーを酵母 two hybrid 法にてスクリーニングしたところ、acyl CoA binding domain containing 3 (ACBD3)を会合タンパク質として同定した。ACBD3 は Golgi dynamics (GOLD) domain を介し giantin と会合することで、主にゴルジ体に局在する。ACBD3 の PP2Cε 会合領域を同定する目的で、さまざまな領域を含む組み換え体を作製し、PP2C との会合を検討したところ、ACBD3 は GOLD ドメインを介して PP2Cε と会合することが示唆された。次に、PP2Cε と ACBD3 の会合がお互いの細胞内局在にどのような影響を与えるかを免疫蛍光法により検討したところ、小胞体上の PP2Cε は、ゴルジ体上の ACBD3 と会合することにより、小胞体-ゴルジ体間に存在する近接領域へリクルートされた。ACBD3 による PP2Cε の小胞体-ゴルジ体近接領域への移行の生理的意義を明らかにするため、ACBD3 の共発現が PP2C のセラミド輸送タンパク質のリン酸化レベルに与える影響を検討したところ、ACBD3 の発現は PP2Cε による CERT の脱リン酸化を亢進することが明らかとなった(図 2)。

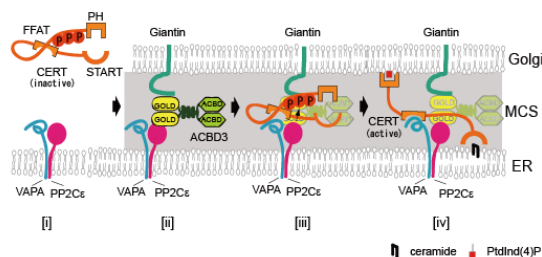


図2 ACBD3 の PP2Cε による CERT の脱リン酸化への関与 ACBD3 は PP2Cε を小胞体・ゴルジ近接領域にリクルートすることにより、CERT の脱リン酸化を亢進すると考えられる

(3) PP2C ファミリーの複製後修飾の解析

タンパク質のミリスチル化は N 末端のグリシンにミリスチン酸が付加する脂質修飾である (N-ミリスチル化)。N-ミリスチル化によりタンパク質の疎水性が上昇し、その結果、N-ミリスチル化はタンパク質の輸送、タンパク質-脂質相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用において重要な役割を果たすことが知られている。今回我々は、PPM1A と PPM1B が N-ミリスチル化されており、この修飾が基質認識に重要な役割を担うことを明らかにした。PPM1A と PPM1B の G2A 変異体は、細胞内で生理的基質である AMPK や SAPK を脱リン酸化できなかった。リン酸化 AMPK を基質とした in vitro の反応系で、これらの G2A 変異体は、活性が減弱していた。興味深いことに、人工的な化合物である p-ニトロフェニルリン酸を基質とした場合は、G2A 変異体のホスファターゼ活性は逆に亢進していた。立体構造上、N 末端のグリシンが活性中心の近傍に位置することを勘案すると、N 末端に結合したミリスチル基は活性中心の構造を安定化し、正確な基質特異性を獲得するのに貢献していると考えられた(図 3)。

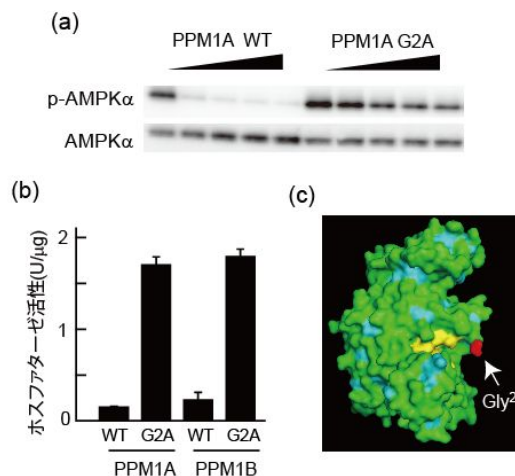


図3 N-ミリスチル化は PPM1A および PPM1B の基質認識に必須である (a および b) ミリスチル化不能変異体 (G2A) は、生理的な基質である AMPKα の脱リン酸化能が低下しているのに対し (a)、人工基質である pNPP に対する脱リン酸化能が亢進していた (b)。 (c) ミリスチル化残基 (Gly2) は活性中心 (黄色で示した領域) の近傍に位置する。

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. Takeuchi, Y., Mishima, E., Shima, H., Akiyama, Y., Suzuki, C., Suzuki, T., Kobayashi, T., Suzuki, Y., Nakayama, T., Takeshima, Y., Vazquez, N., Ito, S., Gamba, G., Abe, T., Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 26, 271-279, 2015, 10.1681/ASN.2013091013 (査読有)
2. Matsui, H., Fukuno, N., Kanda, Y., Kantoh,

Y., Chida, T., Nagaura, Y., Suzuki, O., Nishitoh, H., Takeda, K., Ichijo, H., Sawada, Y., Sasaki, K., Kobayashi, T., Tamura, S., The Expression of Fn14 via Mechanical Stress-activated JNK Contributes to Apoptosis Induction in Osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 289, 6438-6450, 2014, 10.1074/jbc.M113.536300 (査読有)

3. Chida, T., Ando, M., Matsuki, T., Masu, Y., Nagaura, Y., Takano-Yamamoto, T., Tamura, S., Kobayashi, T., N-Myristoylation is essential for protein phosphatases PPM1A and PPM1B to dephosphorylate their physiological substrates in cells. *Biochem. J.* 449, 741-749, 2013, 10.1042/BJ20121201 (査読有)

4. Shinoda, Y., Fujita, K., Saito, S., Matsui, H., Kanto, Y., Nagaura, Y., Fukunaga, K., Tamura, S., Kobayashi, T., Acyl-CoA binding domain containing 3 (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett.* 586, 3024-3029, 2012, 10.1016/j.febslet.2012.06.050 (査読有)
〔学会発表〕(計 9件)

1. 小林孝安, 藤田宏介, 篠田康晴, 永浦裕子, 草野理恵, 渡邊利雄, 松居靖久, 舟橋淳一, 佐藤達也, 阪上洋行, 大西素子, 田村眞理, プロテインホスファターゼ PPM1L の欠損は大脳皮質において軸索線維の異常を引き起こす. 第69回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2014年10月15日~18日

2. 岩下新太郎, 鈴木健裕, 中島健太郎, 小林孝安, 安田武嗣, 大野-岩下淑子, 今城-大海忍, 宋時榮, 堂前直, リン酸化クロマチン構成因子 Bcnt/Cfdp1 の多様性の分子基盤. 第69回日本生化学会大会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2014年10月15日~18日

3. 小林孝安, 千田透子, 安藤正勝, 松木佑, 枘悠太郎, 永浦裕子, 田村眞理, N-ミリスチル化はPP2C α およびPP2C β の生理的基質の認識に必須である. 第86回日本生化学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2013年9月10日~13日

4. 小林孝安, 千田透子, 安藤正勝, 松木佑, 枘悠太郎, 永浦裕子, 田村眞理, N-ミリスチル化はPP2C α およびPP2C β の生理的基質の認識に必須である. 日本生化学会東北支部会第79回例会, 東北大学(宮城県仙台市), 2013年5月11日

5. 篠田康晴, 福永浩司, 藤田宏介, 永浦裕子, 田村眞理, 小林孝安, セリンスレオニンホスファターゼPP2C ϵ のゴルジ体局在タンパク質 GCP60 との機能連関. 日本生化学会東北支部会第79回例会, 東北大学(宮城県仙台市), 2013年5月11日

6. 藤田宏介, 篠田康晴, 千田透子, 永浦裕子, 草野理恵, 渡邊利雄, 松居靖久, 相澤慎一,

清成寛, 阿部高也, 阪上洋行, 大西素子, 田村眞理, 小林孝安, ノックアウトマウスを用いたPP2C ϵ の新規機能解明. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2012年12月11日~14日

7. 篠田康晴, 藤田宏介, 永浦裕子, 福永浩司, 田村眞理, 小林孝安, Golgi complex-associated protein of 60 kDa (GCP60) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites. 第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市), 2012年12月11日~14日

8. 永浦裕子, 千田透子, 神藤佑亮, 松井裕之, 藤田宏介, 篠田康晴, 田村眞理, 小林孝安, プロテインホスファターゼPP2C ϵ による小胞体ストレス応答の制御. 日本生化学会東北支部第78回例会, 山形大学(山形県山形市), 2012年5月26日

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 孝安 (KOBAYASHI, Takayasu)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号: