

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659027

研究課題名(和文)新規ヒスチジン型プロテインホスファターゼの探索と基質特異性についての構造学的解析

研究課題名(英文) A search for novel histidine-based protein phosphatases and structural analysis of their substrate specificities

研究代表者

武田 弘資 (Takeda, Kohsuke)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：10313230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：最近我々は、ヒスチジン残基を活性中心とする全く新しいタイプのプロテインホスファターゼとしてPGAM5を見出したが、その酵素としての作用機構は分かっていない。本研究では、PGAM5の構造解析を行い、2つのヒスチジン残基と2つのアルギニン残基から酵素活性中心が形成されることを見出した。また、PGAM5は二量体を形成し、さらに二量体化がPGAM5の活性保持に必須であることも明らかとなった。この結果は、ヒスチジン型プロテインホスファターゼの作用機構の解明への大きな足がかりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have recently identified PGAM5 as a novel type of protein phosphatase that relies on a histidine residue as a catalytic center; however, its mechanism of enzymatic action has not been revealed. In the current study, we found by structural analyses that the catalytic center of PGAM5 consists of two histidines and two arginines. We also found that PGAM5 forms a dimer and that the dimerization is required for the catalytic activity of PGAM5. These results provide important clues to the mechanism of action of the histidine-based protein phosphatases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シグナル伝達 ストレス応答 プロテインホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞が正常に機能するためには、細胞内の情報伝達機構が秩序だって働くことが必須であり、分子レベルではリン酸化やユビキチン化に代表されるタンパク質の様々な修飾が大きな役割を担っている。よって、その修飾に携わる酵素の同定と機能の解明はきわめて重要である。

我々は、ASK1 というストレス応答性キナーゼの解析過程で見いだした新規分子 PGAM5 が、ヒスチジン残基を活性中心とする全く新しいタイプのセリン・スレオニン特異的ホスファターゼとして機能することを発見した(Takeda et al. PNAS 106: 12301-12305, 2009)。PGAM5 は、解糖系で機能するホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM)と高い相同性をもつ PGAM ファミリーに属するが、PGAM 活性(リン酸基の分子内転移反応を触媒)は示さず、ホスファターゼ活性を示す。その活性により、ASK1 活性を抑制しているリン酸化部位を脱リン酸化することで ASK1 を活性化させ、下流で機能するストレス応答性 MAP キナーゼ経路を活性化する。また我々は、ショウジョウバエ PGAM5 (dPGAM5)がショウジョウバエのパーキンソン病モデルにおける増悪因子であることを明らかにしている (Imai et al. PLoS Genet, 2010)。

このような新規の活性をもつ分子が、PGAM ファミリー内に他にも存在するのではないかと考え、STS-1 という分子の活性を検討してみたところ、驚いたことに STS-1 はチロシンのみを特異的に脱リン酸化することが明らかとなった。このような結果から、PGAM ファミリー内には、互いに非常に似た構造を取りながらも全く異なる基質特異性を有するプロテインホスファターゼがサブファミリーを構成していることが分かった。

2. 研究の目的

タンパク質の脱リン酸化に働くプロテインホスファターゼは、きわめて多くの細胞機能を担っている。これまでに少なくともヒトにおいては、すべてのプロテインホスファターゼのリストアップが終了し、各々の機能解析のフェイズに入ったものと思われていた。しかし、最近我々がヒスチジン残基を活性中心とする全く新しいタイプのプロテインホスファターゼを発見したことで、未知のプロテインホスファターゼがまだ存在することが強く示唆された。さらに興味深いことに、我々の発見した分子はセリン及びスレオニンを特異的に脱リン酸化するのに対し、非常に似た構造を持つ別の分子はチロシンを特異的に脱リン酸化することも見いだした。よって本研究では、新規のヒスチジン型プロテインホスファターゼを探索するとともに、それらの構造と基質特異性との相関から新たなホスファターゼファミリーとしての機能を探り、既知の分子の機能では説明のできないタンパク質脱リン酸化を介した細胞機能

調節の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) ホスファターゼ活性の測定: HEK293 細胞に一過性に発現させた Flag タグ付きタンパク質を、Flag 抗体ビーズを用いた免疫沈降によって単離し、in vitro においてホスファターゼ活性を測定した。基質としてリン酸化セリン・ペプチド (pS: RRApSVA) \ リン酸化スレオニン・ペプチド (pT: RRApTVA) \ リン酸化チロシン・ペプチド (pY1: ENDpYINASL, pY2: DADEpYLIPQQG) を用い、リン酸化ペプチド基質から遊離されるリン酸はモリブデン酸: マラカイトグリーン: リン酸複合体に変換し、分光光度計を用いて 600nm の波長として測定した。

(2) オックスフォード大学 Structural Genomics Consortium (SGC) の Stefan Knapp 教授のグループとの共同研究として、文献 (Bunkoczi et al. Structure 15, 1215-1226, 2007) に記載された方法に基づいて PGAM5 の X 線結晶構造解析を行った。

(3) 産業技術総合研究所の夏目徹博士との共同研究により、ダイレクトナノフロー LC/MS/MS 法に基づくプルダウンによって PGAM5 の結合分子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) PGAM5 および Sts-1 をそれぞれセリン/スレオニンホスファターゼおよびチロシンホスファターゼのコントロールとして、PGAM ファミリーメンバーのうち PGAM1 および TIGAR のホスファターゼを検討したが、どちらの分子もリン酸化セリン、スレオニン、チロシンを含むペプチドに対する脱リン酸化活性は示さなかった。今後、他のファミリーメンバー分子についても同様の検討を進める必要がある。

(2) PGAM5 の PGAM ドメインから C 末端領域 (90-289AA) にかけてのリコンビナントタンパク質が精製できたため、その構造を解析したところ、二量体として存在し、2 つのヒスチジン残基と 2 つのアルギニン残基から酵素活性中心が形成されることが分かった。二量体形成に関しては、C 末端どうしで相互作用していることが示唆されたため、C 末端の欠失変異体を作製して共免疫沈降実験を行ったところ、C 末端の 7 アミノ酸が PGAM5 どうしの二量体形成に必要であることが明らかとなった。さらに、二量体化できない C 末端 7 アミノ酸の欠失変異体はホスファターゼ活性を失っていることが分かり、二量体化が PGAM5 の活性保持に必須であることが明らかとなった。一方、構造解析に用いた 90-289AA のリコンビナントタンパク質の in vitro におけるホスファターゼ活性を検討したところ、ほとんど活性を保持していないことが確認された。そこで、PGAM ドメインより N 末端側の配列を保持したいいくつかの欠失タンパク質のホスファターゼ活性を測し

たところ、54-289AA では活性を保持していることから、PGAM ドメインより N 末端側も活性の保持に必要であることが分かった。その領域には種を越えて保存されたモチーフ (WDxNWDxR) が存在しており、このモチーフが活性制御に重要な役割を担っていると予想される。現在、54-289AA の構造解析を進めているが、うまく結晶が得られておらず、基質ペプチドとの共結晶化が必要と考えられる。

(3) 最近の解析から、PGAM5 はミトコンドリアの機能低下にともなって膜内切断を受けるが、さらにアポトーシス誘導刺激を受けることで、切断型 PGAM5 がミトコンドリアから放出されることが分かった。その一部は核にも移行することが示唆されたため、核における PGAM5 結合分子を探索したところ、SRm160 (別名 SRRM1) をはじめとするいくつかの核タンパク質が同定された。SRm160 はエクソン接合部複合体の構成因子の一つとして高度にリン酸化された状態で核スペckル中存在し、mRNA の選択的スプライシングや核外輸送などを担っている。非ストレス状況下でも核に移行できる膜貫通ドメイン欠失 PGAM5 変異体を細胞に発現させると、SRm160 のスペckル局在が低下することから、PGAM5 が SRm160 の局在および機能を調節していることが示唆された。また、細胞からの免疫沈降によって単離したリン酸化状態の SRm160 を、リコンビナント PGAM5 が *in vitro* において直接脱リン酸化することも明らかとなった。よって、PGAM5 の標的となる SRm160 におけるリン酸化部位の特定を進めることで、PGAM5 のヒスチジン型プロテインホスファターゼとしての脱リン酸化の分子機構の解明を進むことが期待される。

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 11 件)

Matsui, H., Fukuno, N., Kanda, Y., Kantoh, Y., Chida, T., Nagaura, Y., Suzuki, O., Nishitoh, H., Takeda, K., Ichijo, H., Sawada, Y., Sasaki, K., Kobayashi, T. and Tamura, S. The expression of Fn14 via mechanical stress-activated JNK contributes to apoptosis induction in osteoblasts. **J. Biol. Chem.** 289, 6438-6450 (2014) 査読有

Homma, K., Fujisawa, T., Tsuburaya, N., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Takeda, K., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Naguro, I. and Ichijo, H. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. **Mol. Cell** 52, 75-86 (2013) 査読有

Yamaguchi, K., Takeda, K., Kadowaki, H., Ueda, I., Namba, Y., Ouchi, Y., Nishitoh, H. and Ichijo, H. Involvement of ASK1-p38

pathway in the pathogenesis of diabetes triggered by pancreatic β cell exhaustion. **Biochim. Biophys. Acta** 1830, 3656-3663 (2013) 査読有

Sadatomi, D., Tanimura, S., Ozaki, K. and Takeda, K. Atypical protein phosphatases: emerging players in cellular signaling. **Int. J. Mol. Sci.** 14, 4596-4612 (2013) 査読有

Hayakawa, R., Hayakawa, T., Takeda, K. and Ichijo, H. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signalling pathways. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.** 88, 434-453 (2012) 査読有

Kanamaru, Y., Sekine, S., Ichijo, H. and Takeda, K. The phosphorylation-dependent regulation of mitochondrial proteins in stress responses. **J. Signal Transduct.** 2012, 931215 (2012) 査読有

Naguro, I., Umeda, T., Kobayashi, Y., Maruyama, J., Hattori, K., Shimizu, Y., Kataoka, K., Kim-Mitsuyama, S., Uchida, S., Vandewalle, A., Noguchi, T., Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Takeda, K. and Ichijo, H. ASK3 responds to osmotic stress and regulates blood pressure by suppressing WNK1-SPAK/OSR1 signaling in the kidney. **Nat. Commun.** 3, 1285 (2012) 査読有

Sekine, Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Sono, N., Iemura, S., Natsume, T., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K. and Ichijo, H. The kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. **Mol. Cell** 48, 692-704 (2012) 査読有

Hayakawa, Y., Hirata, Y., Sakitani, K., Nakagawa, H., Nakata, W., Kinoshita, H., Takahashi, R., Takeda, K., Ichijo, H., Maeda, S. and Koike, K. Apoptosis signal-regulating kinase -1 inhibitor as a potent therapeutic drug for the treatment of gastric cancer. **Cancer Sci.** 103, 2181-2185 (2012) 査読有

Sekine, S., Kanamaru, Y., Koike, M., Nishihara, A., Okada, M., Kinoshita, H., Kamiyama, M., Maruyama, J., Uchiyama, Y., Ishihara, N., Takeda, K. and Ichijo, H. Rhomboid protease PARL mediates the mitochondrial membrane potential loss-induced cleavage of PGAM5. **J. Biol. Chem.** 287, 34635-34645 (2012) 査読有

Fujisawa, T., Homma, K., Yamaguchi, N., Kadowaki, H., Tsuburaya, N., Naguro, I., Matsuzawa, A., Takeda, K., Takahashi, Y., Goto, J., Tsuji, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H. A novel monoclonal antibody reveals a conformational alteration shared by amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants. **Ann. Neurol.** 72, 739-749 (2012) 査読有

[学会発表](計 19 件)

Takeda, K. Roles of mitochondrial sensing and responding to stress in inflammation regulation. The 1st International Symposium Dejima Challenge for Therapeutic Innovation. 2014.3.14 長崎

武田弘資 ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 によるストレス応答制御. 第6回 日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2014.2.21 三重

門田善法, 竹之内彰吾, 尾崎恵一, 武田弘資, 谷村進 Microvesicles 形成メカニズムの解明. 第30回日本薬学会九州支部大会 2013.12.8 長崎

田淵祐輔, 小野真依, 柿本貴子, 谷村進, 武田弘資, 尾崎恵一 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤に対する感受性における p21 の役割. 第30回日本薬学会九州支部大会 2013.12.7 長崎

米山鷹介, 鏑延淳一, 木田友佳子, 福嶋俊明, 関根史織, 浅野知一郎, 千田和広, 武田弘資, 高橋伸一郎 ミトコンドリア局在型フォスファターゼ PGAM5 は、インスリン受容体基質のセリン/スレオニンリン酸化と安定性の調節に機能している ミトコンドリア局在型フォスファターゼ PGAM5 は、インスリン受容体基質のセリン/スレオニンリン酸化と安定性の調節に機能している. 第36回日本分子生物学会年会 2013.12.5 佐賀

武田弘資 ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御. さきがけ研究報告会「炎症の慢性化機構の解明と制御」 2013.11.10 東京

武田弘資 ミトコンドリアのストレス感知機構と細胞応答. 宮崎大学大学院特別セミナー 2013.9.20 宮崎

水上潤哉, 武田弘資, 一條秀憲, 坪井良治 ASK1 は接触過敏における惹起相での IL-17 産生に重要である. 第86回日本生化学会大会 2013.9.13 横浜

金丸雄祐, 関根史織, 武田弘資, 一條秀憲 ゲノムワイド siRNA スクリーニングによるミトコンドリア局在型ホスファターゼ PGAM5 の切断制御因子の網羅的探索. 第86回日本生化学会大会 2013.9.12 横浜

関根史織, 武田弘資, 一條秀憲 ミトコンドリア局在型プロテインホスファターゼ PGAM5 の膜内切断. 第86回日本生化学会大会 2013.9.12 横浜

谷村進, 浜松絢子, 木原康孝, 大山要, 武田弘資, 河野通明 Myosin1E は Caveolin1-Cavin1/3 複合体の安定化を介して細胞運動を促進する. 第86回日本生化学会大会 2013.9.11 横浜

谷村進, 木原康孝, 大山要, 中原康子, 平田弦也, 松丸由美, 武田弘資, 河野通明 Myosin1E-SH3P2 複合体による細胞運動制御の分子機構. 平成 25 年度日本生化学会

九州支部例会 2013.5.18 佐賀

武田弘資 ミトコンドリア機能低下の感知システムとしてのプロテインホスファターゼ PGAM5 の膜内切断. 日本薬学会第133年会 2013.3.28 横浜

武田弘資 ミトコンドリアのストレス受容・応答機構と炎症制御. 創薬シンポジウム: アカデミア創薬と探索医療 2013.3.19 長崎

Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. JST-CREST International Symposium, Frontiers in Immunology and Inflammation: From Molecules to Disease. 2013.2.12 東京

Sadatomi, D. Takeda, K. Role of mitochondrial protein phosphatase PGAM5 in inflammation. 10th International Conference on Protein Phosphatase. 2013.2.8 東京

Takeda, K. Regulation of cellular stress response by mitochondrial protein phosphatase PGAM5. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling. 2013.2.1 東京

武田弘資 ミトコンドリア局在プロテインホスファターゼ PGAM5 によるストレス応答制御. 第85回日本生化学会大会 2012.12.7 福岡

Takeda, K. Role of mitochondrial phosphatase PGAM5 in inflammation. The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012) 2012.10.24 東京

〔図書〕(計2件)

Kamiyama, M., Sato, T., Takeda, K. and Ichijo, H. Roles for the stress-responsive kinases ASK1 and ASK2 in tumorigenesis. *ChembioMolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology*, eds Shibasaki, M., Iino, M. and Osada, H. (Springer Japan) pp145-154 (2012)

武田弘資 がんと炎症. 「がん増殖と悪性化の分子機構」化学同人 pp 191-205 (2012)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/cell/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 弘資 (TAKEDA KOHSUKE)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 10313230