

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19396

研究課題名（和文）システインのリン酸化 ～新しい翻訳後修飾の仕組みと役割の解明～

研究課題名（英文）Cysteine phosphorylation: elucidating the mechanism and significance of a novel post-translational modification

研究代表者

船戸 洋佑（Yosuke, Funato）

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60505775

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、システイン残基（Cys）のリン酸化という新しい翻訳後修飾の性質やその生理的意義について追究した。その成果として、Cysリン酸化と従来より知られているCys残基の翻訳後修飾である酸化との間の関連性を明らかにしたほか、このCys残基の生物学的な重要性としてMg<sup>2+</sup>輸送体CNNMへの結合を介したがん悪性化への寄与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでセリン/スレオニンやチロシン残基のリン酸化は、その仕組みや意義が深く研究されている一方で、システイン残基のリン酸化はその存在を示す報告すら殆どない状態であった。本研究によりその存在だけでなく重要性も一定レベルで示すことができたことは、この新しいタイプの翻訳後修飾が認知され、今後さらに研究が進んでゆく上で大きな意味のあるステップだったと位置づけられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the properties and physiological significance of a novel post-translational modification, the phosphorylation of cysteine residues (Cys). We clarified the relationship between Cys phosphorylation and oxidation, a previously known post-translational modification of Cys residues, and the biological importance of this Cys residue in cancer malignancy through its binding to the Mg<sup>2+</sup> transporter CNNM.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Cysリン酸化 システイン リン酸化 PRL 翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

私はこれまで Cys 残基の可逆的な酸化修飾により細胞内シグナル伝達を調節する、いわゆる「活性酸素センサー」分子群の同定と解析に取り組み、その成果を自身が筆頭著者の論文として報告してきた (*Nat. Cell Biol.* **8**, 501-508 (2006)、*Curr. Biol.* **20**, 1945-1952 (2010)、*J. Clin. Invest.* **124**, 5398-5410 (2014) など)。その一つである PRL はチロシンホスファターゼファミリーに属しているものの、その酵素活性は他と比べて極めて低いことが知られている。一般的にチロシンホスファターゼによる脱リン酸化反応は、まず基質蛋白質のリン酸基を活性中心の Cys 残基に転移させてリン酸化 Cys 中間体を形成し、その後すぐにこの中間体を加水分解するという 2 段階の反応で行われる。そして活性中心付近にある Ser/Thr 残基はリン酸化 Cys 中間体を加水分解し、反応を完遂するために重要であると言われている。しかし PRL ではこの Ser/Thr 残基が存在せず、そのため PRL では脱リン酸化反応のサイクルが滞ってしまい、酵素活性が低いと考えられている。私は発想を転換させ、他のホスファターゼではすぐに消えてしまうリン酸化 Cys 中間体が、PRL の場合は例外的に安定した状態で存在しており、そして PRL の機能調節に関わっている可能性を考えた。この仮説を実証するため、特異的リン酸化抗体を必要としない蛋白質のリン酸化検出法である phos-tag PAGE で調べたところ、リン酸化 PRL のバンドが強く検出され、そして活性中心である Cys104 のアミノ酸置換変異体ではこのリン酸化バンドが検出されなかった。また私は以前 PRL が過酸化水素処理により Cys104 と Cys49 との間で分子内ジスルフィド結合を形成すると、Mg<sup>2+</sup>排出蛋白質 CNNM から解離することを見出していた。そこで PRL の Cys104 のリン酸化によっても CNNM との結合が阻害されるか調べたところ、予想通り Cys リン酸化された PRL は CNNM と結合しなかった。さらに CNNM の分子機能である Mg<sup>2+</sup>排出との関わりを調べる過程で、培地中の Mg<sup>2+</sup>を除くことで Cys リン酸化レベルが低下することも発見し、PRL が Cys104 でのリン酸化を介して細胞内の Mg<sup>2+</sup>恒常性を維持している、というモデルの着想へと至った。

## 2. 研究の目的

上述のように、私は研究対象としている PRL について、細胞内では大量に Cys リン酸化状態で存在することを発見した。また、この Cys リン酸化により PRL は結合パートナーである Mg<sup>2+</sup>排出分子 CNNM と解離することや、培地中の Mg<sup>2+</sup>を除去することで内在性 PRL の Cys リン酸化レベルが減少することを見出している。つまり、細胞は Cys リン酸化というユニークな翻訳後修飾を介して、細胞内の Mg<sup>2+</sup>恒常性を維持している可能性が考えられる。このような予備的検討結果や考えに立脚して、本研究では、システイン残基 (Cys) のリン酸化という新しい翻訳後修飾の性質やその生理的意義について追究することを目的と定めた。

## 3. 研究の方法

本研究では上述の目的を達成するため、下記の手法で実験を行った。

### (1) Cys 残基におけるリン酸化と酸化の関係性の解明

リン酸化される PRL の Cys104 残基について、以前私は活性酸素種によって酸化され、Cys49 と分子内ジスルフィド形成することを見つけている (*J. Clin. Invest.* **124**, 5398-5410 (2014))。そこで、同じ Cys104 が関わる翻訳後修飾である Cys リン酸化と分子内ジスルフィド形成の 2 つの関係について詳しく解析した。純粋な *in vitro* の系で実験を行う目的で、PRL の組み換えタンパク質を大腸菌で発現・精製し、過酸化水素の存在・非存在下でのリン酸化状態の違いを phos-tag PAGE によって調べた。

並行して、細胞内における両翻訳後修飾の関連についても調べるべく、PRL の大部分が Cys リン酸化状態にある HEK293 細胞の培養液に過酸化水素を添加する実験も行った。

### (2) Cys 残基を介した CNNM 結合とホスファターゼ活性の生物学的重要性の比較検討

PRL はチロシンホスファターゼファミリーに属しており微弱なホスファターゼ活性を有する。一方で Mg<sup>2+</sup>輸送体 CNNM への結合とその阻害という機能も明らかとなっており。この 2 つの機能のいずれもに活性中心のシステイン残基が必要であると知られている。このどちらが PRL によるがん悪性化に重要なのかを明らかにする目的で、活性中心のシステインを種々のアミノ酸に置換した変異体を作成し、それぞれの生物学的重要性を、特にがん悪性化の促進能にフォーカスして解析した。またそれぞれの変異体の違いの解明のため、蛋白質結晶構造解析も行っている。

## 4. 研究成果

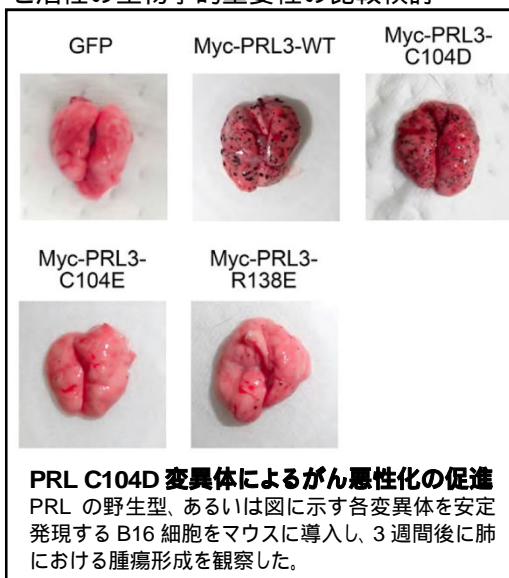
### (1) Cys 残基におけるリン酸化と酸化の関係性の解明

*in vitro* の実験において、PRL 組み換え精製タンパク質にチロシンホスファターゼの基質として汎用される OMFP を用いて PRL の Cys リン酸化を促したのち、過酸化水素を添加した。すると OMFP を添加していない、非リン酸化型の PRL では分子内ジスルフィド結合が速やかに形成された一方で、Cys リン酸化 PRL では分子内ジスルフィド結合が形成されなかった。

また HEK293 細胞での実験からは、in vitro の場合と異なり Cys リン酸化状態が減弱し、分子内ジスルフィド結合が形成された。これらの実験結果より、Cys リン酸化と分子内ジスルフィド形成は排他的であり、また細胞内では Cys リン酸化と脱リン酸化のサイクルが盛んにおこなわれている可能性が示唆された。

## (2) Cys 残基を介した CNNM 結合とホスファターゼ活性の生物学的重要性の比較検討

PRL の活性中心であるシステインをさまざまなアミノ酸に置換した変異体を作成したところ、アスパラギン酸に置換した C104D 変異体では CNNM への結合が維持されており、ホスファターゼ活性と CNNM への結合との切り分けが可能な変異体の作成に成功した。この変異体の結晶構造を取得したところ、ちょうどシステイン残基がチオレートイオン化した状態と非常によく似ており、そのため CNNM への結合が可能であったと判明した。またこのシステインをグルタミン酸に置換した C104E 変異体の構造はシステイン残基がリン酸化された状態と類似しており、実際この変異体は CNNM とは結合しなかった。この変異体群を B16 細胞に安定発現させ、C57BL/6J マウスの尾静脈から導入したところ、C104D 変異体発現細胞を導入した際には野生型 PRL 発現細胞を導入した際と同様に多数の腫瘍が肺に形成されていた(図)。一方で、C104E 変異体では腫瘍はほとんど観察されなかった。これらの実験結果より、PRL によるがん悪性化にはホスファターゼ活性ではなく、CNNM への結合が重要であることが明確となった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Huang Yichen, Jin Fei, Funato Yosuke, Xu Zhijian, Zhu Weiliang, Wang Jing, Sun Minxuan, Zhao Yimeng, Yu Ye, Miki Hiroaki, Hattori Motoyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Structural basis for the Mg <sup>2+</sup> recognition and regulation of the CorC Mg <sup>2+</sup> transporter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabe6140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abe6140	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 Wu Yanying, Funato Yosuke, Meschi Eleonora, Jovanoski Kristijan D, Miki Hiroaki, Waddell Scott	4. 巻 9
2. 論文標題 Magnesium efflux from Drosophila Kenyon cells is critical for normal and diet-enhanced long-term memory	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.61339	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 Funato Yosuke, Yoshida Atsushi, Hirata Yusuke, Hashizume Osamu, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 55
2. 論文標題 The Oncogenic PRL Protein Causes Acid Addiction of Cells by Stimulating Lysosomal Exocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2020.08.009	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 Kozlov Guennadi, Funato Yosuke, Chen Yu Seby, Zhang Zhidian, Illes Katalin, Miki Hiroaki, Gehring Kalle	4. 巻 295
2. 論文標題 PRL3 pseudophosphatase activity is necessary and sufficient to promote metastatic growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11682 ~ 11692
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.014464	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 Hashizume Osamu, Funato Yosuke, Yamazaki Daisuke, Miki Hiroaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Excessive Mg <sup>2+</sup> Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants & Redox Signaling	6. 最初と最後の頁 20 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	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 Osamu Hashizume, Yosuke Funato, Daisuke Yamazaki, Hiroaki Miki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Excessive Mg <sup>2+</sup> Impairs Intestinal Homeostasis by Enhanced Production of Adenosine Triphosphate and Reactive Oxygen Species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxid Redox Signal	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ars.2019.7951	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 E Doka, T Ida, M Dagnell, Y Abiko, N C Luong, N Balog, T Takata, B Espinosa, A Nishimura, Q Cheng, Y Funato, H Miki, J M Fukuto, J R Prigge, E E Schmidt, E S J Arner, Y Kumagai, T Akaike, P Nagy	4. 巻 6
2. 論文標題 Control of Protein Function Through Oxidation and Reduction of Persulfidated States	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Adv	6. 最初と最後の頁 eaax8358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax8358	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 Takuya Kojima, Yosuke Funato, Hiroaki Miki	4. 巻 476
2. 論文標題 Phosphatase of Regenerating Liver Sensitizes MET to Functional Activation by Hepatocyte Growth Factor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem J	6. 最初と最後の頁 1419-1431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20190071	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, Hasegawa A, Funato Y, Tran HN, Mori MX, Mori Y, Sato T, Miki H.	4. 巻 in press
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 -
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 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 Yoshida, A., Funato, Y., and 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., and Miki, H.	4. 巻 596
2. 論文標題 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 該当する

1. 著者名 Matsui, Y., Funato, Y., Imamura, H., Miki, H., Mizukami, S., and 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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

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 Lysosomal exocytosisを介した細胞の酸性環境への適応
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019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、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 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 Funato, Y., Yamazaki, D., and Miki, H.
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 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 本田 茉子, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 がん細胞の酸性環境への新規適応機構「acid addiction」の発見
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 船戸 洋佑, 橋爪 脩, 吉田 篤, 山崎 大輔, 三木 裕明
2. 発表標題 CNNMによるマグネシウムの輸送とその医学生物学的重要性
3. 学会等名 2020年度生理研研究会『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』（招待講演）
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	McGill University			
中国	Fudan University			
英国	The University of Oxford			