

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号： 16101
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2011～2012
 課題番号： 23780106
 研究課題名（和文） 神経系におけるcGMP依存性キナーゼの新規基質を介した細胞内情報伝達経路の解明
 研究課題名（英文） The roles of cGMP-dependent protein kinase and its novel substrates in nervous system
 研究代表者
 湯浅 恵造（YUASA KEIZO）
 徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教
 研究者番号： 70363132

研究成果の概要（和文）：cGKの新たな基質として同定した DAPK2 および PCKT3 が関わる細胞内情報伝達経路の解明を目的として、以下の成果を得た。1. cGK I によるリン酸化部位である Ser²⁹⁹ の擬似リン酸化変異体 DAPK2 S299D は、野生型に比べて約2倍キナーゼ活性が上昇し、また、ヒト乳癌 MCF7 細胞において高いアポトーシス誘導効果を示した。2. DAPK2 の結合因子として 14-3-3 を同定した。DAPK2 は C 末端 369 番目 Thr のリン酸化を介して 14-3-3 と結合し、14-3-3 によって活性が阻害された。3. PCKT3 の活性化因子として cyclin A を同定した。cyclin A は核で CDK2 と結合するのに対して、PCKT3 とは細胞質において結合した。

研究成果の概要（英文）：

1. cGK I phosphorylated DAPK2 at Ser²⁹⁹, Ser³⁶⁷ and Ser³⁶⁸. A phospho-mimic mutant DAPK2 S299D significantly enhanced its kinase activity, while a S367D/S368D mutant did not. Furthermore, overexpression of DAPK2 S299D resulted in a significant increase in apoptosis of human breast cancer MCF7 cells, compared with that of wild type.
2. 14-3-3s were identified as DAPK2-interacting proteins. DAPK2 interacted with 14-3-3s via phosphorylation of Thr³⁶⁹ at its C-terminus, and its kinase activity was inhibited by 14-3-3s.
3. Cyclin A was identified as an activator of PCKT3. CDK2 is complexed with cyclin A in the nucleus, while PCKT3 interacted with cyclin A in the cytoplasm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：情報伝達

1. 研究開始当初の背景

一酸化窒素（NO）やナトリウム利尿ペプチドの刺激によって産生される細胞内セカンドメッセンジャーcGMPは、主にcGMP依存性キナーゼ（cGK）の活性化を介して様々な生理作用に関与している。cGKにはIα、Iβ、II型の計3種類が存在し、細胞や組織によって、また、時期によって異なる発現パターンあるいは細胞内局在を示し、これによりcGMPの

多様な生理機能に対応している。I型cGK（cGK I）は、主に循環器系・神経系において機能していることが示されており、循環器系、特に、血管平滑筋細胞におけるcGK Iの機能に関して多くの研究が行われ、そのシグナル伝達機構の詳細が明らかにされつつある。一方、神経系では、cGK Iはその欠損マウスの解析から末梢感覚神経細胞の軸索伸長および分岐に必須であり、また、軸索ガイダンス因

子セマフォリン3による成長円錐の退縮を抑制することが報告されている。さらに、神経回路の形成だけでなく、神経細胞保護作用(アポトーシス抑制作用)にも関与することが報告されている。しかしながら、いずれも十分な解析がなされておらず、その細胞内情報伝達経路については不明である。

最近、研究代表者はプロテオミクス解析により cGK I の新たな候補基質として death-associated protein kinase 2 (DAPK2)、PCTAIRE protein kinase 1 (PCTK1)/cyclin-dependent protein kinase 16 (CDK16)、PCTK3/CDK18 の3種類のプロテインキナーゼを同定した。これら候補基質は神経細胞に発現し、*in vitro* キナーゼアッセイおよび cGK 基質のリン酸化を認識するリン酸化モチーフ特異的抗体(抗 phospho-RRXS*/T*抗体)を用いた cell-based キナーゼアッセイのいずれにおいても cGK I によってリン酸化されたことから、神経系における cGK I シグナル伝達経路の解明への一つの手がかりになることが考えられた。

DAPK1、DAPK2、DAPK3 などによって構成される DAP kinase ファミリーは、アポトーシスの正の調節因子として機能しており、これらを動物細胞に過剰発現させるとアポトーシスが誘導される。DAPK1 や DAPK3 に関しては多くの研究がなされており、例えば、DAPK1 は NMDA 受容体と相互作用し、かつそのリン酸化を行うことによってカルシウム流入を制御し、結果として脳卒中時における脳障害に関与することが報告されている。これに対して、DAPK2 に関する報告は少なく、特に他の DAP kinase ファミリーに存在する結合タンパク質や基質に関する知見は全くない。

一方、PCTK1/CDK16 と PCTK3/CDK18 は CDK ファミリーに属し、PCTK2/CDK17 とともに PCTK サブファミリーを形成する。PCTK1、2、3 はいずれも有糸分裂後ニューロンでの発現が認められており、このことから CDK ファミリーに属するにもかかわらず、細胞周期の制御以外の生理機能を発揮することが推測されている。しかしながら、CDK が cyclin によって活性化制御を受けるのに対して、PCTK サブファミリーの活性化機構は不明であるため、これまで十分な解析がなされてこなかった。最近、cyclin の新しいファミリーとして cyclin Y が同定され、これが PCTK1 に結合し、PCTK1 を活性化すること、また、PCTK1 が神経突起伸長に関与することが明らかとなった(Ou *et al.* (*Cell*, 2010)、Mokalled *et al.* (*Development*, 2010))。PCTK3 の活性化機構については未だ解明されていないが、

PCTK1 と同様な機構によって制御を受ける可能性が考えられた。

2. 研究の目的

(1) アポトーシス制御因子 DAPK2 の結合タンパク質の同定およびその機能解析

DAPK1 や DAPK3 はそれぞれに特異的な結合タンパク質をリン酸化し、機能を発揮することが示されているが、DAPK2 の結合あるいは基質タンパク質は同定されていない。そこで、これらタンパク質の同定を行い、DAPK2 のシグナル伝達経路の解明を試みる。これと並行して cGK I によるリン酸化の影響(活性および細胞内局在の変化)について検討を行い、cGK I の神経細胞保護作用の分子機構の解明を行う。

(2) 神経特異的キナーゼ PCTK1 と PCTK3 の活性調節機構および基質の同定

PCTK1 が cyclin Y によって活性化されたことから、PCTK3 も cyclin Y によって活性化されるか否か検討する。PCTK3 の活性化機構を明らかにした後、cGK I による PCTK1 および PCTK3 のリン酸化の影響について検討を行う。また、これらの結果を基に PCTK1 と PCTK3 の基質の同定を行い、cGK I の神経細胞における新たなシグナル伝達経路の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス制御因子 DAPK2 の結合タンパク質の同定およびその機能解析

① COS-7 細胞に FLAG タグを付加した cGK I β と不活性型変異体 DAPK2 K52A を共発現させ、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。また、cGK によるリン酸化部位を決定するために、Ser²⁹⁹ を Ala に置換した DAPK2 K52A/S299A および Ser³⁶⁷ を終止コドンに変異させた DAPK2 K52A/S367 Δ を作製し、同様に *in vitro* キナーゼアッセイを行った。

cGK によるリン酸化が DAPK2 活性に及ぼす影響を評価するために、擬似リン酸化変異体(DAPK2 S299D、DAPK2 S367D/S368D)を作製し、COS-7 細胞に遺伝子導入した。抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した後、CaCl₂/CaM あるいは EGTA の存在下で、基質として大腸菌にて発現・精製した GST-MLC2 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。SDS-PAGE によって分離した後、BAS-1500 により解析を行った

② ヒト乳癌 MCF7 細胞に DAPK2 と GFP を強制発現させた後、蛍光染色剤 Hoechst33342 により核染色を行い、2つのアポトーシス形態である membrane blebbing と核凝集を蛍光顕微鏡により観察した。GFP 発現細胞の中で、

両方のアポトーシス形態を示すものをアポトーシス細胞としてその割合を計測した。

③MCF7細胞に Strep タグ DAPK2 を遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った。共沈タンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によりタンパク質を検出した。空ベクターを遺伝子導入したコントロール細胞と比較して、DAPK2 に依存して検出されたタンパク質バンドについて MALDI-TOF MS による質量分析を行った。

④COS-7細胞に Strep タグ DAPK2 と FLAG タグ 14-3-3 アイソフォームをそれぞれ遺伝子導入した後、Strep プルダウンアッセイを行い、抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングにより共沈タンパク質を解析した。また、14-3-3 タンパク質が結合する部位を同定するために、DAPK2 の Ser³⁶⁷、Ser³⁶⁸、Thr³⁶⁹、Ser³⁷⁰ をそれぞれ Ala に置換した変異体(DAPK2 S367A、S368A、T369A、S370A)を作製し、同様に Strep プルダウンアッセイによる結合実験を行った。

(2) 神経特異的キナーゼ PCTK1 と PCTK3 の活性調節機構および基質の同定

①Strep タグ PCTK3 を HEK293T 細胞に遺伝子導入した後、Strep プルダウンアッセイを行い、抗 cyclin A、B1、D3、E1、E2、H 抗体を用いたイムノブロッティングにより共沈タンパク質を解析した。

②COS-7細胞に GST タグ PCTK3 と FLAG タグ cyclin A を遺伝子導入した。GST プルダウンを行った後、基質として大腸菌にて発現・精製した MBP-Rb_{C150} を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行った。また、同時に抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロッティングにより *in vivo* 結合実験を行った。PCTK1、PCTK2、PFTK1、CDK2 についても同様に cyclin A と結合し、活性化されるか否か解析した。

③3種類の PCTK3 特異的 siRNA を作製し、これらをそれぞれヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞に遺伝子導入し、抗 PCTK3 抗体を用いてイムノプロット解析を行った。コントロールとして、非特異的 siRNA を用いた。

また、細胞分画法により HEK293T 細胞を核と細胞質に分画し、抗 PCTK3 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗 cyclin A 抗体を用いてイムノブロッティングを行った。ネガティブコントロールとしてノーマル IgG を用いて免疫沈降を行い、同様に解析した。

4. 研究成果

(1) アポトーシス制御因子 DAPK2 の結合タンパク質の同定およびその機能解析

cGK I の新規基質として同定した DAPK2 に

は、3カ所の cGK によるコンセンサスリン酸化モチーフ(Ser²⁹⁹、Ser³⁶⁷、Ser³⁶⁸)が存在している。まず、どの残基が cGK I によってリン酸化されるのか検討した。Ser²⁹⁹ は Ala に置換し(DAPK2 K52A/S299A)、Ser³⁶⁷ と Ser³⁶⁸ については C 末端に近かったため Ser³⁶⁷ を終止コドンに変異させた(DAPK2 K52A/S367Δ)。これらを用いて、*in vitro* キナーゼアッセイを行った結果、それぞれの変異体は DAPK2 K52A 変異体と比較してリン酸化が減少し、さらに、これらの両変異体(DAPK2 K52A/S299A/S367Δ)ではほとんどリン酸化が検出されなかった。このことから、cGK は DAPK2 の Ser²⁹⁹、Ser³⁶⁷、Ser³⁶⁸ の3カ所をリン酸化することが示唆された。

次に、cGK による DAPK2 のリン酸化が DAPK2 活性に影響を与えるのかどうか検討した。DAPK2 は Ca²⁺/CaM によって活性化されるが、Ser²⁹⁹ の擬似リン酸化変異体 DAPK2 S299D は野生型と比較してさらに約2倍高い活性を示した。一方で、C末端残基の擬似リン酸化変異体 DAPK2 S367D/S368D の活性は野生型と変わらなかった。また、DAPK2 S299D 変異体は、Ca²⁺/CaM の非存在下においても高い活性を示した。別の擬似リン酸化変異体である DAPK2 S299E においても同様な結果が得られ、Ser²⁹⁹ のリン酸化は DAPK2 の活性を増加させ、Ca²⁺/CaM 非依存的にも DAPK2 に活性を与えることが示唆された。

DAPK2 は Ser³¹⁸ を自己リン酸化し、活性を抑制している。cGK による Ser²⁹⁹ のリン酸化がこの自己リン酸化による自己抑制に影響を与えるのか検討するために、自己リン酸化を模倣した DAPK2 S318E および DAPK2 S299D/S318E を作製し、*in vitro* キナーゼアッセイを行った。DAPK2 S318E 変異体は Ca²⁺/CaM による活性化を受けなかったのに対して、cGK によるリン酸化を同時に模倣した DAPK2 S299D/S318E 変異体は DAPK2 S299D 変異体と同様に高い活性を示し、Ca²⁺/CaM の非存在下でも活性が見られた。これらの結果から、DAPK2 Ser²⁹⁹ のリン酸化は、活性化を引き起こすだけでなく、Ca²⁺/CaM 非依存的にも活性を与え、さらには自己リン酸化による自己抑制をも解除できることが示唆された。

さらに、ヒト乳癌細胞である MCF7 細胞を用いて、DAPK2 Ser²⁹⁹ のリン酸化がアポトーシス誘導能に影響を与えるか検討した。野生型 DAPK2 を過剰発現させた細胞では、アポトーシス形態 (membrane blebbing と核凝集) を示す細胞が増加した。一方で、不活性化型変異体 DAPK2 S318E を遺伝子導入した細胞

では、野生型に比べてアポトーシス細胞の減少が認められた。また、キナーゼ活性に一致して、DAPK2 S299D 変異体では、アポトーシス細胞は約 2 倍に増加した。DAPK2 S299D/S318E を過剰発現した細胞も同様な結果が得られ、これらの結果から、cGKI は DAPK2 のリン酸化を介してアポトーシスを誘導していることが示唆された。

続いて、DAPK2 の新規結合タンパク質の同定を試みた。MCF7 細胞に Strep タグ DAPK2 を遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った。共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、銀染色によりタンパク質バンドを検出した。その結果、空ベクターを遺伝子導入したコントロール細胞と比較して、Strep タグ DAPK2 を遺伝子導入した細胞において、31、30kDa 付近に特異的なバンドが検出された。これらの共沈タンパク質について MALDI-TOF MS による解析を行った結果、31、30kDa のタンパク質として 14-3-3ε、14-3-3ζ/δ がそれぞれ同定された。

14-3-3 タンパク質は、哺乳類において 7 種類のアイソフォームが同定されているため、DAPK2 がどのアイソフォームと結合を示すのか検討した。Strep プルダウンアッセイの結果、結合に強弱が見られたが、DAPK2 は 7 種類全ての 14-3-3 アイソフォームと結合した。14-3-3 タンパク質が結合するリン酸化配列は、mode1 (RSX(pS/pT)XP)、mode2 (RXΦX(pS/pT)XP、Φ：芳香族か脂肪族アミノ酸)、mode3 ((pS/pT)Y_{1,2}-COOH、Y：Pro ではないアミノ酸)とそれ以外のモチーフに分類される。DAPK2 の C 末端配列は³⁶⁴RRRSSTS-COOH であり、mode3 モチーフと一致した。そこで、この配列が 14-3-3 タンパク質との結合に関与するかどうか検討を行った。Strep プルダウンアッセイの結果、367 番目の Ser を終止コドンに置換した DAPK2 S367Δ 変異体と 14-3-3ε との結合はほとんど認められず、この配列が 14-3-3 タンパク質との結合に関わることを考えられた。さらに、DAPK2 の 367 番目の Ser 以降のどの Ser または Thr が 14-3-3 タンパク質との結合に関与しているのか調べた。DAPK2 T369A 変異体は野生型と比較して 14-3-3 タンパク質との結合が弱まったのに対して、他の変異体である DAPK2 S367A、S368A、S370A では結合の減弱は認められなかったことから、14-3-3 タンパク質は主に DAPK2 の Thr³⁶⁹ を介して結合することが明らかとなった。

最終的に 14-3-3 タンパク質との結合が DAPK2 のキナーゼ活性に影響を与えるのかどうか *in vitro* キナーゼアッセイにより検討し

た。DAPK2 は Ca²⁺/CaM 存在下で GST-MLC2 をリン酸化したのに対して、14-3-3γ を共発現させた場合では GST-MLC2 のリン酸化はほぼ検出されず、14-3-3 との結合により DAPK2 の活性は阻害されることが明らかとなった。

(2) 神経特異的キナーゼ PCTK1 と PCTK3 の活性調節機構および基質の同定

PCTK3 の活性化機構は解明されていないため、cGKI によるリン酸化が PCTK3 に及ぼす影響について評価が困難である。そこで、まず、PCTK3 の活性化機構の解明を試みた。siRNA および特異的抗体を用いたイムノブロットングにより PCTK3 タンパク質の発現が確認できた HEK293T 細胞に Strep タグ PCTK3 を遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った。数種の抗 cyclin 抗体を用いたイムノブロットングにより、共沈タンパク質について解析した結果、PCTK3 は cyclin A および cyclin E1 と結合することが示された。次に、*in vitro* キナーゼアッセイにより、cyclin A および E1 との結合による PCTK3 の活性への影響を調べた。その結果、cyclin A と PCTK3 の共免疫沈降において Rb_{C150} のリン酸化が認められた。一方、cyclin E1 と PCTK3 の共免疫沈降においてはリン酸化が認められず、PCTK3 の活性化機構に cyclin A が関わっていることが明らかとなった。

cyclin A は CDK1 や CDK2 の活性化因子であり、その制御機構については詳細な研究が行われている。そこで、cyclin A によって活性化された PCTK3 と CDK2 の活性を比較した。また、PCTK サブファミリーである PCTK1 および PCTK2、さらに PCTK3 と約 50% 相同性を示す PFTK1 についても cyclin A と結合し、活性化されるのかどうか検討した。*in vivo* 結合アッセイおよび *in vitro* キナーゼアッセイの結果、cyclin A は PCTK3 よりも CDK2 と高い親和性を示し、CDK2 をより強く活性化することが明らかとなった。これに対して、PCTK1 および PCTK2 は cyclin A と結合したが、Rb のリン酸化は認められなかった。また、PFTK1 に関しては、cyclin A との結合すら認められず、Rb のリン酸化も検出できなかった。これらの結果から、Rb を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイにおいて、CDK2 と比較して弱い活性しか示さなかったが、PCTK3 は cyclin A によって特異的に活性化されることが明らかになった。

さらに、PCTK3 タンパク質の発現が確認できている HEK293T 細胞を用いて、内在性 PCTK3 と cyclin A の結合について検証した。細胞分画法により、HEK293T 細胞を核と細胞質に分画し、抗 PCTK3 抗体を用いて免疫沈降

を行った後、抗 cyclin A 抗体を用いてイムノブロットングを行った。その結果、コントロールであるノーマル IgG による免疫沈降では核、細胞質ともに cyclin A は検出されなかった。一方、抗 PCK3 抗体を用いて免疫沈降を行うと核画分では結合が認められなかったが、細胞質画分において PCK3 と cyclin A の結合が認められた。この結果から、cyclin A は生体内においても PCK3 の活性化因子として機能していることが考えられ、また、CDK2 が cyclin A と核で結合するのに対して、PCK3 は cyclin A と細胞質で結合することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Kinuka Isshiki, Shinya Matsuda, Akihiko Tsuji and Keizo Yuasa: cGMP-dependent protein kinase I promotes cell apoptosis through hyperactivation of death-associated protein kinase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 280-284 (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.148. 査読有
- ② Keizo Yuasa, Takeshi Nagame, Makoto Dohi, Yayoi Yanagita, Shin Yamagami, Masami Nagahama and Akihiko Tsuji: cGMP-dependent protein kinase I is involved in neurite outgrowth via a Rho effector, rhotekin, in Neuro2A neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 239-244 (2012) DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.143. 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 松田真弥, 篠倉悠久, 辻明彦, 湯浅恵造: CDK ファミリー PCK3 の活性化因子の同定, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 東北大学 (仙台市)
- ② 一色衣香, 湯浅恵造, 辻明彦: cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) による Death-associated protein kinase-2 (DAPK2) 調節機構, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡市)
- ③ 一色衣香, 湯浅恵造, 辻明彦: cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) の新規基質同定, 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2012 年 5 月 18 日, 岡山大学 (岡山市)
- ④ 一色衣香, 湯浅恵造, 辻明彦: cGMP 依存性プロテインキナーゼ (cGK) の新規基質同定, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学 (京都市)
- ⑤ 土肥真, 湯浅恵造, 長目健, 辻明彦: 神経細胞における cGMP 依存性プロテインキナーゼと Rho エフェクター rhotekin の相互作用の

解析, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都国際会館 (京都市)

⑥ 土肥真, 湯浅恵造, 長目健, 辻明彦: cGMP 依存性プロテインキナーゼと Rho エフェクター rhotekin の相互作用部位および細胞内局在の解析, 第 52 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2011 年 5 月 13 日, 広島大学 (広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA KEIZO)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 70363132

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者