

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：34303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580150

研究課題名(和文) ミリスチル化を介した蛋白質間相互作用解析とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cellular functions by myristoylation-dependent protein-protein interaction

研究代表者

松原 守 (Matsubara, Mamoru)

京都学園大学・バイオ環境学部・教授

研究者番号：90288481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質のミリスチル化は重要な蛋白質脂質修飾の一つであり、がん遺伝子産物、シグナル伝達系の蛋白質に多く見られる。これまでミリスチル化は主に蛋白質と細胞膜との結合に重要であることが知られているが、蛋白質間相互作用における役割についてはほとんど解明されていなかった。本研究ではミリスチル化の蛋白質間相互作用の役割を明らかにするために、NAP-22とミリスチル化依存的に結合する蛋白質の解析を行った。その結果、ミリスチル化NAP-22のみに結合する蛋白質が見つかった。特にHMGB1という核内蛋白質は、細胞の種類に応じて細胞質や核でNAP-22とミリスチル化依存的に結合することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A variety of oncogene and signal transduction proteins are known to be myristoylated. Although the role of myristoylation in protein-lipid interaction is well established, the involvement of myristoylation in protein-protein interaction is less well understood. To elucidate the myristoylation-dependent protein-protein interaction, we detected the binding proteins of NAP22 in a myristoylation-dependent manner. The binding proteins included the nuclear proteins such as HMGB1. Protein-protein interactions of HMGB1 and myristoylated NAP-22 were observed in cytosol and nuclear regions of various mammalian cells. These results suggest that myristoylation-dependent protein-protein interaction might be very significant to cellular function.

研究分野：蛋白質科学、細胞生物学、分子生物学、生化学

キーワード：ミリスチル化 ミリスチル化 脂質修飾 シグナル伝達 蛋白質間相互作用 リン酸化 転写抑制因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質の翻訳後修飾の一つである脂質修飾のミリスチル化は、真核生物及びウイルス由来タンパク質アミノ末端に炭素数 14 の長鎖飽和脂肪酸であるミリスチン酸がアミド結合を介して共有結合することが知られている。これまでにミリスチル化は、タンパク質の安定性、タンパク質-脂質間相互作用について重要な役割は理解されていたが、タンパク質間相互作用の役割については明らかにされていなかった。

(2) 我々は、タンパク質間相互作用にミリスチル化が直接関与する初めての例として、NAP-22 とその生理的ターゲット因子であるカルモジュリン (CaM) との相互作用を明らかにした。NAP-22 とカルモジュリンとの複合体の X 線結晶構造解析の結果から、NAP-22 のミリスチル基が、カルモジュリンの N 末端ドメインと C 末端ドメインによって形成される疎水性のトンネル構造の中央を貫通しているという非常にユニークな形で分子認識を行っていることが分かった(1)。

(3) ミリスチル化によるタンパク質間相互作用の普遍性を検証するため、カルモジュリン以外にNAP-22とミリスチル化依存的に結合するタンパク質の探索を行い、ラット脳可溶性画分からNAP-22とミリスチル化依存的に結合するタンパク質として10数種類のタンパク質を同定した。これらの結果から、ミリスチル化は、細胞膜との結合だけでなく、蛋白質間相互作用にも関与することで、細胞内シグナルネットワークにおいて重要な役割を担っていることが推察される。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、これまで得られたミリスチル化によるタンパク質間相互作用の関与が普遍的なものであるのかどうかを検証すると同時に、細胞内シグナル伝達のどのような場面において、このタンパク質間相互作用が重要な役割を担っているのかを明らかにする。

(2) 我々が得たラット脳の細胞質画分で

NAP-22とミリスチル化依存的に結合するタンパク質の中には、核内で働くがん遺伝子やがん抑制因子などが含まれており、NAP-22における新たな生理的機能を探る上でも重要な知見となっている。

(3) 特に我々の実験で得られたタンパク質の中で、NAP-22 とミリスチル化依存的に結合すると考えられるタンパク質 DDX5、NONO、HMGB1、YTHD3 に注目し、これらが *in vitro* で直接結合するのかを検討する。

(4) また、細胞内のどの場所で結合するのかを免疫沈降実験や免疫染色実験で確かめる。更に、結合蛋白質のどのような領域で結合するのか、各結合蛋白質において結合領域の共通性が見られるのかを検証する。核内における NAP-22 の生理的役割についてがん細胞を用いて解析するとともに、NAP-22 が多く発現している神経細胞においても結合タンパク質との相互作用を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) COS-7 細胞に NAP-22-EGFP 遺伝子を導入し、細胞内での局在を蛍光顕微鏡で観察した。同様に、ミリスチル化されない NAP-22(G2A) -EGFP や DDX5、NONO、HMGB1、YTHD3 についても同様に行った。更に、NAP-22 と DDX5、NONO、HMGB1、YTHD3 をダブルトランスフェクションした各種細胞についても行った。

(2) HeLa 細胞、N1E-115 細胞では、内在性の NAP-22 と HMGB1 を両者の特異的抗体を用いて免疫免疫染色法で観察した。

(3) 各細胞について細胞分画や免疫沈降法を行うことによって NAP-22 と候補結合タンパク質が相互作用しているかを検討した。

(4) 大腸菌でミリスチル化された NAP-22 とされていない NAP-22 を発現し、同様に大腸菌で発現させた HMGB1、YTHD3 などのタンパク質と *in vitro* で直接の結合を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) NAP-22 とミリスチル化依存的に結合するタンパク質として同定された DDX5、NONO、HMGB1、YTHD3 との細胞内局在を見るために、NAP-22 の C 末端側に EGFP を付加し、融合タンパク質として COS-7 細胞で発現させた。

また、ミリスチル化されないものとして NAP-22 の 2 番目のグリシンをアラニンに置換することでミリスチル化されていない NAP-22-EGFP を作製し、同様に COS-7 細胞で発現させた。その結果、ミリスチル化されている NAP-22-EGFP は主に細胞膜に局在し、ミリスチル化されていない NAP-22(G2A)-EGFP は細胞質全体に局在が見られた(図 1)。

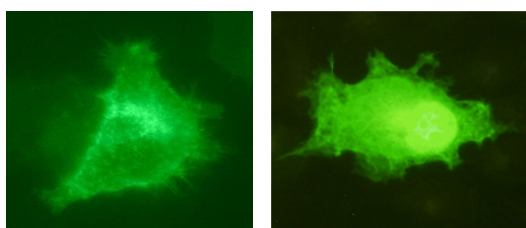


図 1: NAP-22-EGFP(左)と NAP-22(G2A)-EGFP(右)の細胞内局在

(2) NAP-22 とミリスチル化依存的に結合するタンパク質として同定された DDX5、NONO、HMGB1、YTHD3 について COS-7 細胞へ発現した。これらのタンパク質は、タグとして HaloTag を用い、タグ専用のリガンドを取り込むことで、蛍光顕微鏡によって赤色の融合タンパク質として観察した。図 2 から分かるように、HaloTag-DDX5 は主に細胞質に、HaloTag-NONO は主に核と細胞質に局在が見られた(図 2)。

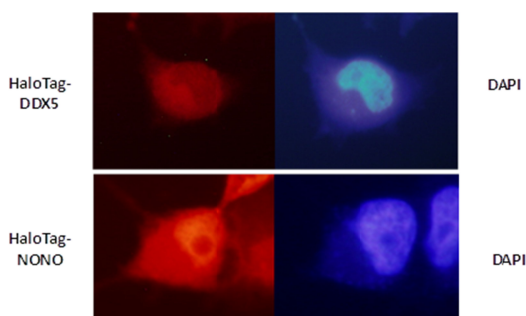


図2: HaloTag-DDX5(上)と HaloTag-NONO(下)の細胞内局在

また、HaloTag-YTHD3は主に細胞質に、HaloTag-HMGB1は主に核内に局在が見られた(図3)。

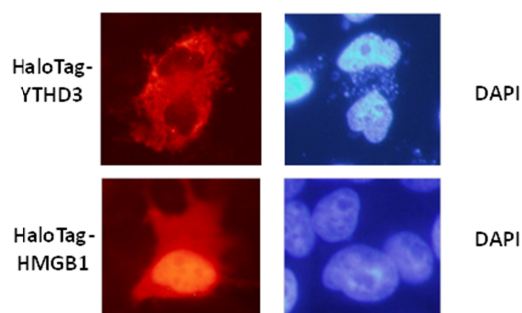


図 3: HaloTag-YTHD3(上)と HaloTag-HMGB1(下)の細胞内局在

(3) ミリスチル化依存的に DDX5、NONO、YTHD3 の細胞内局在が変化するかを観察するためにミリスチル化 NAP-22-EGFP と非ミリスチル化 NAP-22(G2A)-EGFP とダブルトランスフェクションを行った。ミリスチル化に関わらず NAP-22 と DDX5 は細胞質で共局在していることを確認した。NONO のダブルトランスフェクションでは NAP-22 は細胞質あるいは細胞膜に、NONO は核に局在し、ミリスチル化依存的な結合は細胞内では見られなかった。YTHD3 では、ミリスチル化に関わらず NAP-22 と YTHD3 は細胞質で共局在していることが分かった(図 4)。

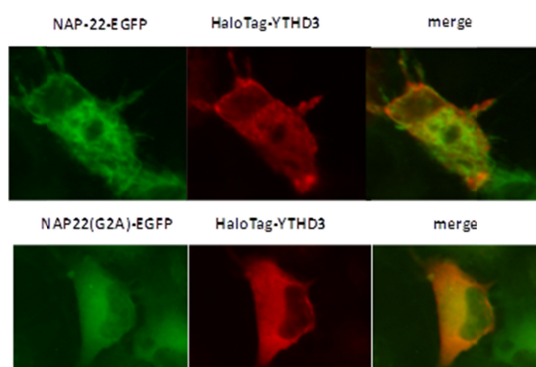


図 4: NAP-22-EGFP と HaloTag-YTHD3 の細胞内局在

(4) ミリスチル化依存的に HMGB1 の細胞内局在が変化するかを観察するために NAP-22-EGFP と NAP-22(G2A)-EGFP のダブルト

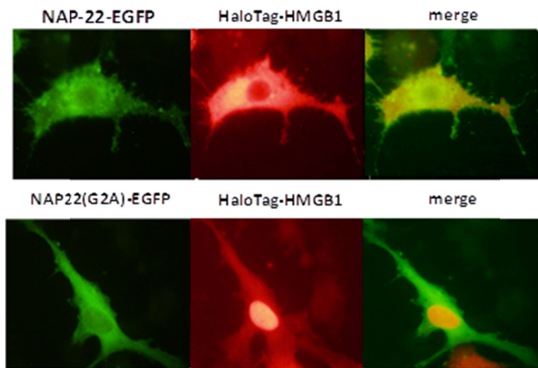


図 5: NAP-22-EGFP と HaloTag-HMGB1 の細胞内局在

ランスフェクションを行った。図 5 に示したように、非ミリスチル化 NAP-22(G2A)-EGFP では HaloTag-HMGB1 は核内に局在し、ミリスチル化 NAP-22-EGFP では、HaloTag-HMGB1 は細胞質に局在した。このことから、ミリスチル化依存的に NAP-22 と HMGB1 は共局在する可能性があると推測した。つまり、通常、核内に存在する HMGB1 が、ミリスチル化 NAP-22 とミリスチル化を介して相互作用することで核から細胞質へ移行する可能性が示唆された。この結果から以降は HMGB1 に焦点を当てて実験を行った。

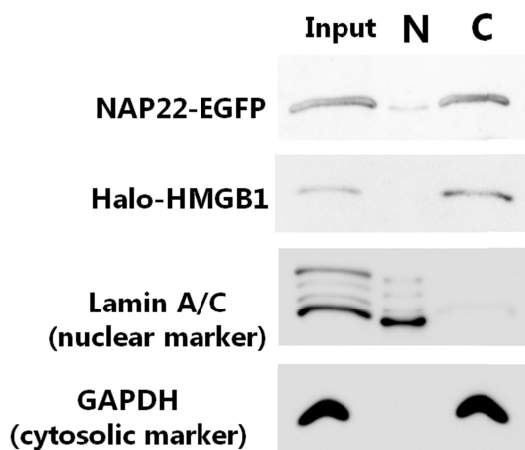


図 6 NAP-22 と HMGB1 の細胞分画

(5) ミリスチル化 NAP-22 と HMGB1 の細胞内局在について更に詳細な情報を得るために、COS-7 細胞で共発現させた NAP-22-EGFP と HaloTag-HMGB1 の細胞分画を行った。その結

果、NAP-22-EGFP と HaloTag-HMGB1 は、細胞質で共局在することが明らかとなった(図 6)。

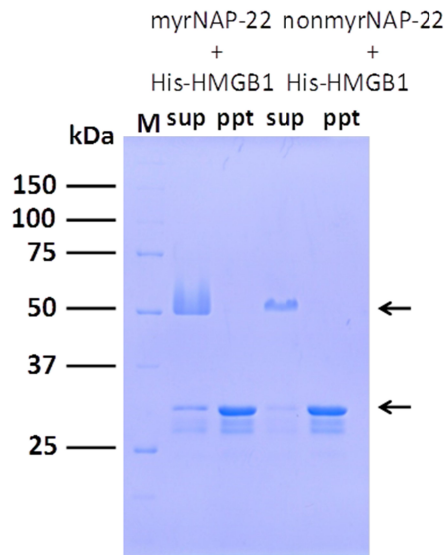


図 7 myr NAP22 および non-myr NAP22 と HMGB1 との in vitro での結合

(6) 大腸菌で発現した myr NAP-22 および non-myr NAP22 と HMGB1 が in vitro で直接結合するかどうかを検討したところ、いずれも HMGB1 との直接の結合は見ることができなかった(図 7)。このことから何らかのタンパク質あるいは脂質などの別の因子を介して両者は結合している可能性が示唆された。

(7) 内在性の NAP-22 と HMGB1 の細胞局在を調べるために、両タンパク質が比較的多く発現している N1E-115(マウス神経芽細胞)と HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん細胞)を用いた。N1E-115 細胞では、神経細胞に分化する前と分化した後についても比較した。

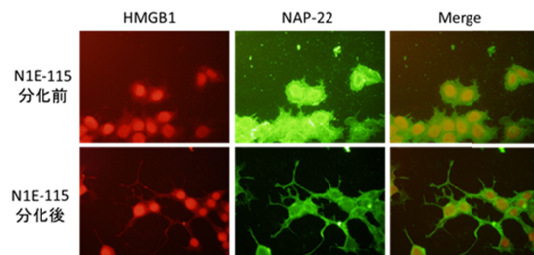


図 8 N1E115 細胞における内在性の NAP-22 と HMGB1 の細胞内局在

N1E-115 細胞では、分化の有無に関わらず HMGB1 は核内局在し、NAP-22 は細胞膜やサイトゾルに局在していることが確認できた。マージの画像においても、両者が異なる局在を示すことが分かる。このことから、通常時における NAP-22 と HMGB1 の局在は異なることが示唆された (図 8)。

HeLa 細胞では、通常の HeLa 細胞とアポトーシスを誘導した HeLa 細胞を用いて NAP-22 および HMGB1 の局在を確認した。HeLa 細胞のアポトーシスは、TNF (50 ng/ml) とシクロヘキシミド (CHX) (10 µg/ml) で 2 時間反応させることで誘導させた。その結果、通常の HeLa 細胞およびアポトーシスを誘導した HeLa 細胞において、NAP-22 および HMGB1 が核内に局在することが分かった (図 9)。またマージの画像より、核内が黄色く染まっていることから両者が核内に共局在していることが示唆された。

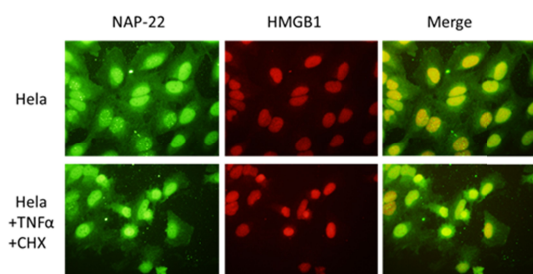


図 9 HeLa 細胞における内在性の NAP-22 と HMGB1 の細胞内局在

(8) 以上の結果から、我々のこれまでの研究で明らかにしてきたミスチル化依存的に NAP-22 に結合する多くのタンパク質のうち HMGB1 はその可能性を強く示唆するタンパク質であることが分かった。COS-7 細胞に過剰発現させた NAP-22 と HMGB1 では、ミスチル化された場合に、通常は核に存在する HMGB1 が細胞質に移行し相互作用するのではという結果が得られた。このことは、HMGB1 が様々な生理機能 (例えば炎症反応など) を果たす際に核から細胞質あるいは細胞外へ移行することからも、これらの生理機能に着目して解析を進めれば両者のミスチル化依存的な相互作用の意義を明らかにできるであろう。

HeLa 細胞では、NAP-22 と HMGB1 が核内に共

局在していた。最近、HeLa 細胞などのがん細胞において NAP-22 の核内での転写因子を抑制する働きなども報告されているので(2)、その関連性に注目することで、NAP-22 と HMGB1 との核内での生理機能も明らかになるであろう。

#### 引用文献

Matsubara, M., Nakatsu, T., Kato, H. and Taniguchi, H. "Crystal structure of a myristoylated CAP-23/NAP-22 N-terminal domain complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin." (2004) *EMBO J.* **23** 712-718

Toska, E., Shandilya, J., Goodfellow, S.J., Medler, K.F. and Roberts, S.G. "Prohibitin is required for transcriptional repression by the WT1-BASP1 complex." (2014) *Oncogene.* **33** 5100-5108

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Osumi, E., Kondo, C., Mizuno, M., Suzuki, T. Matsubara, M., Shimozato, K. and Kanamori, T.

Partial Purification and Characterization of the Rat Parotid Gland Protein Kinase Catalyzing Phosphorylation of Matures Dextrin at Ser-2.

*Advances in Enzyme Research*, 査読有、2, 2014, 100-112

DOI:10.4236/aer.2014.22011

Yamada, K., Nishii, K., Sakai, K, Teranishi, T. and Matsubara, M.

Groped for a Novel Stimulation Method for the Prevention of Lumbar Vertebral Compression Pressure Bone Fracture and Verification Using a Bone Density Drop Model Mouse.

*Okajimas Folia Anat. Jpn.* 査読有、91, 2014, 29-36

<http://doi.org/10.2535/ofaj.91.29>

[学会発表] (計 5 件)

松原守、菊池佑一、谷川新悟、中村正彦  
ミリスチル化を介したタンパク質間相互作用の網羅的解析  
第 85 回日本生化学会  
2012 年 12 月 14 日 ~ 16 日 (福岡)

松原守、菊池佑一、中村正彦  
ミリスチル化を介したタンパク質間相互作用による細胞機能の制御  
第 36 回日本分子生物学会  
2013 年 12 月 2 日 ~ 5 日 (神戸)

本田忠誠、菊池佑一、中村正彦、松原守  
がん抑制因子 NAP-22 のミリスチル化によるタンパク質間相互作用の制御  
第 61 回日本生化学会近畿支部例会  
2014 年 5 月 17 日(京都)

松原守、本田忠誠、菊池佑一、鈴木智之、中村正彦  
ミリスチル化依存的なタンパク質間相互作用による細胞シグナルの制御  
第 37 回日本分子生物学会  
2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日 (横浜)

松原守  
ミリスチル化を介したタンパク質間相互作用による細胞シグナルの制御  
理化学研究所播磨研究所メンブレンダイナミクスグループ 15 周年記念シンポジウム(招待講演)  
2014 年 12 月 6 日 (名古屋)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.kyotogakuen.ac.jp/~molbio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 守 (MATSUBARA MAMORU)

京都学園大学 バイオ環境学部・教授

研究者番号: 9 0 2 8 8 4 8 1