

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2019

課題番号：16K14723

研究課題名（和文）タンパク質のCysリン酸化による分子機能制御

研究課題名（英文）Functional regulation of proteins by Cys phosphorylation

研究代表者

三木 裕明（Miki, Hiroaki）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：80302602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では発がん因子PRLのシステイン残基に起こるリン酸化の解析を行った。細胞外のマグネシウムイオンを枯渇させると速やかに脱リン酸化され、このときPRLのタンパク質量も増加していた。マグネシウムイオン枯渇状態でPRLをノックダウンすると顕著な細胞死が起こり、この応答の機能的重要性も明らかになった。さらにリン酸化反応のメカニズムを調べたところ、ATPなどがリン酸ドナーとしてはたらいしていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化はタンパク質の主要な翻訳後修飾として知られるが、システイン残基のリン酸化はこれまでにバクテリアでの事例が一つしか知られていないユニークなものである。本研究では発がん因子PRLでのシステインリン酸化に関する解析を進め、細胞の環境応答の仕組みとしてダイナミックに制御されており、それが細胞の生死に関わることを明らかにした。タンパク質機能制御の新たな仕組みとして今後の研究の発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the phosphorylation that occurs on Cys residue in oncogenic protein PRL. When magnesium ion was depleted from the culture medium, PRL was rapidly dephosphorylated and its protein levels were increased. PRL knockdown under this magnesium ion-depleted condition resulted in promotion of cell death, indicating the biological importance of this response. Moreover, the investigation of the phosphorylation mechanism revealed the possible role of phosphate-containing molecules, such as ATP, as phosphate donor.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蛋白質 シグナル伝達

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質はさまざまな翻訳後修飾を受けて機能調節されている。その中でもキナーゼによるリン酸化は主要な翻訳後修飾として古くから知られてきた。哺乳動物系では特にセリン残基やスレオニン残基のリン酸化がドミナントであり、そのほかにチロシン残基のリン酸化も発がんシグナルなどの関わりでよく知られている。これらのよく知られたリン酸化はいずれもアミノ酸側鎖の水酸基に起こっており、比較的安定的に存在する。そのため細胞内では脱リン酸化に働くホスファターゼが加水分解反応を触媒している。

(2) 本研究で解析に取り組むリン酸化システインはチロシンホスファターゼの活性中心システインで一過的に生成することが知られていた。このとき、基質のリン酸はシステイン残基のチオール基に転移してリン酸化システインを作るが、速やかに加水分解反応を受けるため安定的には存在しない。実際、哺乳動物系の細胞で安定的なシステインリン酸化は報告されておらず、バクテリアの黄色ブドウ球菌での報告が一つあるだけだった。このような状況の中で、私たちはそれまで機能解析を進めてきた phosphatase of regenerating liver (PRL) ではこの反応中間体のリン酸化システインが安定的に存在していることを見つけた。本研究では哺乳動物系で初めての発見となったこのユニークなリン酸化システインの形成メカニズムや生物学的重要性の解明に取り組むこととした。

### 2. 研究の目的

私たちの研究グループは大腸がんの転移巣で特異的に高発現し、がん悪性を促進する分子 PRL の機能解析を進めてきた。がんとの密接な関わりが示されいながらその分子機能はまったく不明だったので、細胞内で会合している分子を探索し、進化的に高度に保存された膜タンパク質 cyclin M (CNNM) を見つけた。この CNNM はマグネシウムイオンを細胞外に排出するトランスポーターであり、PRL はそれに結合してマグネシウムイオン排出を阻害していた。PRL は反応性の高いシステイン残基を持ち、それが酸化されて分子内でジスルフィド結合を作ることも見つけていたが、これによって CNNM との結合が可逆的に調節されていた。PRL はチロシンホスファターゼドメインを持ち、実際に微弱ながら酵素活性も持っている。チロシンホスファターゼの活性中心システインは反応中間体としてリン酸化されることが知られていたため、PRL の組換えタンパク質を使って調べたところ、他のホスファターゼと異なり非常に安定的に存在していることが分かった。しかも、このリン酸化型の PRL は CNNM と結合できなくなることが分かった。さらに培養系での哺乳動物細胞に内在性の PRL タンパク質でもかなりのリン酸化が観察された。このことはリン酸化システインが生理的に存在しており、細胞機能の調節に寄与している可能性を示唆している。このようなリン酸化システインは哺乳動物系ではまったく報告されておらず、極めてユニークな翻訳後修飾と考えられる。本研究ではこの PRL のシステインリン酸化にフォーカスを絞り、その形成や維持のメカニズムや機能的な重要性を追究することを目的とした。

### 3. 研究の方法

培養系の哺乳動物細胞を用いて、内在性の PRL タンパク質のシステインリン酸化レベルが細胞外環境によってどのような影響を受けるか、特に培地中のマグネシウムイオンを枯渇させるなどの効果について調べる。このとき、PRL のタンパク質量がどのように変化するか、ノックダウン等により人為的に発現抑制すると細胞の機能状態がどうなるかについても調べる。また、このシステインリン酸化のメカニズムを調べるため、リン酸ドナーとなりうるさまざまな生体物質と PRL の組換え精製タンパク質を *in vitro* で混合して、リン酸化状態がどのようになるかについても調べ、具体的な候補については細胞内での量変化とリン酸化レベルについても検討して、*in vivo* でのリン酸化メカニズムとして機能しうるかどうか調べる。

### 4. 研究成果

(1) 培養系の哺乳動物細胞で内在性の PRL タンパク質の大半は通常の培養条件ではリン酸化されていた。培地中のマグネシウムイオンを枯渇させると速やかに脱リン酸化され、それがメジャーになった。このとき CNNM との複合体形成が増加すると共に、PRL のタンパク質量も顕著に増加していることが分かった。PRL のシステインリン酸化が PRL 分子自身の安定性などの制御に関わっている可能性が示唆された。また逆に、マグネシウムイオンを枯渇させた状況で再添加すると速やかに PRL がリン酸化されることも分かった。PRL システインのリン酸化と脱リン酸化がいずれも細胞外環境の変化に応じて迅速に応答することができ、細胞の機能制御に機能しうるということが明らかになった。

(2) PRL のタンパク質量増加の仕組みを調べるため、タンパク質や mRNA の安定性を調べたところ、特に違いは見られなかった。また量的にはタンパク質だけでなく mRNA も増加していることが分かったため遺伝子からの転写が活発化が重要であると考えられた。また、この PRL の発現誘導応答に転写因子の STAT を介するシグナル伝達が重要であり、実際にリン酸化レベル増加して活性化していることも示された。このほか、PRL の発現を調節する仕組みを調べていたところ、mTOR キナーゼの阻害剤として知られるラパマイシンで、極めて顕著な PRL 発現増加が観察された。細胞内のマグネシウムイオン量に応じた ATP 量の変化や、それをセンスする AMP キナーゼに

よって mTOR 機能が制御されていることはよく知られており、PRL 量のフィードバック調節に寄与している可能性が示唆された。

(3) マグネシウムイオンを枯渇させた細胞の状態を調べると、特に顕著な違いは見られなかった。そこで PRL の発現を RNAi でノックダウンさせて調べた。その結果、PRL を発現抑制させた細胞をマグネシウムイオン枯渇状態に置くと顕著なアポトーシスが起きていることが分かった。マグネシウムイオンが枯渇したとき、細胞では PRL を速やかに脱リン酸化して、さらにタンパク質量を増加させ、CNNM に結合・機能阻害して細胞内からマグネシウムイオンが流出するのを防いでいると考えられる。

(4) PRL のシステインリン酸化の分子メカニズムを明らかにするため、PRL の組換えタンパク質を精製して、細胞内に存在するさまざまなリン酸を含む物質とインキュベートしてリン酸化されるかどうかを調べた。その結果、ATP と混合することで部分的にはあるが有意なリン酸化が確認できた。その一方で、この *in vivo* での重要性を調べるため、2-デオキシグルコースやオリゴマイシンなどの処理によって細胞内の ATP 量を大きく減少させても、PRL のリン酸化レベルには特に変化が見られず、この仕組みが細胞内でも働いているかどうかに関しては不明のままに残った。何か別の分子によって ATP による PRL のリン酸化が調節されている可能性が考えられ、さらなる検討が必要であると結論した。

(5) PRL の脱リン酸化を引き起こす仕組みも検討した。リン酸化されるシステイン残基は活性酸素によって酸化されて分子内ジスルフィドを作ることが知られていたため、活性酸素の効果を調べた。まず、細胞を過酸化水素で刺激したところ、速やかに脱リン酸化されることが明らかとなった。この効果が直接起きているのか調べるため、組換えタンパク質を用いて *in vitro* でシステインリン酸化された PRL に対して過酸化水素処理してみたが、有意な脱リン酸化は観察されなかった。細胞内で過酸化水素などの活性酸素に反応して PRL を脱リン酸化する何らかの仕組みが存在することが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamazaki D, Hasegawa A, Funato Y, Tran HN, Mori MX, Mori Y, Sato T, Miki H	4. 巻 38
2. 論文標題 Cnnm4 deficiency suppresses Ca <sup>2+</sup> signaling and promotes cell proliferation in the colon epithelia.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3962-3969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-0682-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Funato Y, Miki H	4. 巻 165
2. 論文標題 Molecular function and biological importance of CNNM family Mg <sup>2+</sup> transporters.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 219-225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chen YS, Kozlov G, Fakih R, Funato Y, Miki H, Gehring K	4. 巻 293
2. 論文標題 The cyclic nucleotide-binding homology domain of the integral membrane protein CNNM mediates dimerization and is required for Mg <sup>2+</sup> efflux activity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 19998-20007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoshida A, Funato Y, Miki H	4. 巻 475
2. 論文標題 Phosphatase of regenerating liver maintains cellular magnesium homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem J.	6. 最初と最後の頁 1129-1139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funato Y, Furutani K, Kurachi Y, Miki H	4. 巻 596
2. 論文標題 CrossTalk proposal: CNNM proteins are Na <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup> exchangers playing a central role in transepithelial Mg <sup>2+</sup> (re)absorption	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 743-746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP275248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Y, Funato Y, Imamura H, Miki H, Mizukami S, Kikuchi K	4. 巻 8
2. 論文標題 Visualization of long-term Mg <sup>2+</sup> dynamics in apoptotic cells using a novel targetable fluorescent probe	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem Sci.	6. 最初と最後の頁 8255-8264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7SC03954A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Funato Y, Yamazaki D, Miki H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Renal function of cyclin M2 Mg <sup>2+</sup> transporter maintains blood pressure.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Hypertens.	6. 最初と最後の頁 585-592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/HJH.0000000000001211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gulerez I, Funato Y, Wu H, Yang M, Kozlov G, Miki H, Gehring K.	4. 巻 17
2. 論文標題 Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 1890-1900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201643393	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Mg <sup>2+</sup> Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in <i>Caenorhabditis elegans</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS Genet.	6. 最初と最後の頁 e1006276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1006276	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki D, Funato Y, Miyata H, Ikawa M, Miki H.	4. 巻 474
2. 論文標題 Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca(2+) influx during capacitation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 441-446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki D, Miyata H, Funato Y, Fujihara Y, Ikawa M, Miki H.	4. 巻 129
2. 論文標題 The Mg <sup>2+</sup> transporter CNNM4 regulates sperm Ca <sup>2+</sup> homeostasis and is essential for reproduction.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 19401949
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.182220	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計30件(うち招待講演 20件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hiroaki Miki
2. 発表標題 Regulation of Mg <sup>2+</sup> levels and ROS generation by PRL/CNNM complexes
3. 学会等名 The Kick-off Symposium of Advanced Graduate Program for Future Medicine and Health Care (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 船戸洋佑、吉田篤、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 がん細胞のエネルギー代謝における細胞の環境pH応答の制御
3. 学会等名 第1回SGH若手がん研究者ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋爪 脩, 船戸 洋佑, 三木 裕明
2. 発表標題 過剰なマグネシウムが引き起こすミトコンドリアでの活性酸素種とATPの過剰産生
3. 学会等名 第18回日本ミトコンドリア学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yosuke Funato, Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki
2. 発表標題 Regulation of Mg <sup>2+</sup> homeostasis and cancer progression by Phosphatase of Regenerating Liver (PRL)
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Osamu Hashizume, Yosuke Funato, Hiroaki Miki
2. 発表標題 Overproduction of ATP and Reactive Oxygen Species in Mitochondria by Excessive Magnesium
3. 学会等名 The Joint Symposium of the 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences and the 28th Hot Spring Harbor (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兒島 卓也, 船戸 洋佑, 三木 裕明
2. 発表標題 PRL高発現によるMetチロシンリン酸化の亢進と細胞内局在変化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajung Ryu, 吉田 篤, 船戸 洋佑, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 がん悪性化のドライバー蛋白質PRLによる染色体制御の異常
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋爪 脩, 船戸 洋佑, 三木 裕明
2. 発表標題 過剰なマグネシウムが引き起こすミトコンドリアでのATPとROSの過剰産生
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 酸化・還元依存的なマグネシウム恒常性の維持機構とその破綻による疾患・老化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎 大輔, 長谷川 綾郁, 船戸 洋佑, 三木 裕明
2. 発表標題 Mg <sup>2+</sup> トランスポーターCNNM4は大腸での発がんを抑制する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 PRL/CNNM複合体によるマグネシウムイオン排出の調節とミトコンドリアでの活性酸素産生
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船戸洋佑、吉田篤、柳嘉晶、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 PRLによる細胞外pH環境依存的な 細胞死
3. 学会等名 第27回日本Cell Death学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船戸洋佑、橋爪脩、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 Mg <sup>2+</sup> 排出タンパク質CNNMによる マグネシウム恒常性維持と寿命制御
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船戸洋佑、山崎大輔、三木裕明
2. 発表標題 マグネシウム再吸収と共役した血圧調節機構の解明
3. 学会等名 ソルト・サイエンス研究財団 第30回 助成研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroaki Miki
2. 発表標題 Overproduction of ATP and reactive oxygen species in mitochondria by excessive magnesium
3. 学会等名 WCP2018 KYOTO Satellite Symposia "Regulating cell homeostasis: from small molecules (drugs, O <sub>2</sub> , ROS, and NO) to ion channels, receptors, and systems."（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木裕明
2. 発表標題 細胞内マグネシウムイオンの調節とミトコンドリアでの活性酸素産生
3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会/第18回日本NO学会 合同学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三木裕明
2. 発表標題 PRL/CNNM複合体によるMg <sup>2+</sup> 排出の調節とPRLのCysリン酸化
3. 学会等名 生体分子コバレント修飾の革新的解析拠点形成 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida A, Funato Y, Miki H
2. 発表標題 Mg <sup>2+</sup> の不足によるPRLの転写活性化
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamazaki D, Hasegawa A, Funato Y, Miki H
2. 発表標題 Mg <sup>2+</sup> トランスポーターCNNM4は大腸での発がんを抑制する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hashizume O, Funato Y, Miki H
2. 発表標題 Mg <sup>2+</sup> トランスポーターCNNM1は線虫でROSレベルと寿命を調節する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Funato Y, Yoshida A, Yamazaki D, Miki H
2. 発表標題 PRLによる酸性微小環境への適応
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船戸洋佑, 山崎大輔, 吉田篤, 三木裕明
2. 発表標題 がんの浸潤運動におけるPRLの役割
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 船戸洋佑, 山崎大輔, 吉田篤, 三木裕明
2. 発表標題 がんの悪性化と酸性環境適応の分子機構
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yosuke Funato, Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki
2. 発表標題 CNNM magnesium transporters in health and disease
3. 学会等名 IUPS 38th world congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三木 裕明
2. 発表標題 細胞内マグネシウム調節とがん悪性化
3. 学会等名 第53回日本臨床分子医学会学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三木 裕明
2. 発表標題 細胞内マグネシウム調節の異常とがん悪性化
3. 学会等名 タイムシグナルと制御シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明
2. 発表標題 PRLによるがん悪性化と上皮組織内の細胞間相互作用
3. 学会等名 第68回日本細胞生物学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明
2. 発表標題 PRLによる細胞内マグネシウムイオン量のレドックス制御
3. 学会等名 第43回日本毒性学会学術年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 三木 裕明
2. 発表標題 PRLによるがん悪性化とpH依存性の細胞死
3. 学会等名 第25回日本Cell Death学会学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 船戸 洋佑、山崎 大輔、三木 裕明
2. 発表標題 PRLによる細胞内Mg <sup>2+</sup> 量の調節とその破綻によるがん悪性化
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----