

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590280

研究課題名（和文）

プロテインホスファターゼ 2C による炎症性サイトカイン応答シグナル伝達路の制御機構

研究課題名（英文）

Regulation of stress activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C

研究代表者

田村 眞理 (TAMURA SHINRI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：20124604

研究成果の概要（和文）：今回、我々は、ストレス応答シグナル伝達路の制御因子である PP2C ϵ の制御機構を明らかにする目的で、会合タンパク質を探索し、ゴルジ体に局在する ACBD3 が、GOLD ドメインを介して PP2C ϵ と会合することを明らかにした。ACBD3 は PP2C ϵ をゴルジ体と小胞体の近接領域にリクルートし、PPM1L による CERT の脱リン酸化を亢進した。

研究成果の概要（英文）：In this study we identified acyl CoA binding domain containing 3 (ACBD3) as a binding partner of PPM1L and suggested that ACBD3 recruits PPM1L to the ER-Golgi membrane contact site. We also demonstrated that PPM1L interacts with GOLD (Golgi dynamics) domain that exists in several proteins involved in Golgi function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

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

炎症によって誘導される IL-1 や TNF α などの炎症性サイトカインは、細胞の炎症応答において主役を担っている。これらの炎症性サイトカインは、標的細胞の受容体への結合、細胞内シグナル伝達及び核における転写制御を介して、炎症反応、細胞の生存と死の制御など様々な細胞応答を誘導する。近年、炎

症性サイトカイン応答において、ストレス応答シグナル伝達路（SAPK 経路）が主要な役割を果たすことが明らかにされてきた。SAPK システムは、タンパク質リン酸化酵素である MKKK、MKK 及び SAPK による三段階の連続したリン酸化反応を基本骨格としており、炎症性サイトカインに応答して活性化された SAPK (JNK 及び p38) が、下流の

転写因子などの基質タンパク質のリン酸化を介して、応答反応を惹起する。これまで我々は、PP2C β 及びPP2C ϵ がMKKKであるTAK1を標的とすることを初めて示すとともに、PP2C ϵ がTNF α 依存性のアポトーシスを担うMKKKであるASK1を負に制御することを見出した。しかしながら、PP2C自身の制御機構を含め、未解明の事柄が多く残っていた。

2. 研究の目的

以上の背景の下に、本研究においては、PP2Cによる炎症性サイトカイン応答シグナル伝達路の調節機構の解明をさらに深めることを目的に、下記の3項目について解明を行うことを目的とした。

- (1) 小胞体上でのPP2C ϵ によるTAK1及びASK1の制御機構
- (2) PP2C ϵ の欠損が炎症性サイトカイン応答シグナル伝達路に及ぼす影響
- (4) PP2C ϵ の発現及び活性制御機構

3. 研究の方法

(1) 小胞体膜上でのPP2C ϵ とTAK1及びASK1の解離・会合についての検討

すでに我々は、細胞内強制発現系を用いた研究で、細胞の無刺激状態でPP2C ϵ がASK1やTAK1と会合し、これらを脱リン酸化して不活性状態に維持するが、IL-1やTNF α 刺激によりASK1やTAK1がPP2C ϵ から解離することを報告していた。また、免疫共沈により、内在性のPP2C ϵ とTAK1やASK1との会合を確認している。さらに最近、PP2C ϵ がERに局在するタンパク質で、N末がER膜を貫通し、活性領域を含むC末が細胞質に突出するトポロジーを示すことを見出していた。そこで、ER膜上でのPP2C ϵ とTAK1やASK1の解離会合状態をリアルタイムにて可視化し、解離会合の制御機構を解明するために以下の実験を行った。

- ① PP2C ϵ とTAK1やASK1の解離会合のFRETによる可視化の検討
- ② IL-1やTNF α 刺激によるTAK1及びASK1のPP2C ϵ からの解離の検討
- ③ PP2C ϵ とASK1との解離・会合が活性酸素により制御される可能性の検討

(2) PP2C ϵ の発現及び活性制御機構

① 発現制御機構

TNF α やIL-1によってPP2C ϵ の発現量が制御されるかどうかは不明であったので、HEK293細胞にTNF α やIL-1刺激を施して、RT-PCRや特異抗体を用いたイムノブロット解析によりPP2C ϵ の発現量の変動の有無を解析した。

② 活性制御機構

PP2C ϵ の機能制御を解明する目的で酵母two hybrid法により会合タンパクの探索を行った。

4. 研究成果

(1) PP2C ϵ 会合タンパク質の同定

PP2C ϵ 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は、組織もしくは細胞特異的に様々なタンパク質と会合し、またそれに伴い様々な機能に関与することが示唆されている。代表的な例として、性ホルモンを分泌する精巣の間質細胞由来のMA-10 cellにおいてPBRおよびプロテインキナーゼAの調節サブユニットI α と会合することによりミトコンドリアにおけるステロイド合成を調節すること、神経細胞において鉄イオンのトランスポーターであるdivalent metal transporter 1と会合することにより細胞内への鉄の取り込みを調節すること、神経前駆細胞においてNumbと会合することにより神経新生・神経への分化を制御することなどが挙げられる。このような特徴から、ACBD3は種々のタンパク質と会合するアダプタータンパク質のような性質を持ち、それら会合タンパク質の機能を調節するのではないかと考えられている。

(2) ACBD3のPP2C ϵ 会合領域の同定

ACBD3のPP2C ϵ 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 ϵ との会合を検討したところ、ACBD3はGOLDドメインを介してPP2C ϵ と会合することが強く示唆された。

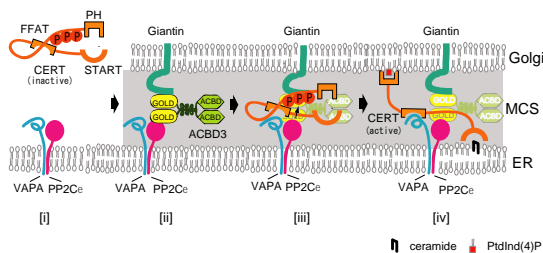
(3) ACBD3によるPP2C ϵ の小胞体-ゴルジ近接領域への移行

PP2C ϵ 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PP2C ϵ は、ゴルジ体上のACBD3と会合することにより、小胞体-ゴルジ体間のMCSへリクルートされることが示唆された。

(4) ACBD3の共発現によりセラミド輸送タンパク質(CERT)のリン酸化レベルの低下

ACBD3によるPP2C ϵ の小胞体-ゴルジ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 ϵ 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PP2C ϵ 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。CERTは小胞体-ゴルジ体間MCSにおいてセラミドの輸送を行うと考えられている一方、PP2Cεにより脱リン酸化される細胞内部位については小胞体上であること以外はわかっていない。したがって、ACBD3との会合によりPP2Cεが小胞体-ゴルジ体間MCSへリクルートされるという今回の結果は非常に興味深いものである。さらに、ACBD3の共発現によりCERTのリン酸化レベルが低下するという結果を考慮すると、CERTの脱リン酸化、小胞体からゴルジ体へのセラミドの輸送、という一連の流れがMCSにおいて効率的に生じているということを示唆するものである。



(図説明) [i] CERTは多重リン酸化され不活性化型にある [ii]ACBD3はGOLDドメインでゴルジ体タンパクである Giantin および小胞体に局在タンパクである PP2Cε と結合し、後者を小胞体-ゴルジ体近接領域にリクルートする。[iii] CERT が VAPA を介して CERT に結合し CERT を脱リン酸化する。[iv]活性化された CERT がセラミドを小胞体からゴルジ体に輸送する。

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 2 件)

①Chida 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.* 741-749, 2013 (査読有) DOI: 10.1042/BJ20121201

②Shinoda, Y., Fujita, K., Saito, S., Matsui, H., Kanto, Y., Nagaura, Y., Fukunaga, K., Tamura, S. and Kobayashi, T. (2012). Acyl-CoA binding domain containing 3 (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites. *FEBS Lett.* 586, 3024-3029, 2012 (査読有) DOI: 10.1016/j.febslet.2012.06.050

[学会発表] (計 11 件)

①Shinoda, Y., Golgi complex-associated protein of 60 kDa (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites, 10th International Conference on Protein Phosphatase, 2013/2/7~2013/2/9, 東京

②Fujita, K., Targeted disruption of the mouse protein phosphatase 2Cε gene leads to structural abnormalities in the brain, 10th International Conference on Protein Phosphatase, 2013/2/7~2013/2/9, 東京

③篠田康晴, Golgi complex-associated protein of 60 kDa (ACBD3) recruits the protein phosphatase PPM1L to ER-Golgi membrane contact sites, 第 35 回日本分子生物学会総会, 2012/12/11~2012/12/14 福岡

④藤田宏介, ノックアウトマウスを用いた PP2Cε の新規機能解明, 第 35 回日本分子生物学会総会, 2012/12/11~2012/12/14 福岡

⑤永浦裕子, プロテインホスファターゼ PP2Cε 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 2012/05/26 山形

⑥田村眞理, プロテインホスファターゼ 2C による細胞機能の制御. 第 5 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会. 2012/01/19~2012/01/20 大阪

⑦小林孝安, N-ミリスチル化は PP2Cα および PP2Cβ の機能発揮に必須である. 第 5 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2012/01/19~2012/01/20 大阪

⑧ 神藤佑亮, PP2Cδ/ILKAP は caspase-3 の新たな基質である. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011/12/13~2011/12/16 横浜

⑨千田透子, PP2Cδ/ILKAP stabilizes p53 through regulation of the Akt-GSK3β pathway. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011/12/13~2011/12/16 横浜

⑩松井裕之, Mechanobiological regulation of bone remodeling cycle by the expression of cytokine-related genes via JNK and p38 in osteoblast. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011/12/13~2011/12/16 横浜

⑪小林孝安, N-ミリスチル化は PP2Cα お

よび β の機能発揮に必須である。第84回日本生化学会大会。2011/09/21～2011/09/24
京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 眞理 (TAMURA SHINRI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：20124604

(2)研究分担者

小林 孝 (KOBAYASHI TAKAYASU)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：10221970