

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06131

研究課題名(和文) ダウン症責任キナーゼDYRK1A-WDR68複合体の生理機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological function of DYRK1A-WDR68 complex

研究代表者

宮田 愛彦 (Miyata, Yoshihiko)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：70209914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DYRK1Aはダウン症候群や自閉症スペクトラム症候群の発症に関与するタンパク質キナーゼである。DYRK1Aおよび関連キナーゼと細胞内で相互作用するタンパク質の同定を行なった。WDR68/DCAF7に加えて新たにHsp90/Cdc37分子シャペロンがDYRK1B・DYRK4に特異的に結合することを明らかにした。またDYRK1A・DYRK1Bに特異的に結合する機能未知タンパク質FAM53Cを同定した。FAM53CはDYRK1Aと複合体を形成してそのキナーゼ活性を抑制し、核局在を阻害することを解明した。FAM53CはDYRK1Aの細胞内活性・局在を支配する重要な因子であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DYRK1Aは活性が増大しても(ダウン症候群)減少しても(DYRK1Aシンドローム)ヒトの精神神経系の発生・機能に重大な問題を引き起こし、その細胞内活性の厳密な制御が必須である。今回同定したHsp90/Cdc37分子シャペロンシステムおよび新規タンパク質FAM53CはDYRKファミリーキナーゼに結合してそのタンパク質量・活性・細胞内局在を制御する、重要な因子であると結論された。DYRK1Aの機能異常によってさまざまなヒトの精神神経系の発生・機能異常が生じる事から、結合タンパク質によるDYRK1Aの制御機構の解明はこれらの疾患の分子基盤の理解と将来的な治療の為に大きな学術的・社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The protein kinase DYRK1A is the major contributor to the multiple symptoms observed in neurodevelopmental disorders such as Down syndrome and autism spectrum disorder. We have identified specific binding proteins for DYRK1A and its related family kinases. In addition to WDR68/DCAF7, we newly identified molecular chaperones Hsp90 and Cdc37 as binding partners for DYRK1B and DYRK4. Furthermore, we revealed a function-unknown protein FAM53C as a specific binding partner for DYRK1A and DYRK1B. FAM53C associates with DYRK1A, suppresses its protein kinase activity, and inhibits nuclear translocation of DYRK1A. FAM53C-dependent regulation of the kinase activity and intracellular localization of DYRK1A may play a significant role in gene expression regulation caused by normal and aberrant levels of DYRK1A.

研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：DYRK1A WDR68/DCAF7 FAM53C Hsp90 Cdc37 分子シャペロン ダウン症候群 タンパク質キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) DYRK1Aは脳神経系の発生・機能に重要なキナーゼで、ダウン症候群の原因の一つである。

*Minibrain*は脳が小さく学習能力の低下した*Drosophila*変異体の原因遺伝子として同定されたタンパク質キナーゼである (Tejedor, F. *et al. Neuron* 14:287, 1995)。*Minibrain*のヒトオルソログDYRK1Aは、クロモソーム21番のダウン症クリティカル領域にマップされ、DYRK1Aの過剰発現はダウン症候群の神経症状や発達異常の主要原因である。近年DYRK1AとASD(自閉症スペクトラム障害)・ADHD(注意欠如-多動性障害)・精神遅滞との関連が明らかになった。また、DYRK1Aの変異を原因とする精神神経系疾患(DYRK1Aシンドローム)が発見された。従って、*Minibrain*/DYRK1Aは種を超えて生物の脳神経系の発生・機能に必須であり、その機能・制御機構の解明は生物学的・医学的に重要な課題である。

(2) 本研究代表者はDYRK1Aの細胞内特異的結合タンパク質としてWDR68/DCAF7を同定した。

これまでの研究により、本研究代表者はDYRK1Aの細胞内特異的結合タンパク質としてWD40リピートタンパク質WDR68/DCAF7を同定した (Miyata, Y. and Nishida, E. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1813:1728, 2011)。WDR68/DCAF7はベチュニアの花の色素(アントシアニン)形成異常の原因遺伝子として同定されたAN11の哺乳類オルソログで、そのアミノ酸配列は植物からヒトまで非常に良く保存されている。しかし、哺乳類はアントシアニン合成系を持たず、WDR68/DCAF7は植物・動物に共通なもっと根源的な未解明の生理機能を持つと予想された。

(3) DYRK1A、WDR68/DCAF7のいずれもその生理的機能・制御機構は未解明である。

DYRK1AはMAPキナーゼと配列が近縁であり何らかのリン酸化シグナル伝達にかかわることが示唆される (Miyata, Y. and Nishida, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:291, 1999)。しかし、DYRK1Aが細胞内で果たす生理的機能や制御機構の詳細は不明であった。一方、WDR68/DCAF7は他の多くのWD40タンパク質と同様に複数の重要なタンパク質と相互作用するアダプターとして機能すると考えられるが、その生化学的及び細胞内機能の詳細は明らかでない。本研究代表者はWDR68/DCAF7と結合する細胞内タンパク質の網羅的探索を行ない、TRiC/CCTを同定した (Miyata, Y., Shibata, T., Aoshima, M., Tsubata, T., and Nishida, E. *J. Biol. Chem.* 289:33320, 2014)。またこのプロテオーム解析によって他にもWDR68/DCAF7と結合するタンパク質が複数同定され、その中にDYRK1A-WDR68/DCAF7複合体に結合するものがあると想定されたため、その解析がDYRK1Aの機能制御機構解明のための重要な課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究計画は、ダウン症責任キナーゼDYRK1Aが細胞内でどのようなタンパク質と相互作用し、どのような制御を受けて機能しているかを明らかにすることを目的とする。特にリン酸化シグナル伝達に於けるタンパク質相互作用の重要性に着目する点に学術的独自性がある。DYRK1Aと構造的類似性をもつDYRKファミリーキナーゼ全体を視野に入れ、従来主流の遺伝学的なダウン症研究とは異なり、DYRK1A-WDR68/DCAF7複合体の生化学的な解析からダウン症の分子の基盤を解明する点が本研究の学術的獨創性である。特に、WDR68/DCAF7結合タンパ

ク質の網羅的プロテオーム解析によって新たに同定した、これまで全く報告の無い FAM53C の細胞内機能を初めて解明すること、それを通じて DYRK1A の制御機構を明らかにすることを目的とする。また、DYRK ファミリーキナーゼが細胞内でどのような品質管理を受けているかを分子シャペロンとの相互作用の観点から明らかにする。更に、WDR68/DCAF7 及び FAM53C という特異的結合タンパク質によって DYRK1A が細胞内でどのように機能・局在が制御されるかを解明する。得られた研究成果により、脳神経系の発生・機能をつかさどるリン酸化シグナル伝達系における FAM53C-DYRK1A-WDR68/DCAF7 複合体の位置づけを明らかにする。得られた結果をもとに、同シグナル伝達系への介入によるダウン症をはじめとする DYRK1A 異常に起因するヒト精神神経系の疾患の治療・症状緩和等の医療応用への道筋を拓くことに貢献する。

3 . 研究の方法

WDR68/DCAF7, DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4, FAM53C の cDNA はいずれもヒト cDNA ライブラリーから単離し、GFP-tag および FLAG-tag を付加した融合タンパク質の哺乳類細胞(主に COS7 細胞を用いた)発現プラスミドを構築した。タンパク質の細胞内局在は蛍光顕微鏡で観察した。また目的タンパク質を抗 FLAG 抗体によりアフィニティー精製し、結合タンパク質を質量分析によるプロテオーム解析及び共免疫沈降実験によって同定した。分子シャペロンの結合は Hsp90, Cdc37, Hsp70 に対する抗体をそれぞれ用いて検出した。DYRK1A 活性は精製リコンビナント MAPT/Tau タンパク質を基質としてリン酸化反応を行なったのち、抗リン酸化 MAPK/Tau 抗体による Western blotting によって測定した。

4 . 研究成果

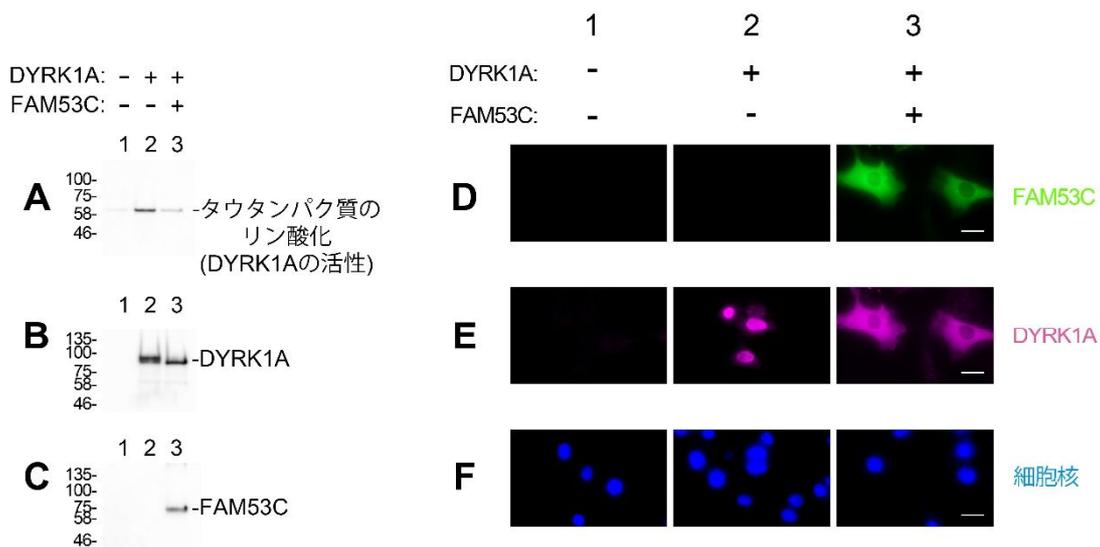
(1) Hsp90-Cdc37 分子シャペロンによる DYRK ファミリーキナーゼのタンパク質クオリティーコントロール機構の解明

ヒト DYRK ファミリーキナーゼは互いに類似した活性ドメインをもつ 5 つのメンバー (DYRK1A, DYRK1B, DYRK2, DYRK3, DYRK4) から成り立っている。これらの 5 つの DYRKs と細胞内で相互作用するタンパク質の同定を行なった。分子量 90, 70, 50kDa のタンパク質が DYRK1B および DYRK4 と特異的に結合することが判明し、それぞれ Hsp90, Hsp70, Cdc37 分子シャペロンであると同定された。GFP-DYRKs の細胞内発現の蛍光顕微鏡解析により、DYRK1A, DYRK1B が細胞核に局在するのに対し、DYRK2, DYRK3, DYRK4 は主に細胞質に局在する事が示された。細胞を Hsp90 の特異的阻害剤であるゲルダナマイシンまたは 17-AAG で処理すると Hsp90・Cdc37 の DYRK1B と DYRK4 との結合が阻害されたが Hsp70 の結合は影響を受けなかった。Hsp90 の活性阻害によって DYRK1B および DYRK4 の細胞内ダイナミクスに影響が見られた。ゲルダナマイシン処理によって DYRK1B および DYRK4 は細胞質でのドット状のアグリゲート(凝集体)を形成したことから、Hsp90 の分子シャペロン機能がこれらのキナーゼのタンパク質凝集抑制に必要であることが示された。ゲルダナマイシン、17-AAG、ganetespib 処理による Hsp90 機能の長期阻害によって細胞内の DYRK1B および DYRK4 の安定性が顕著に低下した。DYRK1B および DYRK4 は細胞内でタンパク質分解に導くユビキチン化を受けており、このユビキチン化は Hsp90 阻害剤処理によって増大した。以上の結果から、Hsp90 と Cdc37 は互いに良く類似した DYRK ファミリーキナーゼの中の特異的なメンバーを厳密に識別し、DYRK キナーゼの細胞内クオリティーコントロールに重要な役割を果たすことが明らかになった。

(2) DYRK1A の新規同定結合タンパク質 FAM53C は DYRK1A の細胞質アンカリング・活性阻害因子である

本研究ではこれまで機能未知のタンパク質 FAM53C を DYRK1A の新たな結合タンパク質として同定した。FAM53C は DYRK1A のキナーゼ触媒領域に結合し、一方で WDR68/DCAF7 は DYRK1A の N 末端ドメインに結合した。FAM53C の結合は DYRK1A の自己リン酸化能および外部基質である MAPT/Tau に対するリン酸化活性を抑制した。FAM53C は WDR68/DCAF7 とは直接結合せず、DYRK1A は FAM53C および WDR68/DCAF7 と同時に結合することにより 3 者複合体を形成した。すなわち、DYRK1A が FAM53C と WDR68/DCAF7 をテザリングする機能を持つことが示された。DYRK1A は核移行シグナルをコードしており、細胞に過剰発現すると核内に集積する。一方で FAM53C を強く発現すると DYRK1A が細胞質に局在変化したことから、FAM53C は DYRK1A に対する細胞質アンカリング機能を持つことが明らかになった。更に FAM53C の DYRK1A への結合は DYRK1A に依存した WDR68/DCAF7 の細胞核への集積も抑制した。

以上の結果を総合して、FAM53C は DYRK1A に結合し、そのキナーゼ活性を阻害し、DYRK1A を細胞質に留める働きをすると結論された。また、FAM53C は DYRK1A と類似のファミリーキナーゼである DYRK1B にも結合した。上述のように DYRK1B は Hsp90/Cdc37 とも結合するが、FAM53C および Hsp90/Cdc37 の結合はそれぞれ独立であった。ヒト脳神経細胞の内在性 DYRK1A は細胞質に局在することが知られており、培養細胞系での DYRK1A の核局在との不一致の原因がこれまで不明であったが、以上の結果は FAM53C が DYRK1A の細胞質局在を支配する因子であることを初めて示唆する。DYRK1A の正常・異常時の活性および細胞内局在と DYRK1A 下流の遺伝子発現調節等の細胞機能に、FAM53C による DYRK1A の活性・局在制御が極めて重要な役割を果たすと考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyata Yoshihiko, Nishida Eisuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of FAM53C as a cytosolic-anchoring inhibitory binding protein of the kinase DYRK1A	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202302129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202302129	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 Perez-Cabello Jesus, Silvera-Carrasco Lucia, Franco Jaime, Capilla-Gonzalez Vivian, Armaos Alexandros, Gomez-Lima Maria, Garcia-G. Raquel, Yap Xin Wen, Leal-Lasarte Magdalena, Lall Deepti, Baloh Robert, Martinez Salvador, Miyata Yoshihiko, Tartaglia Gian, Sawarkar Ritwick, Garcia-D. Mario, Pozo David, Roodveldt Cintia	4. 巻 120
2. 論文標題 MAPK/MAK/MRK overlapping kinase (MOK) controls microglial inflammatory/type-I IFN responses via Brd4 and is involved in ALS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2302143120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2302143120	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 Miyata Yoshihiko, Nishida Eisuke	4. 巻 1868
2. 論文標題 Protein quality control of DYRK family protein kinases by the Hsp90-Cdc37 molecular chaperone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119081 ~ 119081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2021.119081	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 Nakamoto Hitoshi, Yokoyama Yuhei, Suzuki Takahiro, Miyamoto Yuri, Fujishiro Takashi, Morikawa Masaaki, Miyata Yoshihiko	4. 巻 170
2. 論文標題 A cyclic lipopeptide surfactin is a species-selective Hsp90 inhibitor that suppresses cyanobacterial growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 255 ~ 264
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab037	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 Ihama Futoshi, Yamamoto Mami, Kojima Chojiro, Fujiwara Toshimichi, Matsuzaki Katsumi, Miyata Yoshihiko, Hoshino Masaru	4. 巻 1867
2. 論文標題 Structural characterization of the N-terminal kinase-interacting domain of an Hsp90-cochaperone Cdc37 by CD and solution NMR spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 813 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbapap.2019.06.007	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 Nakamoto Hitoshi, Amaya Yosuke, Komatsu Taiwa, Suzuki Takehiro, Dohmae Naoshi, Nakamura Yusuke, Jantan Ibrahim, Miyata Yoshihiko	4. 巻 475
2. 論文標題 Stimulation of the ATPase activity of Hsp90 by zerumbone modification of its cysteine residues destabilizes its clients and causes cytotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 2559 ~ 2576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20180230	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

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yoshihiko Miyata and Eisuke Nishida
2. 発表標題 Identification of FAM53C as a novel regulatory binding protein of DYRK1A
3. 学会等名 International conference "DYRK1A, related kinases and human disease" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshihiko Miyata
2. 発表標題 Hsp90 molecular chaperone, signaling protein kinases, and cancer.
3. 学会等名 Seminar at Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg (Strasbourg, France) (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiko Miyata
2. 発表標題 Functional regulation of DYRK1A, a kinase intimately involved in Down syndrome and autism spectrum disorder, by cellular binding partners.
3. 学会等名 Seminar at Institut de Genetique et de Biologie Moleculaire et Cellulaire (Illkirch, France) (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 大学院生命科学研究科 多細胞体構築学講座 シグナル伝達学分野 助教 宮田 愛彦
<http://www.y-miyata.lif.kyoto-u.ac.jp/>

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		
フランス	Universite de Strasbourg	Institut de Genetique	et de Biologie Moleculaire et Cellulaire
スペイン	University of Seville	Dept. Med.Biochem., Mol.Biol.&Immunol.	Faculty of Medicine